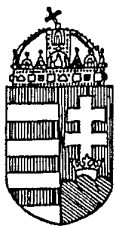


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 849 B

(21) A bejelentés száma: 745/86
(22) A bejelentés napja: 1986. 02. 21.
(30) Elsőbbségi adatok:
704 299 1985. 02. 22. US

(51) Int. Cl.⁵

C. 07 K 007/06

A 61 K 37/43

(40) A közzététel napja: 1986. 11. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 02. 28. SZKV 92/02

(72) Feltalálók:

Anderson, Harry Alec, San Diego, Kalifornia (US)
jr. Vale, Wylie Walker, La Jolla, Kalifornia (US)
Rivier, Jean Edouard Frederic, La Jolla, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmaz:

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

(54) **Eljárás GnRH-antagonista dekapeptid-származékok előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás X-béra-D-2NAL-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Arg-D-Glu-(C₆H₄OCH₃) -Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

általános képletű új dekapeptid-származékok és gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik előállítására, ahol

X 1-6 szénatomos alkanoilcsoport.

Az eljárás során valamely, a peptidkémiai ön-magában ismert csoportokkal védett és/vagy gyantához kötött (I) általános képletű dekapeptid-származékról lehasítják a védőcsoportokat és/vagy a gyantát, és kívánt esetben a kapott peptidet gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sójává alakítják.

HU 204 849 B

A találmány olyan decapeptid-származékok előállítására vonatkozik, melyek befolyásolják a gonadotrop hormonok elválasztását, vagy gátolják a GH elválasztását az emlősök hipofizisében.

Részletesebben, a találmány olyan peptidekre vonatkozik, amelyek jobb biológiai hatással rendelkeznek az ivarmirigy funkció serkentésében vagy inhibálásában és a szteroid hormonok, progeszteron, tesztoszteron elválasztásában, vagy jobb biológiai hatásúak a GH elválasztás gátlásában.

A hipofízis egy nyél (pendiculus) útján kapcsolódik az agy alsó részén elhelyezkedő hipotalamushoz. A hipofízis termeli a follikulus stimuláló hormont (FSH) és a luteinizáló hormont (LH), ezeket gonadotropinoknak vagy gonadotrop hormonoknak is nevezzük. Ezek a hormonok szabályozzák az ivarmirigyek működését, a tesztoszteron termelését a herékben és a progeszteron, valamint az ösztrogén termelését a petefészekben, valamint szabályozzák az ivarsejtek képződését és érését is. A növekedési hormont (GH) is a hipofízis termeli.

Ahhoz, hogy egy hormont ürítsen a hipofízis elülső lebenye, általában az szükséges, hogy előbb kiürüljön a hormonok egy másik csoportja, melyet a hipotalamusz termel. A hipotalamusz hormonok egyike olyan faktorként hat, amely előidézi a gonadotrop hormonok elválasztását, különösen az LH-t és ezt a hormont itt GnRH-nak nevezzük, bár LH-RH-nak és LRF-nek is nevezik. GnRH-t izolálták, és megállapították, hogy egy decapeptid, melynek szerkezete a következő:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

A peptidek olyan vegyületek, melyek két vagy több aminosavat tartalmaznak, melyekben az egyik sav karboxilcsoportja a másik sav aminocsoportjához kapcsolódik. A GnRH képlete, amint azt fent bemutattuk, összhangban van a peptidek konvencionális ábrázolásával, ahol az aminosav vagy N-végződés balról és a karboxil-, vagy C-végződés jobbról van. Az aminosav-rész helyzetét úgy azonosítjuk, hogy az aminosav-részeket balról jobbra számozzuk. A GnRH esetében a glicin karboxilcsoportjának hidroxil-részét egy aminocsoporttal (NH₂) helyettesítjük. Az egyes fenti aminosav-részek rövidítései konvencionálisak és az aminosav triviális nevén alapulnak, pl. pGlu= piroglutaminsav, His= hisztidin, Trp= triptofán, Ser= szerin, Tyr= tirozin, Gly= glicin, Leu= leucin, Orn= ornitin, Arg= arginin, Lys= lizin, Cys= cisztein, Asn= asparagin, Thr= treonin, Pro= prolin, Phe= fenilalanin, Glu= glutaminsav, Asp= aszparaginsav és Ala= alanin. A glicin kivételével a találmány szerinti peptidek L-konfigurációban vannak, eltérő utalás hiányában.

Ha egy D-aminosavval helyettesítjük a glicint a GnRH decapeptid vagy nonapeptid 6-os helyzetében, egy olyan GnRH analóg jön létre, melynek lényegesen nagyobb a kötési aktivitása, így felhasználhatjuk nagyobb hatékonyságú, mind agonisták, mind antagonisták előállítására. Ha egy etil-amin-résszel, vagy hasonlóval helyettesítjük a Gly-NH₂-t a C-terminális részen, nagyobb hatóképességű agonistát nyerünk. Is-

mertek más olyan szubsztitúciók a GnRH decapeptiden belül, melyek antagonistákat eredményeznek, amelyeknek inhibáló hatásuk van az LH és más gonadotropinoknak az emlősök hipofízise általi elválasztásában. Ilyen elválasztó vagy inhibáló hatást érünk el, ha a GnRH analógot egy emlősnek beadagoljuk intravénásan, szubkután, intra-muszkulárisan, orálisan, perkután, pl. intranazálisan, intravaginálisan vagy késleltetett vagy időzített felszabadítási formákban.

Vannak okok, amikor az a kívánság, hogy megelőzzük az ovulációt (peteérés) a nőnemű emlősökben és olyan GnRH analógokat adagoljunk be, amelyek antagonisták a GnRH normális funkcióival szemben, vagy nagy dózisban alkalmazzunk GnRH agonistákat, hogy meggátoljuk vagy késleltessük a ovulációt. Ezért a GnRH olyan analógjait vizsgálják, melyeket esetleg fogamzásgátlóként, vagy a fogamzási periódusok szabályozására használnak fel. GnRH antagonistákat felhasználhatjuk idő előtti pubertás és méhbelhártyagyulladás kezelésére is. Az ilyen antagonisták alkalmasak a gonadotropinok szekréciójának szabályozására hím emlősökben is, és alkalmazhatók az ondóképződés (spermatogenezis) megállítására, vagyis mint hím fogamzásgátlók és a prosztata megnagyobbodás kezelésére.

Kíváncos, hogy jobb peptideket állítsunk elő, amelyek még hatékonyabb GnRH analógok.

A találmány tárgya eljárás olyan hatékonyabb GnRH analógok előállítására, melyek közül egyesek erősen GnRH antagonisták és gátlóhatást gyakorolnak az emlősök szaporodási folyamataira, és mások hatékony GnRH agonisták.

A találmány szerint az

X-béta-D-NAL-(4CI)D-Phe-D-3PAL-Arg-D-Glu (C₆H₄OCH₃)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

általános képletű származékokat vagy gyógyszerészeti elfogadható sóikat állítjuk elő, ahol

X 1-6 szénatomos alkanoilcsoport.

Mivel ezek a peptidek nagymértékben inhibálni képesek az LH elválasztását, ezeket GnRH antagonistáknak nevezzük. A peptidek gátolják a nőstény emlősök ovulációját, ha igen kis mennyiségben adagoljuk a proertrusnál, és hatékonyak abban is, hogy a megtermékenyített petesejtek reszorpcióját okozzák, ha röviddel a fogamzás után adagoljuk be. Ezek a peptidek hatékonyak hím-nemű emlősök fogamzásgátló kezelésére is.

A béta-D-NAL az alanin D-izomerjét jelenti, amely naftilcsoporttal van szubsztituálva a béta-szénatomon, amely 3-D-NAL-ként is jelölünk. A béta-D-2NAL azt jelenti, hogy a béta-szénatom a naftalinhoz a gyűrűs szerkezet 2-helyzetében kapcsolódik.

A találmány szerint úgy járunk el, hogy valamely, a peptidkémiai önmagában ismert csoportokkal védett és/vagy gyantához kötött (I) általános képletű decapeptid-származékról lehasítjuk a védőcsoportokat és/vagy a gyantát, és kívánt esetben a kapott peptidet gyógyszerészeti elfogadható sójává alakítjuk.

A találmány szerinti kiindulási peptideket szinteti-

zálhatjuk klasszikus oldat szintézissel, vagy szilárd fázisú technikával úgy, hogy klór-metilezett gyantát, benzhidril-amin (BHA) gyantát, metil-benzhidril-amin (MBHA) gyantát, N-alkil-amino-metil (NAAM) gyantát vagy más alkalmas, a szakmában ismert gyantát alkalmaznak. Ha klasszikus szintézist alkalmazunk, előnyös lehet, ha függetlenül kialakítjuk a keton-oldalláncot, mielőtt az aminosavat a peptidlánc szomszédos aminosavrészeihez kapcsolódnak. A szilárd fázisú szintézist úgy végezzük, hogy lépésenként kapcsoljuk az aminosavakat a láncba, úgy ahogy az részletesen le van írva a 4 211 693 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Oldallánc-védő csoportokat – ezek jól ismertek a szakmában – előnyösen a Ser és Arg tagok esetén alkalmaznak, ha ezek jelen vannak, valamint bizonyos szubsztituensek esetén, és előnyösen Trp esetén (kivéve, ha acilezett), mielőtt ezeket az aminosavakat a gyantán felépülő láncához kapcsolnánk. Ha szilárd fázisú szintézist alkalmazunk, a 6-helyzetben levő D-Glu-t előnyösen a következő csoportokkal védhetjük; Bzl (benzil-észter)-csoport, 2,6-diklór-benzil (DCB)-csoport, dinitro-fenil (Dnp)-csoport, 1-hidroxi-benzotriazol-benzil-észter (OHbt)-csoport, 8-hidroxi-kinolin-észter (OHq)-csoport, p-nitro-benzil-oxi (ONBzl)-csoport, fenil-azo-fenil-, vagy terc-butoxicsoport; egy ilyen szintézis a teljesen védett peptid-gyanta intermediert eredményezi.

A találmány szerinti HnRH antagonistá intermediereket a (II) általános képlettel jellemezhetjük.

A Ser alkoholos hidroxilcsoportjának védőcsoportja például az acetil-, benzoil-, tetrahidro-piranyl-, terc-butyl-, tritil-, benzil- és 2,6-diklór-benzil-csoport, ezek közül előnyös a benzilcsoport. Alternatív módon, ha Ser a szubsztituens, egy oldallánc aminocsoport is tartalmazhat védőcsoportot, amilyen a Tos, Z vagy ClZ csoport.

X⁵ jelentése a F-Glu oldallánci karboxilcsoportjának védőcsoportja a következők közül: Bzl (benzil-észter)-csoport, 2,6-diklór-benzil (DCB)-csoport, dinitro-fenil (Dnp)-csoport, 1-hidroxi-benzotriazol-benzil-észter (OHbt)-csoport, 8-hidroxi-kinolin-észter (OHq)-csoport, p-nitro-benzil-oxi (ONBzl)-csoport, fenil-azo-fenil- és terc-butoxi-csoport, és előnyös a Bzl.

Az Arg oldallánci guanidincsoportjának védőcsoportja például a nitro-, Tos-, tritil-, benzil-oxi-karbonil-, adamantil-oxi-karbonil-csoport, Z és Boc-csoport. Általában a Tos az előnyös.

A védőcsoportok kiválasztásának az a kritériuma, hogy a védőcsoport stabil legyen a reagenssel szemben az olyan reakciókörülmények között, melyeket az alfa-amino-védőcsoport eltávolítására választunk, a szintézis minden egyes lépésében. A védőcsoport nem hasadhat le a kapcsolás körülményei között, és a védőcsoportnak eltávolíthatónak kell lennie a kívánt aminosav-szekvencia szintézisének befejezésekor, olyan reakciókörülmények között, amely nem változtatja meg a peptidláncot.

Ha X⁶ jelentése acetilcsoport, például az N-terminá-

lis helyzetben a végső képletben felhasználhatjuk azt a D-NAL alfa-amino-csoportja védőcsoportjaként, mellette ezt az utolsó aminosavat a peptidláncához kapcsoljuk. Azonban a reakciót előnyösen a gyantára kötött peptiddel végezzük (az alfa-amino-csoport felszabadítása után, míg az oldallánc-csoportok védve maradnak), pl. úgy, hogy ecetsavval reagáltatjuk azt dikiklo-hexil-karbo-diimid (DCC) jelenlétében, vagy előnyösen ecetsav-anhidriddel, vagy más alkalmas, a szakember számára ismert reakcióval.

A teljesen védett peptid intermediert klasszikus oldat szintézissel állítjuk elő és ezután eltávolítjuk a védőcsoportokat a szakember számára ismert módon. A peptid védőcsoportjainak eltávolítását, valamint a peptid lehasítását a BHA, MBHA vagy NAAM gyantáról fluorhidrogénsavval (HF), vagy ennek ekvivalensével való kezeléssel végezzük el, olyan hőmérsékleten, amely elősegíti az aciliumion képződést az oldalláncban levő karboxilcsoporton, előnyösen kb. 20 °C és kb. 25 °C között, megfelelő ideig, pl. 2–3 óráig. Egy kívánt, aromás vegyületet – melyet a Z' osztályból választunk ki, amilyen az anizol, mely lehasító anyagként is hat – megfelelő feleslegben adunk a peptidhez hidrogén-fluoridos kezelés előtt. Általában olyan mennyiségben adagolunk, mely legalább 20-szorosa a peptid moláris mennyiségének. Aciliumion jelenlétében ez a Z' osztályba tartozó, a reakcióelegyhez adagolt vegyület úgy reagál, hogy az alifás-aromás keton oldalláncot hozza létre, melynek mechanizmusát G.Barany és R.Merrifield mutatja be a *Solid-Phase-Peptide Synthesis* 192-197. idézetben.

Miután a hidrogén-fluoridot vákuumban eltávolítottuk, a lehasított, védőcsoportokat nem tartalmazó peptidet alkalmasan éterrel kezeljük, dekantáljuk, hígított ecetsavban felveszük, és liofilizáljuk. Ennél a pontnál kívánt esetben, a peptidet átalakíthatjuk nem-toxikus sójává, például úgy, hogy n ecetsavval kezeljük.

A peptid tisztítását ioncserés kromatográfiával végezzük egy CMC oszlopon, ezt követően megosztásos kromatográfiával, a következő elúció rendszereket használva: n-butanol; 0,1 n ecetsav (1:1 térfogat arány) egy Sephadex G-25-tel töltött oszlopon, vagy HPLC-t alkalmazva, mint az a szakmában ismert és közölt: Rivier, J. és munkatársai; *J. Chromatography*, 288, 303-328. (1984) idézetben.

A találmány szerinti peptidet gyakran gyógyszerészileg elfogadható, nem-toxikus sók formájában adjuk be, amilyenek a savaddíciós sók, vagy fémkomplexek, pl. cinkkel, báriummal, kalciummal, magnéziummal, alumíniummal, vagy hasonlókkal képzett komplexek, (amelyeket addíciós sókként tekintünk az ilyen alkalmazás céljából), vagy a kettő kombinációja. Az ilyen addíciós sókra példák: hidroklorid, hidrobromid, szulfát, foszfát, nitrát, oxalát, fumarát, glükonát, tanát, maleát, acetát, citrát, benzoát, szukcinát, alginát, malát, aszkorbát, tartarát és hasonlóak. A peptid vizes oldatát ismételtelen kezeljük pl. 1 n ecetsavval és utána liofilizáljuk, hogy megkapjuk az ecetsavas sóját. Ha a hatóanyagot tablettá alakjában adagoljuk, a tablettá

gyógyszerészetileg elfogadható hígítóanyagot tartalmazhat, egy kötőanyagot, amilyen a tragakant, kukoricakeményítő vagy zselatin; egy porítóanyagot, amilyen az algin-sav; és egy síkosítóanyagot, amilyen a magnézium-sztearát. Ha folyadék alakjában kívánjuk beadni, édesítő- és/vagy ízanyagot használhatunk a gyógyszerészetileg elfogadható hígítóanyag egy részeként és intravénás beadagolást izotóniás sóoldatban, foszfát pufferoldatokban vagy hasonlóknak valósíthatjuk meg.

A gyógyszerkompozíciók általában egy konvencionális, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval együtt tartalmazzák a peptidet. Az adagolás általában kb. 1 és kb. 100 µg közötti peptid mennyiség/kg testsúly, ha intravénásan alkalmazzuk; orális adagolás esetén több.

A személyek kezelése ezen peptidekkel általában ugyanolyan módon történik, mint más GnRH antagonistákkal való klinikai kezelés.

Ezek a peptidok beadhatók emlősöknek intravénásan szubkután, intramuszkulárisan, orálisan, perkután, pl. intranazálisan vagy intravaginálisan termékenység gátlás és/vagy szabályzás céljából és a gonádális aktivitás reverzibilis visszaszorítására való alkalmazására, mint a korai pubertás kezelésére vagy sugárkezelés, vagy kemoterapiás kezelés folyamán. A hatásos dózisok változnak az adagolási formák és a kezelt emlős fajtája szerint. Tipikus adagolási formára példa egy, a peptidet tartalmazó baktérioszztatikus vizes oldat, melyet úgy adagolunk be, hogy a dózis kb 0,1 és 2,5 mg/kg testsúlynak megfelelő legyen. A peptidet orálisan akár szilárd, akár folyadék alakjában beadhatjuk.

A találmány szerinti GnRH antagonisták hatékonyak 100 µg/testsúly kb-nál kisebb mennyiségben, ha

a prooestrus napján kb. délben adagoljuk, hogy meggátoljuk az ovulációt a nőstény patkányokban. Az ovuláció hosszabb visszaszorítására szükséges lehet kb. 0,1 – kb. 2,5 mg/kg testsúlytartományban adagolni. Ezek az antagonisták hatásosak arra is, hogy megállítsák a spermatogenezist, ha hím emlősöknek adagoljuk rendszeresen és így fogamzásgátlóként alkalmazhatjuk. Mivel ezek a vegyületek csökkentik a tesztoszteron szintet (nem-kívánatos következmény a normális, szexuálisan aktív hímeknél), célszerű, ha a GnRH antagonistával együtt felváltva tesztoszteront adagolunk. Ezek az antagonisták felhasználhatók arra is, hogy a gonadotropinok és szexuálissteroidok előállítását szabályozzák, más célokra, mint előbb említettük.

Példa

Az [Ac-β-D-2NAL¹, (4 Cl) D-Phe², D-3PAL³, Arg⁵, D-Glu⁶ (C₆H₄OCH₃), D-Ala¹⁰]-GnRH szilárd fázisú szintézisét a következőben mutatjuk be. Ennek a peptidnek képlete a következő:

Ac-β-D-2NAL-(4 Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Arg-D-Glu(C₆H₄OCH₃)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂. A többi peptid-származékot hasonlóan szintetizáljuk és tisztítjuk.

Egy BHA gyantát használunk és Boc-védett D-Ala-t kapcsolunk a gyantához 2 órás perióduson keresztül CH₂Cl₂-ben, háromszoros Boc származék felesleget és DDC-t mint aktiváló reagenst használva. A D-alanincsoport a BHA csoporthoz egy amid kötéssel kapcsolódik.

Az egyes aminosav csoportok kapcsolását követően a mosást, a védőcsoport lehasítását és a következő aminosavrész kapcsolását a következők értelmében végezzük, egy automata készüléket használva és kb. 5 g gyantával kezdve:

Lépés	Reagens és műveletek	keverési idő, perc
1	CH ₂ Cl ₂ mosás-80 ml (2x)	3
2	Metanol (MeOH) mosás-30 ml (2x)	3
3	CH ₂ Cl ₂ mosás-80 ml (3x)	3
4	50% TFA + 5% 1,2-etán-ditiol CH ₂ Cl ₂ -ben -70 ml (2x)	10
5	Izopropil-alkohol + 1% etánditiol mosás - 80 ml (2x)	3
6	TEA 12,5% CH ₂ Cl ₂ -ben - 70 ml (2x) MeOH mosás - 40 ml (2x)	5
7	MeOH mosás - 40 ml (2x)	2
8	CH ₂ Cl ₂ mosás - 80 ml (3x)	3
9	Boc-aminosav (10 mmól) 30 ml DMF-ben vagy CH ₂ Cl ₂ -ben, az egyes védett aminosav oldhatóságától függően, (1x) + DCC (10 mmól) CH ₂ Cl ₂ -ben	30-300
10	MeOH mosás - 40 ml (2x)	3
11	TEA 12,5% CH ₂ Cl ₂ -ben - 70 ml (1x)	3
12	MeOH mosás - 30 ml (2x)	3
13	CH ₂ Cl ₂ mosás - 80 ml (2x)	3

A 13. lépés után, ha a szintézist manuálisan végezzük, alikvot részt veszünk ki nindhirin-próbára: ha a teszt negatív, visszamegyünk az 1. lépéshez a következő aminosav kapcsolás céljából; ha a teszt pozitív, vagy gyengén pozitív, visszamegyünk és megismételjük a 9-13 lépéseket.

A fenti sémát általában használjuk a találmány sze-

rinti peptidok minden egyes aminosavrészének kapcsolására, miután az első aminosavat kapcsoltuk. N^αBoc védőcsoportot használunk minden egyes visszasamaradó aminosavra a szintézis folyamán.

N^αBoc-β-D-NAL-t a szakmában ismert módszerrel készítünk, pl. amint az részletesen leírták a 4 234 571 számú amerikai egyesült államokbeli szála-

dalmi leírásban (kibocsátva 1980. nov. 18.). Az Arg oldalláncát Tos-sal védjük. OBzl-t használunk mint oldallánc védő csoportot Ser hidroxilcsoportjához, és Bzl-t használunk D-Glu védőcsoportjaként. A D-3PAL védőcsoport nélkül marad.

N^α-Boc-β-D-2NAL-t végső aminosavként visszük be. A Boc-Arg (Tos)-t, melynek kicsiny az oldhatósága CH₂Cl₂-ben, egy DMF: CH₂Cl₂ elegyet használva kapcsoljuk.

Miután az α-aminocsoport védőcsoportját lehasítottuk az N-végződésen, acetilezést nagy feleslegben alkalmazott, diklór-metánban oldott ecetsav-anhidriddel végezzük el. A peptid lehasítását a gyantáról és az oldalláncok teljes felszabadítását 24 °C-on hidrogén-fluoriddal hajtjuk végre kb. 2–1/2 óra alatt. A hasító anyagot, mint az a táblázatban látható, a hidrogén-fluoridos kezelés előtt adagoljuk, hogy a vegyes alkil-ketont előállítsuk. Miután a HF-ot vákuumban eltávolítottuk, a gyantát 50%-os ecetsavval extraháljuk és a mosó oldatokat liofilizáljuk, mire nyers peptid port nyerünk.

A peptidet ezután ioncserélő kromatográfiával tisztítjuk CMC-n (Whatman CM 32, 0,05–0,3 mól NH₄OAc grádiens alkalmazva 50/50 metanol/víz elegyben), majd megosztásos kromatográfiával egy gél-szűrő oszlopon a következő eluens rendszert alkalmazva: n-butanol; 0,1 n ecetsav (1:1 térfogat arány).

A peptid homogenitását vékonyréteg kromatográfiát és többféle különböző oldószer rendszereket felhasználva, valamint fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiát és vizes trietil-ammónium-foszfát-oldatot és acetonitrilt alkalmazva ítélik meg. A nyert tisztított peptid aminosav analízise egyezik a szerkezeti képlettel, lényegében egész szám értékeket mutat minden egyes, a láncban levő aminosavra. Az optikai forgatóképességet fotoelektromos polariméterrel mérjük, mint $[\alpha]_D^{22} = -28,77^\circ \pm 1$ (c = 1, 50%-os ecetsav).

A fenti peptidet *in vivo* vizsgálunk, hogy meghatározzuk a hatékonyságot nőtény patkányokban ovuláció megelőzésére vonatkozóan. Ebben a tesztben adott számú érett nőtény Sprague-Dawley patkányt, pl. hetet, melyek testsúlya 225–250 g, szubkután injekciónként adott mikrogramm dózisu kukoricacsíkra olajban peptiddel, a proestrus napjának kb. a delén. Proestrus az ovuláció délutánján van. Külön nőtény patkány csoportot használunk fel kontrollként, melyeknek nem adunk be peptidet. Mindegyik kontroll nőtény patkánynál van peteérés a proestrus estéjén; a kezelt patkányok közül megszámláltuk azokat, melyeknél ovuláció állt be.

A peptid szignifikánsan hatékonynak látszik a nőtény patkányok ovulációjának meggátolására igen kis dózisban, és

teljesen hatékonynak találtuk kb 5 µg-os dózis esetén.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás

X-béta-D-2NAL-(4Cl)D-Phe-D-3PAL-Ser-Arg-D-Glu-(C₆H₄OCH₃)-Leu-Arg-Pro-Ala-NH₂ általános képletű dekapeptid-származékok és gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik előállítására, ahol

X 1–6 szénatomos alkanoilcsoport,

azzal jellemezve, hogy valamely, a peptidkémiai önmagában ismert csoportokkal védett és/vagy gyantához kötött (I) általános képletű dekapeptid-származékról lehasítjuk a védőcsoportokat és/vagy a gyantát, és kívánt esetben a kapott peptidet gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sójává alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hasítást 20°-nál magasabb hőmérsékleten végezzük.