



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 70997

(13) C2

(51) 7 C07K7/23, A61K38/09

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТАГОНІСТИ РГЛГ З ПОЛІПШЕНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ РОЗЧИННОСТІ, СПОСІБ ЇХ ОТРИМАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ

1

2

(21) 2001106842

(22) 11.03.2000

(24) 15.11.2004

(86) PCT/EP00/02165, 11.03.2000

(31) 199 11 771.3

(32) 17.03.1999

(33) DE

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

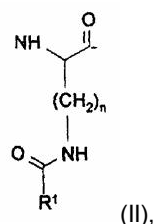
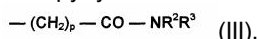
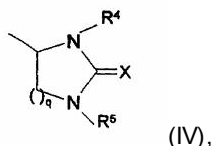
(72) Бернд Міхаель, DE, Кутчер Бернхард, DE, Гюнтер Екхард, DE, Ромейз Петер, DE, Рейссманн Томас, DE, Бекерс Томас, DE

(73) ЦЕНТАРІС ГмбХ, DE

(56) WO 9719953 A

EP 0 328 090 A

EP 0 413 209 A

(57) 1. Сполука загальної формули I
A- $X_{xx}^1-X_{xx}^2-X_{xx}^3-X_{xx}^4-X_{xx}^5-X_{xx}^6-X_{xx}^7-X_{xx}^8-X_{xx}^9-X_{xx}^{10}-NH_2$ (I),
де А являє собою ацетил або 3-(4-фторфеніл)-пропіонільну групу, X_{xx}^1 — D-Nal(1) або D-Nal(2), $X_{xx}^2-X_{xx}^3$ — D-Сра-D-Pal(3) або простий зв'язок, X_{xx}^4 — Ser, X_{xx}^5 — N-Me-Tyr, X_{xx}^6 — D-Cit, D-Hci або D-амінокислотну групу загальної формули (II)де р означає ціле число від 1 до 4, причому R^1 представляє групу з загальною формулою III,де р означає ціле число від 1 до 4, R^2 означає водень або алкільну групу, R^3 означає незаміщену або заміщену арильну групу або гетероарильну групу, або R^1 представляє 3-аміно-1,2,4-триазол-5-карбонільну групу, або R^1 представляє кільце загальної формули (IV)де q означає число 1 або 2, R^4 означає атом водню або алкільну групу, R^5 означає атом водню або алкільну групу, і Х означає атом кисню або сірки, X_{xx}^7 — Leu або Nle, X_{xx}^8 — Arg або Lys(iPr), X_{xx}^9 — Pro, і X_{xx}^{10} — Ala або Sar, та їхні солі з фармацевтично прийнятними кислотами.

2. Сполука за п. 1, де сіль є ацетатом, трифторацетатом або ембонатом.

3. Сполуки за п. 1 або 2, де X_{xx}^6 означає D-[ε-N'-(імідазолідин-2-он-4-іл)-форміл]-Lys, D-(3-аміно-1,2,4-триазол-3-карбоніл)-Lys, скорочено D-Lys(Atz), або D-[ε-N'-4-(4-амідино-феніл)-аміно-1,4-діоксобутил]-Lys, скорочено D-Lys(B).4. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.5. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(Atz)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.6. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.7. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.8. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Ala¹⁰-NH₂.9. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂.10. Сполука за п. 1 з формулою Ac-D-Nal(2)¹-D-Сра²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂.11. Сполука за п. 1 з формулою 3-(4-фторфеніл)пропіоніл-D-Nal(1)¹-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(Atz)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

12. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за одним з пп. з 1 по 11.

13. Спосіб одержання сполук загальної формули I за п. 1, який відрізняється тим, що фрагменти забезпечених відповідними захисними групами ланок X_{xx}^m , де m означає ціле число від 1 до 10, і X_{xx}^1 є ацетильованим, синтезують на твердій фазі або у розчині традиційним способом, відразу після цього фрагменти на твердій фазі зв'язують через сегментне зв'язування і по завершенню зв'язуван-

(13) C2

(11) 70997

(19) UA

ня сполуки загальної формули I традиційним способом з амідуванням у ланці Xxx^{10} відщеплюють від твердої фази.

14. Застосування речовин за пп. з 1 по 11 для одержання медикаментів для лікування залежних від гормонів пухлин, зокрема карциноми передміхурової залози або раку молочної залози, а також

незлоякісних захворювань, лікування яких вимагає пригнічення РГЛГ-гормону.

15. Спосіб одержання медикаментів, який **відрізняється** тим, що сполуки за пп. з 1 по 11 змішують із традиційними носіями або допоміжними речовинами й розфасовують як медикаменти.

Винахід стосується антагоністів РГЛГ з поліпшеними властивостями розчинності, способу одержання цих сполук, медикаментів, які містять ці сполуки, а також застосування медикаментів для лікування гормонозалежних пухлин та спричинених гормонами незлоякісних захворювань, таких як доброякісна гіперплазія передміхурової залози (ВРН) та ендометріоз.

Визначення пептидів, подано за номенклатурою, прийнятою комісією МСТПХ-МБХС з біохімічної номенклатури (European J. Biochem. 1984, 138, 9-37), у якій згідно з традиційними відображеннями аміногрупи на N-кінці подаються справа наліво, а карбоксильна група на C-кінці - зліва направо. Антагоністи РГЛГ, такі як пептиди, згідно з винаходом містять природні та синтетичні амінокислоти, причому до перших належать Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp та His. Скорочення окремих амінокислотних залишків робляться на основі традиційних назв амінокислот: Ala=аланін, Arg=аргінін, Cys=цистеїн, Leu=лейцин, Lys=лізин, Phe=фенілаланін, Pro=пролін, Ser=серин, Thr=треонін, Trp=триптофан, Tyr=тирозин і Sar=саркозин. Переважно всі описані авторами амінокислоти походять від L-серії. Наприклад, D-Nal(2) є скороченням для 3-(2-нафтил)-D-аланіну, а Ser є скороченням для L-серину. Заміщення на ε-аміногрупі у боковому ланцюгу лізину показуються після Lys у дужках за допомогою відповідної форми скорочення.

Інші скорочення:

Ac	Ацетил
Atz	3-аміно-1,2,4-триазол-5-карбоніл
B	4-(4-амідино-феніл)-аміно-1,4-діоксобутил
Boc	трет-бутилоксикарбоніл
Bop	Бензотриазол-1-окси-tris-(диметиламіно)-фосфоній-гексафторофосфат
DCC	Дициклогексилкарбодімід
DCM	Дихлорметан
Ddz	Диметоксифеніл-диметилметиленокси-карбоніл (диметокси-диметил-Z)
DIC	Діізопропілкарбодімід
DIPEA	N,N-діізопропілетиламін
DMF	Диметилформамід
Fmoc	Флуоренілметилоксикарбоніл
HF	Плавикова кислота
HOBt	1-гідроксибензотриазол
HPLC	Рідинна хроматографія високого тиску

Me	Метил
TFA	Трифтороцтова кислота
Z	Бензилоксикарбоніл
Hci	Гомоцитрулін
Cpa	4-хлорфенілаланін

Пептиди згідно з винаходом є аналогами гормону, що вивільнює лютеїнізований гормон (РГЛГ), який має таку структуру:

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, [РГЛГ, гонадорелін].

Понад 20 років дослідники шукали вибірково ефективні антагоністи РГЛГ-декапептиду [M. Karten und J.E. Rivier, Endocrine Reviews 7, 44-66 (1986)]. Велика зацікавленість у подібних антагоністах зумовлена їх корисністю в галузях ендокринології, гінекології, запобігання вагітності та при ракових захворюваннях. Велику частку сполук було одержано як потенційні РГЛГ-антагоністи. Найцікавішими сполуками, що були відомі до нинішнього часу, є сполуки, структура яких являє собою модифікації РГЛГ-структури.

Першу серію ефективних антагоністів одержують через введення ароматичних амінокислотних залишків у позиціях 1, 2, 3 та 6 або 2, 3 та 6. Традиційна форма запису сполук виглядає так: спочатку вказують амінокислоти, які у пептидному ланцюгу РГЛГ розташовані на місці первісних амінокислот, причому позиції, на яких відбувалося заміщення, позначають цифрами, набраними верхнім індексом. Крім того, "РГЛГ" означає, що йдеться про аналоги РГЛГ, у яких відбувалося заміщення.

Відомі антагоністи:

[Ac-D-Cpa^{1,2}, D-Trp^{3,6}] РГЛГ (D. H. Coy et al., In: Gross, E. and Meienhofer, J. (Eds) Peptides; Proceedings of the 6th American Peptide Symposium, S.775-779, Pierce Chem. Co., Rockville Ill. (1979):

[Ac-Pro¹, D-Cpa², D-Nal(2)^{3,6}] РГЛГ (Патент США №4419347) і

[Ac-Pro¹, D-Cpa², D-Trp^{3,6}] РГЛГ (J.L. Pineda, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 420, 1983).

Для посилення дії антагоністів пізніше у позиції 6 вводили основні амінокислоти, наприклад, D-Arg. Наприклад [Ac-D-Gpa^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰] РГЛГ (ORG-30276) (D.H. Coy, et al., Endocrinology 100, 1445, 1982); та [Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶] РГЛГ (ORF 18260) (J.E. Rivier et al., in: Vickery B.H. Nestor, Jr. JJ. (Hafez, E.S.E (Eds). LH-RH and its Analogs, S.11-22 MTP Press, Lancaster, UK 1984).

Інші ефективні РГЛГ-антагоністи описано у WO 92/19651, WO 94/19370, WO 92/17025, WO 94/14841, WO 94/13313, US-A 5,300,492, US-A 5,140,009, EP 0 413 209 A1 та DE 19544212 A1.

В останньому описано сполуки з модифікованою орнітиною або лізиновою ланками у позиції 6, які відповідають такій формулі: AC-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Xxx⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂, де D-Xxx представляє амінокислотну групу загальної формули (VI)

-NH-CH-CO-

(CH₂)_n

NH

CO - R

РГЛГ-антагоністи також описано у WO 97/19953 та EP-A2 0 328 090.

Іншими відомими РГЛГ-антагоністами є Antarelix, Ganirelix та Cetrorelix.

Antarelix:

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

Ganirelix:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-hArg(Et)⁶-Leu⁷-hArg(Et)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Cetrorelix:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Метою винаходу є створення РГЛГ-антагоністів, які виявляють підвищену ферментативну стабільність і значно кращу розчинність у воді.

Цю задачу вирішують завдяки сполукам загальної формули (I),
A-Xxx¹-Xxx²-Xxx³-Xxx⁴-Xxx⁵-Xxx⁶-Xxx⁷-Xxx⁸-Xxx⁹-Xxx¹⁰-NH₂ (I)

де

A являє собою ацетил- або 3-(4-фторфеніл)-пропіонільну групу,

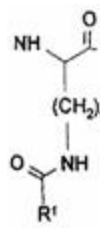
Xxx¹ - D-Nal(I) або D-Nal(2),

Xxx²-Xxx³ - D-Cpa-D-Pal(3) або простий зв'язок,

Xxx⁴ - Ser,

Xxx⁵ - N-Me-Tyr,

Xxx⁶ - D-Cit, D-Hci або D-амінокислотну групу загальної формули (II)

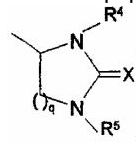


(II)

де n означає число 3 або 4, причому R¹ представляє групу з загальною формулою III,

—(CH₂)_p—CO—NR²R³ (III)

де p означає ціле число від 1 до 4, R² означає водень або алкільну групу, R³ означає незаміщену або заміщену арильну групу або гетероарильну групу, R¹ представляє 3-аміно-1,2,4-триазол-5-карбонільну групу, або R¹ представляє кільце загальної формули (IV)



(IV)

де q означає число 1 або 2, R⁴ означає атом

водню або алкільну групу, R⁵ означає атом водню або алкільну групу, і X означає атом кисню або сірки,

Xxx⁷ - Leu або Nle,

Xxx⁸ - Arg або Lys(iPr),

Xxx⁹ - Pro, і

Xxx¹⁰ - Ala або Sar,

та їхні солі з фармацевтично прийнятними кислотами, зокрема ацетати, ембонати та трифтороацетати.

Серед сполук згідно з винаходом перевагу віддають тим сполукам, де Xxx⁶ означає D-[ε-N'-(імідазолідин-2-он-4-іл)-форміл]-lys, D-(3-аміно-1,2,4-триазол-3-карбоніл)-lys, скорочено D-Lys(Atz) або D-[ε-N'-4-(4-амідинофеніл)-аміно-1,4-діоксобутил]-Lys, скорочено D-Lys(B).

Іншими сполуками, яким згідно з винаходом віддають перевагу, є:

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(Atz)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Ala¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂,

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hci⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂,

3-(4-фторфеніл)-пропіоніл-D-Nal(1)¹-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(Atz)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

а також їхні солі з вищевказаними фармацевтично прийнятними кислотами.

Сполуки згідно з винаходом застосовуються для лікування гормонозалежних пухлин, зокрема карциноми передміхурової залози або раку молочної залози, а також для незлоякісних захворювань, лікування яких вимагає пригнічення РГЛГ-гормону. Для цього їх змішують з традиційними носіями або допоміжними речовинами й розфасовують як медикаменти.

Синтез сполук за формулою (I) може відбуватися як шляхом класичної конденсації фрагментів, так і шляхом синтезу на твердій фазі за Мерифілдом з послідовною побудовою при застосуванні у боковому ланцюгу вже з карбоною кислоту загальної формули R¹-COOH ацильованого D-Лізіну, а також шляхом обміну декапептидної ланки на відповідні карбонові кислоти через амідне зв'язування у боковому ланцюгу D-Лізіну⁶. Після цього здійснюють введення R¹-CO-групи на трьох різних етапах способу: перед конденсацією окремих ланок пептиду, після введення лізіну або орнітину у пептидний ланцюг, але до конденсації наступної ланки, або після конденсації всіх ланок.

Сполуки формули (I) можуть синтезуватися відомими способами, наприклад шляхом повного синтезу на твердій фазі, часткового синтезу на твердій фазі (так званої конденсації фрагментів) або класичного зв'язування розчинів (див. М. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag 1984).

Наприклад, способи синтезу на твердій фазі

описано у підручнику "Solid Phase Peptide Synthesis" J.M. Stewart and J.D. Young, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill, 1984 та у роботах G. Barany and R.B. Merrifield "The Peptides", Ch. 1, S.1-285, 1979, Academic Press Inc. Класичні способи синтезу на основі розчинів докладно описано у роботі "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Synthese von Peptiden" E. Wünsch (Herausgeber) 1974, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, BRD.

Наприклад, під час здійснення поетапної побудови спочатку карбоксикінцева амінокислота, в якій α -постійна аміногрупа є захищеною, ковалентно зв'язується зі звичним у таких випадках нерозчинним носієм, α -амінозахисна група цієї амінокислоти відщеплюється, внаслідок цього виникає вільна аміногрупа, з якою через свою карбоксигрупу зв'язується наступна захищена амінокислота, і таким чином поступово, у правильній послідовності, зв'язуються звичні амінокислоти пептиду, який синтезується, і після зв'язування всіх амінокислот готовий пептид відщеплюється від носія, і за певних умов відщеплюються інші наявні захисні групи побічної функції. Поетапну конденсацію здійснюють традиційним способом шляхом синтезу відповідних звичайним чином захищених амінокислот.

Зв'язування окремих амінокислот між собою здійснюється традиційними способами, зокрема такими:

- Способи симетричних ангідридів у присутності дициклогексилкарбодіміду або діізопропілкарбодіміду (DCC, DIC)
- Карбодімідні способи
- Карбодімідно-гідроксибензотриазольні способи (див. The Peptides, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meienhofer).

В оптимальному варіанті при з'єднанні фрагментів застосовується з'єднання азидів, яке відбувається без рацемізації, або DCC-1-гідроксибензотриазольний або OCC-3-гідроксі-4-оксо-3,4-дигідро-1,2,3-бензотриазиновий способи. Застосовують також активовані естери фрагментів.

Для поетапної конденсації амінокислот найкраще підходять активовані естери N-захищених амінокислот, наприклад N-гідроксисукцинімідний або 2,4,5-трихлорфеніловий естери. Аміноліз добре каталізується N-гідроксисполуками, які мають кислотність оцтової кислоти, наприклад 1-гідроксибензотриазолом.

Як проміжні амінозахисні групи можна застосовувати дегідруючі групи, наприклад бензилоксикарбонільний залишок (= Z-залишок) або слабокислі відщеплювані групи. Як захисні групи для α -постійних аміногруп можна застосовувати наприклад такі:

третинні бутилоксикарбонільні групи, флуоренілметилоксикарбонільні групи, карбобензоксигрупи або карбобензтіогрупи (у даному випадку або з р-бром, або р-нітробензиловим залишком), трифторацетильна група, фталільний залишок, о-нітрофеноксіяцетильна група, тритильна група, р-толуолсульфонільна група, бензильна група, заміщені у бензольному ядрі бензильні залишки (р-бром, або р-нітробензильний залишок) та α -фенілетиловий залишок. Вони також вказані у ро-

ботах Jesse P. Greenstein und Milton Winitz, Chemistry of Amino Acids, New York 1961, John Wiley and Sons, Inc., Volume 2, наприклад, стор.883 і далі, "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, стор.1-285, 1979, Academic Press Inc. а також The Peptides, Volume 2, Ed.E. Gross and J. Maenhofer, Academic Press, New York. Ці захисні групи переважно застосовуються і для захисту інших функціональних бокових груп (ОН-групи, NH₂-групи) відповідних амінокислот.

В оптимальному варіанті наявні гідроксигрупи (серин, треонін) захищаються бензильними групами та подібними групами. Інші аміногрупи, які не є α -постійними (наприклад, аміногрупи у ω -позиції, гуанідиногрупа аргініну) в оптимальному варіанті є ортогонально захищеними.

Окремі амінокислотні ланки, за винятком модифікованих R¹-CO-групою лізину або орнітину, випускаються серійно. Можлива послідовність способу одержання останніх сполук є такою:

1. α -карбоновокислотну групу амідують.
2. ϵ -аміногрупу захищають Z-групою.
3. α -аміногрупу захищають Вос-групою для забезпечення вибіркової щодо подальшого відщеплення амінозахисної групи.
4. Z-групу в ϵ -аміногрупі відщеплюють.
5. В ϵ -аміногрупу вводять потрібну групу R⁴-CO.
6. Вос-групу в α -аміногрупі відщеплюють.
7. α -аміногрупу забезпечують Z-групою.

Для введення R¹-CO-групи шляхом обміну аміногрупи лізину на відповідну карбонову кислоту в принципі застосовують такий самий спосіб, який було описано вище для зв'язування амінокислот. Однак особливу перевагу віддають конденсації з застосуванням карбодіміду, наприклад 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодімід та 1-гідроксибензотриазол.

Реакція зв'язування амінокислот відбувається у традиційному для таких цілей нейтральному розчиннику або суспендуєчому агенті (наприклад, дихлорметані), причому у разі потреби для поліпшення розчинності додають диметилформамід.

Як синтетичні носії застосовують нерозчинні полімери, наприклад полістиролову смолу у формі гранул, які набувають в органічному розчиннику (наприклад співполімеризат з полістиролу та 1% дивінілбензолу). Побудова захищеного декапептидаміду в метилбензгідриламідній смолі (MBHA-смолі, тобто полістироловій смолі з метилбензгідриламідними групами), яка забезпечує потрібну C-кінцеву амідну функцію пептиду після відщеплення HF від носія, здійснюється згідно з послідовністю у нижчеподаній діаграмі:

Діаграма послідовності
Протокол синтезу пептиду I

Етап	Функція	Розчинник/Реагент (об'єм/об'єм)	Час
1	Промивання	Метанол	2x2хв.

2	Промивання	DCM	3x3хв.
3	Відщеплення	DCM/TFA(1:1)	1x30хв.
4	Промивання	Ізопропанол	2x2хв.
5	Промивання	Метанол	2x2хв.
6	Промивання	DCM	2x3хв.
7	Нейтралізація	DCM/DIPEA(9:1)	3x5хв.
8	Промивання	Метанол	2x2хв.
9	Промивання	DCM	3x3хв.
10	STOP	Додавання Boc-As у DCM + DIG + HOBT	
11	Зв'язування	DCM або DCM/DCF	бл. 90хв.
12	Промивання	Метанол	3x2хв.
13	Промивання	DCM	2x3хв.

Захищені N α -Boc амінокислоти зазвичай з'єднують у триразовий молярний надлишковий кількість у присутності діізопропілкарбодіміду (DIC) та 1-гідроксибензотриазолу (HOBT) в CH₂Cl₂/DMF протягом 90 хвилин і Boc-захисну групу при частковій дії 50% трифтороцтової кислоти (TFA) в CH₂Cl₂ відділяють. Для контролю за повним обміном здійснюють хлоранільний тест за Кристенсенем та нінгідринний тест Кайзера. Залишки вільної амінофункції блокують шляхом ацетилювання у п'ятиразовій надлишковій кількості ацетилімідазолу в CH₂Cl₂. Послідовність етапів реакції побудови пептидів можна бачити на діаграмі послідовності. Для відщеплення зв'язаних смолою пептидів відповідний кінцевий продукт синтезу на твердій фазі висушують у вакуумі над P₂O₅ і обробляють у 500-разовій надлишковій кількості на HF/анізолі 10:1/об'єм/об'єм протягом 60 хвилин при 0°C.

Після відгону HF та анізолу у вакуумі одержують пептидами шляхом перемішування з безводним етиловим етером у вигляді білої твердої речовини, відокремлення паралельно утвореного полімерного носія здійснюють вимиванням 50% водним розчином оцтової кислоти. Шляхом обережного звукування оцтовокислих розчинів у вакуумі одержують відповідні пептиди у вигляді високов'язких олій, які після додавання етеру на холоді перетворюються на білу тверду речовину.

Подальше очищення здійснюється традиційним способом препаративної рідинної хроматографії під високим тиском (HPLC).

Перетворення пептидів на їх кислі адиційні солі здійснюється шляхом реакції з кислотами відомим спеціалістам способом. У зворотному порядку одержують вільні пептиди шляхом реакції їх кислих адиційних солей з основами. Пептидні ембонати одержують шляхом реакції солей трифтороцтової кислоти (TFA-солей) пептиду з вільною ембоновою кислотою (памовою кислотою) або відповідною динатрієвою сіллю ембонової кислоти. Для цього до водного розчину пептидно-ТРА-солі додають розчин динатрію-ембонату в полярному апротонному середовищі, в оптимальному варіанті - диметилацетамід, внаслідок чого утворюється світло-жовтий осад.

Нижчеподані приклади служать для пояснення винаходу, не обмежуючи його обсягу.

Приклад 1

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-

D-Hci⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності твердофазного синтезу (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBT-зв'язуванням, з вихідною кількістю 3,3г MBHA-смоли (завантажувальна густина 1,08ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 3,4г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 1,43г HPLC-однорідного продукту сумарної формули C72, H96, N17, O14, Cl з правильним FAB-MS: 1458,7 (M+H⁺) (ber: 1457,7), та відповідним спектром ¹H-ЯМР.

¹H-ЯМР (500МГц, D₂O/DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

Від 8,7 до 7,2, кілька т, аром. Н і неповністю заміщен. NH; 6,92 u. 6,58, 2d, 2x2H, аром. Н p-Cl-Phe; від 5,2 до 3,5, кілька т, C α -H u. aliph.H; 3,2 до 2,6, кілька т, аромат. C β -H, від 2,1 до 0,7, кілька т, залишк. аліфат. Н; 1,70, s, 3H, ацетил; 1,20, d, 3H, C β -H Ala; 0,8, m, C δ -H Leu

Приклад 2

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBT-зв'язуванням, з вихідною кількістю 4,0г MBHA-смоли (завантажувальна густина 1,11ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 4,87г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 0,93г HPLC-однорідного продукту, який за допомогою 4-амідинофеніламіно-4-оксомаєсної кислоти у присутності BOP як зв'язувального реагенту перетворювали на потрібну сполуку. Після повторного HPLC-очищення одержували 148мг названої сполуки сумарної формули C85, H112, N17, O15, Cl з правильним ESI-MS: 1647,6 (M+H⁺), (ber: 1645,8), та відповідним спектром ¹H-ЯМР.

¹H-ЯМР (500МГц, DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

10,4, s, 1H u. 9,13, s, 2H, u. 8,94, s, 2H, NH's з 4-амідиноаніліну; від 8,6 до 7,35, кілька т, аром. Н і NH; 7,22 i 7,18, 2d, 4H, аром. Н (pCl)Phe; 6,95 u. 6,58, 2d, 4H, аром. Н Tyr; від 5,2 до 3,5, кілька т, C α -H і аліфат. Н; від 3,3 до 2,4, кілька т, C β -H і N-CH₃, 2,1 до 1,1, кілька т, залишк. аліфат. Н, 1,68, s, 3H, ацетил; 1,20, d, 3H, C β -H Ala; 0,83, dd, 6H, C δ -H Leu

Приклад 3

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Lys(B)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності твердофазного синтезу (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBT-зв'язуванням, з вихідною кількістю 4,0г MBHA-смоли (завантажувальна густина 0,97ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 4,0г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 1,39г HPLC-однорідного продукту, який за допомогою 4-амідинофеніламіно-4-оксомаєсної кислоти у присутності BOP як зв'язувального реагенту перетворювали на потрібну сполуку. Після повторного

очищення через HPLC одержували 440мг названої сполуки сумарної формули C82, H106, N19, O15, Cl з правильним ESI-MS: 1632,7 (M+H⁺) (ber: 1631,7) та відповідним спектром ¹H-ЯМР.

¹H-ЯМР (500МГц, DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

10,4, s, 1H u. 9,15, s, 2H, u. 9,0, s, 2H, NH's 4-амідиноаніліну; 8,60, m, 2H, аром. H; від 8,3 до 7,2, кілька m, аром. H і NH; 7,27 і 7,20, 2d, 4H, аром. H (pCl)Phe; 6,96 u. 6,60, 2d, 4H, аром. H Tyr; від 5,2 до 3,5, кілька m, Cα-H і аліфат H; від 3,2 до 2,4, кілька m, Cβ-H і N-CH₃, від 2,1 до 1,1, кілька m, залишк. аліфат H, 1,70, s, 3H, ацетил; 1,20, d, 3H, Cβ-H Ala; 0,85, dd, 6H, Cδ-H Leu

Приклад 4

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hcl⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Ala¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності твердофазного синтезу (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBt-зв'язуванням, з вихідною кількістю 2,5г MBHA-смоли (завантажувальна густина 1,08ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 2,78г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 400мг HPLC-однорідного продукту сумарної формули C75, H102, N15, O14, Cl з правильним ESI-MS: 1472,6 (M+H⁺) (ber: 1471,7) і відповідним ¹H-ЯМР-спектром.

¹H-ЯМР (500МГц, D₂O/DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

8,62, m, 2H, 8,30, m, 2H, 7,80, m, 4H, 7,66, s, 1H, 7,47, m, 2H, 7,36, d, 1H, аромат. H; 7,25 і 7,20, 2 d, 4H, аром. H (pCl)Phe; 6,96 і 6,63, 2 d, 4H, аромат. H Tyr; від 5,10 до 4,0, кілька m, Cα-H і аліфат H; 3,75 до 2,65, кілька m, Cβ-H і N-CH₃; від 2,1 до 1,05, кілька m, залишк. аліфат H; 1,74, s, 3H, ацетил; 1,23, d, 3H, Cβ-H Ala; 1,20, m, CH₃ ізопроп.; 0,8, m, 3H, Cδ-H Nle

Приклад 5

Ac-D-Nal(2)¹-D-Cpa²-D-Pal(3)³-Ser⁴-N-Me-Tyr⁵-D-Hcl⁶-Nle⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-Sar¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності твердофазного синтезу (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBt-зв'язуванням, з вихідною кількістю 2,5г MBHA-смоли (завантажувальна густина 1,08ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 2,74г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 840мг HPLC-однорідного продукту сумарної формули C75, H102, N15, O14, Cl з правильним ESI-MS: 1472,6 (M+H⁺) (ber: 1471,7) та відповідним спектром ¹H-ЯМР.

¹H-ЯМР (500МГц, D₂O/DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

8,6, m, 2H, 8,3, m, 2H, 7,85, m, 2H, 7,8, m, 2H, 7,65, s, 1H, 7,46, m, 2H, 7,35, d, 1H, аромат. H; 7,23 і 7,17, 2 d, 4H, аром. H (pCl)Phe; 7,0 і 6,6, 2 d, 4H, аромат. H Tyr; від 5,10 до 3,8, кілька m, Cα-H і аліфат H; від 3,75 до 2,6, кілька m, Cβ-H і N-CH₃; від 2,2 до 1,05, кілька m, залишк. аліфат H; 1,70, s, 3H, ацетил; 1,23, d, 3H, Cβ Ala; 1,20, m, CH₃ ізопроп.; 0,8, t, 3H, Cδ Nle

Приклад 6

3-(4-фторфеніл)-пропіоніл-D-Hal(1)¹-Ser⁴-N-

Me-Tyr⁵-D-Lys(Atz)⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

Синтез здійснювали за діаграмою послідовності твердофазного синтезу (протокол синтезу пептидів, S.11) із DIC/HOBt-зв'язуванням, з вихідною кількістю 9,2г MBHA-смоли (завантажувальна густина 1,08ммоль/г). Після відщеплення HF від полімерного носія одержували 5,8г сирого пептиду, який очищали шляхом стандартної препаративної HPLC. Після сублімаційного сушіння, яке здійснювали відразу після цього, одержували 2,0г HPLC-однорідного незаміщеного октапептиду, з якого 0,4моль за допомогою 0,5ммоль 3-аміно-1,2,4-триазол-5-карбонової кислоти у присутності PyBOP як зв'язувального реагенту перетворювали на 790мг сирого продукту потрібної сполуки. Після повторного очищення через HPLC одержували 200мг названої сполуки сумарної формули C64, H86, N17, O12, F з правильним FAB-MS: 1304,6 (M+H⁺), (ber: 1303,6).

¹H-ЯМР (500МГц, D₂O/DMSO-d₆, δ у млн⁻¹):

8,14, m, 1H, 7,90, m, 1H, 7,80, m, 1H, 7,50, m, 2H, 7,35, m, 2H, 7,0, m, 6H, 7,63, m, 2H, аромат. H; 5,0, m, 1H, 4,83, m, 2H, 4,41, m, 1H, 4,30-4,05, кілька m, 4H, Cα-H; від 3,66 до 2,25, кілька m, аліфат. і H аромат, боков. ланцюгів; 2,95, s, u. 2,75, s, N-Me; від 2,05 до 1,1, кілька m, залишк. аліфат. H; 1,20, d, Cβ-H Ala; 0,75, m, 6H, Cδ-H Leu

Сполуки згідно з винаходом за формулою I досліджували на рецепторне зв'язування. Цей спосіб був наближений до способу, описаного в роботі Beckers et al., Eur. J. Biochem. 231, 535-543 (1995). Одержаний згідно з вищеописаним синтезом Cetorelix йодували за допомогою [¹²⁵I] (Amersham; питома активність 80,5Bq/фмоль) при застосуванні реагенту IodoGen (Pierce). Реакційну суміш очищали шляхом високоефективної рідинної хроматографії з оберненням фаз, причому моноіодований Cetorelix одержували без застосування міченого пептиду. Для специфічного рецепторного зв'язування потрібно приблизно по 80% [¹²⁵I]-Cetorelix та неміченої сполуки згідно з винаходом.

Сполуки згідно з винаходом випробують описаними нижче способами 1 та 2 на їх дію in-vitro, причому спорідненість зв'язування визначали в аналізі зв'язування за допомогою [¹²⁵I]-Cetorelix (Спосіб 1), а функціональну активність визначали за допомогою Triptorelin як агоністичного стимулу (Спосіб 2).

Спосіб 1.

Аналіз рецепторного зв'язування згідно з 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.

Для дослідження рецепторного зв'язування Cetorelix йодували з застосуванням реагенту IodoGen (Pierce) з [¹²⁵I] (Amersham; питома активність 80,5Bq/фмоль). Реакційну суміш очищали за допомогою високоефективної фазообмінної рідинної хроматографії, причому моноіодований Cetorelix одержували без застосування міченого пептиду. Для специфічного рецепторного зв'язування застосовували приблизно 80% [¹²⁵I] Cetorelix.

Аналіз рецепторного зв'язування здійснювали з інтактними клітинами у фізіологічних умовах, як описано у роботі Beckers et al., 1995. Субконфлюентні культури стабільно трансфікованих LTK-клітин, які експресують РГЛГ-рецептори людини, відокремлювали шляхом інкубування у NaCl/P_i (137мМ NaCl, 2,7мМ KCl, 8,1мМ Na₂HPO₄, 11,47мМ KH₂PO₄)/1мМ EDTA і збирали шляхом центрифугування. Гранули клітин ресуспендували у зв'язувальному буфері (DMEM без H₂CO₃, з 4,5г/л глюкози, 10мМ Hepes, pH7,5, 0,5% (маса/об'єм) BSA, 1г/л Bacitracin, 0,1г/л SBTI, 0,1% (маса/об'єм) NaN₃). Для аналізу витіснення 0,25х10⁶клітин/100мкл інкубували з приблизно 225пМ [¹²⁵I]-Cetrorelix (питома активність 5-10х10⁵дпм/пмоль) та різними концентраціями неміченої сполуки згідно з винаходом як конкуруючою сполукою. Шар суспензії клітин у 100мкл зв'язувального середовища у 400мк пробірці поміщали на 200мкл 84об'ємн.% силіконової олії (Merck Typ 550)/16об'ємн.% парафінової олії. Після інкубації протягом 1год при 37°C під час повільного безперервного збовтування клітини шляхом центрифугування протягом 2хв при 9000об./хв (тип двигуна HTA13.8; Heraeus Sepatec, Osterode/Germany) відокремлювали від інкубаційного середовища. Кінчики пробірок, які містили гранули клітин, зрізали. Гранули клітин та інші залишки відразу після цього піддавали аналізу за допомогою γ-лічильника. Кількість неспецифічних зв'язувань визначали з включенням неміченого Cetrorelix при остаточній концентрації 1мМ, і вона становила, як правило, ≤10% від загальної кількості зв'язувань. Аналіз даних зв'язування здійснювали за допомогою програми аналізу EBDA/ліганд (Biosoft V3.0).

Спосіб 2.

Функціональний аналіз для визначення антагоністичної ефективності

Аналіз з окремими видозмінами здійснювали, як описано у роботі Beckers, T., Reiländer, H., Hilgard, P. (1997) „Characterization of gonadotropin-releasing hormone analogs based on a sensitive cellular luciferase reporter gene assay”, *Analyt. Biochem.* 251, 17-23 (Beckers et al. 1997). 10000 клітин на лунку, які експресували РГЛГ-рецептор людини та ген-репортер люциферази, культивували 24год у мікротитрувальних планшетах із застосуванням DMEM з домішками і 1% (о:о) FCS_i. Клітини відразу після цього протягом 6год стимулювали 1нМ [D-Trp⁶] РГЛГ. Перед стимулюванням додавали антагоністичні сполуки згідно з винаходом і клітини на завершення розчиняли для

кількісного визначення клітинної Luc-активності. Розрахунок значень IC₅₀ на основі кривої доза-ефективність здійснювали через нелінійний регресивний аналіз із застосуванням Hill-моделі (Programm EDX 2.0 від C. Grunwald, Arzneimittelwerk Dresden).

Кількісне визначення Luc-активності двічі здійснювали так, як описано в Promega Technical Bulletins #101/161, із застосуванням відповідної системи аналізу люциферази (Promega E4030). Шляхом додавання коферменту А (CoA) відбувається окиснення Luciferyl-CoA зі сприятливою кінетикою. Після видалення культурального середовища з мікротитрувального планшета клітини розчиняли додаванням 100мкл лізисного буфера (25мМ Tris-фосфату, pH 7,8, 2мМ дитіотреїтолу, 2мМ 1,2-діаміноциклогексан-N,N,N',N'-тетраоцтової кислоти (COTA), 10% (об'єм:об'єм) гліцерину, 1% (об'єм:об'єм) Triton X-100). Через 15хв інкубації при кімнатній температурі 10мкл лізату клітин переносили до придатного для люмінометричного детектування білого мікротитрувального планшета (Dynatech). Ферментативну реакцію ініціювали через додавання 50мкл буфера для аналізу (20мМ Tricin, pH 7,8, 1,07мМ (MgCO₃)₄Mg(OH)₂, 2,67мМ MgSO₄, 0,1мМ етилендіамін-тетраоцтової кислоти (EDTA), 33,3мМ дитіотреїтолу, 270мМ коферменту А, 470мМ люциферину світляка (*Photinus pyralis*), 530мМ gATPNa₂). Через одну хвилину для загального часу в одну секунду визначали люмінесценцію з напівперіодом сигналу у п'ять хвилин з застосуванням EG&G Berthold MicroLumat LB 96 P.

Таким чином отримували нижченаведені *in vitro* дані, причому K_D означає спорідненість зв'язування, а IC₅₀ - функціональну активність, і pM означає пмоль на літр:

Сполука	K _D [pM]	IC ₅₀ [pM]
Cetrorelix	170 (21)	198 (5)
Приклад 1 (Ацетатна сіль)	н. в.	242 (3)
Приклад 2	181 (1)	684 (2)
Приклад 3	154(1)	492 (2)
Приклад 6	н. в.	221 (2)

н. в. = не визначено

() = кількість незалежних один від одного дослідів