



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **216 923 A5**

3(51) C 07 C 103/52

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

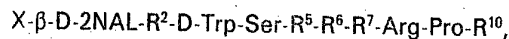
In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 07 C / 253 375 2	(22)	25.07.83	(44)	02.01.85
(31)	402,117	(32)	26.07.82	(33)	US

(71) siehe (73)  
 (72) Rivier, Jean E. F., Prof.; Vale jun., Walker W., Prof., US  
 (73) The Salk Institute for Biological Studies, California/La Jolla, US

(54) Verfahren zur Herstellung eines Peptids

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden mit Wirkung als GnRH-Antagonisten für die Anwendung als Arzneimittel bei Säugetieren einschließlich des Menschen. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung solcher Peptide, die die Sekretion von Gonadotropinen durch die Hypophyse und die Freisetzung von Steroiden durch die Keimdrüsen inhibieren, wobei bei Verabreichung einer wirksamen Dosis die Ovulation weiblicher Säugetiereier und/oder die Freisetzung von Steroiden durch die Keimdrüsen verhindert wird. Die erfindungsgemäßen Peptide haben die Struktur



worin X Wasserstoff oder eine Acylgruppe mit maximal 7 Kohlenstoffatomen ist; R<sup>2</sup> ist Cl-D-Phe, F-D-Phe, NO<sub>2</sub>-D-Phe, Cl<sub>2</sub>-D-Phe oder Br-D-Phe; R<sup>5</sup> ist Tyr oder Cl-Phe; R<sup>6</sup> ist 4-NH<sub>2</sub>-D-Phe oder D-Arg; R<sup>7</sup> ist Leu oder N<sup>2</sup>Me-Leu, und R<sup>10</sup> ist Gly-NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sup>3</sup> oder D-Ala-NH<sub>2</sub>.

-1-

Berlin, den 1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

## Verfahren zur Herstellung eines Peptids

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, insbesondere GnRH-Antagonisten, die die Freisetzung von Gonadotropinen durch die Hypophyse von Säugetieren, einschließlich Menschen, inhibieren, sowie Methoden zur Verhinderung der Ovulation und/oder Inhibierung der Freisetzung von Steroiden. Speziell bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Peptide, die die Funktion der Keimdrüsen und die Freisetzung der Steroidhormone Progesteron und Testosteron inhibieren.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Hypophyse ist mit einem Stiel an der als Hypothalamus bezeichneten Region in der Hirnbasis befestigt. Speziell werden von der Hypophyse das follikelotrope Hormon (FSH) und das luteogene Hormon (LH), die zusammen manchmal als Gonadotropine oder gonadotrope Hormone bezeichnet werden, freigesetzt. Diese Hormone regulieren zusammen die Funktion der Keimdrüsen zur Erzeugung von Testosteron in den Hoden und Progesteron und Estrogen in den Eierstöcken und regulieren ferner die Produktion und Reifung von Keimzellen.

Die Freisetzung eines Hormons durch die Hypophysenvorderlappen erfordert gewöhnlich die vorhergehende Freisetzung einer anderen Klasse von Hormonen, die vom Hypothalamus erzeugt werden. Eines der Hypothalamus-Hormone wirkt als Fak-

-5 MAR 1984 \* 154872

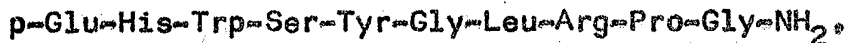
1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 2 -

tor, der die Freisetzung der gonadotropen Hormone, speziell LH, auslöst. Dieses Hormon wird hier als GnRH bezeichnet. Andere Bezeichnungen sind LH-RH und LRF. GnRH wurde isoliert und als Decapeptid der folgenden Struktur erkannt:



Peptide sind Verbindungen, die zwei oder mehr Aminosäuren enthalten, in denen die Carboxygruppe der einen Aminosäure an die Aminogruppe der anderen Aminosäure gebunden ist. Die oben angegebene Formel für GnRH entspricht der konventionellen Formeldarstellung von Peptiden, bei der die Aminogruppe links und die Carboxygruppe rechts erscheint. Die Stellung des Aminosäurerestes wird angegeben, indem die Aminosäurereste von links nach rechts numeriert werden. Im Falle von GnRH ist die Hydroxygruppe der Carboxygruppe des Glycins durch die Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) substituiert. Die Abkürzungen der einzelnen Aminosäurereste in der obigen Formel sind konventionell und sind vom Trivialnamen der jeweiligen Aminosäure abgeleitet. So bedeutet p-Glu Pyroglutaminsäure, His Histidin, Trp Tryptophan, Ser Serin, Tyr Tyrosin, Gly Glycin, Leu Leucin, Arg Arginin, Pro Prolin, Phe Phenylalanin und Ala Alanin. Diese sowie Valin, Isoleucin, Threonin, Lysin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutamin, Cystein, Methionin, Phenylalanin und Prolin werden als gewöhnliche, natürlich vorkommende oder von Eiweißen abgeleitete Aminosäuren bezeichnet. Mit Ausnahme von Glycin haben die Aminosäuren der Peptide der Erfindung L-Konfiguration, wenn nichts anderes angegeben ist.

Es ist bekannt, daß der Ersatz von Glycin in der 6-Stellung von GnRH durch D-Aminosäuren ein Peptidmaterial liefert, das

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 3 -

im Vergleich zu GnRH eine 1- bis 35fach größere Wirksamkeit zur Auslösung der Freisetzung von LH und anderen Gonadotropinen durch die Hypophyse von Säugetieren hat.

K. U. Prasad et al., J. Med. Chem., Bd. 19, 492 (1976) stellen fest, daß eine größere Wirksamkeit auch durch Substitution der 3-Position durch 3-(Naphth-1-yl)-Ala erreicht wird. Der Freisetzungseffekt wird erreicht, wenn das GnRH-Analoge einem Säugetier intravenös, subcutan, intramuskulär, oral, intranasal oder intravaginal verabreicht wird.

Es ist weiterhin bekannt, daß die Substitution von His durch verschiedene Aminosäuren (oder die Abspaltung von His) in 2-Position des GnRH-Decapeptids zu Analogon führt, die eine Inhibierungswirkung auf die Freisetzung von LH und anderen Gonadotropinen durch die Hypophyse von Säugetieren ausüben.

Unter bestimmten Umständen möchte man die Ovulation bei weiblichen Säugetieren verhindern. Die Verabreichung von GnRH-Analogen, die Antagonisten der normalen GnRH-Funktion sind, wurde zur Verhinderung der Ovulation angewendet. Aus diesem Grunde werden GnRH-Analoge, die Antagonisten des GnRH sind, als potentielle Kontrazeptiva oder Mittel zur Regulierung der Empfängnisperiode untersucht. Solche Antagonisten erweisen sich auch zur Regulierung der Sekretion von Gonadotropinen bei männlichen Säugetieren als brauchbar und können als männliche Kontrazeptiva verwendet werden.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer Peptide, die starke Antagonisten des endogenen GnRH sind und die

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 4 -

Sekretion von LH und die Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden von Säugetieren verhindern.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Peptide mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

Erfindungsgemäß werden Peptide zur Verfügung gestellt, die die Freisetzung von Gonadotropinen in Säugetieren, einschließlich Menschen, inhibieren, sowie Methoden zur Inhibierung der Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden männlicher und weiblicher Säugetiere. Die verbesserten GnRH-Analogen sind GnRH-Antagonisten und haben eine Inhibitionswirkung auf die Reproduktionsprozesse von Säugetieren. Diese Analogen können zur Inhibierung der Produktion von Gonadotropinen und Sexualhormonen unter verschiedenen Umständen verwendet werden, z. B. bei vorzeitiger Pubertät, hormonabhängiger Neoplasie, Dysmenorrhoe und Endometriose.

Allgemein wurden entsprechend der vorliegenden Erfindung Peptide synthetisiert, die die Sekretion von Gonadotropinen durch die Hypophyse von Säugetieren, einschließlich Menschen, und/oder die Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden stark inhibieren. Diese Peptide sind Analoge von GnRH, in denen die 1-Position durch  $\beta$ -(Naphth-2-yl)-D-alanin (im folgenden  $\beta$ -D-2NAL) substituiert ist, die 3-Position durch D-Trp substituiert ist, die 6-Position und auch die 2-Position substituiert ist. Der Substituent in 1-Position kann

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 5 -

so modifiziert sein, daß seine alpha-Aminogruppe eine Acylgruppe enthält, wie Formyl, Acetyl, Acryloyl, Vinylacetyl oder Benzoyl, wobei Acetyl (Ac) und Acryloyl (Acr) bevorzugt werden. In 2-Position ist vorzugsweise modifiziertes D-Phe vorhanden, das durch spezifische Modifizierung im Benzenring eine erhöhte Antagonistenwirkung hervorruft. Substitution eines Wasserstoffatoms erfolgt vorzugsweise in para- oder 4-Stellung, und der Substituent ist Chlor, Fluor, Brom oder Nitro, wobei Chlor und Fluor bevorzugt werden. Doppelsubstitutionen erfolgen vorzugsweise in 3- und 4-Stellung, z. B. 3,4-Cl<sub>2</sub>-D-Phe. In 6-Position wird 4-NH<sub>2</sub>-D-Phe oder D-Arg eingesetzt. Die Substitutionen in 5-, 7- und 10-Position sind fakultativ. Wenn Cl-Phe in 5-Position eingesetzt wird, ist das Cl vorzugsweise in der ortho- oder 2-Stellung vorhanden.

Da diese Peptide hochwirksam zur Inhibierung der LH-Freisetzung sind, werden sie oft als GnRH-Antagonisten bezeichnet. Die Peptide inhibieren die Ovulation weiblicher Säugetiere, wenn sie in sehr geringen Dosen während des Prooestrus verabreicht werden und bewirken auch die Resorption befruchteter Eier, wenn sie kurz nach der Empfängnis verabreicht werden. Diese Peptide sind auch für die kontrazeptive Behandlung männlicher Säugetiere wirksam.

Die Peptide der vorliegenden Erfindung werden genauer durch die folgende Formel dargestellt:



worin X Wasserstoff oder eine Acylgruppe mit maximal 7 Kohlenstoffatomen ist; R<sup>2</sup> ist Cl-D-Phe, F-D-Phe, NO<sub>2</sub>-D-Phe,

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

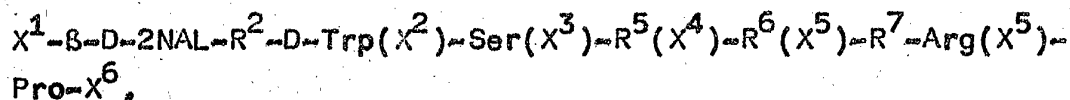
- 6 -

Cl<sub>2</sub>-D-Phe oder Br-D-Phe; R<sup>5</sup> ist Tyr oder Cl-Phe; R<sup>6</sup> ist D-Arg oder 4-NH<sub>2</sub>-D-Phe; R<sup>7</sup> ist Leu oder N-Me-Leu; R<sup>10</sup> ist Gly-NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder D-Ala-NH<sub>2</sub>.

Mit β-D-NAL wird das D-Isomer von Alanin bezeichnet, das am β-Kohlenstoffatom durch Naphthyl substituiert ist, was auch als 3-D-NAL bezeichnet werden kann. Vorzugsweise wird die Bezeichnung β-D-2NAL verwendet, die anzeigt, daß das β-Kohlenstoffatom mit Naphthalen in der 2-Stellung der Ringstruktur verknüpft ist.

Die Peptide der vorliegenden Erfindung können durch klassische Lösungssynthese oder durch eine Festphasentechnik unter Verwendung eines chlormethylierten Harzes, eines Methylbenzhydrylaminharzes (MBHA) oder eines Benzhydrylaminharzes (BHA) dargestellt werden. Die Festphasensynthese wird so durchgeführt, daß die Aminosäuren schrittweise an die Kette angeknüpft werden, nach dem Verfahren, das detailliert in dem US-PS 4.211.693 beschrieben ist. Wie aus der Literatur allgemein bekannt ist, werden Ser, Tyr, Arg und His sowie fakultativ Trp vorzugsweise mit Schutzgruppen an den Seitenketten versehen, bevor sie mit der auf dem Harz aufzubauenden Kette gekoppelt werden. Diese Methode liefert ein voll mit Schutzgruppen versehenes intermediäres Peptidharz.

Die Intermediärprodukte der Erfindung können durch folgende Formel dargestellt werden:



1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 7 -

worin  $X^1$  eine  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe ist, wie sie in der Literatur als geeignet für die schrittweise Synthese von Polypeptiden bekannt ist. Wenn X in dem gewünschten Peptid eine bestimmte Acylgruppe ist, kann diese Gruppe auch als Schutzgruppe verwendet werden. Als  $X^1$  können folgende Klassen von  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppen verwendet werden: 1. Acyl-Schutzgruppen wie Formyl (For), Trifluoracetyl, Phthaloyl, p-Toluensulfonyl (Tos), Benzoyl (Bz), Benzensulfonyl, o-Nitro-phenylsulfenyl (Nps), Tritylsulfenyl, o-Nitro-phenoxyacetyl, Acryloyl (Acr), Chloracetyl, Acetyl (Ac) und p-Chlor-butyryl; 2. aromatische Schutzgruppen vom Urethan-Typ, z. B. Benzyloxycarbonyl (Z) und substituiertes Benzyl-oxycarbonyl, wie p-Chlor-benzyloxycarbonyl, p-Nitro-Benzyl-oxycarbonyl, p-Brom-benzyloxycarbonyl und p-Methoxy-benzyl-oxycarbonyl; 3. aliphatische Urethan-Schutzgruppen, wie tert-Butoxycarbonyl (Boc), Diisopropylmethoxycarbonyl, Isopropoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl und Allyloxycarbonyl; 4. Cycloalkyl-Schutzgruppen vom Urethantyp, wie Cyclopentyl-oxycarbonyl, Adamantyl-oxycarbonyl und Cyclohexyl-oxycarbonyl; 5. Schutzgruppen vom Thiourethan-Typ, wie Phenylthiocarbonyl; 6. Alkylschutzgruppen, wie Allyl (Aly), Triphenylmethyl (trityl) und Benzyl (Bzl); 7. Trialkylsilangruppen, wie Trimethylsilan. Wenn X Wasserstoff ist, ist die bevorzugte  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe Boc.

$X^2$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für den Indol-Stickstoff, wie Formyl oder Benzyl; bei vielen Synthesen ist ein Schutz von Trp jedoch nicht erforderlich.

$X^3$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die alkoholi-

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 8 -

sche Hydroxygruppe von Ser. Dafür wird Acetyl, Benzoyl, Tetrahydropyranyl, tert-Butyl, Trityl, Benzyl oder 2,6-Dichlor-benzyl gewählt, Benzyl wird bevorzugt.

$X^4$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die phenolische Hydroxygruppe von Tyr. Dafür wird Tetrahydropyranyl, tert-Butyl, Trityl, Benzyl, Benzyloxycarbonyl, 4-Brom-benzyl-oxycarbonyl oder 2,6-Dichlor-benzyl gewählt, 2,6-Dichlor-benzyl wird bevorzugt.

$X^5$  ist eine Schutzgruppe für die Stickstoffatome von Arg. Dafür wird Nitro, Tos, Benzyloxycarbonyl, Adamantyl-oxycarbonyl oder Boc gewählt,  $X^5$  kann auch Wasserstoff sein, d. h., daß sich an den Stickstoffatomen der Seitenkette von Arginin keine Schutzgruppe befindet, Tos wird bevorzugt.

$X^6$  ist eine der folgenden Gruppen: Gly-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz); O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz); D-Ala-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz); Gly-NH-(Trägerharz); D-Ala-NH-(Trägerharz); sowie OH, Ester, Amid oder Hydrazid von Gly oder D-Ala oder direkte Bindung an Pro.

Das Kriterium für die Wahl der Seitenkettenschutzgruppen  $X^2$ - $X^5$  besteht darin, daß die Schutzgruppe gegenüber dem Reagens stabil sein muß, das unter den Reaktionsbedingungen für die Abspaltung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppen bei jedem Syntheseschritt gewählt wird. Die Schutzgruppe darf nicht unter den Kupplungsbedingungen abgespalten werden und muß nach Abschluß der Synthese der gewünschten Aminosäuresequenz unter Reaktionsbedingungen abspaltbar sein, die die Peptidkette nicht verändern.

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 9 -

Wenn die Gruppe  $X^6$  Gly-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz), D-Ala-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz) oder O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz) ist, ist der Esterteil einer der vielen funktionellen Gruppen des Polystyren-Trägerharzes dargestellt. Wenn die Gruppe  $X^6$  Gly-NH-(Trägerharz) oder D-Ala-NH-(Trägerharz) ist, so ist Gly oder D-Ala über eine Amidbindung an ein BHA-Harz oder ein MBAH-Harz gebunden.

Wenn X beispielsweise in der Endformel vorhanden ist, kann es als  $X^1$ -Schutzgruppe für die  $\alpha$ -Aminogruppe von D-NAL benutzt werden, indem es vor der Kupplung dieser letzten Aminosäure an die Peptidkette zugegeben wird. Vorzugsweise wird jedoch eine Reaktion an dem Peptid an dem Harz durchgeführt (nach Entblockung der  $\alpha$ -Aminogruppe, während die Gruppen an der Seitenkette geschützt bleiben), z. B. durch Reaktion mit Essigsäure in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder vorzugsweise mit Acetanhydrid oder durch eine andere geeignete aus der Literatur bekannte Reaktion.

Von einem chlormethylierten Trägerharz kann das voll geschützte Peptid auf bekannte Weise durch Ammonolyse abgespalten werden, so daß das voll geschützte Amid-Zwischenprodukt erhalten wird. Abspaltung der Schutzgruppen des Peptids sowie die Abspaltung des Peptids von einem Benzhydrylaminharz kann bei 0 °C mit Flußsäure (HF) erfolgen. Vor der Behandlung mit HF wird dem Peptid vorzugsweise Anisol zugesetzt. Nach dem Entfernen der HF unter Vakuum wird das abgespaltene, von Schutzgruppen befreite Peptid zweckmäßig mit Ether behandelt, dekantiert, in verdünnter Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 10 -

Die Reinigung des Peptids erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie an einer CMC-Säule und anschließende Verteilungschromatographie mit dem Elutionssystem Butanol/0,1 N Essigsäure (Volumenverhältnis 1:1) an einer Kolonne mit Sephadex G-25 oder durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie in bekannter Weise.

Die Peptide der Erfindung sind in Dosen von unter 100 Mikrogramm je Kilogramm Körpergewicht wirksam zur Verhinderung der Ovulation weiblicher Ratten wirksam, wenn sie gegen Mittag des Proöestrustages verabreicht werden. Für längere Unterdrückung der Ovulation kann eine höhere Dosierung im Bereich von 0,1 bis etwa 2,5 Milligramm je Kilogramm Körpergewicht erforderlich sein. Diese Antagonisten sind auch als Kontrazeptive wirksam, wenn sie männlichen Säugetieren auf reguläre Weise verabreicht werden. Da diese Verbindungen den Testosteronspiegel reduzieren (eine unerwünschte Begleiterscheinung beim normalen, sexuell aktiven männlichen Tier), kann es zweckmäßig sein, zusammen mit dem GnRH-Antagonisten Ersatzdosen von Testosteron zu verabreichen. Diese Antagonisten können auch zur Regulierung der Produktion von Gonadotropinen und Sexualsteroiden zu anderen als den oben angegebenen Zwecken verwendet werden.

#### Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert.

Die in Tabelle I angegebenen Peptide mit der Formel

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 11 -

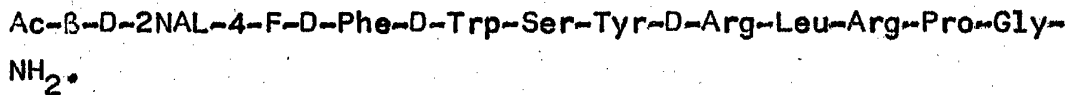


werden nach dem oben angegebenen Festphasenverfahren dargestellt.

TABELLE I

	R <sup>2</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>10</sup>
1	4-F-D-Phe	D-Arg	Gly-NH <sub>2</sub>
2	"	4-NH <sub>2</sub> -D-Phe	"
3	4-Cl-D-Phe	D-Arg	"
4	4-Cl-D-Phe	"	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
5	4-NO <sub>2</sub> -D-Phe	"	"
6	4-Br-D-Phe	"	"
7	4-F-D-Phe	"	D-Ala-NH <sub>2</sub>
8	"	"	Gly-NH <sub>2</sub> (N <sup>α</sup> MeLeu <sup>7</sup> )
9	"	"	" (2-Cl-Phe <sup>5</sup> )
10	"	"	Gly-OCH <sub>3</sub>
11	"	"	Gly-NHNH <sub>2</sub>

Als Beispiel wird eine repräsentative Festphasensynthese des oben genannten Peptide Nr. 1, das als [Ac-β-D-2NAL<sup>1</sup>, 4-F-D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>]-GnRH bezeichnet wird, im folgenden beschrieben. Dieses Peptid hat die folgende Formel:



Es wird ein BHA-Harz verwendet, und Boc-geschütztes Gly wird 2 Stunden in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit einem dreifachen Überschuß des Boc-Derivats und DCC als Aktivierungsmittel an das Harz gebunden.

1.3.1984

253 375/2

- 12 -

62 695/18/39

Der Glycinrest wird über eine Amidbindung an den BHA-Rest gebunden.

Nach der Kupplung jedes Aminosäurerestes erfolgt Waschen, Abspaltung der Schutzgruppe und Kupplung des nächsten Aminosäurerestes in einer automatischen Maschine nach dem folgenden Schema, wobei mit etwa 5 g Harz begonnen wird.

Schritt	Reagenzien und Operationen	Mischzeit (min)
1	Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 80 ml (2x)	3
2	Waschen mit Methanol (MeOH) 30 ml (2x)	3
3	Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 80 ml (3x)	3
4	50 % TFA plus 5 % Ethan-1,2-dithiol in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 70 ml (2x)	10
5	Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 80 ml (2x)	3
6	TEA 12,5 % in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 70 ml (2x)	5
7	Waschen mit MeOH 40 ml (2x)	2
8	Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 80 ml (3x)	3
9	Boc-Aminosäure (10 mMol) in 30 ml DMF oder $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , je nach Löslichkeit der jeweiligen geschützten Aminosäure plus DCC (10 mMol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1x)	30-300
10	Waschen mit MeOH 40 ml (2x)	3
11	TEA 12,5 % in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 70 ml (1x)	3
12	Waschen mit MeOH 30 ml (2x)	3
13	Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 80 ml (2x)	3

Nach Schritt 13 wird ein aliquoter Teil für eine Ninhydrinprobe entnommen. Ist die Probe negativ, wird mit Schritt 1 zum Kuppeln der nächsten Aminosäure fortgefahren. Ist die

Probe positiv oder leicht positiv, werden die Schritte 9 bis 13 wiederholt.

Das obige Schema wird für die Kupplung jeder Aminosäure des Peptids der Erfindung benutzt, nachdem die erste Aminosäure gebunden wurde. Für jede der verbleibenden Aminosäuren während der gesamten Synthese wird  $N^{\alpha}$ Boc als Schutzgruppe verwendet.  $N^{\alpha}$ Boc- $\beta$ -D-2NAL wird nach einer bekannten Methode dargestellt, z. B. entsprechend der ausführlichen Beschreibung im US-PS Nr. 4.234.571 vom 18. November 1980. Die Seitenkette von Arg wird mit Tos geschützt. Als Schutzgruppe für die Hydroxygruppe der Seitenkette von Ser wird OBzl verwendet, als Schutzgruppe für die Hydroxygruppe der Seitenkette von Tyr dient 2,6-Dichlor-benzyl. Trp verbleibt ungeschützt.  $N^{\alpha}$ Boc- $\beta$ -D-2NAL wird als letzte Aminosäure eingeführt. Boc-Arg(Tos) und Boc-D-Trp, die in  $CH_2Cl_2$  schlecht löslich sind, werden mit Hilfe von DMF- $CH_2Cl_2$ -Gemischen gekuppelt.

Nach Abspaltung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe am N-Ende erfolgt Acetylierung mit einem großen Überschuß von Acetanhydrid in Dichlormethan. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen der Seitenketten erfolgt sehr leicht bei 0 °C mit HF. Vor der Behandlung mit HF wird Anisol als Spülmittel zugegeben. Nach der Entfernung der HF unter Vakuum wird das Harz mit 50%iger Essigsäure gewaschen, und die Waschextrakte werden zu einem Rohpeptidpulver lyophilisiert.

Die Reinigung des Peptids erfolgt dann durch Ionenaustausch-

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 14 -

chromatographie an CMC (Whatman CM 32 mit einem Gradienten von 0,05 bis 0,3 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  in 50 : 50 Methanol - Wasser) und anschließende Verteilungschromatographie in einer Gel-filtrationskolonne mit dem Elutionssystem Butanol - 0,1 N Essigsäure (Volumenverhältnis 1 : 1).

Die Prüfung des Peptids auf Homogenität erfolgt durch Dünnschichtchromatographie und verschiedene Lösungsmittelsysteme sowie durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit umgekehrten Phasen und einer wäßrigen Triethylammoniumphosphat-lösung plus Acetonitril. Die Aminosäureanalyse des gebildeten gereinigten Peptids stimmt mit der Formel für die dargestellte Struktur überein und zeigt nahezu ganze Zahlen für jede Aminosäure in der Kette. Die optische Rotation wurde mit einem photoelektrischen Polarimeter zu  $[\alpha]_D^{22} = -29^\circ + 1$  ( $c = 1$ , 50%ige Essigsäure) bestimmt.

Das Peptid wird in vitro und in vivo getestet. Der in-vitro-Test erfolgt an zerkleinerten Rattenhypophysenzellen, die 4 Tage vor dem Test in Kultur gehalten wurden. Der nach der Zugabe der Peptide eingestellte LH-Spiegel wird durch einen spezifischen Radioimmuntest für Ratten-LH bestimmt. Die Kontrollplatten erhalten nur eine 3nanomolare Dosis GnRH; die Versuchsplatten erhalten eine 3nanomolare Dosis GnRH plus eine Dosis von entweder dem vorgegebenen Standardantagonisten (für Vergleichszwecke), d. h.  $[\text{Ac-Dehydro-Pro}^1, 4\text{-F-D-Phe}^2, \text{D-Trp}^{3,6}]\text{-GnRH}$ , oder dem Testpeptid in Konzentrationen zwischen 0,01 und 10nanomolar. Die LH-Menge, die von den nur mit GnRH behandelten Proben freigesetzt wird, wird mit der von den Proben, die mit GnRH plus Peptid be-

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 15 -

handelt wurden, freigesetzten Menge verglichen.

Die Fähigkeit des Testpeptids, die Menge des durch 3nanomolares GnRH freigesetzten LH zu reduzieren, wird mit der des vorgegebenen Standardpeptids verglichen. Die Ergebnisse werden aus 3 bis 5 Dosen jedes Peptids nach dem statistischen Programm BIOPROG (aufgestellt von D. Rodbard NICHD) berechnet und als relative Wirksamkeit gegenüber dem vorgegebenen Standard ausgedrückt. Das Standardpeptid blockiert gewöhnlich 50 % des von GnRH freigesetzten LH bei einem Verhältnis von unter 0,1 [Antagonist] .

1 [GnRH]

Das oben beschriebene Peptid wurde auch zur Bestimmung der Wirksamkeit der Verhinderung der Ovulation bei weiblichen Ratten verwendet. Bei diesem Test wurde eine festgelegte Zahl geschlechtsreifer weiblicher Sprague-Dawley-Ratten, nämlich sechs, mit einem jeweiligen Körpergewicht von 225 bis 250 g gegen Mittag des Prooestrus-Tages mit einer Injektion von 10 µg Peptid in Maisöl behandelt. Der Prooestrus ist der Nachmittag vor dem Oestrus (Eisprung). Eine weitere Gruppe weiblicher Ratten, denen das Peptid nicht verabreicht wird, dient als Kontrolle. Jede der weiblichen Kontroll-Ratten hatte einen Eisprung zum Oestrus. Von den behandelten Ratten hatte keine einen Eisprung. Als Schlußfolgerung daraus wird das Peptid als deutlich wirksam zur Verhinderung des Eisprungs weiblicher Ratten bei sehr niedriger Dosierung angesehen, und das Peptid wird bei einer Dosis von etwa 10 µg als absolut wirksam angesehen. Zusätzlich erfolgen Tests mit niedrigeren Dosierungen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle II zusammengefaßt.

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 16 -

Die übrigen Peptide Nr. 2 bis 7 werden in ähnlicher Weise dargestellt und gereinigt. Nach der Aminosäureanalyse wird die Reinheit durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen bestätigt. Die in-vitro-Testung in ähnlicher Weise ergibt die in der Tabelle angegebene Wirksamkeit jeweils gegenüber dem vorgegebenen Standardantagonisten. Die in-vivo-Testung erfolgt mit verschiedenen Dosierungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II angegeben.

TABELLE II

Peptid Nr.	in-vitro- Wirksamkeit <sup>+</sup> )	Dosis µg	in vivo Anzahl Ovulationen
1	0,44	10	0/6
		5	0/8
		2,5	0/10
		1	0/8
		0,5	2/11
2	1,4	5	3/6
3	0,56	1	0/10
		0,5	2/10
4	0,38	10	0/8
		5	0/7
		2,5	0/10
		1	0/4
		0,5	6/6
5	0,20	5	4/10
6	0,46	2,5	9/10

1.3.1984

253 375/2

- 17 -

62 695/18/39

TABELLE II (Fortsetzung)

Peptid Nr.	in-Vitro- Wirksamkeit <sup>+</sup> )	Dosis µg	in vivo	Anzahl Ovulationen
7	0,63	1		1/10
		0,5		7/10
8		1		0/5
		0,5		
9		1		0/7
		0,5		

<sup>+</sup>) relativ zu [Ac-Dehydro-Pro<sup>1</sup>, 4-F-D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>]-GnRH

Alle angegebenen Peptide blockieren bei geeigneter Konzentration vollständig die GnRH-induzierte LH-Sekretion in vitro, obwohl die meisten in vitro etwas geringer wirksam sind als der vorgegebene Standard; jedoch in vivo sind diese Peptide viel wirksamer.

Alle Peptide erweisen sich als wirksam zur Verhinderung der Ovulation weiblicher Säugetiere bei sehr niedrigen Dosierungen. Einige von ihnen sind mindestens zweimal so wirksam wie alle bisher bekannten und getesteten GnRH-Antagonisten.

Die Peptide der Erfindung werden oft in Form pharmazeutisch akzeptabler nichttoxischer Salze, z. B. Additionssalze mit Säuren, oder in Form von Metallkomplexen, z. B. mit Zink, Barium, Calcium, Magnesium, Aluminium usw. (die als Additionssalze für diesen Zweck angesehen werden) oder als Kom-

1.3.1984

253 375/2

- 18 -

62 695/18/39

bination dieser beiden Formen verabreicht. Beispiele für Additionssalze mit Säuren sind Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Nitrat, Oxalat, Fumarat, Gluconat, Tannat, Maleat, Acetat, Citrat, Benzoat, Succinat, Alginat, Pamoat, Malat, Ascorbat, Tartrat usw. Wenn der aktive Bestandteil in Tablettenform verabreicht werden soll, kann die Tablette ein pharmazeutisch akzeptables Verdünnungsmittel sowie ein Bindemittel enthalten, z. B. Tragant, Maisstärke oder Gelatine; ein Auflösungsmittel, wie Alginsäure; sowie ein Gleitmittel, wie Magnesiumstearat. Wird Verabreichung in flüssiger Form gewünscht, so können Süßmittel und/oder Geschmacksverbesserungsmittel als Teil des pharmazeutisch akzeptablen Lösungsmittels verwendet werden. Intravenöse Verabreichung kann in physiologischer Kochsalzlösung, Phosphat-Pufferlösungen oder ähnlichem erfolgen.

Die pharmazeutischen Zubereitungen enthalten gewöhnlich das Peptid in Verbindung mit einem herkömmlichen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Gewöhnlich beträgt die Dosierung zwischen 1 bis ca. 100 g Peptid je kg Körpergewicht des behandelten Subjekts bei intravenöser Verabreichung. Orale Dosierungen sind höher. Allgemein erfolgt die Behandlung von Subjekten mit diesen Peptiden im ganzen in derselben Weise wie die klinische Behandlung mit anderen GnRH-Antagonisten.

Diese Peptide können Säugetieren intravenös, subcutan, intramuskulär, oral, intranasal oder intravaginal verabreicht werden, um eine Inhibierung der Fruchtbarkeit und/oder Kontrolle der Fruchtbarkeit zu erreichen, sowie zu Anwendungszwecken, die eine reversible Unterdrückung der Keimdrüsen-

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 19 -

funktion erfordern, wie Behandlung von vorzeitiger Pubertät oder während einer Strahlen- oder Chemotherapie. Die wirksamen Dosierungen variieren mit der Anwendungsform und der Art des behandelten Säugetiers. Ein Beispiel einer typischen Dosierungsform ist eine physiologische Kochsalzlösung, die das Peptid enthält und die so verabreicht wird, daß eine Dosis zwischen ca. 0,1 bis 2,5 mg/kg Körpergewicht erreicht wird. Orale Verabreichung des Peptids kann sowohl in flüssiger Form als auch in fester Form erfolgen.

Obwohl die Erfindung bezüglich ihrer vorzugsweisen Verkörperungen beschrieben wurde, versteht es sich, daß Veränderungen und Modifizierungen, wie sie einem auf diesem Gebiet erfahrenen Mitarbeiter einleuchten, innerhalb des Bereiches der Erfindung liegen, welche in den nachfolgenden Ansprüchen spezifiziert wird. Beispielsweise können andere in der Literatur bekannte Substitutionen, die die Wirksamkeit der Peptide nicht deutlich verändern, in den Peptiden der Erfindung angewendet werden. So kann anstelle des für R<sup>10</sup> spezifizierten Restes Gly-OCH<sub>3</sub> oder Gly-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder Gly-NHNH<sub>2</sub> oder Sar-NH<sub>2</sub> (Sar = Sarcosin) verwendet werden, die als gleichwertig angesehen werden.

Die Einzelheiten der Erfindung sind in den folgenden Ansprüchen dargelegt.

1.3.1984

253 375/2

- 20 -

62 695/18/39

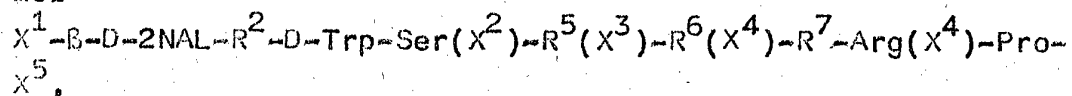
### Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Peptids der folgenden Formel oder eines nichttoxischen Salzes davon:



worin X Wasserstoff oder eine Acylgruppe mit maximal 7 Kohlenstoffatomen ist;  $R^2$  ist Cl-D-Phe, F-D-Phe-NO<sub>2</sub>-D-Phe, Cl<sub>2</sub>-D-Ph oder Br-D-Phe;  $R^5$  ist Tyr oder 2-Cl-D-Phe;  $R^6$  ist 4NH<sub>2</sub>-D-Phe oder D-Arg;  $R^7$  ist Leu oder N<sup>4</sup>Me-Leu;  $R^{10}$  ist Gly-NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder D-Ala-NH<sub>2</sub>, gekennzeichnet dadurch, daß es folgende Schritte umfaßt:

(a) die Bildung einer Intermediärverbindung mit der Formel



worin  $X^1$  Wasserstoff oder eine  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe ist;  $X^2$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die alkoholische Hydroxygruppe von Ser;  $X^3$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die phenolische Hydroxygruppe von Tyr;  $X^4$  ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die Stickstoffatome von Arg;  $X^5$  ist Gly-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz), O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz), D-Ala-O-CH<sub>2</sub>-(Trägerharz), Gly-NH-(Trägerharz), D-Ala-NH-(Trägerharz), Gly-NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder Ester, Amide und Hydrazide von Gly oder D-Ala;

(b) die Abspaltung von einer oder mehreren der Gruppen  $X^1$  bis  $X^4$  und/oder Abspaltung von dem in  $X^5$  einbegriffenen Trägerharz und gegebenenfalls Umwandlung eines gebildeten Peptids in eines seiner nichttoxischen Salze.

1.3.1984

253 375/2

62 695/18/39

- 21 -

2. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^2$  4-Cl-D-Phe oder 4-F-D-Phe ist,
3. Verfahren gemäß Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^7$  Leu ist,
4. Verfahren gemäß Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^6$  D-Arg ist,
5. Verfahren gemäß Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^5$  Tyr ist,
6. Verfahren gemäß Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß X Ac ist,
7. Verfahren gemäß Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß X Acr ist,
8. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß X ac und  $R^4$  D-Arg ist,
9. Verfahren gemäß Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^2$  4-Cl-D-Phe ist,
10. Verfahren gemäß Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß  $R^2$  4-F-D-Phe ist,