



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 552 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 96 02550
(22) A bejelentés napja: 1995. 03. 03.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/210,627 1994. 03. 18. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 95/02653
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/25741

(51) Int. Cl.⁷

C 07 K 7/23

A 61 K 38/09

(40) A közzététel napja: 1997. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 02. 28.

(72) Feltalálók:

Hoeger, Carl A., San Marcos, Kalifornia (US)
Jiang, Guangcheng, La Jolla, Kalifornia (US)
Porter, John S., Leucadia, Kalifornia (US)
Rivier, Catherine L., La Jolla, Kalifornia (US)
Rivier, Jean E. F., La Jolla, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla,
Kalifornia (US)

(74) Képvisező:

ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Budapesti
Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54)

GnRH-antagonista peptidek

KIVONAT

A találmány tárgyát olyan dekapeptid analógok képezik, amelyek két, jelentősen módosított aminosavat tartalmaznak az 5-ös és 6-os pozícióban, valamint gátolják a gonadotropinok hipofízis által való szekrécióját, és gátolják a szteroidok felszabadulását az ivarszervekben.

A találmány szerinti GnRH-antagonista peptidek, vagy azok nemtoxikus sói képlete az alábbi:

G-β-D-Nal-(A)D-Phe-D-Pal-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-Leu-ILys-Pro-AA₁₀, ahol G jelentése 7, vagy annál kevesebb szénatomot tartalmazó alkanoilcsoport; A jelentése klór-, fluor- vagy brómatom; Q₅ jelentése

For, Ac, Iac, Ura, Atc, Pca, Bt, Cac, pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, 3-amino-1,2,4-triazol, β-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol), Gab-(3-amino-1,2,4-triazol), Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), D-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Ser-(3-amino-1,2,4-triazol); Q₆ jelentése For, Ac, Iac, Ura, Atc, Pca, Bt, Cac, Gab(atz), Ala(atz), D-Ala(atz), Ahx(atz), Ser(atz), pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, β-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol), vagy Gab-(3-amino-1,2,4-triazol) és AA₁₀ D-Ala-NH₂.

A találmány tárgyát olyan új peptidek képezik, amelyek a humán gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) antagonistái, pontosabban olyan GnRH-antagonisták, amelyek jelentősen módosított aminosavcsoportokat tartalmaznak, valamint előnyös fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A találmány részletesebben olyan decapeptidekre vonatkozik, amelyek gátolják az ivarmirigyek funkcióját, valamint a progeszteron és a tesztoszteron szteroidhormonok felszabadulását. Az ilyen decapeptideket tehát ilyen célokra, valamint az ovuláció megakadályozására lehet adagolni.

Az agyalapi mirigy egy nyélen keresztül kapcsolódik az agyalap hipotalamusz néven ismert régiójához. Pontosabban a tüszőéretést serkentő hormont (FSH) és a luteinizáló hormont, amiket néha gonadotropinokként vagy gonadotrop hormonokként említene, az agyalapi mirigy bocsátja ki. Ezeknek a hormonoknak a kombinációja szabályozza az ivarmirigyek működését, hogy tesztoszteron termelődjön a herékben és progeszteron, valamint ösztrogén a petefészkekben, valamint szabályozza a gaméták termelődését és érését.

Egy hormonnak az agyalapi mirigy első lebenye által való kibocsátásához a hormonok egy másik osztályának az előzetes felszabadulására van szükség, amelyeket a hipotalamusz termel. A hipotalamusz által termelt hormonok közül az egyik olyan faktorként működik, amely a gonadotrop hormonok felszabadulását indítja be, főleg az LH-ét, és ezt a hormont a továbbiakban GnRH-nak nevezzük, jóllehet ezt a hormont LH-RH és LRF néven is ismerik. A GnRH-t körülbelül 20 évvel ezelőtt izolálták egy decapeptid formájában, és röviddel azután kiderült, hogy azoknak a GnRH-analógoknak, amelyekben a 6-os helyzetben a Gly helyett egy D-izomer található, azaz például [D-Ala⁶]-GnRH (4,072,668 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés), amelyek a szerkezete az alábbi: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, sokkal erősebben kötődnek a receptorhoz és nagyobb a biológiai hatásuk mint a természetes hormonnak.

A peptidek olyan vegyületek, amelyek két vagy több aminosavat tartalmaznak, amelyekben az egyik aminosav karboxilcsoportja a másik aminosav aminocsoportjához kapcsolódik. A [D-Ala⁶]-GnRH képlete, amint azt az előzőekben bemutattuk, megfelel a peptidek szokványos ábrázolásának, ahol az N-terminálist a bal oldalon ábrázoljuk, a C-terminálist a jobb oldalon ábrázoljuk. Az egyes aminosavcsoportok pozícióját az aminosavcsoportok balról jobbra történő számozásával határozzuk meg. A GnRH esetében a glicin karboxilcsoportjának a hidroxilrészét egy, aminocsoport (NH₂) helyettesíti, azaz a C-terminális amidálva van. A leírásban az egyes aminosavak nevének fenti rövidítése szokványos, és az aminosav triviális nevének alapul, azaz például a pGlu jelentése piroglutaminsav, Glu jelentése glutaminsav, Trp jelentése triptofán, Ser jelentése szerin, Tyr jelentése tirozin, Gly jelentése glicin, Leu jelentése leucin, Arg jelentése arginin, Pro jelentése prolin, Lys lizin, Ala jelentése alanin, Phe jelentése fenilalanin, Asn jelentése aszparagin, Cit jelentése citrullin. A glicin kivételével a találmány szerinti peptidekben szereplő ami-

nosavak L-konfigurációval rendelkeznek, hacsak külön nem jelezzük az eltérést.

Megvannak az okai, hogy miért kell elnyomni a gonadotropin szekrécióját és megakadályozni az ovulációt a nőstény emlőskben, és a GnRH-analógokat, amelyek a GnRH normális működésének antagonistái, használjuk ezekre a célokra. Ebből az okból a GnRH-antagonista GnRH-analógoknak vizsgáljuk a fogamzásgátlóként, a fogamzási periódust szabályozó anyagként, valamint a terméketlenség kezelésére szolgáló anyagként, valamint a krónikus anovulációban szenvedő nőknél az ovuláció kontrollált indukálásában és *in vitro* megtermékenyítésben való alkalmazhatóságát. Jól használhatók emellett a korai pubertás, endometriózis (méhnyálkahártya-gyulladás, beleértve a fájdalommal kísért endometriózist is), acné, a menstruáció kimaradása (azaz például a szekunder menstruáció kimaradása), méhmióma, a petefészek és az emlő cisztás megbetegedései [beleértve a policisztás petefészek-betegséget (PCO) is], valamint az emlő- és nőgyógyászati rákok kezelésére is. A GnRH-antagonisták jól használhatók a premenstruális szindróma (PMS) tüneteinek enyhítésére is. Nőknél használhatók a petefészek-hiperandrogenizmus és rendellenes szőrösödés kezelésére is. Ezekről az antagonistákról az is kiderült, hogy jól használhatók a gonadotropinok szekréciójának szabályozására emlős hímekben, és használhatók a spermatogenezis leállítására, azaz férfi fogamzásgátló szerekként férfi nemi bűnözők kezelésében, valamint a prosztatahipertrofia kezelésében. Még pontosabban, a GnRH-antagonisták használhatók a szteroid-dependens tumorkok, azaz például a prosztata- és emlőtumorkok kezelésére, valamint az ovuláció időzítésének szabályozására az *in vitro* megtermékenyítésnél.

A GnRH-antagonisták használhatók még AIDS-ben szenvedő betegek kezelésére, a timusz megfiatalítására, ha körülbelül 10 µg/kg/nap-tól 1 µg/kg/nap-ig terjedő dózisban adjuk be. A timusz azután T-sejteket termel, az AIDS-vírus által tönkretett T-sejtek pótlására, ezzel kompenzálva a vírus hatásait.

Számos peptidről ismert, hogy hisztamin felszabadulását okozza az árbocsejtekből, amelyek megtalálhatók a bőrben, az ínben, és egyéb helyeken, az egész testben. Ennek az az eredménye, hogy gyulladás jön létre, ami gyakran ödémát okoz az arcon és a test egyéb részein. Korábban azt figyelték meg, hogy bizonyos GnRH-antagonisták, amelyek hatékonyan előzik meg az ovulációt, nemkívánatos mellékhatásokkal rendelkeznek, azaz serkentik a hisztamin felszabadulását, és ezáltal általában használhatatlanná teszik ezeket a GnRH-analógokat az embereknek való beadás céljára. Ennek eredményeként a GnRH-analógok tervezését abba az irányba terelték, hogy olyan polipeptideket kapjanak, amelyek megtartják a biológiai aktivitásukat, de nem okoznak nemkívánatos hisztaminfelszabadulást [Rivier és munkatársai: J. Med. Chem. 29, 1846–1851 (1986)]. Emellett az is fontos, hogy a peptid analóg beadását jól tűrje a szervezet, főleg az injekció formájában való beadást. Előnyös, ha megfelelően hosszú ideig tart a hatása az LH szekrécióra, ami egy olyan tulajdonság, amiről azt gondolják,

hogy fokozza a testben levő proteolitikus enzimek lebontó hatásával szembeni ellenállást; tehát ezeket a tulajdonságokat is figyelembe kell venni az új GnRH-analógok tervezésénél. Emellett, hogy megkönnyítsük ezeknek az anyagoknak emlősöknek, főleg embereknek való beadását, előnyös lehet, ha ezeknek a GnRH deka-peptideknek nagy a vízzoldhatóságuk, különösen bakteriosztatikus vízben, pH=5 és pH=7,4 közötti normális fiziológiás pH-n.

J. Rivier és munkatársai leírták olyan GnRH-antagonisták szintézisét, amelyeknek az előbb említett szempontok alapján számos tulajdonságuk jobb a korábbi vegyületekénél [J. Rivier és munkatársai: J. Med. Chem. 35, 4270–4277 (1992)]. Ezeknek a GnRH-analógoknak a vonzó tulajdonságai ellenére a kutatás tovább folyik még javított GnRH-antagonisták keresése irányában, különösen olyanokat kerestek, amelyek alkalmasak szubkután injekció formájában való beadásra, és amelyeket kevésbé drágán lehet előállítani. Az összes érdekes GnRH-antagonista legalább három D-izomert tartalmaz az aminosav szekvenciájában. Javított GnRH-antagonistákra is szükség van.

Nemrégiben derült ki, hogy az alábbi képletű GnRH-antagonista deka-peptidek, valamint azok közeli analógjai különösen előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek: Ac-β-D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-AA₅-D-AA₆-Leu-Lys (izopropil)-Pro-D-Ala-NH₂, ahol AA₅ és AA₆ jelentése amino-helyettesített fenil-alanin-csoport (vagy annak ekvivalense), amelyben a szubsztituens előnyösen a 4-es pozícióban van, és előnyösen egy amidkötés részét képezi, amely kötés egy előnyösen semleges és/vagy hidrofilsoporthoz kapcsolódik. Még előnyösebb, ha az egység egy öt vagy kevesebb szénatomból álló acilező ágens, vagy amely egy 2–4 nitrogénatomot tartalmazó telítetlen heterociklusos gyűrűt tartalmaz, például egy öttagú triazol gyűrűt. Az 5-ös és 6-os pozíciókban levő csoportoknak lehet azonos szubsztituensük, vagy például az 5-ös pozícióban levő csoport tartalmazhat egy triazol egységet, míg a 6-os pozícióban levő csoport egy amino-helyettesített Phe (vagy annak ekvivalense), és az aminosorozatja acilezve van, acetilcsoporttal vagy hasonló csoporttal. GnRH-agonisták is léteznek a 6-os pozícióban hasonló helyettesítőket tartalmazva.

Ezek az antagonisták különösen hasznos termékenységszabályozók emberekben, mivel magas a biológiai potenciáljuk, és közülük számos hosszú ideig hat. Elhanyagolható mellékhatásuk a hisztaminfelszabadulás serkentése. Jól oldódnak vizes pufferekben fiziológiás pH-értékeken, jól elviselhetők, és nem mutatnak jelentős gélesedést ha szubkután injekcióban alkalmazzák őket. Az 5-ös és/vagy a 6-os pozícióban levő csoport oldalláncában egy amidkötés jelenlétéről, amely kötés a fenilcsoportot hozzákapcsolhatja bizonyos vegyületek heterociklusos gyűrűjéhez, azt gondolják, hogy az felelős ezeknek az előnyös peptideknek a jelentősen jobb tulajdonságaikért, amik megnyilvánulhatnak a jó oldhatóságban és az *in vivo* gélesedésnek való ellenállásban. A jelen találmány szerinti különböző vegyületek szintén különösen hosszú ideig tartó hatással rendelkeznek, csökkentik az LH-szinteket *in*

vivo, még 72 óránál hosszabb ideig is, ha szubkután adjuk be őket. Ennek eredményeképpen ezek a deka-peptidek különösen jól használhatók emlősök, főleg állatok kezelésére termékenységszabályozó anyagokként, valamint patológiás állapotok, azaz serdülési problémák, rendellenes szőrösödés, acne, hormondependens neoplázia, méhmióma, menstruációkimaradás, rendellenes menstruálás, méhnyálkahártya-gyulladás, PMS, a petefészek és az emlő cisztás megbetegedései, azaz a PCO és hormondependens tumorok, beleértve a rosszindulatú és jóindulatú prosztata-, emlő-, petefészek- és heretumorokat is.

Ezek a GnRH-antagonisták oldódnak bakteriosztatikus vízben 5–7,4 pH-tartományban; ennek következtében tömény formában szerelhetők ki és adhatók be, különösen az 5–7-es pH-tartományban. Ezek jól tolerálhatók *in vivo* és különösen alkalmasak szubkután injekcióként beadott gyógyászati készítményekben való alkalmazás céljára. Ezeket az antagonistákat különösen hatékonyak ítélik nőstény emlősök fogamzásgátló kezelésében, valamint szteroid-dependens tumorok kezelésében; emellett ezek közül számos a beadást követően hosszú ideig hatásosan nyomja el az LH-szintet, és különösen kis mellékhatással rendelkezik a hisztaminfelszabadítás szempontjából.

Az 1992. december 8-án megadott 5,169,932 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk, leírják számos GnRH-antagonista szintézisét, amelyekben a kiválasztott csoportok oldalláncait reagáltatják cianoguanidinoegységek létrehozására, és ezek közül néhány spontán átalakul egy kívánt heterociklussá, azaz például 3-amino-1,2,4-triazollá. Az ebben az amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben szereplő cianoguanidino egységek egy természetes vagy szintetikus α-aminosav, azaz például lizin, ornitin vagy amino-helyettesített fenilalanin (Aph), illetve ezeknek egy meghosszabbított verziója, azaz például az aminohelyettesített homofenil-alanin (Ahp) oldalláncában szereplő omega-amino-csoportjára épülnek. Az aminohelyettesítés a fenilgyűrű 4- vagy parapozíciójában jön létre. Az 5. és 6. pozícióban ilyen jelentősen módosított vagy mesterséges aminosavakat tartalmazó GnRH-antagonistákról kiderült, hogy jó biológiai hatékonysággal rendelkeznek; az is kiderült nemrég, hogy ha a deka-peptid 5. vagy 6. pozíciójában az oldalláncokat tovább módosítjuk, akkor ennek eredményeképpen különösen előnyös összetulajdonságokkal rendelkező anyagokat kapunk.

Az elmúlt évtizedben a GnRH-t alkotó szekvencia mind a tíz egységét részletesen tanulmányozták, azzal a céllal, hogy hatékony antagonistákat hozzanak létre, és ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeképpen felfedezték, hogy számos ekvivalens csoport választható, és egy ilyen ekvivalensnek egy másik ekvivalenssel való helyettesítése nem változtatja meg lényegesen a deka-peptid GnRH-antagonista biológiai hatását. Az N-terminális előnyösen N-acilezve van. Kimutatták, hogy az N-terminális 1-es pozíciójában általában megfelel egy olyan N-acetilezett D-izomer, amelynek oldalláncában aromásgyűrű-struktúra található, azaz például a helyet-

tesített D-Phe, a helyettesített vagy helyettesítetlen D-Trp vagy β -D-Nal, és ez a 3 csoport általában egymással helyettesíthető az N-terminálison, anélkül, hogy lényegesen megváltoztatnánk a biológiai hatékonyságát.

Az is széles körben elfogadott tény, hogy ha a 2-es pozícióba egy parahelyettesített vagy egy 2,4-klór-helyettesített vagy egy pentametil-D-Phe csoportot építünk be, akkor ez jelentősen megnöveli a GnRH-antagonista aktivitást, és az, hogy pontosan milyen a gyűrű-szubsztituens, csak viszonylag kis hatást mutat, ha az alábbiak közül választjuk: klór-, fluor-, brómatom, nitro-, metil- és alkoxicsoprot.

Ami a molekula 3-as pozícióját illeti, széles körben elfogadott tény, hogy itt egy aromás oldallánccal rendelkező D-izomer az előnyös. A D-Pal, D-Nal vagy D-Trp (helyettesítetlen vagy 6NO₂ vagy N^mFor helyettesített) azok a csoportok, amelyeket előnyösen lehet alkalmazni anélkül, hogy jelentősen megváltoztatnánk a biológiai antagonisták aktivitást, és ezek közül is a D-Pal-t részesítik előnyben. Jóllehet leírtak a 4-es pozícióban levő szerinnek tolerált ekvivalensei, ezeknek nincs jelentősen megnőtt biológiai aktivitásuk, és a natív csoport általában előnyös ebben a pozícióban.

Az 1987. március 24-én megadott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben azt írják le, hogy a 7-es pozícióban levő Leu-t számos különböző helyettesítővel helyettesíthetjük anélkül, hogy lényegesen megváltoztatnánk a biológiai hatását, és ezeket a potenciális szubsztituenseket ma egymással ekvivalenseknek tekintjük. Azonban a Leu vagy N^αCH₃Leu(NML) csoportot használják a leggyakrabban, és ezek közül az egyik, vagy az Nle vagy a Phe az általánosan elfogadott. A 8-as pozícióban a természetes Arg-csoportot használhatjuk, vagy az alábbi csoportok egyikét: Har, Arg vagy dietil-, N^α- izopropil-lizin- (ILys) és izopropil-ornitin- (IOrn) helyettesített Har, amelyeket ebben a pozícióban ekvivalenseknek tekinthetünk, de általában az ILys-t részesítik előnyben. Jóllehet használhatjuk az amidált Gly csoportot a természetes hormon C-terminálisán, az amidált alfa-karboxil-csoporttal rendelkező D-alanint részesítik előnyben. A többi ekvivalensben vagy AzaGly-NH₂-t használnak, vagy kihagyják a 10-es pozíciót és ehelyett a 9-es pozícióban prolin-etilamidot használnak.

Az előzőekben említettek fényében a jelen találmány tárgyát az alábbi képlettel rendelkező GnRH-antagonisták családja képezi:

GnRH-antagonista peptidek, vagy azok nemtoxikus sói, amelyek képlete az alábbi:

G- β -D-Nal-(A)D-Phe-D-Pal-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-Leu-ILys-Pro-AA₁₀, ahol G jelentése 7, vagy annál kevesebb szénatomot tartalmazó alkanoilcsoport; A jelentése klór-, fluor- vagy brómatom; Q₅ jelentése For, Ac, Iac, Ura, Atc, Pca, Bt, Cac, pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, 3-amino-1,2,4-triazol, β -Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol), Gab-(3-amino-1,2,4-triazol), Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), D-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Ser-(3-amino-1,2,4-triazol) vagy Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol); Q₆ jelentése For, Ac, Iac, Ura, Atc, Pca, Bt, Cac, Gab(atz),

Ala(atz), D-Ala(atz), Ahx(atz), Ser(atz), pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, β -Ala-(3-amino-1,2,4-triazol) Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol) vagy Gab-(3-amino-1,2,4-triazol) és AA₁₀ D-Ala-NH₂ csoport.

A β -D-Nal alatt az alanin D-izomerje értendő, amit a β -szénatomon naftilcsoport helyettesít, azaz lehet például 3-D-Nal. Előnyösen a β -D-2Nal-t alkalmazzák, ahol a naftalinnal való kapcsolódás a gyűrű 2-es pozíciójában történik; azonban a β -D-1Nal is alkalmazható. Az előnyben részesített 1-es pozíciójú csoportok a β -D-Nal, a helyettesített D-Phe és adott esetben a helyettesített D-Trp; a 3,4-dehidroprolint (C₅H₇O₂N) is ekvivalensnek tekintik. A Pal jelentése alanin, amit piridilcsoport helyettesít a β -szénatomon; a 3-as pozícióhoz való kapcsolat előnyösen a piridinggyűrűn van. Aph alatt 4-NH₂Phe-t értünk, vagy NH₂-homofenil-alanint, amit az Aph-val ekvivalensnek tekintenek. A 8-as pozícióban levő csoport ILys, azaz izopropil-leucin.

Az előforduló rövidítéseket, amelyek az 5-ös és 6-os pozícióban található csoportok oldalláncainak módosítására használt egységeket írnak le, az alábbiakban adjuk meg: atz jelentése a 3-amino-1,2,4-triazol, Gab jelentése a gamma-amino-vajsav. Cit jelentése a citrullin, Iac jelentése az imidazol-ecetsav, Ura jelentése az urakonsav, Atc jelentése a 3-amino-1,2,4-amino-triazol-karbonsav, Pca jelentése a 2-pirazin-karbonsav. Ahx jelentése a 6-amino-hexánsav megfelelő gyöke. Ha arról beszélünk, hogy egy aminocsoport blokkolva van, akkor ez azt jelenti, hogy úgy van módosítva, hogy már nem primer aminosav, amidocsoporttá van acilezve. Bt jelentése butirilcsoport, Cac klór-acetil-csoport.

A GnRH-antagonisták egy előnyös alcsaládjának a képlete az alábbi:

Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-Leu-ILys-Pro-AA₁₀, ahol Q₅, Q₆ és AA₁₀ jelentése a fenti.

A GnRH-antagonistáknak egy további előnyben részesített alcsaládja az alábbi képlettel írható le:

Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂.

A GnRH-antagonisták egy további előnyben részesített alcsaládjának a képlete az alábbi:

Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-ILys-Pro-AA₁₀.

A találmány szerinti peptidek sói is a találmány körébe tartoznak. A sók a molekula karboxil vagy szabad bázikus csoportjaival, például aminocsoportokkal egyaránt képződhetnek. Szakember számára az ilyen sók előállítása kézenfekvő; azok az izolálás során, vagy megfelelő savakkal vagy bázisokkal reagáltatva egyaránt előállíthatók.

A jelen találmány szerinti peptideket szintetizálhatjuk klasszikus, oldatban végzett szintézissel, de előnyösen szilárd fázisú technikával szintetizáljuk. Egy klór-metilezett gyantát vagy egy hidroximetilezett gyantát használhatunk; azonban előnyösen egy metil-benzhidril-amin (MBH) gyantát, egy benzhidril-amin (BHA) gyantát, vagy egyéb olyan, a szakterületen ismert, alkalmas gyantát használunk, amely közvetlenül szolgál

tatja a C-terminális amidot vagy helyettesített amidot a hasítás után. Például a C-terminálisukon helyettesített amidot tartalmazó peptidket előnyösen N-alkil-aminometil gyantán szintetizáljuk (1986. február 11-én megadott, 4,569,967 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A szilárd fázisú szintézist oly módon végezzük, hogy lépésenként adjuk az aminosavakat a láncba (lásd a 4,211,693 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentést). Az oldallánc-védőcsoportokat, amint az a szakterületen jártas szakember számára jól ismert, előnyösen bármelyik olyan aminosav részeként vihetjük be, amelynek egy különösen reakcióképes oldallánca van, és adott esetben egy olyan aminosavval, például triptofánnal, amely aminosavakat hozzá kell kapcsolni a gyantán szintetizált láncához. Az ilyen szintézissel teljesen védett intermediert peptidgyantát lehet kapni.

A jelen találmány szerinti kémiai intermediereket az alábbi képlettel lehet leírni: $X^1\text{-}\beta\text{-D-Nal}(X^2)\text{-(A)}(D)\text{-Phe-D-Pal-Ser}(X^3)\text{-Aph}(Q_5)\text{-D-Aph}(Q_6)\text{-Leu-ILys-Pro-X}^7$, ahol X^1 jelentése egy α -amino védőcsoport, amely a polipeptidok lépésenkénti szintézisének szakterületén egy jól ismert típus. Ha a kívánt peptidben G egy adott acilcsoport, akkor az ilyen csoportot használhatjuk védőcsoportként. Az X^1 jelzéssel ellátott α -amino védőcsoportok között vannak (1) acil típusú védőcsoportok, azaz például a formil- (For), trifluoracetil-, ftalil-, p-toluolszulfonil- (Tos), benzoil- (Bz), benzolszulfonil-, ditiaszucinoil- (Dts), o-nitro-fenil-szulfenil- (NPS), tritilszulfenil-, o-nitro-fenoxi-acetil-, akrilil- (Acr), klór-acetil-, acetil- (Ac) és gamma-klórbutiril csoportok; (2) aromás uretán típusú védőcsoportok, azaz például a benzil-oxi-karbonil (Z), fluorenil-metiloxi-karbonil (Fmoc) és helyettesített benzil-oxi-karbonil, azaz például a p-klór-benzil-oxi-karbonil- (ClZ), p-nitro-benzil-oxi-karbonil-, p-bróm-benzil-oxi-karbonil- és p-metoxi-benzil-oxi-karbonil csoport; (3) alifás uretán típusú védőcsoportok, azaz például terc-butil-oxi-karbonil- (Boc), diizopropil-metoxi-karbonil-, izopropil-oxi-karbonil-, etoxi-karbonil- és allil-oxi-karbonil-csoport; (4) cikloalkil uretán típusú védőcsoportok, azaz például ciklopentil-oxi-karbonil-, adamantil-oxi-karbonil- és ciklohexil-oxi-karbonil-csoportok; (5) tiouretán típusú védőcsoportok, azaz például a fenil-tiokarbonil; (6) alkil típusú védőcsoportok, azaz például allil- (aly), trifenil-metil- (tritol-) és benzil- (Bzl) csoportok; (7) trialkil-szilán csoportok, azaz például trimetilszilán. Az előnyben részesített α -amino védőcsoport a Boc.

X^3 jelentése hidrogénatom vagy a Ser hidroxil oldallancának egy védőcsoportja, azaz például Ac, Bz, tritol, DCB vagy benziléter (Bzl), előnyösen Bzl.

X^7 jelentése D-Ala-NH-[gyantahordozó] vagy a D-Ala amidétere.

Az X^3 csoport egy bizonyos oldallánc védőcsoportjai kiválasztásának kritériuma az, hogy a védőcsoportnak stabilnak kell lennie a reagenssel szemben azok között a reakciókörülmények között, amelyeket az α -amino védőcsoport (előnyösen Boc) eltávolítására választottunk, a szintézis egyes lépéseiben. Ezeknek a védőcsoportoknak általában nem szabad lehasadniuk a

kapcsolási körülmények között, de eltávolíthatóknak kell lenniük a kívánt aminosavszekvencia szintéziséhez követően, olyan reakciókörülmények között, amelyek nem változtatják meg a peptidláncot. Azokat a védőcsoportokat, amelyeket először az 5-ös és 6-os pozícióban levő csoportokhoz használtunk, a gyantáról való lehasítás előtt eltávolítottuk, amint azt a későbbiekben ismertetjük.

Ha az X^7 csoport D-Ala-NH-[gyantahordozó], akkor egy amidkötés kapcsolja a D-Ala-t egy BHA gyantához vagy egy MBHA gyantához.

Ha G jelentése például acetilcsoport, akkor lehetséges, hogy a β -D-NAL α -aminocsoportja X^1 védőcsoportjaként alkalmazzuk, azelőtt, mielőtt ezt az utolsó aminosavat hozzáadjuk a peptidláncához. Azonban egy reakciót előnyösen úgy végzünk el, hogy a peptid a gyantán van (az α -aminocsoport deblokkolása után, miközben az oldallánc csoportok védve maradnak), például ecetsavval, vagy előnyösen ecetsav-anhidriddal reagáltatva diizopropil- vagy diklohexil-karbodiimid (DIC vagy DCC) jelenlétében, vagy bármely egyéb megfelelő reakcióval, amely a szakterületen jártas szakember számára ismert.

A találmány szerinti peptidket úgy állítjuk elő, létrehozunk egy intermediert peptidet, amelynek képlete az alábbi:

$X^1\text{-}\beta\text{-D-Nal}(X^2)\text{-(A)}(D)\text{-Phe-D-Pal-Ser}(X^3)\text{-Aph}(Q_5)\text{-D-Aph}(Q_6)\text{-Leu-ILys-Pro-X}^7$, eltávolítjuk a védőcsoportokat az 5. vagy 6. aminosavról, hogy védőcsoport-mentessük az említett intermediert peptid ezen aminosav-csoportjainak egy oldallánc primer aminocsoportját; (c) reagáltatjuk az említett védőcsoport-mentesített oldallánc primer aminocsoportokat, hogy mindegyik említett csoportot beépítsük egy olyanba, amelyik a kívánt módosított oldallánccal rendelkezik; és (d) mindegyik megmaradt védőcsoportot lehasítjuk, és/vagy lehasítunk minden X^7 -ben levő gyantahordozót.

A peptid tisztítását ioncserélő kromatográfiával végezzük egy MMC oszlopon, ezt követi egy megoszlási kromatográfia, az alábbi elúciós rendszert használva: n-butanol; 0,1 mol/l ecetsav (1:1 térfogatarány) egy Sephadex G-25 töltetű tartalmazó oszlopon, vagy egy HPLC, amint az a szakterületen jártas szakember számára ismert és publikált [J. Rivier és munkatársai: J. Chromatography 288, 303-328 (1984)].

A találmány szerinti antagonisták 100 μ g/test-tömegkilogramm szintnél alacsonyabb szinten is hatékonyak, ha a proestrus napján körülbelül délben szubkután beadjuk, nőtény patkányok ovulációjának megelőzésére. Az ovuláció meghosszabbított elnyomására szükséges lehet hogy 0,1-2,5 mg/testtömegkilogramm tartományba eső dózisszinteket alkalmazzunk. Ezek az analógok különösen jól oldódnak fiziológias pH-kon, és viszonylag tömény oldatokban állíthatók elő a beadáshoz, főleg szubkután injekciózáshoz. Ezeket a peptidket a test jól tolerálja, és nem mutatnak gélesedési tendenciát, valamint az injekciózás helyén maradnak, ha szubkután adjuk be őket. Az antagonisták hatékonyan állítják le a spermatogenezist is, ha hím emlősöknek adjuk be szabályos időközökben, és így fogamzásgátló szerekként

használhatók. Mivel ezek a vegyületek csökkentik a tesztoszteronszintet (ez egy előnytelen, nem kívánt következmény normális, szexuálisan aktív hímeknél), ezért szükség lehet tesztoszteron kiegészítő dózisainak beadására a GnRH-antagonisták beadásával egy időben. Ezek az antagonisták használhatók arra is, hogy szabályozzák a gonadotropinok és szexszteroidok termelődését egyéb célokra is, amint azt az alábbiakban ismertetjük.

Az alábbi képletekben az 5-ös és 6-os pozíciókban levő csoportokat az eredeti aminosavcsoport szerint határozzuk meg, mint amelynek van egy oldalláncban levő aminocsoportja, plusz a kérdéses módosítás, amit a kísérő zárójeles rész tartalmaz. Az eredeti csoport a fő peptidláncba épül be, például az Aph vagy az Ahp, vagy az annak megfelelő D-izomer, és úgy módosítjuk, hogy a kívánt AA₅ vagy AA₆ csoport jöjjön létre, miközben a peptidlánc egy része még a gyantához kötődik. Azonban egy megfelelően védett, jelentősen módosított aminosav egy másik módszer szerint hozzáadható a növekvő peptidlánchoz, a szokásos lánchosszabbítási folyamat részeként, ha szükséges.

Az alábbi példákban számos GnRH-antagonista peptidet mutatunk be, amelyek számos, a találmány olalmi körébe tartozó tulajdonsággal rendelkeznek. Az összes ilyen peptid tartalmaz legalább egy D-izomer aminosavat. Az aminosavak módosításait az 5-ös és 6-os pozíciókban előnyösen a peptidgyantához való kapcsolásuk után hajtjuk végre (az alábbiakban ismertetett módon).

1. példa

Az 1-es számú, [Ac-β-D-2NAL¹, (4Cl)D-Phe², D-3PAL³, Aph(Gly)(atz)⁵, D-Aph(Gly)(atz)⁶, ILys⁸, D-Ala¹⁰]-GnRH peptidet szilárd fázisú szintézissel állítjuk elő. A peptid képlete az alábbi:

[Ac-β-D-NAL-(4Cl)D-Phe-3PAL-Ser-Aph(Gly)(3-amino-1,2,4-triazol)-D-Aph(Gly)(3-amino-1,2,4-triazol)-Leu-Lys(izopropil)-Pro-D-Ala-NH₂].

Körülbelül 3 g (0,76 mmol/lg) MBHA gyantát használunk, és a Boc-védett D-Ala-t körülbelül 2 óra alatt kapcsoljuk a gyantához DMF/CH₂Cl₂-ben, körülbelül 5 mmol Boc-származékot és dicikloheximidet használva aktiváló reagensként. A D-Ala csoport egy amidkötéssel kapcsolódik az MBHA maradékhoz.

Az egyes aminosavcsoportok kapcsolását, mosását, védőcsoport-mentesítését és a következő aminosav kapcsolását az alábbi séma szerint végezzük egy automatizált berendezésben, 1,5 g gyantával indulva:

Lépés	Reagensek és műveletek	Keverési idő (perc)
1.	CH ₂ Cl ₂ mosás – 80 ml (kétszer)	3
2.	Metanolos (MeOH) mosás – 30 ml (kétszer)	3
3.	CH ₂ Cl ₂ mosás – 80 ml (háromszor)	3

Lépés	Reagensek és műveletek	Keverési idő (perc)
4.	50% TFA plusz 5% 1,2 etánditiol CH ₂ Cl ₂ -ben 70 ml (kétszer)	10
5.	Izopropil alkohol + 1% etánditiolos mosás 80 ml (kétszer)	3
6.	TEA 12,5% CH ₂ Cl ₂ -ben (70 ml)	5
7.	MeOH mosás – 40 ml (kétszer)	2
8.	TEA 12,5% CH ₂ Cl ₂ -ben – 70 ml (kétszer)	2
9.	CH ₂ Cl ₂ mosás – 80 ml (háromszor)	3
10.	Boc-aminosav (5 mmol) 30 ml, vagy dimetilformamid (DMF):CH ₂ Cl ₂ vagy N-metilpirrolidinon (DMP):DCM elegyben, az adott védett aminosav oldhatóságától függően, plusz DIC vagy DCC (5 mmol) CH ₂ Cl ₂ -ben	30–300
11.	MeOH mosás – 40 ml (kétszer)	3
12.	Trietilamin (TEA) 12,5% CH ₂ Cl ₂ -ben – 70 ml (kétszer)	3
13.	MeOH mosás – 40 ml (kétszer)	3
14.	DCM-es mosás – 80 ml (kétszer)	3

A fenti sémát alkalmazzuk a találmány szerinti peptid egyes aminosavainak a kapcsolására, miután az első aminosavat a gyantához kapcsoltuk. N^oBoc védelmet alkalmazunk a szintézis során minden egyes további aminosavhoz. Az N^oBoc-β-D-2NAL-t a szakterületen jártas szakember számára ismert módon állítjuk elő [4,235,571 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, megadva 1980. november 18-án], emellett kereskedelmi forgalomban is van (Synthetech, Oregon, USA). Az 5-ös pozícióban levő Aph és a 6-os pozícióban levő D-Aph oldalláncának primer aminocsoportjait Fmoc-cal védjük meg. Bzl (benziléter) használható oldallánc-védőcsoportként a Ser hidroxilcsoportjához, vagy a Ser-t kapcsolhatjuk oldallánc-védelem nélkül is. A 8-as pozícióban levő csoportként Boc-Lys(Ipr,Z)-t használunk. Az N-terminálison levő α-aminocsoport trifluorecetsavval (TFA) való védőcsoportmentesítése után az acetilezést diklór-metánban nagy főlegben alkalmazott ecetsavanhidriddel érjük el.

A peptid összeállítását és az N-terminális acetilezését követően körülbelül 9 gramm, alábbi képletű in-

termedier anyagunk van: Ac- β -2NAL-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser(Bzl)-Aph(Fmoc)-D-Aph(Fmoc)-Leu-Lys(Ipr,Z)-Pro-D-Ala-NH-(MBHA gyantahordozó). Az 5-ös és 6-os pozíciókban levő aminosavcsoportok oldalláncait ezután egyszerre módosítjuk, egyszerre végezve el az alábbi reakciókat, az Aph csoportok oldalláncainak védőcsoport-mentesítése után. Az Fmoc védőcsoportot mindkét csoportról eltávolítjuk, körülbelül 400 mg peptidgyantát 20 százalékos piperidinnel kezelve 10 ml DMF-ben körülbelül 30 percig; előnyösen DMF-fel mossuk, majd még több piperidin/dimetil-formamiddal mossuk újabb 30 percig. A peptidgyantát előnyösen dimetil-formamiddal mosva az újonnan felszabadított aminosocsoportokat 2,5 ekvivalens Boc-Gly-vel kezeljük 5 ml dimetil-formamidban, valamint 2,5 ekvivalens diizopropil-karbodiimiddal (DIC), éjszakán át keverve. A Gly Boc védőcsoportját 50% TFA 10 ml DCM-ben készült oldatával 30 percig kezelve távolítjuk el. 5 ml dimetil-formamidban oldott 2,5 ekvivalens difenil-ciano-karbonimidátot (PCI) reagáltatunk a peptidgyantával, éj szakán át szobahőmérsékleten keverve. Ezután a peptidgyantát standard mosásnak vetjük alá, majd hidrazinnal keverjük (3 ml, 3 ml dimetil-formamidban) éjszakán át szobahőmérsékleten, hogy teljesen lejátszódjon a Gly csoportok α -amino csoportján a cianoguanidin egység kialakulása. Ezt a lépést előnyösen megismételjük. A keletkező cianoguanidin egységek spontán átalakulnak a megfelelő heterociklussá, azaz 3-amino-1,2,4-triazollá. A peptidgyantát azután standard mosásnak vetjük alá.

A peptidgyantát megszáritjuk, majd a peptidnek a gyantáról való lehasítását, a Ser és Lys oldalláncok védőcsoport-mentesítését 0 °C-on hajtjuk végre, 40 perces HF kezeléssel. A HF kezelés előtt megkötő anyagként anizolt adunk a rendszerhez. A HF csökkentett nyomáson való eltávolítása után a gyantát kétszer mossuk 100-100 ml etiléterrel. A lehasított peptidet azonos mennyiségű CH₃CN és víz elegyével extraháljuk a gyantáról, az eljárást többször megismételve, az egyes kezeléseket során 100-100 ml-t alkalmazva. Az extraktumokat egyesítjük, majd liofilezzük, így kapunk 181 mg nyers peptidport.

A peptid tisztítását azután preparatív nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) végezzük, a szakterületen jártas szakember számára ismert módon, illetve a szakirodalomban publikált módon [J. Rivier és munkatársai: J. Chromatography 288, 303–328 (1984)]. Az első preparatív RP-HPLC elválasztásban TEAP (triethylammónium-foszfát) pufferrendszert használunk. Ezt az elválasztást megismételjük, ugyanezt a pufferrendszert, de egy kicsit eltérő gradienst alkalmazva, majd a végső elválasztást egy 0,1% TFA (trifluor-ecetsav) gradienssel végezzük a J. Rivier és munkatársai által közölt cikkben leírtaknak megfelelően [J. Rivier és munkatársai: J. Chromatography 288, 303–328 (1984)]. A dekapeptidből körülbelül 92 mg-ot kapunk.

A peptidet homogénnek találjuk kapilláris zóna elektroforézissel (CZE), valamint fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával, vizes triethylammónium-foszfát puffert plusz acetonitrilt használ-

va. A tisztaságot körülbelül 97–98 százalékosnak becsüljük. A kapott, tisztított peptid aminosav elemzése azt mutatja, hogy megfelel a várt képletnek, a láncban szereplő minden egyes aminosavra lényegében egész-szám értékeket adva; a tömegspektrométeres elemzés is megegyezik ezzel az eredménnyel. Az optikai forgatóképességet fotoelektromos polariméterrel mérve $[\alpha]_D^{20} = -34^{\circ} \pm 1,0$ értéket kapunk ($c=1$, 50% ecetsav).

A peptidet *in vivo* vizsgáljuk, hogy meghatározzuk nőstény patkányok ovulációjának megelőzésében mérhető hatékonyságát. Ebben a vizsgálatban meghatározott számú nőstény Sprague–Dawley patkányt (azaz például 5–10 darabot), mindegyik testtömege 225–250 gramm között van, a peptid bakteriosztatikus vízben készült, meghatározott mikrogramm dóziséval injektiozzuk a proestrus napján délben. A proestrus az ovuláció délutánja. Egy másik nőstény patkánycsoportot használunk kontrollként, amelyiknek nem adunk peptidet. Mindegyik kontroll nőstény patkány a proestrus estéjén ovulál; a kezelt, ovuláló állatok számát feljegyezzük. A peptid *in vivo* vizsgálata azt mutatja, hogy 0,5 mikrogramm dózisban 4 kezelt patkányból 3 ovulál, 1 mikrogramm dózis esetében 8 patkányból csak 5 ovulál. A patkányok vizsgálata azt mutatja, hogy a peptidet az állatok nagyon jól tűrték, nem volt megfigyelhető jelentős gélesedés az injekciózás helyén.

Az *in vitro* vizsgálatokat disszociált patkány hipofízis sejtekkel végezzük, amelyeket a vizsgálat előtt 4 napig tenyésztetben tartunk. A peptidek alkalmazására adott válaszként kialakult LH szintet patkány LH-ra specifikus radioimmunszéssel vizsgáljuk. A kontrollsejtek csak 3 nmol GnRH-t kapnak, míg a kísérleti sejtek 3 nmol GnRH-t plusz 0,1–10 nmol-t kapnak a jelenleg standardnak használt antagonistából (összehasonlítás céljából), azaz az [Ac-dehidro Pro¹, (4F)D-Phe², D-Trp^{3,6}]-GnRH-ból vagy a vizsgált peptidből. A csak GnRH-val kezelt mintákban szekretált LH mennyiségét a peptiddel plusz GnRH-val kezelt mintákban szekretált LH mennyiségéhez hasonlítjuk. A peptid hatékonyabb mint a jelenleg standardnak tekintett [Ac- Δ^3 Pro¹, D-4Fphe², D-Trp^{3,6}]-GnRH.

A peptidet különösen hasznosnak tekintjük, mivel jól oldódik vizes pufferekben 5-ös és 7-es pH-érték között, valamint azért, mert *in vivo* ellenáll a gélesedésnek, ami különösen alkalmassá teszi szubkután injekció formájában való beadásra, más, összemérhető biológiai hatékonysággal rendelkező vegyületekkel összehasonlítva. Emellett meglehetősen hosszú biológiai potenciállal rendelkezik, az LH koncentrációkat olyan szintekre csökkentve, amelyek több mint 48 óra hosszat alacsonyabbak a kiindulási szint 20%-ánál.

2. példa

Az alábbi, az A táblázatban ismertetett peptidek képlete az alábbi: Ac- β -D-Nal-(4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-AA₅-AA₆-Leu-Ileu-Pro-D-Ala-NH₂. A peptideket általában az 1. példában ismertetett módon állítjuk elő, szilárd fázisú eljárással, a megfelelő aminosavakat behelyettesítve.

A) táblázat

Sorszám	AA ₅	AA ₆
2.	Aph(β -Ala)(atz)	D-Aph(β -Ala)(atz)
3.	Aph(Gab)(atz)	D-Aph(Gab)(atz)
4.	Aph(Ala)(atz)	D-Aph(Ala)(atz)
5.	Aph(D-Ala)(atz)	D-Aph(D-Ala)(atz)
6.	Aph(Ahx)(atz)	D-Aph(Ahx)(atz)
10.	Aph(Ser)(atz)	D-Aph(Ser)(atz)

Az atz jelentése 3-amino-1,2,4-triazol.

Az A) táblázatban felsorolt peptideket hatékonyak tekintjük a GnRH által indukált LH szekréció gátlásában, ésszerű koncentrációban. Mindegyik peptidet hatékonyak tekintjük nőstény emlősök ovulációjának gátlásában, alacsony dózisokban. A hatékonyság időtartamának vizsgálata azt mutatja, hogy a 2. és 3. számú peptid nagyon hosszú ideig hatékony biológiailag, az LH szekréciót az eredeti koncentrációnak kevesebb mint 20%-ára csökkenti a perifériás szérumban, több mint 72 órára.

3. példa

A B) táblázatban bemutatott, és az alábbi képlettel rendelkező vegyületeket: Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-AA₅-AA₆-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂ az 1. példában általánosan ismertetett szilárd fázisú eljárással állítjuk elő, a szakterületen jártas szakember számára ismert megfelelő gyanta alkalmazásával.

B) táblázat

Sorszám	AA ₅	AA ₆
15.	Aph(pGlu)	D-Aph(pGlu)
16.	Aph(Ser)	D-Aph(Ser)
17.	Aph(Ac-Ser)	D-Aph(Ac-Ser)
18.	Aph(D-Ser)	D-Aph(D-Ser)
20.	Aph(Ac-D-His)	D-Aph(Ac-D-His)
21.	Aph(Ac-D-Asn)	D-Aph(Ac-D-Asn)
22.	Aph(Ac-D-Cit)	D-Aph(Ac-D-Cit)
23.	Aph(Ac-Gly)	D-Aph(Ac-Gly)

A 20. számú peptidet például úgy állítjuk elő, hogy az 1. példában ismertetett módon előállítjuk az intermedierjét, majd az Aph oldalláncait védőcsoport-mentesítjük, eltávolítva az Fmoc csoportokat, ismét 20%-os dimetil-formamid oldatot használva. Mosás után az oldalláncokon levő aminoszoportokat reagáltatjuk oly módon, hogy körülbelül 2 mmol Boc-D-His(Tos)-szal reagáltatjuk egy DCM:DMF oldószerkeverékben, egy megfelelő kapcsoló ágenssel, azaz például DIC-vel. 2 óra hosszat hagyjuk állni szobahőmérsékleten, ezalatt a kapcsolásnak teljesen le kell játszódnia. A Boc csoportot azután TFA-val eltávolítjuk, és a D-His α -aminocsoportjának az acetilezését nagy fölöslegben levő ecetsavanhidriddel végezzük, DCM:DMF elegyben, körül-

belül 15 percig. Mosás után a peptidet lehasítjuk a gyantáról és az előzőekben ismertetett módon tisztítjuk.

A B) táblázatban listázott peptideket tekintjük hatékonyak a GnRH által indukált LH szekréció blokkolásában, *in vitro* körülmények között, ésszerű koncentrációban. Mindegyik peptidet hatékonyak tekintjük nőstény emlősök ovulációjának gátlásában, alacsony dózisban.

4. példa

A C) táblázatban bemutatott, és az alábbi képlettel rendelkező vegyületeket: Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-AA₅-AA₆-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂ az 1. példában általánosan ismertetett szilárd fázisú eljárással állítjuk elő, a szakterületen jártas szakember számára ismert megfelelő gyanta alkalmazásával.

C) táblázat

Sorszám	AA ₅	AA ₆
28.	Aph(Iac)	D-Aph(Iac)
29.	Aph(Ura)	D-Aph(Ura)
31.	Aph(Atc)	D-Aph(Atc)
33.	Aph(Pca)	D-Aph(Pca)
34.	Aph(Ac)	D-Aph(Ac)
35.	Aph(For)	D-Aph(For)
37.	Aph(Bt)	D-Aph(Bt)
38.	Aph(Cac)	D-Aph(Cac)

A decapeptidgyanta intermediert az alábbiakban ismertetett módon állítjuk elő, és az Fmoc védőcsoportokat eltávolítjuk az 5-ös és 6-os pozícióból. A 32. számú peptid szintéziséhez például a védőcsoport-mentesített peptidgyantát Pca-val kezeljük, amit előzetesen aktiváltunk, pentafluorofenilészterének előállításával. Pontosan 248 mg (2 mmol) 2-pirazin-karbonsavat oldunk 40 ml dimetil-formamidban, amihez 368 mg pentafluorofenilt (2 mmol) és 252 mg DIC-t (2 mmol) adunk. Az elegyet szobahőmérsékleten 30 percig keverjük, majd hozzáadjuk a védőcsoport-mentesített gyantához, és a végső elegyet szobahőmérsékleten keverjük körülbelül 12 óra hosszat, hogy a kapcsolás teljes mértékben lejátsszódjon. Mosás után a peptidgyantát megszáritjuk, majd a peptidet lehasítjuk, körülbelül 1,5 óra hosszat 0 °C-on HF-dal kezelve, megkötésre anizolt használva. A HF-et csökkentett nyomáson eltávolítjuk, majd a gyantát etiléterrel mossuk, és 25% acetonitril és 75% víz elegyével mossuk. A tisztítást az alábbiakban ismertetett módon végezzük.

A C) táblázatban listázott peptideket tekintjük hatékonyak a GnRH által indukált LH szekréció blokkolásában, *in vitro* körülmények között, ésszerű koncentrációban. Mindegyik peptidet hatékonyak tekintjük nőstény emlősök ovulációjának gátlásában, alacsony dózisban. A 34. és 35. számú peptid nagyon hosszú ideig megtartja a biológiai aktivitását, az LH szekréció szintjét a perifériás szérumban levő koncentrációnak kevesebb mint 20%-ára csökkenti több mint 72 órára.

5. példa

Az alábbi képlettel rendelkező 40. számú vegyületet: Ac-β-D-2Nal (4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-Aph(atz)-D-Aph(Ac)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂ az 1. példában általánosan ismertett szilárd fázisú eljárással állítjuk elő, de a lánchosszabbítást megszakítjuk a 6-os pozícióban levő csoport hozzáadása után, oldalláncának acilezése miatt.

A peptidet úgy szintetizáljuk, hogy az első 5 csoportnak az MBHA gyantához való hozzáadása után leállítjuk a lánchosszabbítást és eltávolítjuk az Fmoc védőcsoportot a D-Aph-ról, piperidin dimetil-formamidos oldatát használva, az előzőekben ismertetett módon. Az oldallánc aminocsoport acetilezését azután főlegesen levő ecetsavanhidriddel végezzük dimetil-formamidban. A mosást követően a Boc védőcsoportot TFA-val eltávolítjuk, és a lánchosszabbító szintézist ugyanúgy folytatjuk mint korábban. A decapeptid teljes előállítás után az N-terminálison levő védőcsoportot eltávolítjuk, majd acetilezést végzünk, majd az 5-ös pozícióban levő oldallánc triazol egységének kialakítását az 1. példában leírtak alapján végezzük, arányosan kisebb mennyiséget használva a reagensekből, mivel a lánchban csak egy csoportnak az oldallánc lép reakcióba. Egy másik módszer szerint a triazol csoport készítését bármikor elvégezhetjük, az Aph(Fmoc) csoportnak a növekvő peptidlánchoz való hozzáadása után. A hasítást és a tisztítást szintén az előzőekben ismertetett módon, az 1. példában leírtak alapján végezzük.

A fenti peptidet tekintjük hatékonynak a GnRH által indukált LH szekréció blokkolásában, *in vitro* körülmények között, ésszerű koncentrációban. Mindegyik peptidet hatékonynak tekintjük nőstény emlősök ovulációjának gátlásában, alacsony dózisban. A 40. számú peptid nagyon hosszú ideig megtartja a biológiai aktivitását, az LH szekréció szintjét a perifériás szérumban levő koncentrációnak kevesebb mint 20%-ára csökkenti több mint 72 órára.

Az ezek közül az antagonisták közül kiválasztott anyagok *in vitro* vizsgálatát az alábbi, X) táblázatban mutatjuk be, a dózisokat mikrogrammban értve:

X) táblázat

A peptid sorszáma	Dózis	Ovuláló patkányok	Dózis	Ovuláló patkányok
1.	1,0	5/8	0,5	3/4
2.	1,0	9/18	2,5	0/3
3.	1,0	1/8	0,5	4/6
4.	1,0	1/8		
5.	1,0	2/8		
6.	1,0	0/2		
10.	1,0	8/12		
15.	2,5	4/8		
17.	1,0	4/7	2,5	1/9
18.	2,5	2/5		
20.	2,5	0/2	1,0	4/15

A peptid sorszáma	Dózis	Ovuláló patkányok	Dózis	Ovuláló patkányok
21.	1,0	4/6	2,5	2/8
22.	2,5	4/8	1,0	6/7
23.	1,0	5/8	0,5	3/4
28.	1,0	3/8		
29.	1,0	4/8		
31.	1,0	11/15		
33.	1,0	4/8		
34.	1,0	5/15	0,5	6/7
35.	2,5	0/8	1,0	3/9
37.	2,5	0/8		
38.	2,5	4/8		
40.	1,0	2/7	2,5	0/8

Ezeknek a peptideknek a tisztítását követően közülük számosat tovább jellemeztünk, nagynyomású folyadékkromatográfiával, C₁₈ szilikagélen (Vydac 0,46×25 cm), 1,7 ml/min áramlási sebességet, valamint 35–85%-os gradienst alkalmazva a B pufferből, 50 perc alatt, és a maradék az A puffer. Az A puffer egy 0,3% trietil-amint (térfogat/térfogat) és 0,1% foszorsavat tartalmazó vizes oldat, pH-ja 7,0; a B puffer összetétele 60 térfogatszázalék acetonitril és 40 térfogatszázalék A puffer. Az alábbi, Y) táblázatban azt mutatjuk be, amikor a specifikus peptidek eluálódnak a C₁₈ szilikagélről (részecskemérete körülbelül 5 μm, pórusmérete 300 Å), ha az említett gradienssel eluáljuk 50 percig.

Y) táblázat

A peptid sorszáma	Elúciós idő	Optikai forgatóképesség [α _D]*
1.	13,9	–34°
2.	14,3	–31°
3.	14,7	–33°
4.	15,2	–41°
5.	15,2	–30°
6.	16,5	–30,4°
10.	13,0	–36°
15.		–46°
16.	16,1	–29°
17.	15,5	–48°
18.	16,1	–33°
20.	15,8	–31°
21.	14,6	–25°

Y) táblázat (folytatás)

A peptid sorszáma	Elúciós idő	Optikai forgatóképesség [α_D]*
22.	14,3	-24°
23.	16,6	-39°
28.	17,0	-32°
29.	18,2	-26°
31.	15,5	-32°
33.	23,5	-31°
34.	19,9	-38°
35.	18,5	-38°
37.	24,6	-38°
38.	24,5	-38°
40.	17,9	-26°

* jelentése: c=1,50%-os ecetsavban, víz és trifluor-ecetsav jelenlétére korrigálva.

A találmány szerinti peptideket gyakran gyógyászatilag elfogadható, nemtoxikus sók, azaz például savaddíciós sók vagy fémkomplexek, azaz például cink, bárium, kalcium, magnézium, alumínium vagy hasonló komplexek formájában (amelyeket a jelen találmány szempontjából addíciós sóknak tekintünk) adjuk be, vagy a kettő kombinációjában. Az ilyen savaddíciós sók lehetnek például hidroklorid, hidrobromid, szulfát, foszfát, nitrát, oxalát, fumarát, glükonát, tannát, maleát, acetát, citrát, benzoát, szukcinát, alginát, maleát, aszkorbát, tartarát és hasonló sók. A peptid vizes oldatát például ismételtelen 1 mol/l ecetsavval kezelhetjük, így kapjuk az ecetsavas sóját. Ha a hatóanyagot tablettá formájában kell beadni, akkor a tablettá tartalmazhat egy gyógyászatilag elfogadható hígítóanyagot, ami lehet kötőanyag, azaz például akácmézga, kukoricakeményítő vagy zselatin; egy dezintegrálást elősegítő anyag, azaz például alginát, és egy csúsztató anyag, azaz például magnézium-sztearát. Ha a gyógyászatilag elfogadható hígítószereként használhatunk édesítő és/vagy ízesítő anyagokat is, az intravénás beadást végezhetjük izotóniás sóoldatban, foszfátpuffer oldatokban vagy hasonlóknak.

A gyógyászati készítmények általában egy szokványos, gyógyászatilag elfogadható hordozóval együtt tartalmazzák a peptidet. A dózis általában körülbelül 10 µg és 2,5 µg peptid/gazdaszervezet testtömegkilogramm között változik, ha az anyagot intravénásan adjuk be. Az orális dózisok lehetnek magasabbak; azonban ezeknek az anyagoknak a természete lehetővé kell hogy tegye az orális beadást. Összességében, a betegeknek ezekkel a peptidekkel való kezelését általában ugyanúgy végezzük, mint a klinikai kezelést egy másik GnRH-antagonistával, megfelelő hordozót alkalmazva, amelyben a peptid oldódik.

Arra is szükség lehet, hogy a GnRH-analógot hosszabb idő alatt juttassuk be a szervezetbe, például egyetlen beadást követően egy hét – egy év alatt, és ekkor a lassú felszabadulású, depó vagy implant dózisformát kell alkalmazni. Például egy alkalmas, lassú felszabadulású depó injekciós készítmény tartalmazhatja a GnRH-antagonistát vagy annak sóját, egy lassan lebomló, nemtoxikus vagy nem antigén tulajdonságú polimerben, azaz például politejsav/poliglikolsav polimerben diszpergálva vagy kapszulázva (3,773,919 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Ezeket a vegyületeket szilasztikus implantumok formájában is formulázhatjuk.

Ezeket a peptideket emlősknek beadhatjuk intravénásan, szubkután, intramuszkulárisan, orálisan, percután, azaz például intranazálisan vagy intravaginálisan, hogy termékenységgátlást és/vagy -szabályozást érjünk el, valamint olyan alkalmazásokban, amelyekben a gonádaktivitás reverzibilis szuppressziójára van szükség, azaz például a pubertáskori zavaroknál vagy besugárzási, illetve kemoterápiában. Ezek emellett jól használhatók szteroid-dependens tumorok kezelésében. Az effektív dózisok függenek a beadás formájától és az éppen kezelt emlősfajtól. Egy tipikus dózisforma lehet például egy bakteriosztatikus vizes oldat, pH=6, amely tartalmazza a peptidet, ezt az oldatot parenterálisan adjuk be, így kapunk egy 0,1–2,5 mg/testtömegkilogramm per nap dózistartományt. Ezek a vegyületek *in vivo* jól tolerálhatók, és ellenállnak a gélesedésnek; ennek megfelelően különösen alkalmasnak ítélik őket bakteriosztatikus vizes oldatban készített szubkután injekció formájában való beadásra, a megfelelő koncentrációban, azaz körülbelül 0,75 mg/ml fölött és még 1,0 mg/ml fölött is, anélkül, hogy az injekció helyén fellépne a gélesedés veszélye.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. GnRH-antagonista peptidek, vagy azok nemtoxikus sói, amelyek képlete az alábbi:
G-β-D-Nal-(A)D-Phe-D-Pal-Ser-Aph(Q₅)-D-Aph(Q₆)-Leu-ILys-Pro-AA₁₀, ahol
G jelentése 7, vagy annál kevesebb szénatomot tartalmazó alkanoilcsoport;
A jelentése klór-, fluor- vagy brómatom;
Q₅ jelentése For, Ac, Iac, Ura, Ate, Pca, Bt, Cac, pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, β-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol), Gab-(3-amino-1,2,4-triazol), Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), D-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Ser-(3-amino-1,2,4-triazol),
Q₆ jelentése For, Ac, Iac, Ura, Ate, Pca, Bt, Cac, Gab(atz), Ala(atz), D-Ala(atz), Ahx(atz), Ser(atz), pGlu, Ser, D-Ser, Ac-Ser, Ac-D-His, Ac-D-Asn, Ac-D-Cit, Ac-Gly, β-Ala-(3-amino-1,2,4-triazol), Gly-(3-amino-1,2,4-triazol), Ahx-(3-amino-1,2,4-triazol), vagy Gab-(3-amino-1,2,4-triazol), és
AA₁₀-D-Ala-NH₂.

2. Az 1. igénypont szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben mind Q_5 , mind Q_6 jelentése Ac csoport, és A, G és AA_{10} jelentése az 1. igénypontban megadott.

3. Az 1. igénypont szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben mind Q_5 , mind Q_6 jelentése For csoport, és A, G és AA_{10} jelentése az 1. igénypontban megadott.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben G jelentése Ac és A, Q_5 , Q_6 és AA_{10} az 1–3. igénypontokban megadott.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben A jelentése 4-klór- vagy

4-fluoratom és G, Q_5 , Q_6 és AA_{10} az 1–4. igénypontokban megadott.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben D-Pal jelentése D-3Pal és A, G, Q_5 , Q_6 és AA_{10} az 1–6. igénypontokban megadott.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti GnRH-antagonista peptid, amelyben β -D-Nal jelentése β -D-2Nal és A, G, Q_5 , Q_6 és AA_{10} az 1–7. igénypontokban megadott.

8. Az 1. igénypont szerinti GnRH-antagonista peptid, amelynek a képlete az alábbi: Ac- β -D-2Nal-(4Cl)D-Phe-D-3Pal-Ser-Aph(Ac)-D-Aph(Ac)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂.