

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4191259号
(P4191259)

(45) 発行日 平成20年12月3日 (2008. 12. 3)

(24) 登録日 平成20年9月26日 (2008. 9. 26)

(51) Int.Cl. F I

C O 7 K 7/23 (2006. 01)

A 6 1 K 38/04 (2006. 01)

A 6 1 P 15/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

C O 7 K 7/23

A 6 1 K 37/43

A 6 1 P 15/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00

1 1 1

請求項の数 13 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-544225	(73) 特許権者	フェリング ベスローテン フェンノート シャップ オランダ エヌエル—2 1 3 2 ジェイエ ックス ホーフドルプ ポラリス アベニ ュー 1 4 4
(86) (22) 出願日	平成10年4月13日 (1998. 4. 13)		
(65) 公表番号	特表2001-523232 (P2001-523232A)		
(43) 公表日	平成13年11月20日 (2001. 11. 20)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/007519	(74) 代理人	弁理士 谷 義一
(87) 国際公開番号	W01998/046635		
(87) 国際公開日	平成10年10月22日 (1998. 10. 22)	(74) 代理人	弁理士 阿部 和夫
審査請求日	平成17年4月13日 (2005. 4. 13)	(72) 発明者	ジアン, ガンチェン. アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォル ニア州 サン ディエゴ アベニダ ナビ ダド 8 0 2 0 アpartment ナンバ ー 3 9
(31) 優先権主張番号	08/837, 041		
(32) 優先日	平成9年4月11日 (1997. 4. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G n R H拮抗物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

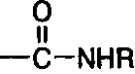
X - D - N a 1 - (A) D - P h e - X a a 3 - S e r - X a a 5 - X a a 6 - L e u - X
a a 8 - P r o - X a a 1 0

を有する直鎖 G n R H 拮抗物質ペプチドまたは薬学的に許容可能なその塩。

[式中、

X は、 7 個以下の炭素原子を有するアシル基、または Q であり、

該 Q は、



(式中 R は、 H または低級アルキル (C 1 ~ C 5) である。) であり、

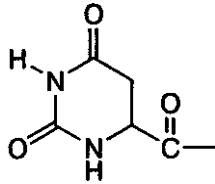
A は、 4 C 1、 4 F、 4 B r、 4 N O 2、 4 C H 3、 4 O C H 3、 3 , 4 C 1 2、または C
M e 4 C 1 であり、

X a a 3 は、 D - G l n、 G l n、 D - A s n、 A s n、または D - D p r (Q) であり、

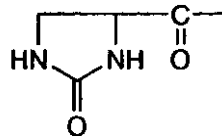
X a a 5 は、 T y r、 A p h (アミノフェニルアラニン) (Q 1)、 A m f (アミノメチル
フェニルアラニン) (Q 1)、または L y s (N i c)

(ここで、 Q 1 は、 Q、 F o r、 A c、 3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - トリアゾール、 - A
1 a (3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - トリアゾール)、 G a b (3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - ト

リアゾール)、



または



(D-HorまたはL-Hor)

(D-ImzまたはL-Imz)

である。)であり、

Xaa₆は、D-Aph(Q₂)、D-Amf(Q₂)、D-Lys(Nic)、D-Cit、D-Hci、またはD-Pal(ここで、Q₂は独立して、Q₁の構成員のいずれかである。)であり、

10

Xaa₈は、Lys(ipr)、Arg、Har、Har(Et₂)、またはArg(Et₂)であり、そして

Xaa₁₀は、D-Ala-NH₂、NHCH₂CH₃、Gly-NH₂、Azagly-NH₂、Ala-NH₂、Agly-NH₂、D-Agly-NH₂、Agly(Me)-NH₂、またはD-Agly(Me)-NH₂であり、

Xaa₅の - アミノ基は、メチル化されていてもよく、Leu⁷の代わりにPhe⁷を用いてもよく、

Dprは、 - ジアミノプロピオン酸を意味し、

20

Nicは、ニコチノイルを意味し、

Forは、ホルミルを意味し、

Gabは、ガンマアミノ酪酸を意味し、

iprは、イソプロピルを意味する。]

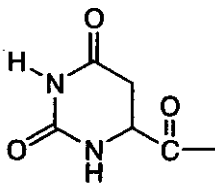
【請求項2】

請求項1に記載のGnRH拮抗物質ペプチドであって、

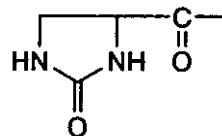
Xは、For、Ac、Acr、Pn、By、Vl、Vac、Bz、またはQであり、

Xaa₅は、Aph(Q₁)またはAmf(Q₁)(ここでQ₁は、Ac、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール、Q、または

30



もしくは



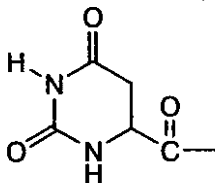
(D-HorまたはL-Hor)

(D-ImzまたはL-Imz)

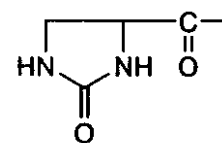
である。)であり、

Xaa₆は、D-Aph(Q₂)、D-Amf(Q₂)、D-Lys(Nic)、D-Cit、D-Hci、またはD-Pal(ここで、Q₂は、For、Ac、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール、Q、または

40



もしくは



(D-HorまたはL-Hor)

(D-ImzまたはL-Imz)

である。)であり、

Q、A、Xaa₃、Xaa₈、およびXaa₁₀は、請求項1で定義したものであり、

Xaa₅の - アミノ基は、メチル化されていてもよく、

50

F o r は、ホルミルを意味し、
A c r は、アクリリルを意味し、
P n は、プロピオニルを意味し、
B y は、ブチリルを意味し、
V l は、バレリルを意味し、
V a c は、ビニルアセチルを意味し、
B z は、ベンゾイルを意味する、 G n R H 拮抗物質。

【請求項 3】

式：

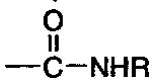
X - D - N a l - D - 4 C p a - X a a ₃ - S e r - X a a ₅ - X a a ₆ - L e u - L s y
 (i p r) - P r o - D - A l a - N H ₂ 10

を有する請求項 1 に記載の G n R H 拮抗物質または薬学的に許容可能なその塩。

[式中、

X は、7 個以下の炭素原子を有するアシル基、または Q であり、

該 Q は、



(式中、R は、H、メチル、またはエチルである。) であり、

X a a ₃ は、D - G l n、G l n、または D - D p r (Q) であり、

X a a ₅ は、A p h (A c)、A p h (Q)、A m f (Q)、または A p h (a t z) で 20
 あり、そして

X a a ₆ は、D - A p h (A c)、D - A m f (Q)、D - A p h (Q)、または D - A
 p h (a t z) であり、

i p r は、イソプロピルを意味し、

D p r は、 , - ジアミノプロピオン酸を意味する。]

【請求項 4】

X が A c であり、X a a ₅ が 4 A p h (Q ₁) または 4 A m f (Q ₁) であり、X a a ₆ が D
 - 4 A p h (Q ₂) または D - 4 A m f (Q ₂) であり、X a a ₈ が L y s (i p r) であ
 り、X a a ₁₀ が D - A l a - N H ₂ であり、

i p r は、イソプロピルを意味する、

請求項 1 または請求項 2 に記載の G n R H 拮抗物質。

【請求項 5】

X a a ₅ が 4 A p h (A c) であり、X a a ₆ が D - 4 A p h (A c) であるか、あるいは
 X a a ₅ が 4 A p h (a t z) であり、X a a ₆ が D - 4 A p h (a t z) である請求項 1
 乃至請求項 3 のいずれか一項に記載の G n R H 拮抗物質。

【請求項 6】

X a a ₅ が T y r であり、X a a ₆ が D - c i t であるか、または X a a ₅ が L y s (N i
 c) であり、X a a ₆ が D - L y s (N i c) であるか、または X a a ₅ が T y r であり、
 X a a ₆ が D - H c i であり、

N i c は、ニコチノイルを意味する、 請求項 1 または請求項 2 に記載の G n R H 拮抗物質 40
 。

【請求項 7】

X a a ₃ が D - G l n である請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか一項に記載の G n R H 拮抗
 物質。

【請求項 8】

X a a ₃ が G l n である請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか一項に記載の G n R H 拮抗物質
 。

【請求項 9】

X a a ₃ が D - D p r (Q) であり、R が H、M e、または E t であり、D p r は ,
 - ジアミノプロピオン酸を意味する、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか一項に記載の G n 50

R H拮抗物質。

【請求項10】

次式：Ac-D-2Na1-D-4Cpa-Dpr(MeCbm)-Ser-4Aph(Ac)-D-4Aph(Ac)-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂；Ac-D-2Na1-D-4Cpa-Dpr(MeCbm)-Ser-4Aph(Cbm)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂；およびAc-D-2Na1-D-4Cpa-Xaa₃-Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(Ac)-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂(式中、Xaa₃は、D-GlnまたはGlnである。)の1つを有し、Dprは、-ジアミノプロピオン酸を意味し、iprはイソプロピルを意味する、請求項1に記載のGnRH拮抗物質。

10

【請求項11】

非毒性の希釈剤とともに、活性成分として、有効量の、請求項1乃至請求項10のいずれか一項に記載のGnRH拮抗物質を含む、哺乳動物でのゴナドトロピン分泌を抑制するための医薬組成物。

【請求項12】

GnRHが過剰なホルモン分泌または腫瘍の増殖を引き起こしている状態のin vivoまたはin vitroでの診断に使用するための処方剤の製造における、請求項1乃至請求項11のいずれか一項に記載のGnRH拮抗物質ペプチドの使用であって、その診断において、GnRH拮抗物質を投与することと、ホルモン分泌または腫瘍細胞増殖をモニタすることを特徴とする使用。

20

【請求項13】

有効量を投与することによって、哺乳動物でのゴナドトロピン分泌を抑制するのに使用するための医薬の製造のための請求項1～10に記載のGnRH拮抗物質ペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

本発明は、一般に、ヒトゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)の拮抗物質であるペプチドであって、有利な物理的、化学的、および生物学的特性を有するペプチドに関する。より詳細には、生殖腺機能と、ステロイドホルモンであるプロゲステロンおよびテストステロンの放出とを長時間にわたって抑制し、共通点のあるGnRHペプチド拮抗物質より製造費用が安い、デカペプチド、ならびにこのような目的において、特に生殖腺ステロイドの過剰分泌によって生じる諸状態を管理するために、このデカペプチドを含有する医薬品組成物を投与する方法に関する。

30

発明の背景

ゴナドトロピンまたは性腺刺激ホルモンと呼ばれることもある、卵胞刺激ホルモン(FSH)および黄体化ホルモン(LH)は、柄によって視床下部に付いている下垂体から放出される。

通常、下垂体前葉からホルモンが放出されるには、例えばGnRHデカペプチドなどの、視床下部で産生されるホルモンが予め放出される必要がある。

一般に哺乳動物においてゴナドトロピンの分泌を抑制するために、また排卵を抑制または遅延するために、GnRHの正常な作用に拮抗するGnRHアナログの投与が用いられてきた。

40

改善されたGnRH拮抗物質の探求の結果、アンチド(Antide)すなわち[Ac-D-2Na1¹, D-4ClPhe², D-3Pal³, Lys(Nic)⁵, D-Lys(Nic)⁶, ILys⁸, D-Ala¹⁰]-GnRH；およびセトロレリックス(Cetrorelix)すなわち[Ac-D-2Na1¹, D-4ClPhe², D-3Pal³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰]-GnRHが生成された。米国特許第5,516,887号には、血漿テストステロンの抑制においてアンチドより有効であると言われるGnRH拮抗物質、例えばアンタレリックス(Antarelix)と呼ばれる[Ac-D-2Na1¹, D-4ClPhe², D-3Pal³, D-N-カルバモイルLys⁶, ILys⁸, D-Ala¹⁰]-GnRHについて記載されている。

50

1994年3月22日発行の米国特許第5,296,468号には、多くのGnRH拮抗物質の設計および合成について開示されているが、ここでは、選択された残基の側鎖は反応してシアノグラニジノ部分を生じ、その一部は続いて自発的に所望の複素環に変換するものであり、例えば3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(atz)がある。このようなシアノグラニジノ部分は、リジン、オニチン、4-アミノフェニルアラニン(4Aph)、または4Aphの延長鎖型である4-アミノホモフェニルアラニン(4Ahp)などのアミノ酸側鎖のオメガアミノ基において形成される。このように有意に修飾されたアミノ酸または非天然アミノ酸を5位および6位に有するGnRH拮抗物質は、良好な生物学的な効力を呈し、シアノグラニジノ部分がAph上に作られているものが一般に好ましいとされている。特に好ましいGnRH拮抗物質は、アザリンB(Azaline B)B、すなわち[Ac-D-2Na1¹, D-4ClPhe², D-3Pal³, 4Aph(atz)⁵, D-4Aph(atz)⁶, ILys⁸, D-Ala¹⁰]-GnRHである。米国特許第5,506,207号には、5位および6位の残基のアミノ置換フェニルアラニン側鎖がアシル化されている生物作用能が大きいGnRH拮抗物質が開示されているが、特に効力の大きいデカペプチドは、アシリン(Acyl line)、すなわち[Ac-D-2Na1¹, D-4ClPhe², D-3Pal³, 4Aph(Ac)⁵, D-4Aph(Ac)⁶, ILys⁸, D-Ala¹⁰]-GnRHである。

これらのGnRH拮抗物質が有する魅力ある特性にもかかわらず、より一層改善されたGnRH拮抗物質、特に生物学的作用が長時間持続するGnRH拮抗物質の探求は今日まで続いている。ペプチドアナログは、短期および長期の治療適応症のいずれの場合にも、LH分泌に対する活性の持続時間が長いものであること、すなわち体内でのタンパク質分解酵素に対する分解ペプチドの抵抗性によって助長される特性を呈すること、および比較的わずかなヒスタミン放出を刺激することがしばしば重要となる。さらに、これらの化合物をゲル化することなしに、哺乳動物、特にヒトに対して投与することを容易にするには、このようなGnRH拮抗物質デカペプチドが、通常の生理学的pH、すなわち約pH5から約pH7.4において、水に対する溶解度が高いことが非常に有利であると考えられる。さらに、これらの化合物は臨床的究明目的のためと考えられるため、上記ペプチドはすべて、購入または合成するのに特に安価な保護アミノ酸を必用とし、3位にある3Palを利用していることに注意すべきである。より安価に合成することができる生物作用能が等しいアナログは、魅力的であり、3位が、費用減少を図る1つの標的である。

発明の概要

セトロレリックス、アンタレリックス、アシリン、アザリンB、アンチドなどを含む、直鎖GnRH拮抗物質のサブクラスにおいて、より安価な3位の残基を置換することにより、生物作用能を減少させないで費用を安くすることができることが判明した。これらのアナログは、今まで好ましいとされたD-3Pal3を含有するペプチドよりも製造費用が安価であるだけでなく、生物活性の持続期間が長いという特に有利な特性がしばしば意外にも得られる。一般に、式：

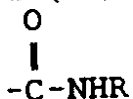
$$X - D - 2Na1 - (A)D - Phe - Xaa_3 - Ser - Xaa_5 - Xaa_6 - Leu - Xaa_8 - Pro - Xaa_{10}$$

を有するGnRH拮抗物質デカペプチド、密接に関連するそのアナログ、および薬剤学的に許容可能なその塩は、類似する従来技術の化合物よりも合成費用が安価であり、特に生物活性持続期間が長いという改善された薬理学的特性をしばしば有する：

上式で、

Xは、7個以下の炭素原子を有するアシル基、またはQであり、

該Qは、



であり、

式中Rは、Hまたは低級アルキルであり、

10

20

30

40

50

Aは、4 Cl、4 F、4 Br、4 NO₂、4 CH₃、4 OCH₃、3, 4 Cl₂、またはC Me 4 Clであり、

Xaa₃は、D - Gln、Gln、D - Asn、Asn、またはD - Dpr (Q)であり、

Xaa₅は、Tyr、Aph (Q₁)、Amf (Q₁)、またはLys (Nic)であって、式中Q₁は、For、Ac、3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、- Ala (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、Gab (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、D - Hor、L - Hor、D/L - Hor、D - Hor、L - Hor、またはD/L - Horであり、

Xaa₆は、D - Aph (Q₂)、D - Amf (Q₂)、D - Lys (Nic)、D - Cit、D - Hci、またはD - Palであって、式中Q₂は、Q、For、Ac、3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、- Ala (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、Gab (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、D - Hor、L - Hor、D/L - Hor、D - Hor、L - Hor、またはD/L - Horであり、

Xaa₈は、Lys (ipr)、Arg、Har、Har (Et₂)、またはArg (Et₂)であり、そして

Xaa₁₀は、D - Ala - NH₂、NHCH₂CH₃、Gly - NH₂、Azagly - NH₂、Ala - NH₂、Agly - NH₂、D - Agly - NH₂、Agly (Me) - NH₂、またはD - Agly (Me) - NH₂であり、

ただし、Xaa₅の - アミノ基は、任意選択でメチル化されていてもよい。

別の態様において、本発明は、GnRHが過剰なホルモン分泌または腫瘍の増殖を引き起こしている状態をin vivoまたはin vitroで診断する方法を提供するものであり、該方法には、前記種類のGnRH拮抗物質ペプチドを投与することと、ホルモン分泌および腫瘍細胞の増殖をモニタすることとが含まれる。

これらの拮抗物質は、デカペプチドの3位に存在する残基の結果、活性の持続期間が長いため、すなわち少なくとも約4日間にわたってLHの分泌を有意に抑制しつづけるために、ヒトでのゴナドトロピンの分泌の抑制、および受胎能調整剤として特に有効である。生理学的pHでの水性緩衝液へのこれらの溶解性は非常によく、ヒスタミン放出の刺激に関する副作用も許容でき、すなわち現在臨床的に用いられているGnRHスーパーアゴニストに比べてより良好である。さらに、皮下(SC)注射してもゲル化は最小限しか認められない。これらのGnRH拮抗物質は、比較的小さな膨疹を引き起こすアナフィラキシーアッセイ(anaphylactoid assay)においても良好に機能する。その結果、これらのペプチドを、受胎能調整剤として、あるいは性的早熟症、ホルモン依存性腫瘍形成、月経困難症、子宮内膜症、ステロイド依存性腫瘍、およびその他本明細書で先に言及した短期適応症もしくは長期適応症の治療用に、哺乳動物、特にヒトへの投与において、特に用いることが見出される。これらは診断にも有用である。

これらのGnRH拮抗物質は、約5から約7.4の生理学的pH範囲で容易に溶解するため、特にpH約5からpH約7において濃縮された形態で製剤化および投与することができる。その極性ゆえに、既知コポリマーをベースとした徐放性調製品での使用に特に適している。3位の置換ゆえに、これらのアナログは、D - Pal³を含有する共通点のあるアナログよりも製造費用が安価である。これらのGnRH拮抗物質は、長期にわたってLHおよびFSHの抑制に有効であるため、雄哺乳動物の避妊治療に(テストステロンを任意選択で投与しながら)、およびステロイド依存性腫瘍の治療に、特に有効でもある。

好ましい実施形態の詳細な説明

最近10年から12年にわたって、有効な拮抗物質をつくるという観点から、GnRH配列における10個の残基それぞれの特性について徹底した研究がなされてきた。その結果、等価な残基として選択し得る種々の残基があること、およびこれらの等価な残基の1つを別の等価な残基と置換してもデカペプチドGnRH拮抗物質の生物作用能が有意に損なわれることはないことが分かった。本発明のGnRH拮抗物質において、このような等価な置換を行うことができる。

10

20

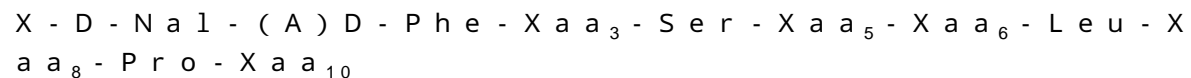
30

40

50

例えば、パラ - 置換 D - P h e、2, 4ジクロロ - 置換 D - P h e、または D - C メチル 4 C l P h e 残基を 2 位に有するようにすると、G n R H 拮抗物質の活性は有意に増すが、環置換基の特有の独自性は、クロロ、フルオロ、ブromo、ニトロ、メチル、およびアルコキシの中から選択した場合には、あまり重要でないことが一般に認められている。したがって、2 位のこのような残基は、一般的に用いる D - 4 C l P h e の等価体であると考えられる。N 末端は、好ましくはアセチル (A c) により、N - アシル化されていることが好ましいが、例えばホルミル (F o r)、アクリリル (A c r)、プロピオニル (P n)、ブチリル (B y)、バレリル (V l)、ビニルアセチル (V a c)、およびベンゾイル (B z) などの 7 個以下の炭素原子を有するその他のアシル基により、N - アシル化されていても好ましい。あるいは、置換カルバモイルまたは非置換カルバモイルが存在していてもよい。その他のより長いアシル基も等価体であると考えられるが、あまり好ましくない。米国特許第 5, 110, 904 号に開示されているように、5 位の残基の - アミノ基を任意選択でメチル化して水溶性を高めることもできるが、このような修飾を行うと L H 抑制持続期間が短縮され、ヒスタミン放出の可能性が大きくなる。C 末端は、D - A l a - N H₂ であることが好ましいが、G l y - N H₂、N H C H₂ C H₃、A z a G l y - N H₂、A l a - N H₂、A g l - N H₂、D - A g l - N H₂、A g l (M e) - N H₂、および D - A g l (M e) - N H₂ も、既知の等価体と考えられることから、代わりに使用することができる。

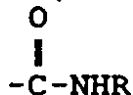
本明細書で先に開示したように、本発明は、3 位を置換して既知の G n R H 拮抗物質を一般的に改良した、下式で表される G n R H 拮抗物質の部類 (g e n u s) を提供し、該式は、



であって、上式で、

X は、7 個以下の炭素原子を有するアシル基、または Q であり、

該 Q は、



であり、

式中 R は、H または低級アルキルであり、

A は、4 C l、4 F、4 B r、4 N O₂、4 C H₃、4 O C H₃、3, 4 C l₂、または C M e 4 C l であり、

X a a₃ は、D - G l n、G l n、D - A s n、A s n、または D - D p r (Q) であり、

X a a₅ は、T y r、A p h (Q₁)、A m f (Q₁)、または L y s (N i c) であり、式中 Q₁ は、F o r、A c、3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、- A l a (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、G a b (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、D - H o r、L - H o r、D / L - H o r、D - H o r、L - H o r、または D / L - H o r であり、

X a a₆ は、D - A p h (Q₂)、D - A m f (Q₂)、D - L y s (N i c)、D - C i t、D - H c i、または D - P a l であって、式中 Q₂ は、Q、F o r、A c、3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、- A l a (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、G a b (3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール)、D - H o r、L - H o r、D / L - H o r、D - H o r、L - H o r、または D / L - H o r であり、

X a a₈ は、L y s (i p r)、A r g、H a r、H a r (E t₂)、または A r g (E t₂) であり、そして

X a a₁₀ は、D - A l a - N H₂、N H C H₂ C H₃、G l y - N H₂、A z a G l y - N H₂、A l a - N H₂、A g l - N H₂、D - A g l - N H₂、A g l (M e) - N H₂、または D - A g l (M e) - N H₂ であり、

ただし、X a a₅の - アミノ基は、任意選択でメチル化されていてもよい。

D - N a l は、 - 炭素原子でナフチルが置換したアラニンのD - 異性体を意味し、すなわち - D - N a l または3 - D - N a l ともいう。ナフタレンとの結合が環構造上の2位である、D - 2 N a l を用いることが好ましいが、D - 1 N a l を用いることもできる。D - C P a は、クロロ - D - P h e を表わしており、D - 4 C l P h e すなわちD - 4 C P a が好ましい。D - P a l は、 - 炭素原子でピリジルが置換したアラニンのD - 異性体を表わし、ピリジン環の3位に結合していること、すなわち - 3 - ピリジル - D - A l a であることが好ましい。D - 2 P a l は、等価体であると考えられる。4 A p h は、フェニル環上のアミノ置換基が4位にある4 N H₂ P h e を意味し、3 N H₂ P h e (3 A p h) は、その等価体であると考えられる。4 A m f は、メチレン結合を介してフェニル環に結合しているフェニルアラニンを意味する。4位に結合していることが好ましいが、3 A m f が、等価体であると考えられる。G a b は、ガンマアミノ酪酸を意味する。a t z は、3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - トリアゾールを意味する。A p h (a t z) は、より正確な化学名である4 - (3 - アミノ - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル) アミノフェニルアラニンでも知られている。L y s (N i c) は、N - ニコチノイルリジンを意味し、すなわちL y s の - アミノ基が3 - カルボキシピリジンでアシル化されている。H a r は、ホモアルギニンを意味する。D - C i t は、シトルリンのD - 異性体を意味し、D - H c i は、D - N - カルバモイルリジンとも呼ばれる、ホモシトルリンのD - 異性体を意味する。I L y s またはL y s (i p r) は、N - イソプロピルリジン、すなわちL y s の - アミノ基がアルキル化されていることを意味する。A z a G l y - N H₂ は、N H N H C O N H₂ を意味する。D b u は、アルファ、ガンマ - ジアミノ酪酸を意味し、D p r は、 - ジアミノプロピオン酸を意味する。A g l は、 - アミノグリシンを意味し、A g l (M e) では、アミノ基の側鎖がメチル化されている。C b m は、カルバモイルを意味し、M e C b m は、メチルカルバモイルまたは - C O N H C H₃ を意味する。低級アルキルは、C₁ ~ C₅ を意味し、好ましくはC₁ からC₃ を、さらに好ましくはC₁ またはC₂、すなわちメチル (M e) またはエチル (E t) を意味する。

これらG n R H拮抗物質の6位に組み込まれる好ましいD - 異性体を具体例によって開示したが、過去20年にわたる当分野の広範な研究の結果、多くの既知の等価なD - 異性体が存在する。このような従来技術のD - 異性体置換によって、これらの改良化合物の生物作用能、特に本明細書に開示した3位の置換によって得られるより長い持続時間と合致するものであって、これが損なわれることもなく、したがって該置換を任意選択で用いることができる。同様に、L u e⁷をP h e⁷で置換して、等価な特性を有するG n R H拮抗物質を得ることができる。

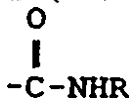
G n R H拮抗物質の好ましい下位部類 (s u b g e n u s) は、式：

X - D - N a l - D - 4 C l P h e - X a a₃ - S e r - X a a₅ - X a a₆ - L e u - L s y (i p r) - P r o - D - A l a - N H₂

であって、上式で、

Xは、7個以下の炭素原子を有するアシル基、またはQであり、

該Qは、



であり、

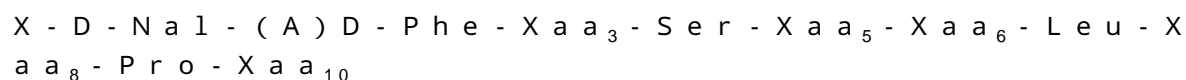
式中Rは、H、メチル、またはエチルであり、

X a a₃は、D - G l n、G l n、またはD - D p r (Q) であり、

X a a₅は、A p h (A c)、A p h (Q)、A m f (Q)、またはA p h (a t z) であり、そして

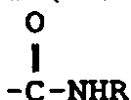
X a a₆は、D - A p h (A c)、D - A m f (Q)、D - A p h (Q)、またはD - A p h (a t z) である。

本発明の特徴を具体化した、5位および6位に別の置換を含む、別のGnRH拮抗物質の部類は、式：



であって、上式で、

Xは、For、Ac、Acr、Pn、By、Vl、Vac、Bz、またはQであって、該Qは、



10

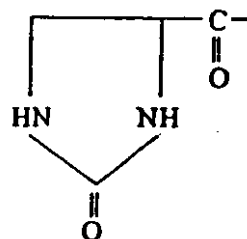
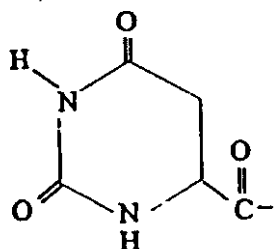
であり、

式中Rは、Hまたは低級アルキルであり、

Aは、4Cl、4F、4Br、4NO₂、4CH₃、4OCH₃、3,4Cl₂、またはCMe₄Clであり、

Xaa₃は、D-Gln、Gln、D-Asn、Asn、またはD-Dpr(Q)であり、

Xaa₅は、Aph(Q₁)またはAmf(Q₁)であって、式中Q₁は、Ac、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール、Q、



20

または

(D-HorまたはL-Hor)

(D-ImzまたはL-Imz)

であり、

30

Xaa₆は、D-Aph(Q₂)、D-Amf(Q₂)、D-Lys(Nic)、D-Cit、D-Hci、またはD-Palであって、式中Q₂は、ForまたはQ₁であり、

Xaa₈は、Lys(ipr)、Arg、Har、Har(Et₂)、またはArg(Et₂)であり、そして

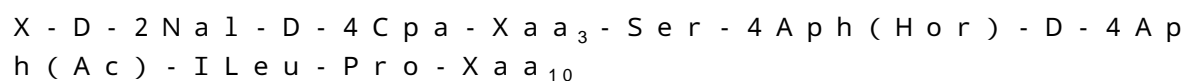
Xaa₁₀は、D-Ala-NH₂、NHCH₂CH₃、Gly-NH₂、AzaGly-NH₂、Ala-NH₂、Agl-NH₂、D-Agl-NH₂、Agl(Me)-NH₂、またはD-Agl(Me)-NH₂であり、

ただし、Xaa₅の-アミノ基は、任意選択でメチル化されていてもよい。

Horは、L-ヒドロオロチルまたはヒドロオロト酸を意味する。Imzは、L-2-イミダゾリドン-4-カルボニルを意味する。HorおよびImzのいずれもD-異性体もしくはD-異性体として、またはD/L混合物として用いることもできる。

40

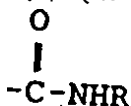
GnRH拮抗物質の好ましい下位部類は、式：



であって、上式で、

Xaa₃は、D-Gln、Gln、またはD-Dpr(Q)であり、

式中Qは、



50

であり、式中 R は、H または低級アルキルであり、そして
 Xaa_{10} は、D-Ala-NH₂ または等価体である。

本発明の化合物は、古典的なペプチド溶液合成によって合成することができ、このような合成は、大量の製品を合成するのに好ましい。例えば 1 kg 未満の限られた量を得るためには、固相技術を利用して合成することが好ましい。クロロメチル化樹脂またはヒドロメチル化樹脂を用いることができるが、切断に際に C - 末端アミドが直接得られる、メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) 樹脂、ベンズヒドリルアミン (BHA) 樹脂、または当該技術分野で知られているその他のある適当な樹脂を用いることが好ましい。C - 末端に置換アミドを有する等価なペプチドが所望する場合、1986 年 2 月 11 日に発行された米国特許第 4,569,967 号に述べられている N - アルキルアミノメチル樹脂を用いて、これらを合成することが好ましい。固相鎖延長合成は、例えば、米国特許第 5,296,468 号に詳細に述べられている方法のようにして、個々のアミノ酸を鎖に順次加える方法で、通常、行われる。当技術分野で周知であるように、側鎖の保護基は、アミノ酸が樹脂上につくられる鎖にカップリングするときに著しく活性な側鎖または不安定な側鎖を有する任意アミノ酸の一部として、含まれていることが好ましい。このような合成によって、充分保護された中間体ペプチド樹脂が得られる。

3 位に所望のカルバモイル含有残基を有する GnRH 拮抗物質の合成に用いる化学中間体の一例は、式： $X^1 - D - NaI - D - 4ClPhe - Xaa_3 (X^3 \text{ または } X^5) - Ser (X^2) - Aph (X^3) - D - Aph (X^3) - Leu - Ilys (X^4) - Pro - X^6$ で表わされる。上式で、 X^1 は、当技術分野においてポリペプチドの段階的合成に有用であることが知られている型の - アミノ保護基であり、所望のペプチド組成物中の X が特定のアシル基である場合、その基を保護基として用いることができる。 X^1 に含まれる

- アミノ保護基の種類は、(1) ホルミル (For)、トリフルオロアセチル、フタロイル、p - トルエン - スルホニル (Tos)、ベンゾイル (Bz)、ベンゼンスルホニル、ジチアスクシノイル (Dts)、o - ニトロフェニルスルフェニル (Nps)、トリチルスルフェニル、o - ニトロフェノキシアセチル、アクリリル (Acr)、クロロアセチル、アセチル (Ac)、および - クロロブチリルなどの、アシル型保護基、(2) ベンジルオキシカルボニル (Z)、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、ならびに p - クロロベンジルオキシ - カルボニル (ClZ)、p - ニトロベンジルオキシカルボニル、p - ブロモベンジルオキシカルボニル、および p - メトキシベンジルオキシカルボニルなどの置換ベンジルオキシカルボニルなどの、芳香族ウレタン型保護基、(3) tert - ブチルオキシカルボニル (Boc)、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、およびアリルオキシカルボニルなどの、脂肪族ウレタン型保護基、(4) シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、およびシクロヘキシルオキシカルボニルなどの、シクロアルキルウレタン型保護基、(5) フェニルチオカルボニルなどの、チオウレタン型保護基、(6) アリル (Ally)、トリフェニルメチル (トリチル)、およびベンジル (Benz) などの、アルキル型保護基、(7) トリメチルシランなどの、トリアルキルシラン基である。好ましい - アミノ保護基は、Boc である。

X^2 は、Ac、Bz、トリチル、2,6 - ジクロロベンジル、またはベンジルーエテル (Benz) などの、Ser のヒドロキシル側鎖の保護基であり、Benz であることが好ましい。

X^3 は、- アミノ保護基または別のアミノ保護基を除去するときに除去されない、Dpr などの側鎖アミノ基の保護基である。具体例には、(1) Fmoc またはその他の弱酸性に安定な芳香族ウレタン型保護基などの塩基に不安定な基、(2) チオール分解により除去または切断することができるジチアスクシノイル (Dts) などのチオールに不安定な基、(3) ヒドラジン分解によって切断されるフタロイル (Phth) などのヒドラジンに不安定な基、(4) チオアセトアミドまたは弱酸もしくはその塩によって切断される o - ニトロフェニルスルフェニル (Nps) などの求核試薬に不安定な基、(5) 光分解によって切断される光に不安定な基、および (6) Dts などの還元によって選択的に取り

10

20

30

40

50

除かれる基などが含まれる。Fmocは、Boc SPPS戦略に好ましい。
X⁴は、Zまたは2ClZなどの、第一級または第二級アミノ側鎖基に用いる酸に不安定な保護基である。

X⁵は、水素、またはキサントニル(xan)などのGlnのアミド基の保護基である。しかしながら、GlnまたはAsnは、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HABt)の存在下で側鎖を保護せずにカップリングすることが好ましい。

X⁶は、D-Ala-、Gly-、Ala-、Agly-、D-Agly-、Agly(Me)-、もしくはD-Agly(Me)-NH-[樹脂保持体]であってもよいし、N(Et)-[樹脂保持体]であってもよい。X⁶は、GlyもしくはD-Alaのいずれかのアミド、Proに直接付いている低級アルキル置換アミド、またはAzagly-NH₂であ
10

ってもよい。
側鎖保護基X²~X⁵の選択基準は、合成の各段階における - アミノ保護基(Bocが好ましい)の除去用に選択される反応条件下で、保護基が試薬に対して概ね安定であることである。これらの保護基は、一般にカップリング条件下で分離されるようなことがあってはならないが、所望のアミノ酸配列の合成が完了したときに、ペプチド鎖に変化を生ずることのないような反応条件下で取り除くことが可能でなければならない。3位のアミノ酸と、5位および6位の残基とに最初に用いた保護基は、取り除かれることが好ましく、本明細書中で後述するが、該選択的反応は、樹脂から最終段階のペプチドを切断する前に行う。

X⁶基がD-Ala-NH-[樹脂保持体]であるとき、保護基D-Alaは、アミド結合によってBHA樹脂またはMBHA樹脂に結合するが、このことはAglyまたはD-AglyをC末端に用いた場合も同様である。X⁵基がN(Et)-[樹脂保持体]のとき、Proは、アミド結合によってN-アルキルアミノメチル樹脂(NAM)に結合する。N末端をアセチル化する場合に、例えば、1位の - D-Nalの - アミノ基に対するX¹保護基としてアセチルを用いることが可能であるが、このことは、 - D-Nalをペプチド鎖にカップリング前にアセチルを該アミノ酸に加えることにより可能となる。しかしながら、樹脂上のペプチド中間体を用いて反応を行うことが好ましい。 - アミノ保護基を脱保護した後、所望の側鎖が保護されたまま状態で、無水酢酸を用いた反応によってアセチル化を行うことが好ましい。あるいは、ジイソプロピルカルボジイミドまたはジシクロヘキシルカルボジイミド(DICまたはDCC)の存在下で、酢酸を用いて反応を行
20
30
40

うこともでき、あるいは当技術分野で知られているその他の適当なアシル化反応によって行うこともできる。N末端にカルバモイル基または置換カルバモイル基を所望する場合も、同様の手順が行われる。残基がペプチド鎖の一部となっている状態で、脱保護した側鎖アミノ基を修飾する場合には、例えばN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)などの適当な塩基の存在下、適当なイソシアネートを用いて反応を行う。ただし、このような塩基の使用は任意選択である。最終製品に非置換カルバモイル基が所望される場合、脱保護したアミノ側鎖をベンジルイソシアネート、トリメチルシリルイソシアネート、またはtert-ブチルイソシアネートと反応させてもよいが、tert-ブチルイソシアネートと反応させることが好ましい。このような戦略を用い、t-ブチル部分を脱保護の際に取り除き、カルバモイル基が尿素の一部として残される。

本発明はさらに、例えば、式：Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-Dpr(Mecbm)-Ser-4Aph(Ac)-D-4Aph(Ac)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂を有するGnRH拮抗物質を生成する新規方法を提供するものであって、該方法には、(a)式：Boc-Ser(X²)-Aph(X³)-D-Aph(X³)-Leu-ILys(X⁴)-Pro-X⁶(式中、X²は、水素、またはSerのヒドロキシル基の保護基であり；X³は、塩基に不安定なアミノ基保護基、ヒドラジンに不安定なアミノ基保護基、またはその他の適当な不安定なアミノ基保護基であり；X⁴は、酸に不安定なアミノ側鎖保護基であり；X⁶は、D-Ala-NH-[樹脂保持体]である。)を有する中間ペプチドを生成すること、(b)4AphおよびD-4AphからX³を取り除き、脱保護された第一級アミノ基を無水酢酸と反応させること、(c)鎖の延長
50

を完了して、中間体 $X^1 - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - Dpr(X^3) - Ser(X^2) - 4Aph(Ac) - D - 4Aph(Ac) - Leu - Ilys(X^4) - Pro - X^6$ (上式で、 X^1 は、 $-$ アミノ保護基である。)を生成すること、(d)3位の残基から X^3 を取り除き、中間体ペプチドのこのアミノ酸残基の側鎖一級アミノ基を脱保護すること、(e)この脱保護された側鎖第一級アミノ基をメチルイソシネートと反応させること、(f)N-末端をアシル化すること、ならびに(g)残存するすべての保護基を分離すること、および/または X^6 に含まれる樹脂保持体から切断することとが含まれる。

最終的なペプチドの精製は、当技術分野で知られているクロマトグラフィー、分配クロマトグラフィーにより、またはHPLCを用いて行う。J. Rivier他、J. Chromatography、288巻、303~328頁、1984年；ならびにC. MillerおよびJ. Rivier、Biopolymers (Peptide Science)、40巻、265~317頁、1996年を参照のこと。

本発明のGnRH拮抗物質は、雌ラットの排卵を防止するために、発情前期の正午頃に皮下投与した場合、体重1kg当たり100マイクログラム未満のレベルで有効であると考えられる。排卵抑制期間を長くするには、体重1kg当たり約0.1ミリグラムから約2.5ミリグラムの範囲の用量レベルを使用する必要がある。この拮抗物質を哺乳動物の雄に規則的に投与すると、精子形成の停止にも有効であり、したがって避妊薬としても使用できる。これらの化合物はテストステロンレベルを低下させ、したがってリビドーをも低下させるため(正常な性的活動力のある雄にとっては望ましくない結果)、リビドーを維持しながら無精子症または髪の増殖を達成するためには、GnRH拮抗物質と併用して補充用量(replacement dosage)のテストステロンを投与することが望ましかろう。この拮抗物質は、ゴナドトロピンおよび性ステロイドの調整に用いることもでき、本明細書で先に述べたようなその他の長期および短期の適応症にも用いることもでき、これをペットの避妊薬として獣医学にも適用できる。

本発明によって提供されるペプチドは、生理学的pH値において著しい溶解性があり、したがって比較的高濃度の投与液剤として、特に皮下注射剤として調製することができる。これらのペプチドは体内で充分耐性であり、有効濃度で皮下投与する場合に容易にはゲル化しない。一般に、このようなペプチドと、医薬品として容認可能な好適な賦形剤とを含有する医薬品組成物を、1日に体重1kg当たり約0.001mgから約2.5mgの間のレベルで、静脈、腹腔、皮下などに投与することができ、通常は1日体重1kg当たり0.5mgで充分である。

適正に保護されたD-もしくはL-ヒドロオルチル-含有アミノ酸、カルバモイル-含有アミノ酸、および/またはD-もしくはL-イミダゾリドン-カルボニル-含有アミノ酸を合成し、次いで鎖延長ペプチド合成で用いることができる。しかしながら、等しく有効な合成は、適正に保護された4Aph残基、4Amf残基、またはDpr残基を、ペプチド中間体の所望の位置に最初に組込むことによって達成され、このような方法は、最初はずか少量だけが望まれる実験室向けの方法として選択することができよう。この方法における最後のストラテジーは、特定の残基を順次に脱保護し(合成中直ちにまたは順次のいずれか)、次いで脱保護した側鎖アミノ基を所望の試薬と反応させることによって達成される。

本発明を以下の実施例でさらに説明する。

実施例 1

式： $Ac - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - 3Pal - Ser - Lys - (Nic) - D - Lys(Nic) - Leu - Ilys - Pro - D - Ala - NH_2$ (アンチド)を有するペプチドは、現在アシリンと呼ばれている、アンチドとは5位および6位のみが異なるペプチドと同様、GnRHの拮抗物質として非常に良好な生物学的性質を示すことが判明している。現在では、これらのデカペプチドの3位残基、または他の既知の生物作用能をもつGnRH拮抗物質の3位残基に置換を施した場合、製造費用がより安価である、および/またはin vivoでの生物活性持続時間が改善された、GnRH拮抗物質が得られることが判明している。

以下のデカペプチド[$D-Dpr(MeCbM)^3$]-アシリン、あるいは[$Ac-D-2Na1^1$ 、 $D-4Cpa^2$ 、 $D-Dpr(MeCbM)^3$ 、 $4Aph(Ac)^5$ 、 $D-4Aph(Ac)^6$ 、 $ILys^8$ 、 $D-Ala^{10}$]-GnRH(ペプチド番号1)は、固相合成法によって合成される。このペプチドは以下の式を有する：

$Ac-D-2Na1-D-4Cpa-D-Dpr(メチルカルバモイル)-Ser-4Aph(アセチル)-D-4Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH_2$ 。

MBHA樹脂(Bachem社)約9.3グラム(0.54mmol/g)を最初に用い、そしてBoc-保護D-Alaを該樹脂にカップリングさせるが、このカップリングは、活性化試薬またはカップリング試薬として約10ミリモルのBoc誘導体、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、および無水1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)を用いて、ジメチルホルムアミド(DMF)またはN-メチルピロリドン(NMP)/ CH_2Cl_2 中で、約8時間かけて行う。D-Ala残基は、アミド結合によりMBHA残基と結合する。

各アミノ酸残基のカップリングの後、出発樹脂約0.5グラムから1グラムに対し、洗浄、脱保護、次いで次のアミノ酸残基のカップリングを以下の合成計画要覧に従って行う。

工程	試薬および操作	攪拌時間 分
1	メタノール(MeOH)洗浄-15ml(2回)	1
2	CH_2Cl_2 (DCM)洗浄-30ml(3回)	1
3	50%TFA+1% m -クレゾールのDCM溶液-25ml(2回)	5, 20
4	イソプロピルアルコール洗浄-20ml(2回)	1
5	トリエチルアミン10%のDCM溶液-20ml(2回)	2
6	メタノール洗浄-15ml(2回)	1
7	DCM洗浄-20ml(3回)	1
8	DICまたはDCC(0.5~1.0mmole)のDCM溶液を加えた、特定の保護アミノ酸の溶解性に依存する、ジメチルホルムアミド(DMF):DCMまたはN-メチルピロリドン(NMP):DCMのいずれか10~20ml中のBoc-アミノ酸(0.5~1.0mmole)およびHOBt(0.5~1.0mmole)	1~17 時間
9	メタノール洗浄-15ml(2回)	1
10	DCM洗浄-20ml(3回)	1

前記の計画は、最初のアミノ酸を結合した後、本発明ペプチドの各アミノ酸のカップリングに用いる。N-Boc保護は、合成全体を通して、カップリングされる各アミノ酸に用いる。N-Boc-D-2Na1は、例えば1980年11月18日に発行された米国特許第4,234,571号で詳述されているように、当技術分野で知られている方法によって調製することができるし、米国オレゴン州SyntheTech社から市販されてもいる。5位における4Aph、および6位におけるD-4Aphの側鎖の第一級アミノ基は、Fmocによって保護する。ベンジルエーテル(Bzl)をSerのヒドロキシル基の側鎖保護基として用いることが好ましいが、Serは側鎖の保護を行わずにカップリングすることができる。N-Boc-Lys(ipr, Z)を8位残基に用いる。

4位残基にN-Boc-Ser(Bzl)としてSerを付加すると、以下の中間体： $Boc-Ser(Bzl)-4Aph(Fmoc)-D-4Aph(Fmoc)-Leu-$

Lys (i p r、Z) - P r o - D - A l a - N H - [M B H A 樹脂保持体] が得られる。25%ピペリジンのDMF溶液(10ml)を用いて、それぞれ約15分間、連続的に処理することによって、Fmoc保護基を除去する。ペプチド樹脂をDMFで洗浄した後、DMF中の大過剰の無水酢酸を用いて、室温で、約30分間またはニンヒドリン試験で検査しながら反応が完了するまで、新しく遊離したアミノ基を処理して、双方の側鎖をアセチル化する。次いでペプチド樹脂をMeOHおよびDCMで標準的に洗浄する。

4 A p h 残基およびD - 4 A p h 残基の側鎖のアセチル化が完了した後、N B o c、N F m o c - 保護のD - D p r を鎖にカップリングして3位の残基とする。ひとたび残基をカップリングしたならば、B o c 保護を除去し、最後の2つの残基を順次付加して鎖を完成させる。N末端の - アミノ基をトリフルオロ酢酸(TFA)で脱保護した後、約30分間、ジクロロメタン(DCM)中の大過剰の無水酢酸を用いて、アセチル化を行う。適度に大量の樹脂を用いて出発することにより、本明細書中で以後に記載する3つの並行して行う合成で用いるために、ペプチド樹脂中間体の分画をこのときに除去することができる。

N - 末端のアセチル化の後、ペプチド樹脂約500mgを25%ピペリジンで処理して、D - D p r 側鎖を選択的に脱保護する。次いで、適当な塩基であるDIEA 2.7モルの存在下、DMF 10ml中、室温で2時間、部分的に脱保護されたペプチド樹脂をメチルイソシアネートで処理して、メチルカルバモイル置換残基を形成する。

ペプチド樹脂を乾燥し、そして樹脂からのペプチドの切断と、SerおよびLys側鎖の脱保護とを、HF 15mlおよび不純物除去剤としてのアニソール(0.5ml)を用いて、約0で約1.5時間行う。真空下でHFを除去した後、エチルエーテル100mlで樹脂を2回洗浄する。切断されたペプチドは、0.2%TFAの25%CH₃CN/H₂O溶液で毎回100mlずつ繰り返し抽出する。抽出液を集め、凍結乾燥して、粗ペプチド粉末約160mgを得る。

次いで、ペプチドを、当技術分野で知られており、J. Rivier 他、J. Chromatography、288巻、303~328頁、1984年で具体的に述べられている、分取用逆相高速液体クロマトグラフィ(RP-HPLC)により精製する。RP-HPLC分離による最初の分取ではTEAP(リン酸トリエチルアンモニウム)を用い、最終の分離は、J. Chromatographyの文献にすべて詳述されているように、0.1%TFA(トリフルオロ酢酸)勾配を用いて行う。

ペプチド(約51mg)は、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)を用いて実質的に均質であると判断され、その純度は約100%と推定される。精製されたペプチドのアミノ酸分析は、調製された構造式と一致する。液体二次イオン質量分析計(LSIMS)によって測定した分子量は、1527.8Daとして測定され、これはこのペプチドの期待される分子量1527.8Daと一致する。

親水性は、緩衝液AをpH7.0のTEAPとし、緩衝液BをCH₃CN 70%および緩衝液A 30%とし、30分間にわたり緩衝液B 40%から緩衝液B 70%の濃度勾配としたRP-HPLCを用いて保持時間を測定することにより、検査した。ペプチド番号1は、アシリンより親水性であって、アシリンより先に約1.8分間溶出する。pH約5から約7の水性緩衝液での溶解度、およびin vivoでのゲル化抵抗性により、循環LHレベルを抑制する長時間作用生物作用能(後述)を有しながら、概ね同等の生物学的な効力を有する短時間作用の化合物に比べて、特に皮下注射による投与に適するものとなる。該ペプチドを本明細書中で以後ペプチド番号1と呼ぶ。ラットでのLH分泌抑制効果を測定するために、ペプチドをin vivoでアッセイした。ペプチドで皮下処理したスプラッグ-ダウレー(Sprague-Dawley)ラットの精巣除去した雄における循環LHレベルの測定を、C. Rivier 他、Biol. Reproduc.、29巻、374~378頁、1983年に報告されているように行う。ペプチドをまず1.0mg/mlまたは10mg/mlの濃度で静菌水に溶解し、次いでさらに0.1%BSAを含むリン酸緩衝液0.04Mで希釈する。以後の希釈はリン酸緩衝液で行う。ペプチドを5匹のラットに皮下注射し、メタン麻酔して血液試料(300μl)を集める。血清(5

10

20

30

40

50

0 µl) の LH レベルを、National Pituitary and Hormone Distribution Program (NIIDDK) から提供された試薬を用いて 2 回検査する。ラット当たりペプチド 50 µg の用量で、最初の 3 日間、コントロールレベルの 50 % より低いレベルに抑制することが検査により示されたが、このレベルは、アシリンを 50 マイクログラムの用量で同様に注射したラットにより示される LH レベルとほぼ同じである。さらに、注射後 96 時間後では、LH レベルは、アシリンを注射したラットで示される LH レベルの約 75 % にすぎない。ラットの実験により、該ペプチドは、注射箇所での著しいゲル化は検出できず、耐性が良好であることが示された。

数多くの GnRH 拮抗物質の検査から得られた経験から、このような長時間 LH の抑制作用を表すペプチドは、成熟したメスのスプラーグ-ダウレーラットで *in vivo* で測定した場合、2.5 マイクログラムの用量で完全に排卵を遮断することが示される。

実施例 2

実施例 1 で合成されたペプチド樹脂中間体の一部を用いて、[D-Dpr(Cbm)³]-アシリンを生成する。実施例 1 のようにして、D-Dpr 残基の側鎖から Fmoc 保護基を取り除いた後、t-ブチルイソシナネートで中間体を室温で約 6 時間処理する。実施例 1 に述べたように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行うと、t-ブチルが取り除かれ、D-Dpr 残基のアミノ側鎖上に置換されたカルバモイル基が残ることとなる。ペプチド Ac-D-2NaI-D-4Cpa-D-Dpr(カルバモイル)-Ser-4Aph(アセチル)-D-4Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂(ペプチド番号 2) が、RP-HPLC 精製によって得られる。該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。質量スペクトル分析によって、質量 1513.7 Da が示されるが、これは計算質量 1513.7 Da に一致する。HPLC の結果から、このペプチドがペプチド番号 1 よりも親水性であることが分かる。

実施例 1 のようにして、このペプチドをラットの標準 *in vivo* 試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、このペプチドは、ペプチド番号 1 とほぼ同等の LH 抑制効果がある生物活性を有することが示される。

実施例 2 A

実施例 1 で述べた合成法で調製したペプチド樹脂中間体の一部を本明細書において利用して、[D-Dpr(EtCbm)³]-アシリンを形成する。実施例 1 のようにして、D-Dpr 残基の側鎖から Fmoc 保護基を取り除いた後、DIEA の存在下、室温で約 60 分間、中間体をエチルイソシナネートで処理して、D-Dpr 残基のアミノ側鎖とともにエチル尿素を形成する。実施例 1 に述べたように、樹脂から切断して脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac-D-2NaI-D-4Cpa-D-Dpr(エチルカルバモイル)-Ser-4Aph(アセチル)-D-4Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂ が、RP-HPLC 精製によって得られる。該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。質量スペクトル分析によって、質量 1541.4 Da が示されるが、これは計算質量 1541.8 Da に一致する。HPLC の結果から、このペプチドがアシリンとほぼ同じ親水性であることが分かる。

実施例 1 のようにして、このペプチドをラットの標準 *in vivo* 試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、このペプチドは、ペプチド番号 2 とほぼ同等の LH 抑制効果がある生物活性を有することが示される。

実施例 2 B

実施例 1 で調製したペプチド樹脂中間体の別の一部を利用して、デカペプチド [D-Dpr(iprCbm)³]-アシリンを形成する。実施例 1 のようにして、D-Dpr 残基の側鎖から Fmoc 保護基を取り除いた後、DIEA の存在下、イソプロピルイソシナネートで中間体を室温で約 30 分間処理して、D-Dpr 残基のアミノ側鎖とともにイソプロピル尿素基を形成する。実施例 1 に述べたように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて

精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{Nal} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}$ (イソプロピルカルバモイル) - $\text{Ser} - 4\text{Aph}$ (アセチル) - $\text{D} - 4\text{Aph}$ (アセチル) - $\text{Leu} - \text{Lys}$ (イソプロピル) - $\text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ が、 $\text{RP} - \text{HPLC}$ 精製によって得られる。該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 95 パーセントより高いと推定される。質量スペクトル分析によって、質量 1555.5 Da が示されるが、これは計算質量 1555.8 Da に一致する。

実施例 1 のようにして、このペプチドをラットの標準 *in vivo* 試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、2 日間はペプチド番号 2 とほぼ同等の LH 抑制効果がある生物活性を有することが示される。3 日目では、アシリンよりも LH 抑制効果が低い。

10

実施例 2 C

実施例 1 で述べた合成を一般的に利用して、 $\text{D} - \text{Dpr}$ 残基、 4Aph 残基、および $\text{D} - 4\text{Aph}$ 残基すべてが Fmoc で保護されたままのデカペプチド中間体を形成する。実施例 1 のように、 $\text{N} -$ 末端をアセチル化し、次いで 3 つの側鎖から Fmoc 保護基を取り除いた後、 DIEA の存在下、イソプロピルイソシアネートで中間体を室温で約 2 時間処理して、3 つのアミノ側鎖とともにメチル尿素基を形成する。実施例 1 に述べたように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{Nal} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}$ (メチルカルバモイル) - $\text{Ser} - 4\text{Aph}$ (メチルカルバモイル) - $\text{D} - 4\text{Aph}$ (メチルカルバモイル) - $\text{Leu} - \text{Lys}$ (イソプロピル) - $\text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ が、 $\text{RP} - \text{HPLC}$ 精製によって得られる。該ペプチドは、実質的に均質であり、アシリンよりも親水性であると判断される。

20

実施例 1 のようにして、このペプチドをラットの標準 *in vivo* 試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、このペプチドは、アシリンとほぼ同等の抑制効果のある生物活性を有することが示される。

実施例 3

実施例 1 に概要を示した合成法を用いて、式 $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{Nal} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}$ (メチルカルバモイル) - $\text{Ser} - \text{Tyr} - \text{D} - \text{Cit} - \text{Leu} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ を有するセトロレリックスペプチドのアナログを合成する。6 位および 5 位に $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - 4\text{Aph}$ および $\text{N} - \text{Boc} - 4\text{Aph}$ をカップリングする代わりに、 $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Cit}$ を 6 位にカップリングし、 $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Tyr}$ (2 Br Z) を 5 位にカップリングする。 $\text{N} - \text{Boc} - \text{Lys}$ (ipr, Z) の代わりに、 $\text{N} - \text{Boc} - \text{Arg}$ (Tos) を用いる。あるいは、 $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Orn}$ (Fmoc) を 6 位にカップリングし、 $\text{Boc} - \text{Tyr}$ (2 Br Z) を 5 位に付加した後、一時的に鎖延長を中断し、次式のペプチド中間体: $\text{Boc} - \text{Tyr}$ (2 Br Z) - $\text{D} - \text{Orn}$ (Fmoc) - $\text{Leu} - \text{Arg}$ (Tos) - $\text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH} - [\text{MBHA 樹脂保持体}]$ を得る。次いで、実施例 1 のように、 Fmoc 保護を除去することにより Orn 残基のアミノ側鎖を脱保護し、中間体を過剰の t - ブチルイソシアネートの DMF 溶液で約 6 時間室温で処理して、 Orn 残基の側鎖と反応させる。次いで、実施例 1 のようにして、デカペプチド中間体の合成を完了し、続いて $\text{D} - \text{Dpr}$ 側鎖を脱保護し、メチルイソシアネートと反応させる。

30

40

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチド樹脂を洗浄し、そして樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製する。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{Nal} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}$ (メチルカルバモイル) - $\text{Ser} - \text{Tyr} - \text{D} - \text{Cit} - \text{Leu} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ (ペプチド番号 3) が、 $\text{RP} - \text{HPLC}$ 精製後に得られる。このペプチドは、セトロレリックスよりも親水性であり、セトロレリックスよりも *in vivo* で長時間 LH が抑制されると考えられる。

実施例 3 A

$\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Cit}$ の代わりに $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Hci}$ を、 Arg^8 の代わりに ILys^8 を用いて、実施例 3 で記載した合成を繰り返し、アンタレリックスデカペプチドのアナログを合成する。 $\text{D} - \text{Dpr}$ 側鎖を脱保護した後、メチルイソシアネートと反応を行

50

う。次いで、実施例 1 で述べたようにして、樹脂からの切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - \text{Tyr} - \text{D} - \text{Hci} - \text{Leu} - \text{ILys} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ が、RP-HPLC 精製で得られる。

このペプチドは、ペプチド番号 3 と実質的に同じ *in vivo* での LH 分泌抑制能を有している。

実施例 4

$\text{D} - 3\text{Pal}$ の代わりに $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{Fmoc})$ を用いることを除き、米国特許第 5, 169, 935 号の実施例 1 に概要を示した合成法を用いて、式 $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - \text{Lys}(\text{ニコチノイル}) - \text{D} - \text{Lys}(\text{ニコチノイル}) - \text{Leu} - \text{Lys}(\text{ipr}) - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ を有する、アンチドペプチドのアナログを合成する。実施例 1 のように、デカペプチド中間体の合成を完了した後、 $\text{D} - \text{Dpr}$ 側鎖の脱保護およびメチルイソシアネートとの反応を行う。

10

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチドを標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - \text{Lys}(\text{Nic}) - \text{D} - \text{Lys}(\text{Nic}) - \text{Leu} - \text{ILys} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ (ペプチド番号 4) が、RP-HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アンチドよりも長時間 *in vivo* での LH 分泌を抑制する。

20

実施例 5

米国特許第 5, 269, 468 号の実施例 VII I に概要を示した合成法を用いて、式 $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - 4\text{Aph}(\text{atz}) - \text{D} - 4\text{Aph}(\text{atz}) - \text{Leu} - \text{ILys} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ を有する、アザリン B ペプチドのアナログを合成する。3 位に $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - 3\text{Pal}$ をカップリングする代わりに、 $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{Fmoc})$ を用いる。実施例 1 のようにして、デカペプチド中間体の合成を完了した後、 $\text{D} - \text{Dpr}$ 側鎖の脱保護およびメチルイソシアネートとの反応を行う。

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチドを標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - 4\text{Aph}(\text{atz}) - \text{D} - 4\text{Aph}(\text{atz}) - \text{Leu} - \text{ILys} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ (ペプチド番号 5) が、RP-HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性であり、アザリン B よりも長時間 *in vivo* での LH 分泌を抑制する。

30

実施例 5 A

実施例 1 に概要を示した合成法を用いて、アンチドペプチドのアナログ [$\text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル})^3$ 、 $4\text{Aph}(\text{Gab})(\text{atz})^5$ 、 $\text{D} - 4\text{Aph}(\text{Gab})(\text{atz})^6$] を合成する。 $\text{N} - \text{Boc} - \text{D} - 4\text{Aph}(\text{Fmoc})$ および $\text{N} - \text{Boc} - 4\text{Aph}(\text{Fmoc})$ を 6 位および 5 位にカップリングした後、一時的に鎖延長を中断し、側鎖保護ガンマ酪酸 (Gab) との反応を行い、続いて米国特許第 5, 506, 207 号の実施例 1 に述べられているトリアゾール修飾を行う。実施例 1 のようにして、デカペプチド中間体の合成を完了した後、 $\text{D} - \text{Dpr}$ 側鎖の脱保護およびメチルイソシアネートとの反応を行う。

40

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチドを標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド $\text{Ac} - \text{D} - 2\text{NaI} - \text{D} - 4\text{Cpa} - \text{D} - \text{Dpr}(\text{メチルカルバモイル}) - \text{Ser} - 4\text{Aph}(\text{Gab})(\text{atz}) - \text{D} - 4\text{Aph}(\text{Gab})(\text{atz}) - \text{Leu} - \text{ILys} - \text{Pro} - \text{D} - \text{Ala} - \text{NH}_2$ (ペプチド番号 5 A) が、RP-HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性であり、アザリン B よりも長時間 *in vivo* での LH 分泌を抑制する。

実施例 5 B

50

実施例 1 に概要を示した合成法を用いて、アンチドペプチドのアナログ [D - Dpr (メチルカルバモイル)³、4Aph (- Ala) (atz)⁵、D - 4Aph (- Ala) (atz)⁶] を合成する。6 位および 5 位の D - 4Aph および 4Aph の側鎖アミノ基と、Gab とを反応させる代わりに、N Fmoc - - Ala との反応を最初に行う。残りの合成法は同じである。実施例 1 のように、デカペプチド中間体の合成を完了した後、D - Dpr 側鎖の脱保護およびメチルイソシアネートとの反応を行う。

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチドを標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - Dpr (メチルカルバモイル) - Ser - 4Aph (- Ala) (atz) - D - 4Aph (- Ala) (atz) - Leu - Ilys - Pro - D - Ala - NH₂ (ペプチド番号 5B) が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アンチドよりも親水性であり、アンチドよりも長時間 *in vivo* で LH 分泌を抑制する。

10

実施例 5C

実施例 1 に概要を示した合成法を用いて、アンチドペプチドのアナログ [D - Dpr (メチルカルバモイル)³、4Aph (For)⁵、D - 4Aph (For)⁶] - アンチドを合成する。6 位および 5 位の D - 4Aph および 4Aph の側鎖アミノ基を Gab と反応させる代わりに、ギ酸および無水酢酸の混合物との反応を行う。実施例 1 のようにして、デカペプチド中間体の合成を完了した後、D - Dpr 側鎖の脱保護およびメチルイソシアネートとの反応を行う。

次いで、実施例 1 で述べたようにして、このペプチドを標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - Dpr (メチルカルバモイル) - Ser - 4Aph (For) - D - 4Aph (For) - Leu - Ilys - Pro - D - Ala - NH₂ (ペプチド番号 5C) が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アンチドよりも長時間 *in vivo* で LH 分泌を抑制する。

20

実施例 5D

実施例 1 に示した概要のようにして、アナログ [D - Dpr (MeCbm)³、4Aph (Hor)⁵] - アシリンを合成する。N Boc - 4Aph (Fmoc) を鎖に付加する前に、6 位の D - 4Aph をアセチル化する。4Aph 側鎖の脱保護の後、DIC および HOBT の存在下、DMF 中、約 8 時間、室温でヒドロオロト酸 (C₄N₂H₅(O)₂COOH) との反応を行う。次いで、実施例 1 で述べたようにして、合成を完了し、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - Dpr (MeCbm) - Ser - 4Aph (Hor) - D - 4Aph (アセチル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 99 パーセントより高いと推定される。MS 分析によって、質量 1625.5 Da が示されるが、これは期待される質量 1625.8 Da によく相応する。HPLC の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

30

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは 2 日間、LH レベルの抑制においてアシリンとほぼ同等の活性であり、3 日目では、アシリンよりも LH 抑制レベルが低いことが示される。

40

実施例 5E

実施例 5D に述べたようにして、アナログ [D - Dpr (MeCbm)³、4Aph (Hor)⁵、D - 4Aph (Hor)⁶] - アシリンを合成する。6 位の D - 4Aph 残基および 5 位の 4Aph 残基を同時に反応させる。実施例 5D で述べたようにして、2 つの 4Aph 側鎖の脱保護の後、ヒドロオロト酸との反応を行い、次いで合成を完了し、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2NaI - D - 4Cpa - D - Dpr (MeCbm) - Ser - 4Aph (Hor) - D - 4Aph (Hor) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製

50

で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は95パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1735.5 Daが示されるが、これは期待される質量1735.8 Daによく相応する。HPLCの結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、1日目、2日目、および3日目には、LHレベルの抑制においてアシリンとほぼ同等の活性を有することが示され、長時間作用するものと考えられる。

実施例 5 F

N-Boc-D-Dpr(Fmoc)の代わりにN-Boc-D-Dbu(Fmoc)を用いて、実施例5Dに示した概要のようにして、アナログ[D-Dbu(MeCbm)³、4Aph(For)⁵]-アシリンを合成する。次いで、実施例1で述べたようにして、合成を完了し、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチドAc-D-2Na1-D-4Cpa-D-Dbu(MeCbm)-Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られる。該化合物は、LH分泌抑制の生物活性を有する。

実施例 5 G

実施例5Dに示した概要のようにして、アナログ[D-Dpr(MeCbm)³、4Aph(For)⁵、D-4Amf(Cbm)⁶]-アシリンを合成するが、6位残基に対しN-Boc-D-4Aph(Fmoc)の代わりにN-Boc-D-4Amf(Fmoc)を用い、次いで、N-Boc-D-4Aph(Fmoc)を付加する前に、脱保護した側鎖をt-ブチルイソシアネートと反応させる。次いで、実施例1で述べたようにして、合成を完了し、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチドAc-D-2Na1-D-4Cpa-D-Dpr(MeCbm)-Ser-4Aph(Hor)-D-4Amf(Cbm)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られる。該化合物は、LH分泌抑制の生物活性を有する。

実施例 6

実施例1に記載した合成を繰り返して、ペプチド[D-Dpr(MeCbm)³、4Aph(Cmb)⁵、D-4Aph(Cmb)⁶]-アンチドを合成する。D-4Aph残基および4Aph残基の側鎖アミノ基を無水酢酸と反応させる代わりに、これら双方をt-ブチルイソシアネートと反応させる。次いで、Bocを取り除くことにより、ペプチド鎖をさらに延長することが可能となる。N-末端をアセチル化し、次いでD-Dpr側鎖の脱保護の後、メチルイソシアネートとの反応を行う。実施例1で述べたように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行い、その結果、t-ブチル部分が取り除かれる。ペプチドAc-D-2Na1-D-4Cpa-D-Dpr(メチルカルバモイル)-Ser-4Aph(カルバモイル)-D-4Aph(カルバモイル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は98パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1529.9 Daが示されるが、これは期待される質量1529.8 Daによく相応する。HPLCの結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、アシリンとほぼ同じ時間作用するものと考えられる。

実施例 6 A

実施例5Gに概要を示した合成を行って、ペプチド[D-Dpr(MeCbm)³、4Aph(Hor)⁵、D-4Amf(Cbm)⁶]-アンチドを形成する。D-4Amfの側鎖アミノ基をt-ブチルイソシアネートと反応させる。Bocを取り除いた後、N-Boc-4Aph(Fmoc)をペプチド鎖に付加する。Fmocを取り除いた後、ヒドロキソ酸との反応を行う。N-末端をアセチル化し、次いでD-Dpr側鎖の脱保護の後、

t - ブチルイソシアネートとの反応を行う。実施例 1 で述べたように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2 NaI - D - 4 Cpa - D - Dpr (カルバモイル) - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Amf (カルバモイル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、LH 分泌抑制の生物活性を有する。

実施例 7

実施例 1 に示した概要のようにして、ペプチドアナログ [D - Gl n³] - アシリンを合成する。3 位に N Boc - D - Dpr (Fmoc) をカップリングする代わりに、N Boc - D - Gl n を用いる。任意選択で、N Boc - D - Gl n (Xan) を用いる。しかしながら、側鎖を保護しないで、D - Gl n をカップリングすることが好ましい。実施例 1 で述べたように、デカペプチド中間体の合成を完了した後、このペプチド樹脂を標準的に洗浄し、次いで樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2 NaI - D - 4 Cpa - D - Gl n - Ser - 4 Aph (Ac) - D - 4 Aph (Ac) - Leu - I Lys - Pro - D - Ala - NH₂が、RP - HPLC 精製で得られる。該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 99 パーセントより高いと推定される。LSIMS 分析によって、質量 1512.9 Da が示されるが、これは計算質量 1512.7 Da に一致する。実施例 1 のようにして、このペプチドをラットの標準 in vivo LH 抑制試験でアッセイにより、該ペプチドは、3 日間にわたり生物活性持続時間がアシリンとほぼ同じであることが示される。

実施例 7 A

実施例 5 D および実施例 7 に示した概要のようにして、アナログ [D - Gl n³, 4 Aph (Hor)⁵] - アシリンを合成する。N Boc - 4 Aph (Fmoc) を鎖に付加する前に、6 位の D - 4 Aph をアセチル化する。実施例 5 D のようにして、4 Aph 側鎖の脱保護の後、ヒドロオロチン酸との反応を行う。次いで、合成の完了および精製の後、ペプチド Ac - D - 2 NaI - D - 4 Cpa - D - Gl n - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Aph (アセチル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂が、RP - HPLC 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 95 パーセントより高いと推定される。MS 分析によって、質量 1610.9 Da が示されるが、これは期待される質量 1610.8 Da によく相応する。HPLC の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。このペプチドをラットの標準 in vivo LH 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、1 日目、2 日目、および 3 日目には、LH レベルの抑制においてアシリンとほぼ同等の活性を有することが示され、96 時間後には、アシリンよりも非常に低いレベルにまで LH が抑制されることが示される。該ペプチドは、長時間作用するものと考えられる。

実施例 7 B

実施例 7 A で示した合成を繰り返して、D - Gl n³ の代わりに D - Gl n (Me)³ としたペプチドを生成する。単に N Boc - D - Gl n (Me) の代わりに N Boc - D - Gl n を用いることとする。あるいは、Boc - D - Gl n (OFm) を付加し、フルオレニルメチルエステル側鎖保護基を取り除いた後、DIEA および BOP (ベンゾトリアゾイル - N - オキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート) の存在下、NH₂Cl₃・HCl との反応を行い、N - メチルアミノを形成する。次いで、実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド Ac - D - 2 NaI - D - 4 Cpa - D - Gl n (メチル) - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Aph (アセチル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂が、RP - HPLC 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。MS 分析によって、質量 1624.8 Da が示されるが、これは期待される質量 1624.8 Da によく相応する。HPLC の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、アシリンとほぼ同じ期間作用することが示される。このペプチドは、3日間は等しい効果を有し、4日目を過ぎると少々効果が低下する。

実施例 7 C

実施例 7 A で示した合成を繰り返すが、N Boc - D - 4 A p h (F m o c) の代わりに N Boc - D - 4 A m f (F m o c) を用い、次いで N Boc - 4 A p h (F m o c) を鎖に付加する前に、その脱保護した側鎖を t - ブチルイソシアネートと反応させる。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A p h (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (カルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は98パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1625.8 Da が示されるが、これは期待される質量1625.8 Da によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

10

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、2日間から3日間、アシリンとほぼ同じ効果を有することが示される。

実施例 7 D

実施例 7 C の合成に概ね従って、[N - M e C b m - D - 2 N a l¹、D - G l n³、4 A p h (H o r)⁵、D - 4 A p h (C b m)⁶] - アンチドを合成する。しかしながら、N - 末端の修飾後まで、F m o c 保護を4 A p h から取り除かない。N - 末端の脱保護の後、- アミノ基をイソシアネートと反応させる。次いで、実施例 7 A のようにして、F m o c 保護を取り除き、4 A p h を L - ヒドロオロチン酸と反応させる。次いで、実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を行う。ペプチド N - メチルカルバモイル - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A p h (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (カルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は99パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1640.8 Da が示されるが、これは期待される質量1640.8 Da によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

20

30

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、2日間から3日間、アシリンとほぼ同じ効果を有することが示される。

実施例 7 E

実施例 7 C で示した合成を繰り返すが、D - 4 A m f の脱保護した側鎖との反応を行うときに t - ブチルイソシアネートの代わりにメチルイソシアネートを用いる。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A p h (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (メチルカルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は99パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1639.7 Da が示されるが、これは期待される質量1639.8 Da によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

40

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、2日間から3日間、アシリンとほぼ同じ効果を有することが示される。

実施例 7 F

N Boc - D - 4 A p h (F m o c) の代わりに N Boc - D - 4 A m f (F m o c)

50

を用い、実施例 7 C で示した合成を繰り返して、[D - G l n³、4 A m f (H o r)⁵、D - 4 A m f (C b m)⁶] - アンチドのアナログを生成する。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A m f (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (カルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。M S 分析によって、質量 1639.7 D a が示されるが、これは期待される質量 1639.8 D a によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

このペプチドをラットの標準 i n v i v o L H 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、効果が持続し、4 日後からアシリンよりも少々良好となる。

実施例 7 G

実施例 7 C で示した合成を繰り返すが、4 A p h の脱保護した側鎖との反応において L - ヒドロオロト酸の代わりに D - ヒドロオロト酸を用いて、アナログ [N - M e C b m - D - 2 N a l¹、D - G l n³、4 A p h (D - H o r)⁵、D - 4 A m f (C b m)⁶] - アンチドを生成する。イソシアネートとの反応が行われるときにペプチド樹脂がヒドロオロト酸を含有する別のプロトコールを用いるならば、D I E A などの塩基を添加せずに、3 等量の特定のイソシアネートのみを用いる。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド N - メチルカルバモイル - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A p h (D - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (カルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。M S 分析によって、質量 1640.7 D a が示されるが、これは期待される質量 1640.8 D a によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

このペプチドをラットの標準 i n v i v o L H 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量において、該ペプチドは、短期間作用を示し、1 日間はアシリンと近似した効果であり、その後効果が非常に急速に低下した。

実施例 7 H

実施例 7 D で示した合成を繰り返すが、4 A p h の脱保護した側鎖との反応において L - ヒドロオロト酸の代わりに L - I m z を用いて、アナログ [N - M e C b m - D - 2 N a l¹、D - G l n³、4 A p h (I m z)⁵、D - 4 A m f (C b m)⁶] - アンチドを生成する。実施例 1 に記載したように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド N - メチルカルバモイル - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A p h (I m z) - D - 4 A m f (カルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性であり、2 日間から 3 日間、アシリンとほぼ同じ L H 抑制効果を有する。

実施例 7 I

実施例 7 F で示した合成を繰り返すが、D - 4 A m f の脱保護した側鎖との反応において t - ブチルイソシアネートの代わりにメチルイソシアネートを用いて、[D - G l n³、4 A m f (H o r)⁵、D - 4 A m f (M e C b m)⁶] - アンチドのアナログを生成する。実施例 1 に記載したように、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - D - G l n - S e r - 4 A m f (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (メチルカルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂ が、R P - H P L C 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は 98 パーセントより高いと推定される。M S 分析によって、質量 1653.7 D a が示されるが、これは期待される質量 1653.8 D a によく相応する。H P L C の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる

10

20

30

40

50

。このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、3日間アシリンとほぼ同等の効果を有し、4日目を過ぎても効果が持続していることが示される。

実施例 7 J

N Boc-D-4Aph(Fmoc)の代わりにN Boc-D-4Amf(Fmoc)を用いて、実施例 7 Aで示した合成を繰り返し、[D-Gln³, 4Amf(Hor)⁵]-アシリンのアナログを生成する。ペプチドAc-D-2Nal-D-4Cpa-D-Gln-Ser-4Amf(L-ヒドロオロチル)-D-4Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は99パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1624.8Daが示されるが、これは期待される質量1624.8Daによく相応する。HPLCの結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

10

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、3日後および4日後の双方ともアシリンに近似した効果を有することが示される。

実施例 7 K

N Boc-D-Glnの代わりにN Boc-D-Asnを用いることを除いて、実施例 7 Aで示した概要のようにして、[D-Asn³, 4Aph(Hor)⁵]-アシリンのアナログを合成する。ペプチドAc-D-2Nal-D-4Cpa-D-Asn-Ser-4Aph(Hor)-D-Aph(アセチル)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は99パーセントより高いと推定される。MS分析によって、質量1596.9Daが示されるが、これは期待される質量1596.7Daによく相応する。HPLCの結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

20

このペプチドをラットの標準 *in vivo* LH抑制試験でアッセイすることにより、50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、2日間LHレベルの抑制についてアシリンとほぼ同様の活性を有し、3日後にはアシリンよりも低いレベルにまでLHが抑制されることが示される。

30

実施例 7 L

D-4Amfを6位の残基として用いることを除いて、実施例 7 Aで示した概要のようにして、アナログ[D-Asn³, 4Aph(Hor)⁵, D-4Amf(Cbm)⁶]-アシリンを合成する。D-4Amfを脱保護した後、鎖を延長するためにBocを取り除く前に、これをt-ブチルイソシアネートと反応させる。ペプチドAc-D-2Nal-D-4Cpa-D-Asn-Ser-4Aph(Hor)-D-Amf(Cbm)-Leu-Lys(イソプロピル)-Pro-D-Ala-NH₂が、RP-HPLC精製で得られる。このペプチドは、LH分泌抑制の生物活性を有する。

実施例 8

40

3位にN Boc-D-Glnの代わりにN Boc-Glnを用いることを除いて、実施例 7で示した合成を繰り返して、ペプチド[Gln³]-アシリンを合成する。ペプチドAc-D-2Nal-D-4Cpa-Gln-Ser-4Aph(Ac)-D-4Aph(Ac)-Leu-Lys-Pro-D-Ala-NH₂(ペプチド番号8)が、RP-HPLC精製で得られる。該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は99パーセントより高いと推定される。LSIMS分析によって、質量1512.7Daが示されるが、これは計算質量1512.7Daと一致する。HPLCの結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。実施例 1のように *in vivo* でLH抑制を検査したとき、このペプチドは、アシリンとほぼ同じ生物活性持続時間を示し、4日間にわたってアシリンとほぼ等しい。このペプチドは、長時間作用すると考えら

50

れる。

実施例 8 A

N - Boc - D - Gln の代わりに N - Boc - Gln を用い、実施例 7 A で示したようにして、アナログ [Gln³, 4 Aph (Hor)⁵] - アシリンを合成する。ペプチド Ac - D - 2 Nal - D - 4 Cpa - Gln - Ser - 4 Aph (Hor) - D - 4 Aph (アセチル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製で得られ、該ペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は約 99 パーセントであると推定される。MS 分析によって、質量 1610.7 Da が示されるが、これは計算質量 1610.8 Da に良く相応する。HPLC の結果から、このペプチドがアシリンよりも親水性であることが分かる。

10

このペプチドをラットの標準 in vivo LH 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、4 日間にわたって、LH レベルの抑制についてアシリンとほぼ同等の効果であることが示される。このペプチドは、長時間作用すると考えられる。

実施例 8 B

実施例 7 A で示した合成を繰り返して、D - Gln³ の代わりに Gln (Me)³ としたペプチドを生成する。単に N - Boc - D - Gln (Me) の代わりに N - Boc - D - Gln を用いる。ペプチド Ac - D - 2 Nal - D - 4 Cpa - Gln (メチル) - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Aph (アセチル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、アシリンとほぼ同じ作用期間である。

20

実施例 8 C

実施例 8 A で示した合成を繰り返すが、N - Boc - D - 4 Aph (Fmoc) の代わりに N - Boc - D - 4 Amf (Fmoc) を用い、次いで脱保護した側鎖を t - ブチルイソシナネートと反応させる。ペプチド Ac - D - 2 Nal - D - 4 Cpa - Gln - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Amf (カルバモイル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。このペプチドは、実質的に均質であると判断され、その純度は約 99 パーセントより高いと推定される。MS 分析によって、質量 1625.6 Da が示されるが、これは計算質量 1625.8 Da に一致する。

30

このペプチドをラットの標準 in vivo LH 抑制試験でアッセイすることにより、50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、24 時間アシリンとほぼ同等の効果である生物活性を有することが示される。2 日目に、LH 抑制がアシリンよりも少々低下し、その後急速にその効果が低下する。

実施例 8 D

D - 4 Amf の脱保護した側鎖との反応を行うときに t - ブチルイソシナネートの代わりにメチルイソシナネートを用いて、実施例 8 C で示した合成を繰り返す。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド Ac - D - 2 Nal - D - 4 Cpa - Gln - Ser - 4 Aph (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Amf (メチルカルバモイル) - Leu - Lys (イソプロピル) - Pro - D - Ala - NH₂ が、RP - HPLC 精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50 マイクログラムの用量で、該ペプチドは、2 ~ 3 日間アシリンとほぼ同じ効果を示す。

40

実施例 8 E

N - Boc - D - 4 Aph (Fmoc) の代わりに N - Boc - D - 4 Amf (Fmoc) を用いて、実施例 8 C で示した合成を繰り返す。ペプチド [Gln³, 4 Amf (Hor)⁵, D - 4 Amf (Cbz)⁶] - アンチドを生成する。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド Ac - D - 2 Nal - D - 4 Cpa - Gln - Ser - 4 Amf (L - ヒドロオロチル) - D - 4 Amf (カル

50

バモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂が、R P - H P L C精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、4日間にわたってアシリンとほぼ同等の効果を示す。

実施例 8 F

D - 4 A m f の脱保護した側鎖との反応において t - ブチルイソシアネートの代わりにメチルイソシアネートを用いて、実施例 8 E で示した合成を繰り返す。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - G l n - S e r - 4 A m f (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A m f (メチルカルバモイル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂が、R P - H P L C精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、3日間アシリンとほぼ同等の効果を示す。

10

実施例 8 G

N B o c - D - 4 A p h (F m o c) の代わりに N B o c - D - 4 A m f (F m o c) を用いて、実施例 8 A で示した合成を繰り返す。ペプチド [G l n³, 4 A m f (H o r)⁵] - アシリンのアナログを生成する。実施例 1 に記載したようにして、樹脂から切断し、脱保護し、続いて精製を順次行う。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - G l n - S e r - 4 A m f (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A p h (アセチル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂が、R P - H P L C精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、3日間にわたってアシリンとほぼ同等の効果を示す。

20

実施例 8 H

実施例 7 A で示した合成を繰り返して、D - G l n³の代わりに A s n³としたペプチドを生成する。単に N B o c - D - G l n を N B o c - A s n の代わりに用いる。ペプチド A c - D - 2 N a l - D - 4 C p a - A s n - S e r - 4 A p h (L - ヒドロオロチル) - D - 4 A p h (アセチル) - L e u - L y s (イソプロピル) - P r o - D - A l a - N H₂が、R P - H P L C精製で得られる。このペプチドは、アシリンよりも親水性である。50マイクログラムの用量で、該ペプチドは、アシリンとほぼ同じ作用期間を示す。

実施例 9

30

実施例 1 から 8 で概要を述べた手順を用いて、以下の G n R H 拮抗物質ペプチドも調製する：

[A c r - D - 2 N a l¹, 4 F D - P h e², D - D p r (M e C b m)³] - アシリン
[B z - D - 2 N a l¹, 4 N O₂ D - P h e², D - D p r (M e C b m)³, 4 A p h (H o r)⁵] - アシリン

[F o r - D - 2 N a l¹, 4 O C H₃ D - P h e², D - D p r (M e C b m)³, 4 A m f (H o r)⁵] アシリン

[B z - D - 2 N a l¹, 4 B r D - P h e², D - D p r (M e C b m)³, D - 4 A p h (I m z)⁶] - アシリン

[P n - D - 2 N a l¹, 4 C H₃ D - P h e², D - D p r (M e C b m)³, 4 A p h (M e C b m)⁵] - アシリン

40

[B y - D - 2 N a l¹, 3, 4 C l₂ D - P h e², D - D p r (M e C b m)³, 4 A p h (C b m)⁵] - アシリン

[V l - D - 2 N a l¹, 4 N O₂ D - P h e², D - G l n³, D - 4 A p h (C b m)⁶] - アシリン

[V a c - D - 2 N a l¹, C M e₄ C l D - P h e², D - G l n³, 4 A p h (H o r)⁵] - アシリン

[P n - D - 2 N a l¹, D - G l n³, A p h (I m z)⁵, D - 3 A m f (H o r)⁶, A g l¹⁰] - アンチド

[A c r - D - 2 N a l¹, D - G l n³, 4 A h p (H o r)⁵, A r g⁸, D - A g l (

50

- Me)¹⁰] - アシリン
 [MeCbm - D - 2Na1¹, D - Gl n³, 4Aph (Cbm)⁵, Ag1 (Me)¹⁰] - アシリン
 [Cbm - D - 2Na1¹, D - Dpr (MeCbm)³, 4Amf (MeCbm)⁵, D - Ag1¹⁰] - アシリン
 [EtCbm - D - 2Na1¹, D - Dpr (MeCbm)³, 4Amf (iprCbm)⁵, Pro⁹NHCH₂CH₃] - アシリン
 [Acr - D - 2Na1¹, D - Gl n³, 4Aph (Imz)⁵, D - 4Amf (Cbm)⁶, Ala¹⁰] - アンチド
 [Cbm - D - 2Na1¹, D - Dpr (Cbm)³, 4Aph (MeCbm)⁵, Arg (Et₂)⁸] - アシリン 10
 [D - Dpr (Cbm)³, 4Ahp (Hor)⁵, D - 4Ahp (Imz)⁶, D - Ag1¹⁰] - アンチド
 [Ac - D - 1Na1¹, D - Gl n³, 3Amf (Hor)⁵, D - 4Amf (Hor)⁶, Arg⁸] - アンチド
 [PrCbm - D - 2Na1¹, D - Gl n³, D - 3Aph (EtCbm)⁶, Pro⁹NHCH₂CH₃] - アシリン
 [D - Dpr (MeCbm)³, 4Amf (Hor)⁵, AzaGly¹⁰] - アンチド
 [D - Dpr (Cbm)³, 4Amf (Hor)⁵, D - Cit, Har⁸] - アシリン
 [D - Dpr (EtCbm)³, 4Aph (Hor)⁵, D - 4Aph (D - Imz)⁶, Gly¹⁰] - アンチド 20
 [D - Dpr (Cbm)³, D - Hci⁶, Ag1 (Me)¹⁰] - アンチド
 [D - Gl n³, 4Aph (Hor)⁵, D - 2Pal⁶, Har⁸, Ala¹⁰] - アンチド
 [D - Dpr (Cbm)³, 4Aph (Hor)⁵, D - 4Aph (For)⁶, D - Ag1 (Me)¹⁰] - アンチド
 [D - Dpr (EtCbm)³, 4Aph (Hor)⁵, D - 4Aph (atz)⁶, Har (Et₂)⁸] - アンチド
 [D - Gl n³, 4Aph (Hor)⁵, D - 4Aph (iprCbm)⁶, D - Ag1¹⁰] - アンチド
 [For - D - 1Na1¹, D - Dpr (EtCbm)³, 4Amf (Hor)⁵, D - 4Amf (atz)⁶] - アンチド 30

これらのペプチドはLHの分泌を阻害する生物作用能を有する。

実施例 10

実施例 1 から 5、および米国特許第 5、491、217 号に概要を述べた手順を用いて、以下の GnRH 拮抗物質ペプチドも調製する：

- [D - Dpr (MeCbm)³, N Me4Aph (Ac)⁵] - アシリン
 [D - Dpr (Cbm)³, N Me4Aph (Ac)⁵] - アシリン
 [D - Dpr (EtCbm)³, N Me4Aph (Ac)⁵] - アシリン
 [D - Dpr (iprCbm)³, N Me4Aph (Ac)⁵] - アシリン
 [D - Dpr (MeCbm)³, N Me4Aph (Hor)⁵] - アシリン 40
 [D - Dpr (MeCbm)³, N Me4Aph (Hor)⁵, D - Aph (Hor)⁶] - アシリン
 [D - Dbu (MeCbm)³, N Me4Aph (Hor)⁵] - アシリン
 [D - Dpr (MeCbm)³, N Me4Aph (Hor)⁵, D - 4Amf (Cbm)⁶] - アシリン
 [Dpr (MeCbm)³, N Me4Aph (Cbm)⁵, D - 4Aph (Cbm)⁶] - アシリン
 [Dpr (Cbm)³, N Me4Aph (Hor)⁵, D - 4Amf (Cbm)⁶] - アシリン
 [D - Gl n³, N Me4Aph (Ac)⁵] - アシリン 50

[D - G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン
 [D - G l n³ (M e), N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン
 [D - G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [N Me C b m¹, D - G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [D - G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (M e C b m)⁶] - アシリン
 [D - G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [N Me C b m¹, D - G l n³, N Me₄ A p h (D - H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン 10
 [N Me C b m¹, D - G l n³, N Me₄ A p h (I m z)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [D - G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵, D - 4 A m f (M e C b m)⁶] - アシリン
 [D - G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵] - アシリン
 [D - A s n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン
 [D - A s n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A p h (A c)⁵] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン
 [G l n³ (M e), N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン 20
 [G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵, D - 4 A m f (M e C b m)⁶] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵, D - 4 A m f (C b m)⁶] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵, D - 4 A m f (M e C b m)⁶] - アシリン
 [G l n³, N Me₄ A m f (H o r)⁵] - アシリン
 [A s n³, N Me₄ A p h (H o r)⁵] - アシリン

実施例 1 1

実施例 1 から 8 に概要を述べた手順を用いて、以下の G n R H 拮抗物質ペプチドも調製する：

[F o r - D - 2 N a l¹, 4 C H₃ D - P h e², G l n³, 4 A m f (H o r)⁵] - アシリン 30
 [B z - D - 2 N a l¹, 4 B r D - P h e², G l n³, D - 4 A p h (I m z)⁶] - アシリン
 [A c r - D - 2 N a l¹, G l n³, 4 A h p (H o r)³, A r g⁸, D - A g l (M e)¹⁰] - アシリン
 [F o r - D - 2 N a l¹, 4 N O₂ D - P h e², G l n³, D - 4 A p h (C b m)⁶] - アシリン
 [B z - D - 2 N a l¹, C Me₄ C l D - P h e², G l n³, 4 A p h (H o r)⁵] - アシリン
 [P n - D - 1 N a l¹, G l n³, 3 A p h (I m z)⁵, D - 3 A m f (H o r)⁶, A g l¹⁰] - アンチド 40
 [M e C b m - D - 2 N a l¹, G l n³, 4 A p h (C b m)⁵, A g l (M e)¹⁰] - アシリン
 [P r C b m - D - 2 N a l¹, G l n³, D - 4 A p h (E t C b m)⁶, P r o⁹ N H C H₂ C H₃] - アシリン
 [G l n³, 4 A p h (H o r)⁵, D - 4 A p h (i p r C b m)⁶, D - A g l¹⁰] - アンチド
 [G l n³, 4 A p h (H o r)⁵, D - 3 P a l⁶, H a r⁸, A l a¹⁰] - アンチド
 [A c - D - 1 N a l¹, G l n³, 4 A m f (H o r)⁵, D - 4 A m f (H o r)⁶, A r g⁸] - アンチド 50

[Gln³, 3Amf(Hor)⁵, D-Cit⁶, Har⁸] - アシリン

[Gln³, 4Aph(Hor)⁵, D-4Aph(atz)⁶, Har(Et₂)⁸] - アンチド

[For-D-1Nal¹, Gln³, 3Amf(Hor)⁵, D-4Amf(atz)⁶] - アンチド

[Acr-D-2Nal¹, Gln³, 4Aph(Imz)⁵, D-4Amf(Cbm)⁶, Ala¹⁰] - アンチド

これらのペプチドは、LH分泌を抑制する生物作用能を有し、かつ生理的pHの水に極めて良好な溶解性を有する。

アッセイした前述の化合物は、LH抑制の観点から、アンチドとして知られるGnRH拮抗物質ペプチドに少なくとも概ね匹敵する程度の生物作用能を示すことが示され、これらはアンチドのアナログであると考えられる。この地域での10年にわたる熱心な検査の結果として、広く受け入れられている検査で測定した生物作用能は、ゴナドトロピン分泌を抑制する、したがって抗生殖効果および抗排卵効果を示す、このような化合物の生物作用能についての証拠となる。優れた溶解性、*in vivo*でのゲル化に対する抵抗性、長時間持続する生物活性、およびその他の特性に基づき、これらの化合物は、例えば抗排卵剤として、ゴナドトロピン分泌を抑制すること、および生殖腺によるステロイドの放出を阻害することにおいて、一般的に有用であると考えられる。本発明の化合物は、薬剤学的に許容可能な、酸付加塩などの無毒性の塩の形態、例えば、亜鉛、バリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウムなどの金属の錯体の形態（本発明の目的から付加塩として考える）、または双方の組み合わせの形態で、しばしば投与される。このような付加塩の具体例は、塩化水素、臭化水素、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、タンニン酸塩、パモ酸塩（pamoate）、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、アルギン酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、および酒石酸塩などであり、好ましくは酢酸塩と、パモ酸（pamoic acid）の塩であるパモ酸塩とが好ましい。薬効成分を錠剤の形態で投与した場合、その錠剤は、トラガカント、コーンスターチ、もしくはゼラチンなどの結合剤、アルギン酸などの崩壊剤、またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤を含む、薬剤学的に許容可能な無毒性の希釈剤を含んでいてもよい。液剤の形態で投与することを所望する場合、甘味剤および/または香味剤を薬剤学的に許容可能な希釈剤の一部として用いることができるし、等張生理的食塩水またはリン酸緩衝液に入れて静脈投与すると効果があるだろう。

医薬品組成物には、通常、慣用的な薬剤学的に許容可能な担体または希釈剤とともに、有効量のペプチドを含むこととする。通常、用量は、静脈投与する場合、被験体の体重1kgあたり約10マイクログラムから約2.5ミリグラムのペプチドとする。これらの化合物の性質より、経口投与も効果的なものとして行うことができる。しかしながら、経口での用量は多くなるであろう。総合すると、一般にこれらのペプチドによる被験者の治療は、化合物が溶解しやすい適当な担体を用い、患者のLHレベルおよびFSHレベルを抑制するのに十分な用量を投与するといった、他のGnRH拮抗物質を用いた臨床的治療と同様の方法で行う。

長時間にわたって（例えば1回の投与から、1週間から1年間にかけて）、GnRHアナログが運ばれることが望ましく、除放投与形態、貯留（depot）投与形態、または移植投与形態を利用することができる。

これらの化合物は、哺乳動物に、静脈内に、皮下的に、筋肉内に、経口的に、経皮的に、鼻腔内に、肺内に、直腸内に、または腔内に投与することにより、一般にゴナドトロピンの分泌を抑制することができ、例えば、受胎能の抑制および/または制御をすることができ、性早熟症の管理などの生殖腺活性の可逆的抑制が必用となる用途において投与したり、または放射線治療あるいは化学治療の際に投与したりできる。それらは、ステロイド依存性腫瘍の治療にも有用である。効果的な用量は、投与形態および治療される哺乳動物の特定の種類により変化する。ある典型的な投与形態の例は、該ペプチドを含有するpH約6の静菌水溶液であり、その溶液は、1日当たり約0.1/kg体重から2.5mg/kg

10

20

30

40

50

体重の範囲の有効な用量を与えるように非経口的に投与される。これらの化合物は *in vivo* で非常に耐性であって、ゲル化に抵抗性があると考えられる。したがって、注射点におけるゲル化の危険を伴わずに、適当な濃度（約 0.75 mg/ml 以上、さらには約 1.0 mg/ml 以上）の静菌水溶液に入れて、皮下注射投与することに特に良く適していると考えられる。

これらの GnRH 拮抗物質ペプチドは、*in vivo* および *in vitro* での両方の診断にも有用である。これらのペプチドを *in vivo* で注射し、続いてホルモン分泌、例えば LH 分泌の減少の程度を測定するために患者の血流をアッセイすることができる。*in vitro* アッセイを行って、ある種の腫瘍細胞が GnRH に対して感受性であるか否かを測定することができる。このようなアッセイでは、腫瘍細胞培養物を GnRH 拮抗物質ペプチドで処理し、次いでホルモン分泌や細胞増殖をモニタする。

本発明は、その好ましい実施形態に関して述べてきたが、本明細書付属の請求の範囲で述べられている本発明の範囲から逸脱することなく、当技術分野における通常の技術を有する者に明らかな改変や変更をしてもよいものであることを理解しておくべきである。例えば、合成において、鎖の一部の状態としながら修飾するのではなく、 α -アミノ保護アミノ酸をペプチド鎖にカップリングする前に、イソシアネートをアミノ側鎖と反応させてもよい。ペプチドの効果をあまり減じない、当該技術分野で知られた他の置換を、本発明の置換に用いることもできる。ペプチドの有効性を著しく損なわない当該技術分野で知られた他の置換も、本発明ペプチドに用いることもできる。N 末端は非置換のままでもよいし、あるいは他の等価なアシル化基を用いることもできるが、アセチル、置換カルバモイル、または非置換カルバモイルのいずれかが好ましい。4 A p h (A c) の代わりに、アミノ P h e 基を、米国特許第 5,506,207 号で開示されているように、ギ酸、 α -A l a (a t z)、およびガンマ-アミノ酪酸 (a t z) などの他のアシル化剤で処理することができ、これにより実施例中に示されているように同様に、長時間の作用を示す GnRH 拮抗物質を得ることができる。したがって、これらはそれぞれ、D - 4 A p h (A c) および L - 4 A p h (A c) の等価体であると考えられる。A p h もしくは D - A p h の代わりに、A p h (アミノホモフェニルアラニン) もしくは D - A p h を 5 位および 6 位にそれぞれ用いることができる。L y s (B u) および L y s (E t ₂) は双方とも、A r g、A r g (E t ₂)、H a r、および H a r (E t ₂) と同様に、I L y s の等価体であると考えられるが、I L y s が最も好ましい。その他の疎水性アミノ酸残基も、好ましくは D - 異性体形で、1 位および 6 位に用いることができる（前述の通り）が、これらは明細書中で述べられたものの等価体であると考えられる。C - 末端の D - A l a - N H ₂ の代わりに、D - A l a - o l または A l a - o l を等価体として用いてもよい。さらに、拮抗物質を、前述した薬剤学的にまたは獣医学的に許容可能な無毒性塩の形態で投与してもよく、これらは等価体であると考えられる。

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/74 (2006.01) G 0 1 N 33/74

(72)発明者 センプル, グレーメ.
英国 エスオー 5 1 8 ディーピー ハンプシャー ロムジー ステーション ロード 2

審査官 新留 豊

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 2 5 7 4 1 (W O , A 1)
特表平 0 5 - 5 0 3 6 8 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C07K 1/00 - 19/00
G01N 33/00 - 33/98
A61K 38/00 - 38/58