



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20020810A A2

HR P20020810A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 07 K 7/23**

A 61 K 38/09

A 61 P 35/00

A 61 P 5/04

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 10.10.2002.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.12.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP01/02719

Datum podnošenja međunarodne prijave 12.03.2001.

(87) Broj međunarodne objave: WO 01/68676

Datum međunarodne objave 20.09.2001.

(31) Broj prve prijave: 09/525,007

(32) Datum podnošenja prve prijave: 14.03.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Zentaris GmbH, Weismüllerstrasse 45, 60314 Frankfurt, DE
Michael Bernd, Günthersburgallee 52, 60316 Frankfurt, DE
Bernhard Kutscher, Stresemannstrasse 9, 63477 Maintal, DE
Eckhard Günther, Wingertstrasse 176, 63477 Maintal, DE
Peter Romeis, Mühlrainstrasse 16, 63571 Gelnhausen, DE
Thomas Reissmann, Massbornstrasse 44, 60437 Frankfurt am Main, DE
Thomas Beckers, Passavantstrasse 26, 60596 Frankfurt, DE
(74) Punomoćnik: **Mladen VUKMIR, Zagreb, HR**

(54) Naziv izuma:

NOVI LHRH ANTAGONISTI, NJIHOVA PRIPRAVA I UPORABA KAO LIJEKOVA

(57) Sažetak: Izum se odnosi na peptide, koji sadrže komponentu N-metilirane aminokiseline i poboljšane vodene topljivosti. Sukladno izumu, lijekovi sadrže rečene peptide koji se mogu koristiti za liječenje hormon-ovisnih tumora i hormonski izazvanih nemalighnih bolesnih stanja.

HR P20020810A A2

OPIS IZUMA

Izum se odnosi na LHRH antagoniste koji imaju poboljšana svojstva topljivosti, na postupke za pripremu takvih spojeva, lijekove koji sadrže takove spojeve, te uporabu lijekova za liječenje hormon-ovisnih tumora i hormonski izazvanih ne-malignih poremećaja, poput dobroćudne hiperplazije prostate (HPP) i endometriozе.

Nazivlje koje je korišteno za određenje peptida slaže se s onim koje je objašnjeno od strane IUPAC-IUB Komisije za Biokemijsko nazivlje (*European J. Biochem.* 1984, 138, 9-37), u kojem se, u skladu s konvencionalnim predstavljanjem, amino skupine na N terminusu pojavljuju s lijeva, a karboksilna skupina na C terminusu s desna. LH-RH antagonisti poput peptida u skladu s predmetnim izumom uključuju prirodno dobivene i sintetičke aminokiseline, s time da prve uključuju Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp i His. Skraćenice za pojedinačne aminokiselinske skupine temelje se na trivijalnim imenima aminokiselina i one su Ala=alanin, Arg=arginin, Gly=glicin, Leu=leucin, Lys=lizin, Phe=fenilalanin, Cpa=4-kloro fenilalanin, Pro=prolin, Ser=serin, Thr=treonin, Trp=triptofan, Try=tirozin i Sar=sarkozin. Sve ovdje opisane aminokiseline potječu od L serija, ako nije navedeno drugačije. Na primjer, D-Nal (2) je skraćenica za 3-(2-naftil)-D-alanin, a Ser je skraćenica za L-serin. Supstitucije na ε amino skupini u postranjskom lancu lizina predstavljene su nazivom stavljenim u zagrade iza Lys, ako je prikladno u obliku skraćenice.

Druge skraćenice koje su korištene su:

Ac	Acetil
B	4-(4-Amidinofenil)amino-1,4-dioksobutil
Boc	terc-Butiloksikarbonil
Bop	Benzotriazol-1-oksi-tris(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat
DCC	Dicikloheksilkarbodiimid
DCM	Diklorometan
Ddz	Dimeprotoksi-fenil-dimetilmetilenoksi-karbonil (dimeprotoksi-dimetil-Z)
DIC	Diizopropilkarbodiimid
DIPEA	N,N-Diizopropiletilamin
DMF	Dimetilformamid
Fmoc	Fluorenilmetiloksikarbonil
HF	Fluorovodična kiselina
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	Visokotlačna tekuća kromatografija
Me	Metil
TFA	Trifluoroctena kiselina
Z	Benziloksikarbonil

Peptidi u skladu s predmetnim izumom su analozi hormona za oslobađanje luteinizacijskog hormona (LH-RH) koji ima sljedeću građu:
p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Lcu-Arg-Pro-Gly-NH₂, [LH-RH, gonadorelin].

Više od 20 godina istraživači su tražili selektivne potentne antagoniste LH-RH deka-peptida [M. Karten i J.E. Rivier, *Endocrine Reviews* 7, 44-66 (1986)]. Veliko zanimanje za takove antagoniste temelji se na njihovoj korisnosti u području endokrinologije, ginekologije, kontracepcije i raka. Znatno broj spojeva pripremljeni su kao potencijalni LH-RH antagonisti. Najzanimljiviji spojevi koji su do danas otkriveni su oni čija struktura je modifikacija LH-RH strukture.

Prva serija potentnih antagonista dobivena je uvođenjem ostataka aromatskih aminokiselina na pozicije 1, 2, 3 i 6 ili pak (na pozicije) 2, 3 i 6. Uobičajeni način označavanja spojeva je sljedeći: prvo se označavaju amino kiseline koje su zauzele mjesto amino kiselina izvorno nazočnih u peptidnom lancu LH-RH, a pozicije na kojim je došlo do zamjene označavaju se brojevima u superskriptu. Osim toga, notacijom "LH-RH" koja potom slijedi označava se da je riječ o LH-RH analozima u kojima je došlo do zamjene.

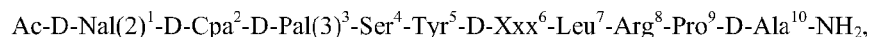
Poznati antagonisti su:
[Ac-D-Cpa^{1,2}, D-Trp^{3,6}] LH-RH (D.H. Coy i sur., u: Gross, E. and Meinhofer, J. (Eds.): *Peptides, Proceedings of the 6th American Peptide Symposium*, pp. 775-779, Pierce Chem. Co., Rockville Ill. (1979);
[Ac-Pro¹, D-Cpa², D-Nal(2)^{3,6}] LH-RH (S.A.D. Patent No. 4,419,347) i [Ac-Pro¹, D-Cpa², D-Trp^{3,6}] LH-RH (J.L. Pineda i sur., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56, 420, 1983).

U svrhu poboljšanja djelovanja antagonista, kasnije su na poziciju 6 uvedene bazične aminokiseline, primjerice D-Arg. Na primjer, [Ac-D-Cpa^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰] LH-RH (ORG 30276) (D.H. Coy i sur., Endocrinology 100, 1445, 1982), te

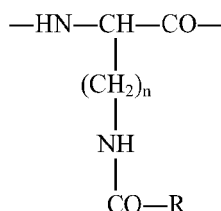
[Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶] LH-RH (ORF 18260) (J.E. Rivier i dr., in: Vickery B.H. Nestor, Jr. J.J., Hafez, E.S.E (Eds.), LHRH i njegovi analozi, pp. 11-22 MTP Press, Lancaster, UK 1984).

Sljedeći potentni antagonisti LH-RH opisani su u WO 92/19651; WO 94/19370; WO 92/17025; WO 94/14841; WO 94/13313; S.A.D. 5,300,492; S.A.D. 5,140,009; EP 0 413 209 A1 i DE 195 44 212 A1.

Potonji (patent) otkriva spojeve koji imaju modificiranu ornitinsku ili lizinsku jedinicu na poziciji 6 i koji su u skladu sa sljedećom formulom:

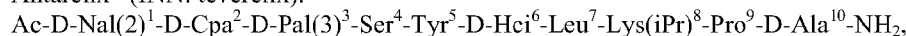


a D-Xxx je aminokiselinska skupina opće formule (VI)

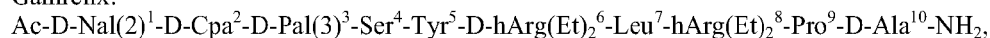


Sljedeći poznati antagonisti LH-RH su antarelix, ganirelix i cetorelix.

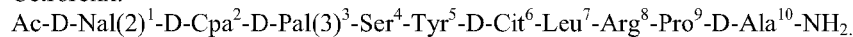
Antarelix[®] (INN: teverelix):



Ganirelix:

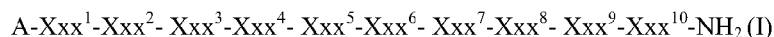


Cetorelix:



Cilj predmetnog izuma je stvoriti nove antagoniste LH-RH koji imaju povećanu enzimsku stabilnost i znatno poboljšanu topljivost u vodi.

Rečeni cilj je postignut spojevima sljedeće opće formule (I):



gdje je :

A	acetilna skupina,
Xxx ¹	D-Nal(2),
Xxx ²	D-Cpa,
Xxx ³	D-Pal(3),
Xxx ⁴	Ser,
Xxx ⁵	N-Me-Tyr,
Xxx ⁶	D-Cit, D-Hci ili D-[⁻ -N'-4-(4-amidinofenil)-amino-1,4-dioksibutil]Lys (skraćenica: D-Lys(B)),
Xxx ⁷	Leu ili Nle,
Xxx ⁸	Arg ili Lys (iPr),
Xxx ⁹	Pro, a
Xxx ¹⁰	D-Ala ili Sar,

uz uvjet da

Ako je Xxx⁶ D-Lys(B), onda je Xxx⁷ Nle;
Ako je Xxx⁶ D-Cit, onda je Xxx⁷ Nle, a Xxx¹⁰ je D-Ala; ili
Ako je Xxx⁶ D-Hci, onda je Xxx⁷ Leu, a Xxx¹⁰ je D-Ala,

te njihovim solima s farmaceutski prihvatljivim kiselinama, a naročito acetati, embonati i trifluoroacetati.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, naročito su poželjni sljedeći spojevi i njihove soli s farmaceutski prihvatljivim kiselinama:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4-Cl)²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, spojevi prema predmetnom izumu pojavljuju se kao acetatna, trifluoracetatna ili cmbonatska sol.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, spojevi prema predmetnom izumu mogu se koristiti kao lijekovi ili farmaceutski pripravci.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, omogućeni su farmaceutski pripravci koji sadrže barem jedan od spojeva prema predmetnom izumu i uobičajena sredstva isporuke i ekscipijente.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, omogućen je postupak za pripravu spojeva opće formule I u skladu s predmetnim izumom, kod kojih su dijelovi jedinica Xxx^m opremljeni prikladnim zaštitnim skupinama, m je cijeli broj u rasponu od 1 – 10, Xxx¹ je acetiliran, sintetiziraju se u krutoj fazi ili otopini u skladu s uobičajenim postupcima, a potom se dijelovi vezuju na krutu fazu sprežanjem segmenata, a po dovršetku sprežanja, spojevi opće formule I uklanjaju se iz krute faze uporabom uobičajenih postupaka s amidacijom na jedinici Xxx¹⁰.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, omogućena je uporaba spojeva prema predmetnom izumu u proizvodnji lijekova za liječenje za hormon-ovisnih tumora, naročito raka prostate ili dojke, te za ne-maligne indikacije čije liječenje zahtijeva supresiju LH-RH hormona.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, omogućen je postupak za proizvodnju farmaceutskih pripravaka, pri čemu se barem jedan od spojeva iz Patentnih zahtjeva 1 - 10 miješa s uobičajenim sredstvima isporuke i ekscipijensima te pripravlja kao lijek.

Prema sljedećem aspektu predmetnog izuma, omogućen je postupak za liječenje hormon-ovisnih tumora, naročito raka prostate, raka dojke ili mioma maternice, te za ne-maligne indikacije čije liječenje zahtijeva supresiju LH-RH hormona, poput endometrioze, dobroćudne hiperplazije prostate (BHP), te za liječenje poremećaja plodnosti kod mužjaka i ženki sisavaca, a posebice ljudi, davanjem učinkovite doze jednog od spojeva prema predmetnom izumu.

Spojevi prema predmetnom izumu mogu se koristiti za liječenje hormon-ovisnih tumora, naročito raka prostate, raka dojke ili mioma maternice, te za ne-maligne indikacije čije liječenje zahtijeva supresiju LH-RH hormona, poput endometrioze ili dobroćudne hiperplazije prostate (BHP). Osim toga, (rečeni spojevi) se mogu koristiti za liječenje poremećaja plodnosti kod muškaraca i žena, na primjer za kontroliranu superstimulaciju jajnika tijekom in-vitro oplodnje. U tu svrhu se (rečeni spojevi) obično miješaju s konvencionalnim sredstvima isporuke i ekscipijentima, te se pripravlja kao lijekovi u skladu s dobro poznatim postupcima.

Sinteza spojeva u skladu s formulom (I) može se izvoditi ili klasičnom kondenzacijom fragmenata ili sintezom u krutoj fazi prema Merrifieldu, pri čemu sinteze slijede jedna drugu uz uporabu D-lizina koji je već u postranjskom lancu aciliran karboksilnom kiselinom opće formule R¹ - COOH ili reakcijom dekaeptidne jedinice s prikladnim karboksilnim kiselinama amidnom vezom u postranjskom lancu D-lizina⁶. Prema tome, uvođenje R¹ - CO skupine može se izvesti u tri različite faze postupka: prije kondenzacije pojedinačnih jedinica kako bi se dobio peptid; nakon uključivanja lizina ili ornitina u peptidni lanac, ali prije kondenzacije sljedeće jedinice ili pak nakon kondenzacije svih jedinica.

Spojevi formule (I) se sintetiziraju prema poznatim postupcima poput, primjerice, čiste tehnike krute faze, tehnike djelomične krute faze (tzv. kondenzacija fragmenata) ili klasičnim sprežanjem u otopini (vidi M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag, 1984).

- 5 Na primjer, postupci sinteze u krutoj fazi opisani su u udžbeniku "Solid Phase Peptide Synthesis", J.M. Stewarta i J.D. Younga, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill. 1984, te u G. Barany i R.B. Merrifield "The Peptides", Ch. 1, pp. 1-285, 1979, Academic Press Inc. Klasične sinteze u otopini potanko su opisane u prilogu "Methoden der Organischen Chemie [Postupci u organskoj kemiji] (Houben - Weyl), Synthese von Peptiden" [Sinteza peptida] E. Wünsch (Editor) 1974, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Njemačka.

10

Postupna sinteza izvodi se, primjerice, na sljedeći način: prvo se kovalentno spoji amino kiselina na karboksi-terminusu, čija je α -amino skupina zaštićena netopljivim uporištem na uobičajen način, ukloni se α -amino zaštitna skupina rečene amino kiseline, spoji se na taj način dobivena slobodna amino skupina na sljedeću zaštićenu amino kiselinu preko njezine karboksilne skupine, te se na taj način vežu uobičajene amino kiseline peptida koji se sintetizira u ispravan slijed

15 korak po korak, te se nakon vezivanja svih amino kiselina s uporišta ukloni dovršeni peptid i uklone sve eventualne preostale postranjske zaštitne skupine na funkcijama. Postupna kondenzacija se izvodi na uobičajeni način, sintezom iz odgovarajućih amino kiselina koje su zaštićene na uobičajeni način.

Vezivanje pojedinačnih amino kiselina jedne na drugu izvodi se za to uobičajenim postupcima; naročito su prikladni:

- 20
- Simetrični postupak s anhidridom u nazočnosti dicikloheksilkarbodiimida ili diizopropilkarbodiimida (DCC, DIC)
 - Općenito postupak s karbodiimidom
 - Postupak s karbodiimidom/hidroksibenzotriazolom (vidi: The Peptides, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meinhofcr).

Kod sprežanja fragmenata, poželjna je uporaba azidnog sprežanja koje se nastavlja bez rasemizacije, ili postupak s

25 DCC-1-hidroksibenzotriazolom ili DCC-3-hidroksi-4-okso-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazinom. Također se mogu rabiti i aktivirani esteri fragmenata .

Esteri N-zaštićenih amino kiselina, poput, primjerice, N-hidroksisukcinamid estera ili 2,4,5-triklorofenil estera, izrazito su prikladni za postupnu kondenzaciju amino kiselina. Aminoliza se može jako dobro katalizirati N-hidroksi spojevima

30 čija kiselost je otprilike jednaka onoj octene kiseline, poput, primjerice, 1-hidroksibenzotriazola.

Intermedijerne zaštitne amino skupine koje se pojavljuju su skupine koje se uklanjaju hidrogenacijom, poput, primjerice, benziloksikarbonil radikala (= Z radikal)) ili skupine koje se mogu ukloniti slabom kiselinom. Prikladne

35 zaštitne skupine za α -amino skupine su na primjer:

- tercijarne butiloksikarbonil skupine; fluorenilmetil-oksikarbonil skupine; karbobenzoksi skupine ili karbobenzotio
- 40 skupine (ako je prikladno, u oba slučaja s p-bromo- [sic] ili p-nitrobenzil radikalom); trifluoroacetil skupina; ftalil radikal; o-nitrofenoksiacetil skupina; tritil skupina; p-toluensulfonil skupina; benzil skupina; benzil radikali supstituirani u benzenskoj jezgri (p-bromo- ili p-nitrobenzil radikal) i α -feniletil radikal. Ovdje se također upućuje na P. Greenstein and Milton Winitz, Chemistry of Amino Acids, New York 1961, John Wiley and Sons, Inc., Volume 2, na primjer str. 883 i dalje; "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag 1984, "Solid Phase Peptide Synthesis", J.M. Stewart and J.D. Young, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill. 1984; G. Barany and R. B. Merrifield, "The Peptides", Ch. 1, pp. 1-285, 1979, Academic Press Inc., kao i The Peptides, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meinhofcr, Academic Press, New York. Rečene zaštitne skupine su u biti također prikladne kao zaštita sljedećih funkcijskih postranjskih skupina (OH skupine, NH_2 skupine) odgovarajućih amino kiselina.

45

Poželjno je da nazočne hidroksilne skupine (serin, treonin) budu zaštićene benzil i sličnim skupinama. Poželjno je da sljedeće amino skupine koje nisu na α -poziciji (na primjer, amino skupine na ω -poziciji, gvanidino skupina arginina) budu ortogonalno zaštićene.

- 50 Pojedinačne amino kiselinske jedinice, uz izuzetak lizina [*lacuna*] modificiranog pomoću R^1 - CO - skupine, komercijalno su dostupne.

Slijedi prikaz faza jednog od mogućih postupaka za pripravu lizina modificiranog R^1 - CO - skupinom:

- 55
1. Skupina α -karboksilne kiseline prikladno se zaštiti, na primjer esterifikacijom
 2. Zaštiti se ϵ -amino skupina, na primjer Z skupinom
 3. Zaštiti se α -amino skupina (na primjer Boc skupinom) tako da se postigne selektivnost glede kasnijeg uklanjanja amino zaštitnih skupina
 4. Ukloni se Z skupina na ϵ -amino skupini
 5. Uvodi se poželjna skupina R^1 - CO - u ϵ -amino skupinu
 - 60 6. Ukloni se zaštitna skupina α -amino skupine
 7. α -amino skupina se izborno reverzibilno derivira, primjerice sa Z skupinom

Kod uvođenja R¹ - CO - skupine reakcijom amino skupine s lizinom uz prikladnu karboksilnu kiselinu ili derivat karboksilne kiseline, prikladni postupci u osnovi su isti gore opisani postupci za vezivanje amino skupina. Međutim, naročito je poželjna kondenzacija uz uporabu karbodiimida, na primjer 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida i 1-hidroksibenzotriazola.

Reakcija za spajanje amino kiselina odvija se u inernom otapalu ili sredstvu za suspenziju koje je uobičajeno za ovaj tip operacije (na primjer, diklormetan), uz moguće dodavanje dimetilformamida kako bi se poboljšala topljivost.

Prikladna uporišta u sintezi su netopljivi polimeri, na primjer polistirenska smola u obliku zrnaca, a koje u organskom otapalu mogu nabubriti (na primjer, kopolimer polistirena i 1% divinilbenzena). Sintaza zaštićenog deka-peptid amida na metilbenzhidrilaminskoj smoli (MBHA smola, tj. polistirenska smola s metilbenzhidrilaminskim skupinama), što daje traženu amidnu funkciju na C-terminusu peptida nakon HF cijepanja od uporišta, može se izvesti prema sljedećem dijagramu protoka (*flow diagram*):

Dijagram protoka

Proprotokol za sintezu peptida uporabom Boc-zaštićene amino kiseline

Faza	Funkcija	Otapalo / Reagens (v/v)	Vrijeme
1	Ispiranje	Metanol	2 x 2 min
2	Ispiranje	DCM	3 x 3 min
3	Ispiranje	DCM/TFA (1:1)	1 x 30 min
4	Ispiranje	Izopropanol	2 x 2 min
5	Ispiranje	Metanol	2 x 2 min
6	Ispiranje	DCM	2 x 3 min
7	Neutralizacija	DCM/DIPEA (9:1)	3 x 5 min
8	Ispiranje	Metanol	2 x 2 min
9	Ispiranje	DCM	3 x 3 min
10	STOP	Dodavanje Boc-As DCM+DIC+HOBt	u
11	Sprezanje	DCM, izborna DCM/DCF	cca 90 min
12	Ispiranje	Metanol	3 x 2 min
13	Ispiranje	DCM	2 x 3 min

N^α-Boc-zaštićene amino kiseline se obično sprežu u trostruko većem mol- omjeru u nazočnosti diizopropilkarbodiimida (DIC) i 1-hidroksibenzotriazola (HOBt) u CH₂Cl₂/DMF tijekom 90 min, a Boc-zaštitna skupina se ukloni djelovanjem 50%-tne trifluorooctene kiseline (TFA) u CH₂Cl₂ u trajanju od pola sata.

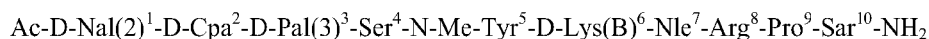
Kako bi se provjerilo da je konverzija potpuna, može se upotrijebiti kloranil test prema Christensenu i Kaiserov ninhidrin test. Radikali slobodnih amino funkcija blokiraju se acetilacijom u peterostrukom omjeru acetilimidazola u CH₂Cl₂. Slijed faza reakcije sinteze peptida na smoli proizlazi iz dijagrama protoka. Kako bi se uklonili peptidi vezani na smole, konkretni konačni proizvod sinteze u krutoj fazi se suši *in vacuo* preko P₂O₅ i tretira s HF/anizolom (10:1/v:v) na 0°C tijekom 60 min u omjeru 500-strukom omjeru.

Nakon destiliranja HF i anizola *in vacuo*, dobiju se peptidni amidi u vidu bijele krutine ispiranjem s bezvodnim etil eterom uz miješanje, a polimerna uporišta se dodatno uklanjaju ispiranjem s vodenom octenom kiselinom jačine 50%. Pomnom koncentracijom otopinā octene kiseline *in vacuo* dobivaju se respektivni peptidi u vidu visoko viskoznih ulja, koja se prevode u bijelu krutinu nakon dodavanja ohlađenog abs. etera.

Daljnje pročišćavanje izvodi se rutinskim postupcima preparativne visokotlačne tekuće kromatografije (HPLC).

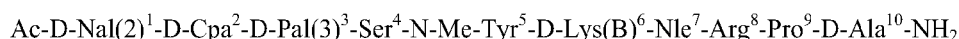
Konverzija peptida u njihove adicijske kiselinske soli izvodi se na dobro poznati način reakcijom (rečenih peptida) s kiselinama. Vrijedi i obratno, slobodni peptidi mogu se dobiti reakcijom njihovih adicijskih kiselinskih soli s bazama. Peptidni embonati mogu se pripremiti reakcijom soli trifluorooctene kiseline respektivnog peptida (TFA soli) sa slobodnom emboničnom kiselinom (pamoičnom kiselinom) ili odgovarajućih dinatrijevih soli embonične kiseline. U tu svrhu peptidna TFA sol se tretira u vodenoj otopini s otopinom dinatrij embonata u polarnoj aprotičnoj sredini, poželjno je dimetilacetamid, a dobiveni žuti talog se izdvoji.

Sljedeći primjeri poslužiti će ilustraciji izuma bez njegova ograničavanja.

Primjer 1 (D-68968):

5 Sinteza dekapeptida izvedena je na polimernom uporištu gustoće punjenja od 0,55 mmol/g (aminometil-supstituirana smola, Fmoc zaštita, tip D-1675, Bachem). Lizin je spregnut kao Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, a Fmoc zaštitne skupine su uklonjene uporabom 20%-tnog piperidin/DMF. Nakon istodobnog uklanjanja svih zaštitnih grupa na postranjskim lancima i odvajanja od polimernog uporišta, izolirani sirovi peptid je pročišćen preparativnom HPLC. Nakon sušenja na niskoj temperaturi, dobiven je dekapeptid jačine 98,5%.

10 Supstitucija na dušiku D-lizina s 4-(4-aminofenil)amino-1,4-diokisbutiričnom kiselinom izvedena je uz uporabu PyBop u DMF-u uz dodavanje DIPEA. Pročišćavanje izdvojenog sirovog peptida izvedeno je preparativnom HPLC. Potom je sušenjem na niskoj temperaturi dobiven proizvod 99%-tne čistoće (trifluoroacetat) empirijske formule $\text{C}_{82}\text{H}_{106}\text{ClN}_{19}\text{O}_{15}$ s točnim FAB-MS 1633 (M+H) (izrač. 1631.78096).

Primjer 2 (D-68969):

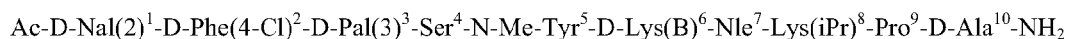
20 Sinteza dekapeptida izvedena je na polimernom uporištu gustoće punjenja od 0,55 mmol/g (aminometil-supstituirana smola, Fmoc zaštita, tip D-1675, Bachem). Lizin je spregnut kao Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, a Fmoc zaštitne skupine su uklonjene uporabom 20%-tnog piperidin/DMF. Nakon istodobnog uklanjanja svih zaštitnih grupa na postranjskim lancima i odvajanja od polimernog uporišta, izolirani sirovi peptid 71%-tnog sadržaja (HPLC) bez pročišćavanja je uključen u daljnju reakciju.

25 Supstitucija D-lizina na postranjskom lancu s 4-(4-aminofenil)amino-1,4-diokisbutiričnom kiselinom izvedena je uz uporabu PyBop u DMF-u uz dodavanje DIPEA. Pročišćavanje izdvojenog sirovog peptida izvedeno je preparativnom HPLC. Potom je sušenjem na niskoj temperaturi dobiven proizvod 98,8%-tne čistoće (trifluoroacetat) empirijske formule $\text{C}_{82}\text{H}_{106}\text{ClN}_{19}\text{O}_{15}$ s točnim FAB-MS 1633 (M+H) (izrač. 1631.78096).

Primjer 3 (D-68971):

35 Sinteza dekapeptida izvedena je na polimernom uporištu gustoće punjenja od 0,55 mmol/g (aminometil-supstituirana smola, Fmoc zaštita, tip D-1675, Bachem). Lizin je spregnut kao Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, a Fmoc zaštitne skupine su uklonjene uporabom 20%-tnog piperidin/DMF. Nakon istodobnog uklanjanja svih zaštitnih grupa na postranjskim lancima i odvajanja od polimernog uporišta, izolirani sirovi peptid (sadržaj oko 59%, HPLC) pročišćen je preparativnom HPLC. Nakon sušenja na niskoj temperaturi, dobiven je dekapeptid jačine 95%.

40 Supstitucija D-lizina na postranjskom lancu s 4-(4-aminofenil)amino-1,4-diokisbutiričnom kiselinom izvedena je uz uporabu PyBop u DMF-u uz dodavanje DIPEA. Pročišćavanje izdvojenog sirovog peptida izvedeno je preparativnom HPLC. Potom je sušenjem na niskoj temperaturi dobiven proizvod 96,6%-tne čistoće (trifluoroacetat) empirijske formule $\text{C}_{82}\text{H}_{112}\text{ClN}_{17}\text{O}_{15}$ s točnim FAB-MS 1648 (M+H) (izrač. 1645.8218).

Primjer 4 (D-68987):

50 Sinteza D-Lys-6-nesupstituiranih dekapeptida izvedena je na 9,09 g polimernog uporišta gustoće punjenja od 0,55 mmol/g, a lizin⁶ je spregnut kao Fmoc-D-Lys(Boc)-OH.

Nakon uklanjanja smole, izdvojeno je 8,15 g sirovog peptida. Pročišćavanje sirovog peptida izvedeno je preparativnom HPLC.

55 Supstitucija D-lizina na postranjskom lancu s 4-(4-aminofenil)amino-1,4-diokisbutiričnom kiselinom izvedena je uz uporabu PyBop u DMF-u uz dodavanje DIPEA. Pročišćavanje izdvojenog sirovog peptida izvedeno je preparativnom HPLC. Potom je sušenjem na niskoj temperaturi dobiven proizvod 94,6%-tne čistoće (trifluoroacetat) empirijske formule $\text{C}_{85}\text{H}_{112}\text{ClN}_{17}\text{O}_{15}$ s odgovarajućim FAB-MS 1646.8 (M+H) (izrač. 1645.82).

60

Primjer 5:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Primjer 6:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Primjer 7:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Primjer 8:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Opći radni postupci za pripravu petida prema primjerima 5 – 8:

Dekapeptidi se mogu pripravljeni podjednako Merrifieldovom sintezom u krutoj fazi (SPSS) [sic] kao i klasičnom kondenzacijom fragmenata u otopini. Sinteza peptidnog slijeda na polimernom uporištu poželjna je iz troškovnih razloga, te se u načelu može izvoditi po izboru (1) *Boc* odnosno (2) *Fmoc* strategijom; prema tome, u oba slučaja može se koristiti ili metilbenzhidralminska smola (za strategiju 1) ili Fmoc-2,4-dimeprotoksi-4'-(karboksimetiloksi)benzhidralminska smola (za strategiju 2) za spajanje D-alanina na C-terminusu.

Sinteza u krutoj fazi, Merrifieldov postupak:

Dekapeptidi se sintetiziraju prema *Fmoc* strategiji pod standardnim uvjetima reakcije (shema protoka, Tablica I) kod sinteze u krutoj fazi, uporabom 5 grama polimernog uporišta Fmoc-2,4-dimetoksi-4'-(karboksimetiloksi)benzhidrilaminska smola, Bachem 1675, gustoće punjenja 0,55 mmol/gram, veličine zrna 200-400.

Postupna sinteza slijeda na smoli izvodi se uz pomoć amino kiselina zaštićenih s N-*Fmoc* prema sljedećoj shemi protoka:

Tablica I

Korak	Funkcija	Otapalo	Vrijeme	Ponavljanje
1	Ispiranje	DMF	2 min	2 x
2	Ispiranje	20% piperidin u DMF	5 min	2 x
3	Ispiranje	DMF	2 min	2 x
4	Ispiranje	Izopropanol	2 min	1 x
5	Ispiranje	DMF	2 min	2 x
6	Ispiranje	Izopropanol	2 min	1 x
7	Ispiranje	DMF	2 min	2 x
8	Sprezanje	Boc-AS-OH, HOBt, DIC u DMF	90 min	1 x
9	Ispiranje	DMF	2 min	1 x
10	Ispiranje	Izopropanol	2 min	1 x
11	Ispiranje	DMF	2 min	1 x
12	Ispiranje	Izopropanol	2 min	1 x
13	Ispiranje	DMF	2 min	1 x
14	Ispiranje	Izopropanol	2 min	1 x
15	Provjera	Test boje s kloranilom *		

(*Prema T. Christensen, *Acta Chem. Scand. B* 33, 763 – 766, 1979)

Tipični (repetitivni) procesni parametri sinteze u krutoj fazi dekaeptida prema gornjoj shemi:

Uklanjanje Fmoc zaštite skupine uporabom 20%-tnog piperidina u DMF, 2 x 5 min na sobnoj temperaturi (Korak 2)

Sprezanje u trostrukom mol omjeru Fmoc-amino kiselina s diizopropilkarbodiimidom (DIC) u nazočnosti hidroksibenzotriazola (HOBt) (Korak 8)

Odvajanje C-terminusa s polimernog uporišta, uključivo odvajanje zaštitnih skupina na postranjskim lancima amino-kiselina uporabom trifluorooctene kiseline (TFA).

- 5 Nakon uklanjanja polimernog uporišta, uporabom 5 grama smole nastaje 5-6 grama sirove peptidne smjese s oko 70-80% traženog sastojka; (rečeni proizvod) se dobiva naknadnom preparativnom HPLC kromatografijom.

Pročišćavanje dekapetida preparativnom HPLC; Uvjeti za kromatografiju:

- 10 Prep. HPLC, Shimadzu, Dymax stupac RP18, 12 μ m, 300 Å, L= 250 mm, ID = 41,4 mm;
 10 Gradijentni sustav s vremenskim programom, 40% B → 90% B, 50 min;
 Eluent A: 970 ml H₂O + 30 ml CH₃CN + 1 ml CF₃COOH;
 Eluent B: 300 ml H₂O + 7000 ml CH₃CN + 1 ml CF₃COOH;
 UV detekcija, λ = 220 nm, brzina protoka 60 ml/min;
 15 Dobivene frakcije koncentriraju se *in vacuo* i liofiliziraju. Dobiveni dekaeptidi su u obliku svijetlog, bezbojnog materijala.
 Potom se, kromatografskom izmjenom iona, izvodi dvostruko razlaganje u oblik acetatne soli koji je poželjan za daljni farmakološki postupak.

20 Ispitivanja biološkog djelovanja:

- Ispitivani su spojevi prema Formuli I u skladu s predmetnim izumom glede vezivanja na receptore. Ovaj postupak tijesno slijedi postupak opisan u Beckers i sur., Eur. J. Biochem. 231, 535-543 (1995). Cetrorelix koji se dobije gore
 25 opisanom sintezom se jodira s [¹²⁵I] (Amersham; specifična aktivnost 80,5 Bq/fmol) uporabom IodoGen reagensa (Pierce). Reakcijska smjesa se pročisti tekućom kromatografijom visokog učinka s povratnom fazom, te se dobije monojodirani cetrorelix bez neoznačenog peptida. U svakom pojedinačnom slučaju, oko 80% [¹²⁵I]-cetrorelixa i neoznačenog spoja prema predmetnom izumu prikladni su za spajanje na specifičnom receptoru.

- 30 Spojevi prema predmetnom izumu mogu se testirati glede njihovog in-vitro djelovanja uporabom sljedećih Postupaka 1 i 2, a sklonosti vezivanju u testu na vezivanje određuju se [¹²⁵I]-cetrorelixom (Postupak 1), a funkcionalne aktivnosti određuju se triptorelinom kao agonist stimulusom (Postupak 2).

Postupak 1 (određivanje K_D na primjeru cetrorelixa):

- 35 Test za vezivanje na receptor prema Beckers, T., Marheineke, K., Reiländer, H., Hilgard P. (1995) "Selection and characterization of mammalian cell lines with stable overexpression of human pituitary receptors for gonadoliberein (GnRH)" Eur. J. Biochem. 231, 535-543.

- 40 Kod ispitivanja vezivanja na receptor, cetrorelix se jodira uporabom IodoGen reagensa (Pierce) s [¹²⁵I] (Amersham; specifična aktivnost 80,5 Bq/fmol). Reakcijska smjesa se pročisti tekućom kromatografijom visokog učinka s izmijenjenim fazama, te se dobiva monojodirani cetrorelix bez neoznačenog peptida. Oko 80% [¹²⁵I]-cetrorelixa bilo je prikladno za spajanje na specifičnom receptoru.

- 45 Test za vezivanje na receptor izvodi se pod fiziološkim uvjetima na opisani način (Beckers i sur., 1995) uz uporabu intaktnih stanica. Subkonfluentne kulture stabilno transfektiranih LTK stanica, koje eksprimiraju humani LHRH receptor, odvajaju se inkubacijom u NaCl/P_i (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 11,47 mM KH₂PO₄)/1 mM EDTA i prikupljaju centrifugom. Stanični pelet je ponovno suspendiran u vezivnom puferu (DMEM bez H₂CO₃, uz 4,5 g/l glukoze, 10 mM Hepes s pH 7,5, 0,5% (masa/volumen) BSA, 1 g/l bacitracin, 0,1 g/l SBTI, 0,1% (masa/volumen) NaN₃). Za testove istiskivanja, 0,25 x 10⁶ stanica/100 μ l se inkubira s oko 225 pM [¹²⁵I]-cetrorelixa
 50 (specifična aktivnost 5-10 x 10⁵ dpm/pmol) i raznim koncentracijama neoznačeneog spoja prema predmetnom izumu kao takmacem. Stanična suspenzija u 100 μ l medija za vezivanje se nanese u slojevima u 400 μ l-skim testnim cjevčicama iznad 200 μ l 84% volumena silikonskog ulja (Merck Type 550)/16% volumena parafinskog ulja. Nakon inkubacije tijekom 1 h na 37°C uz polaganu, neprekinuto mućkanje, stanice se od inkubacijskog medija odvajaju centrifugom tijekom 2 min na 9000 o/min (rotor tip HTA13.8; Heraeus Sepatec, Osterode/Njemačka). Vrhovi cjevčica
 55 koji su sadržavali stanični pelet se odrežu. Stanični pelet i supernatanti se potom analiziraju mjerenjem γ -radijacije. Količina ne-specifično vezanog materijala određuje se u konačnoj koncentraciji od 1 μ M uz uključanje neoznačenog cetrorelixa, a tipično iznosi $\leq$ 10% sveukupnog vezanog materijala. Analiza podataka o vezivanju izvodi se uporabom EBDA/ligand programa za analizu (Biosoft V 3.0).

- 60 Cetrorelix ima K_D vrijednost od 170 pikomola po litri (pM) (broj neovisno izvedenih eksperimenata: 21).

Postupak 2 (test funkcionalnosti za određivanje antagonističke aktivnosti (IC₅₀ vrijednost)):

Rečeni test se izvodi, uz dolje spomenute promjene, kako je opisano u Beckers, T., Reiländer, H., Hildegard, P. (1997) "Characterization of gonadotropin-releasing hormone analogs based on a sensitive cellular luciferase reporter gene assay", *Analyt. Biochem.* 251, 17-23 (Beckers i sur., 1997). Tijekom 24 sata se 10.000 stanica po jamici, koje

5 eksprimiraju humani LHRH receptor i gen za dojavljivanje luciferaze, uzgajaju u mikrotitarnim pločicama uz uporabu DMEM s aditivima i 1% (v:v) FCS_i. Stanice se potom stimuliraju s 1 nM [D-Trp⁶] LHRH tijekom 6 sati. Antagonistički spojevi prema predmetnom izumu dodaju se prije stimulacije, a stanice se na kraju liziraju kako bi se kvantificirala stanična Luc aktivnost. Izračun vrijednosti IC₅₀ iz krivulja doza-učinak izvodi se ne-lineranom regresivnom analizom uporabom Hillovog modela (program EDX 2.0 .C. Grunwalda, Arzneimittelwerk Dresden).

10 Kvantifikacija Luc aktivnosti izvodi se udvostručeno u osnovi na opisani način (Promega Technical Bulletins #101/161) uz uporabu odgovarajućeg sustava za testiranje luciferaze (Promega E4030). Zbog dodavanja koenzima A (CoA), oksidacija luciferyl-CoA odvija se uz povoljne kinetičke uvjete. Nakon uklanjanja podloge za kulturu iz mikrotitarnih pločica, stanice se liziraju dodavanjem 100 µl pufera za liziranje (25 mM tris-fosfata pH 7,8, 2 mM ditioneitol, 2 mM

15 1,2-diaminocikloheksan-N,N,N',N'-tetraoctene kiseline (CDTA), 10% (v:v) glicerola, 1% (v:v) Triton X-100). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tijekom 15 min, 10 µl staničnog lizata se prenese u bijelu mikrotitarnu pločicu prikladnu za luminometrijsku detekciju (Dynatech). Enzimatska reakcija se začne dodavanjem 50 µl testnog pufera (20 mM tricina pH 7,8, 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂, 2,67 MgSO₄, 0,1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), 33,3 mM ditioneitol, 270 µM koenzima A, 470 µM luciferina iz kriješnice (*Photinus pyralis*), 530 µM rATPNa₂). Nakon 1

20 minute, svjetlucanje se određuje u cjelokupnom vremenu od 1 sekunde uz poluvijek signala od 5 minuta uporabom naprav EG&G Berthold MicroLumat LB 96 P.

Fizičko-kemijski i in-vitro podaci spojeva prema predmetnom izumu su sabrani u Tablici 2. IC₅₀ označava funkcijsku aktivnost, a pM označava pikomole po litri. Topljivost u vodi je određena u skladu s postupkom opisanim pod Opaskom

25 2):

Tablica 2:

Spoj	Topljivost u vodi ² [mg/ml]	IC ₅₀ [pM]
Cetorelix	0,002	198 (5) ¹
Primjer 1 (D-68968)	1,03	1300 (1) ¹
Primjer 2 (D-68969)	1,11	1400 (1) ¹
Primjer 3 (D-68971)	1,36	4700 (1) ¹
Primjer 4 (D-68987)	1,18	700 (1) ¹

Opaske:

30 Broj u zagradama označava broj pokusa neovisno jedan od drugog

Topljivost u vodi određena je prema dolje opisanom postupku:

Topljivost u skladu s postupkom iz službenog glasila u Ringerovoj otopini:

Kako bi odredili topljivost prema postupku iz službenog glasila, testna tvar se miješa u većem omjeru s inernim nosećim materijalom poput, primjerice, pijeska i slaže u stakleni stupac (veličine volumena 10 ml). Prethodno su u dno

35 stupca ugrađeni sito od pamučne vune i filter od staklenih vlakana. Smjesa (testne) tvari i pijeska se natapa tijekom 1 sata u 1,0 ml otapala u kojem će se odrediti topljivost. Potom se 10 ml otapala izlije u stakleni stupac. Otopina se reciklira pomoću peristaltičke pumpe. Određivanje (topljivosti) se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20°C). Topljivost je određena kada je masena koncentracija suslijednih izvađenih frakcija konstantna.

40 Određivanje masene koncentracije određuje [sic] se pomoću dolje opisanim postupkom HPLC.

HPLC postupak:

Oprema

45 HPLC sustav: Hewlett Packard 1100; detektor: Hewlett Packard DAD serija 1100

Stupac: Materijal u stupcu: Nucleosil[®] 120-3 C₁₈

Veličina čestica: 3 µm

Veličina stupca: 125 x 4 mm

Proizvođač: Macherey & Nagel

50 Parametri naprave: Volumen uštrcavanja: 15 µl

Protok: 1,0 ml/min

Temperatura pećnice: 45 °C

Valna duljina: 226 nm

Vrijeme zaustavljanja: 15 min

55% mobilna faza A: 970 ml Milli-Q-H₂O, 30 ml acetonitrila i 1 ml trifluorooctene kiseline se pomiješa. Dobiveni pH je oko 1,9.

45% mobilna faza B: 300 ml Milli-Q-H₂O, 700 ml acetonitrila i 1 ml trifluorooctene kiseline se pomiješa. Dobiveni pH je oko 1,8.

Primjena spojeva prema predmetnom izumu može se izvoditi u različitim oblicima, prikladnim za peptidne aktivne sastojke. Prikladni načini primjene dobro su poznati stručnim osobama. Primjena se može izvesti primjerice injekcijom. Primjena se može izvesti i parenteralno. Subkutana (s.c.) intramuskularna (i.m.), intravenozna (i.v.), bukalna (npr. sublingvalna) ili rektalna primjena su poželjne, a i.s. i i.m. primjena su naročito poželjne.

Spojevi prema predmetnom izumu su prikladni za pripremu raznih oblika za primjenu, na primjer za liofilizate, otopine ili suspenzije. Prikladni oblici za primjenu su dobro poznati stručnoj osobi. Prikladni ekscipijenti i sredstva za nakupljanje su, na primjer, heksitoli, poput manitola, a posebice D-manitol, L-manitol ili D,L-manitol; sorbitol, poput D-sorbitola; D- ili L-altritol, iditol, glucitol i dulcitol. Priprava se izvodi u skladu s dobro poznatim postupcima, na primjer miješanjem, suspendiranjem ili liofilizacijom.

Primjer A: Liofilizat za pripremu otopine za s.c. injekciju

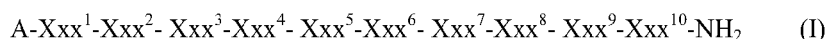
Jedan mg spoja iz Primjera 1 (što odgovara 0,26 - 0,27 mg acetatne soli); 0-16,9 težinskih dijelova D-manitola, poželjno je 0,1-7 težinskih dijelova, u oba slučaja temeljeno na Primjeru 1, te voda za injekciju (za pripremu injekcijske otopine iz liofilizata).

Priprava: Otopiti 1.62 g (tvari) iz Primjera 1 u octenoj kiselini 30%-tne jačine (oko 1,5 litara vode za injekciju i 97,17 g octene kiseline). Otopina se rastvori sa 1,5 litara vode, doda se 82,2 g manitola i sterilni filter, potom se dozira u sterilne injekcijske ampule od 2 ml pod sterilnim uvjetima i osuši na niskoj temperaturi. Dobije se 1 mg liofilizata spoja u skladu s Primjerom 1.

Spojevi prema predmetnom izumu prikladni su za liječenje zloćudnih ili ne-malignih hormon-ovisnih poremećaja, poput, primjerice, liječenja raka dojke, raka prostate, endometrioze, mioma maternice, dobroćudne hiperplazije prostate (BPH), liječenja poremećaja plodnosti kod muškaraca i žena, primjerice za sprečavanje preuranjene ovulacije kod pacijentica koje su podvrgnute kontroliranoj stimulaciji jajnika, potom uzimanju jajne stanice i tehnikama potpomognute reprodukcije. Rečeni načini liječenja mogu se primjenjivati na sisavcima, posebice ljudima.

PATENTNI ZAHTRAJEVI

1. Spojevi, **naznačeni time** da imaju opću formulu I



gdje je :

A	acetilna skupina,
X_{xx}^1	D-Nal(2),
X_{xx}^2	D-Cpa,
X_{xx}^3	D-Pal(3),
X_{xx}^4	Ser,
X_{xx}^5	N-Me-Tyr,
X_{xx}^6	D-Cit, D-Hci ili D-[⁻ -N'-4-(4-amidinofenil)-amino-1,4-dioksibutil]Lys (skraćenica: D-Lys-(B)),
X_{xx}^7	Leu ili Nle,
X_{xx}^8	Arg ili Lys (iPr),
X_{xx}^9	Pro, a
X_{xx}^{10}	D-Ala ili Sar,

uz uvjet da

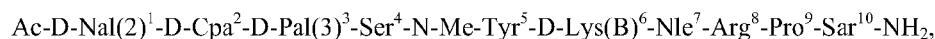
Ako je X_{xx}^6 D-Lys(B), onda je X_{xx}^7 Nle;

Ako je X_{xx}^6 D-Cit, onda je X_{xx}^7 Nle, a X_{xx}^{10} je D-Ala; ili

Ako je X_{xx}^6 D-Hci, onda je X_{xx}^7 Leu, a X_{xx}^{10} je D-Ala,

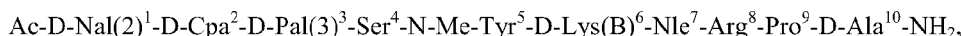
te njihove soli s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

2. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



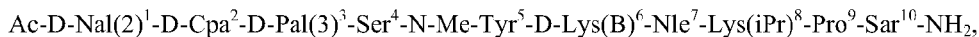
ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

3. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



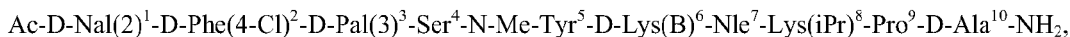
ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 5 4. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 10 5. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



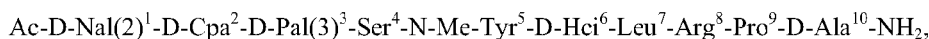
ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 15 6. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



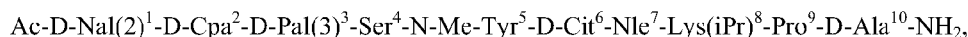
ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 20 7. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



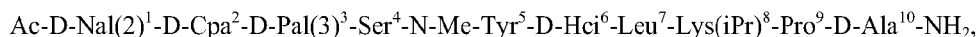
ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 25 8. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 30 9. Spoj prema Zahtjevu 1, **naznačen time** da ima sljedeću formulu:



ili sol rečenog spoja s farmaceutski prihvatljivim kiselinama.

- 35 10. Spojevi prema bilo kojem od Zahtjeva 1-9, **naznačeni time** da je sol acetat, trifluoroacetat ili embonat.

11. Spojevi prema bilo kojem od Zahtjeva 1-10, **naznačeni time** da se koriste kao lijekovi.

12. Farmaceutski pripravci, **naznačeni time** da sadrže barem jedan spoj prema Zahtjevima 1 - 10, te uobičajena sredstva isporuke i ekscipijente.

13. Postupak za pripremu spojeva opće formule I prema Zahtjevu 1 i jednom od Zahtjeva 2 - 9, **naznačen time** da su fragmenti jedinica Xxx^m opremljene prikladnim zaštitnim skupinama, m je cijeli broj u rasponu od 1 - 10, Xxx¹ je acetiliran, sintetiziraju se u krutoj fazi ili otopini prema uobičajenim postupcima, a potom se fragmenti vezuju na krutu fazu sprežanjem segmenata, a po dovršetku sprežanja, spojevi opće formule I se uklanjaju iz krute faze uporabom uobičajenih postupaka s amidacijom na jedinici Xxx¹⁰.

14. Uporaba spojeva prema Zahtjevima 1 - 10, **naznačena time** da je namijenjena proizvodnji lijekova za liječenje hormon-ovisnih tumora, posebice raka prostate, raka dojke ili mioma maternice, te za ne-maligne indikacije čije liječenje zahtijeva supresiju LH-RH hormona, poput endometriozе, dobroćudne hiperplazije prostate (BHP), te za liječenje poremećaja plodnosti kod mužjaka i ženki sisavaca, a posebice kod ljudi.

15. Postupak za proizvodnju farmaceutskih pripravaka prema Zahtjevu 12, **naznačen time** da je barem jedan spoj prema bilo kojem od Zahtjeva 1 - 10 pomiješan s uobičajenim sredstvima isporuke i ekscipijentima, te formuliran kao lijek.

16. Postupak za liječenje hormon-ovisnih tumora, naročito raka prostate, raka dojke ili mioma maternice, te za ne-maligne poremećaje čije liječenje zahtijeva supresiju LH-RH hormona, poput endometriozе, dobroćudne hiperplazije prostate (BHP), te za liječenje poremećaja plodnosti kod mužjaka i ženki sisavaca, a posebice kod ljudi, **naznačen time** da se daje učinkovita doza barem jednog od spojeva prema Zahtjevima 1 - 10.

55

SAŽETAK

- 60 Izum se odnosi na peptide, koji sadrže komponentu N-metilirane aminokiseline i poboljšane vodene topljivosti. Sukladno izumu, lijekovi sadrže rečene peptide koji se mogu koristiti za liječenje hormon-ovisnih tumora i hormonski izazvanih nemalighnih bolesnih stanja.