

(19)



(10) **LT 3971 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3971**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 7/20**
A61K 37/43

(21) Paraiškos numeris: **IP1513**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **PCT/EP 91/02110, 1991 11 08**

(31, 32, 33) Prioritetas: **90108955, 1990 11 10, CN**

(72) Išradėjas:
Shaobo Xiao, CN

(73) Patent savininkas:
ASTA Medica Aktiengesellschaft, An der Pikardie 10, Dresden, DE

(74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Hormono, atpalaiduojančio liuteinizacijos hormoną, antagonistai

(57) Referatas:

Šis išradimas apima du aspektus: 1) hipotalaminį liuteinizacijos hormoną atpalaiduojančio hormono (LHRT) antagonistų konstravimo ir sintezės metodus, ir 2) produktus, gaunamus panaudojant aukščiau minėtus metodus. Naudojant [NAc-D2NaI¹, DpClPhe², D3Pal³, Ser⁴, Tyr⁵, DArg⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰]NH₂ kaip pradinį junginį, buvo gauta serija naujų analogų [NAc-D2NaI¹, AA², AA³, Ser⁴, AA⁵, AA⁶, Leu⁷, AA⁸, Pro⁹, DAla¹⁰]NH₂, modifikuojant tiek lipofilinę, tiek ir bazinę pradinės molekulės sritis. Tokiu būdu išlaikomas aukštas antiovuliacinis pradinio junginio aktyvumas ir sumažinamas histamino atpalaidavimo aktyvumas iki klinikinių reikalavimų lygio.

Šiame išradime aprašomi produktai ir jų pritaikymas, konstruojant ir sintetinant liuteinizacijos hormoną atpalaiduojančio hormono antagonistus.

Liuteinizacijos hormoną atpalaiduojančio hormono (LHRH), antagonistai, turintys negamtinges aminorūgštis 6-je padėtyje, aprašyti K.Liu et al., *International Journal of Peptide and Protein Research*, **35**, No.2, 157-160 (1990); LHRH antagonistai, turintys pakaitus tam tikrose padėtyse, aprašyti K.Folkers et al., *Z. Naturforsch.*, **41C**, 1087-1091 (1986) bei K.Folkers et al., *Z. Naturforsch.*, **42B**, 101-106 (1987).

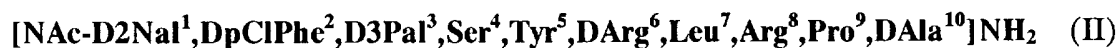
Pateikiamas išradimas susijęs su naujais peptidais ir jų dariniais, turinčiais tikslią cheminę struktūrą. Išradime taip pat aprašyti jų gavimo ir pritaikymo metodai.

Hipotalaminį liuteinizacijos hormoną atpalaiduojantis hormonas (LHRH) veikia priekinį hipofizį, stimuliuodamas liuteinizacijos hormono (LH) sekreciją ir folikulus stimuliuojantį hormoną (FSH). LHRH antagonistiniai analogai veikia priekinį hipofizį greitai, pasižymi ilga veikimo trukme ir gali būti saugiai ir reversiškai naudojami kontracepcijai arba selektyviam gonadotropino sekrecijos slopinimui. Šia pritaikymo prasme LHRH antagonistai yra geresni negu agonistai. Iki šio laiko žinoma per du tūkstančius sukonstruotų ir susintetintų LHRH analogų, tarp kurių "Nal-Arg" analogas pasižymi pakankamai aukštu priešnėštuminiu aktyvumu. Tačiau "Nal-Arg" analogas turi labai aukštą histamino-išskyrimo aktyvumą (HRA). Dėl to, kai daromų injekcijų dozė 50-100 kartų viršija terapinę dozę, žiurkėms atsiranda trumpalaikė snukio ir galūnių edema. Klinikinių bandymų rezultatai pademonstravo histaminą išskiriančios sistemos efektus. Kiti LHRH antagonistai, turintys DArg⁶ arba DLys⁶, pasižymėjo panašiais šalutiniais poveikiais, jų HRA ED₅₀ buvo mažiau 1 μg/ml.

Šiame išradime siūlomi nauji LHRH antagonistai, kurie pasižymi labai aukštu antiovuliaciniu aktyvumu (AOA) ir labai žemu histamino išskyrimo aktyvumu (HRA), bei nedideliais šalutiniais poveikiais.

Šio išradimo turinys ir pavyzdžiai yra:

Išradimo sukūrimo metodologija remiasi topologiniu panašumu tarp pirminio junginio



molekulės (II) ir neuropeptido substancijos P, kurių savybės modifikuoti pirminio junginio molekulėje tiek bazine, tiek lipofilinę sritį įgalina sukurti naują antagonistą, turintį aukštą AOA ir žemą HRA. Terminas “modifikacija” šiuo atžvilgiu reiškia aminorūgščių pritaikymą ar pakeitimą (II) molekulės Tyr⁵-DArg⁶-Arg⁸ srityje C-gale ir aromatinių rūgščių - N-gale. Tiksliau sakant, konstravimo metodas yra atitinkamų bazinių grupių įvedimas ir negamtinių aminorūgščių pakeitimai (II) molekulės 2, 3, 5, 6 ir 8 padėtyse.

Toliau taip pat pateikiami šio išradimo metodai ir pavyzdžiai.

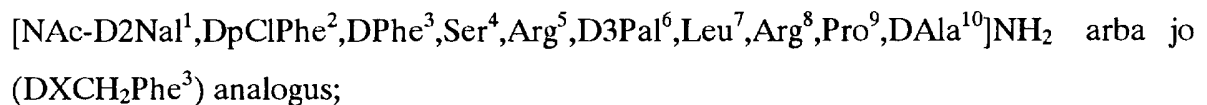
1. D3Pal, kuri yra aromatinė aminorūgštis, turinti atitinkamą bazingumą, pakeitimas vietoje DArg⁶ (II) molekulėje, norint gauti analogą (III):



2. Arg⁵ pakeitimas vietoje Tyr⁵ (III) molekulėje, norint gauti (IV):

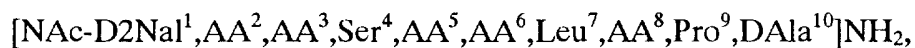


3. DPhe³ arba jo darinių DXCH₂Phe pakeitimas vietoje D3Pal³ (IV) molekulėje, norint gauti (V):

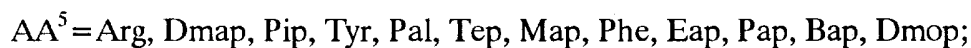
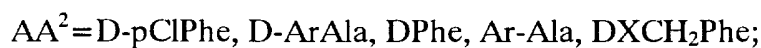


4. DPhe³ arba jo darinių pakeitimas vietoje D3Pal³ (III) molekulėje, norint gauti (V): $[\text{NAc-D2Nal}^1, \text{DpClPhe}^2, \text{DPhe}^3, \text{Ser}^4, \text{Tyr}^5, \text{D3Pal}^6, \text{Leu}^7, \text{Arg}^8, \text{Pro}^9, \text{DAla}^{10}] \text{NH}_2$ arba jo (DXCH₂Phe³) analogus.

Buvo susintetintos naujų LHRH antagonistų serijos, kurių formulė yra:

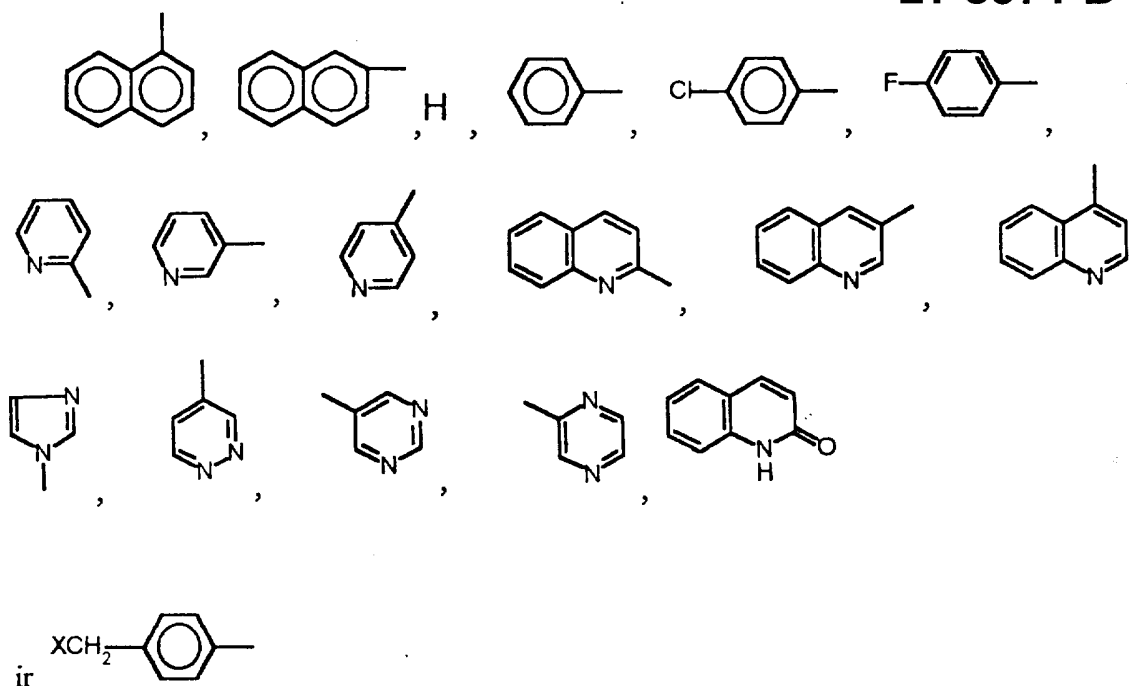


kurioje AA yra gamtinės arba negamtinės aminorūgštys, kurios išreiškiamos, kaip D- ar L-ArAla. Tiksliau imant, jos yra tokios:



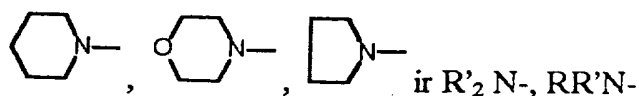
kuriose

Ar=



kuriuose

X=



kuriuose

R' = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

R' = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

LHRH antagonistai, kaip medicininiai peptidai, gauti pagal aukščiau aprašytą metodą, gali būti naudojami reprodukcinės endokrininės sistemos sutrikimų, tokių kaip endometriozės, vaikų ankstyvojo lytinio subrendimo, prostatos vėžio, krūties vėžio gydymui taip pat sėkmingai, kaip ir vyrų bei moterų naudojama kontraceptinė priemonė gimimų reguliavimui; taip pat gali būti panaudojami, diagnozuojant ir gydant nevaisingumą ir t.t. Tokie medicininiai peptidai gali būti paruošti įprastos injekcinės formos, injekcinių kapsulių arba kita vaisto forma, pritaikyta patogiam vartojimui.

Pateikiamas tolesnis šio išradimo aprašymas:

Natūraliomis sąlygomis organizme, išsiskiriant histaminui, neuropeptido substancija P vaidina labai didelį vaidmenį; jos histamino išskyrimo aktyvumas (HRA) ED₅₀ yra 5-15 μM. Substancijos P (SP) cheminė struktūra yra

[Arg¹,Pro²,Lys³,Pro⁴,Gln⁵,Gln⁶,Phe⁷,Phe⁸,Gly⁹,Leu¹⁰,Met¹¹]NH₂. Jos struktūros ir HRA ryšio tyrimai parodė, kad Arg¹-Pro²-Lys³ aminorūgštys, esančios SP molekulės N-gale, yra esminės HRA aktyvumui, kadangi šių trijų aminorūgščių iškirpimas visiškai panaikina jos HRA. Priešingai, vienos, dviejų ar trijų aminorūgščių iškirpimas molekulės C-gale, palieka HRA tokį pat aukštą, koks ir buvo. Tolesnis Phe⁸ ir Phe⁷ iškirpimas HRA sumažina atitinkamai 4 % ir 0,57 %. Gln⁵ ir Gln⁶ iškirpimas neduoda žymaus HRA pasikeitimo. Pagal šiuos duomenis daroma išvada, kad aplink Phe⁸ ir Phe⁷ esanti lipofilinė sritis apsprendžia HRA dydį ir ši sritis dalyvauja, susirišant receptoriui su mastląstelės receptoriu.

Kaip anksčiau minėta, LHRH analogai (D2Nal¹, DArg⁶) rodė labai aukštą HRA, jų molekulinė struktūra turi topologinį panašumą su SP: DArg⁶-Leu⁷-Arg⁸ pirmame darinyje atitinka Arg¹-Pro²-Lys³ antrame darinyje, abu susidaro iš poros labai bazinių aminorūgščių liekanų, tarp kurių yra tikrai viena neutrali aminorūgštis liekana; abu LHRH analogai D2Nal¹ ir DArg⁶ ir substancija P turi dvi labai bazines aminorūgšties liekanas, kurios yra 1- ir 3-je padėtyse. Iš kitos pusės, manoma, kad aromatinių aminorūgščių liekanų grupė darinyje atitinka Phe⁸ ir Phe⁷ sritį substancijoje P pagal HRA reikšmės dydį.

Pagal pateikiamą išradimą, konstravimas apima du aspektus: vienas yra Tyr⁵-DArg⁶-Arg⁸ srities modifikavimas C-gale, kitas - po modifikavimo optimizavimo, geras aromatinių aminorūgščių pritaikymas bazinėje srityje C-gale. [Nac-D2Nal¹,DpClPhe²,D3Pal³,Ser⁴,Tyr⁵,DArg⁶,Leu⁷,Arg⁸,Pro⁹,DAla¹⁰]NH₂ (II) molekulė yra naudojama kaip pradinis junginys, kuris rodo AOA 100 %, esant 0,5 μg kukurūzų aliejuje, ir - 57 %, esant 0,25 μg.

Pirmiausia, DArg⁶ (II) junginyje gali būti pakeista bazinėmis ar neutraliomis rūgštimis, tokiomis kaip D3Pal, D6Qal, tetrahidrotriptofanu, metiltriptofanu. [Nac-D2Nal¹,DpClPhe²,D3Pal³,Ser⁴,Tyr⁵,D3Pal⁶,Leu⁷,Arg⁸,Pro⁹,DAla¹⁰]NH₂ (III) junginys buvo gautas, D3Pal⁶ pakeitus vietoje DArg⁶ (II) junginyje. (III) junginys turėjo AOA 100 %, esant 3 μg, 83 %, esant 1 μg (kukurūzų aliejuje), ir jo HRA ED₅₀ buvo mažiau negu 1 μg/ml. Matyt, visos molekulės bazingumas gali būti lygus arba artimas tam, kad arginino pora pasiektų aukštą AOA. Kadangi 5-ta padėtis, kaip ir 6-ta padėtis, nedalyvauja receptoriniame ryšyje, daug aminorūgščių, įskaitant arginą, gali būti įterpiama 5-je

padėtyje. Buvo sukurtos naujų analogų serijos. Pavyzdžiui, Arg⁵ pakeitimas vietoje Tyr⁵ (III) molekulėje davė (IV) junginį [NAc-D2Nal¹,DpClPhe²,D3Pal³,Ser⁴,Arg⁵,D3Pal⁶,Leu⁷, Arg⁸,Pro⁹,DAla¹⁰]NH₂. Abu junginiai, (IV) ir (II), turi du argininus, bet atstumas tarp dviejų argininių (IV) junginyje, kurio geometrinis ryšys tampa 1, 4, tai yra tarp šių dviejų argininių yra dvi kitos aminorūgštys, yra didesnis, negu (II) darinyje. Todėl, HRA sumažės, ir, iš kitos pusės, kadangi yra du argininai, AOA nebus žemesnis, negu (II) junginio. Pagal biotyrimus, (IV) molekulės HRA buvo ED₅₀ 3,5 μg/ml, nors AOA buvo 60 %, esant 0,12 μg (kukurūzų aliejuje), 85 %, esant 0,25 μg ir 100 %, esant 0,5 μg. Tai buvo pirmą kartą LHRH antagonistų pasiektos AOA ED₅₀ reikšmės, kurios buvo lygios ar mažesnės už 0,125 μg.

Todėl tolesnis konstravimas paremtas (IV) molekulės struktūra.

(IV) molekulėje yra keturios bazinės liekanos: DPal^{3,6} ir Arg^{5,8}, tuo tarpu, kai (II) molekulė turi tik tris bazines liekanas. Todėl yra tikslinga pakeisti vieną D3Pal neutralia aminorūgštimi; iš kitos pusės, (IV) molekulė pasižymėjo labai stipriu hidrofiliškumu, todėl hidrofiliškumo sumažinimas, pakeičiant hidrofobine aminorūgštimi D3Pal vietoje, bus sėkmingas, norint išlaikyti organizme ilgesnį laiko tarpą vaistus, tuo padidinant jų efektyvumą. Pakeičiant D3Pal, buvo sukonstruotos naujos analogų serijos. (V) junginys rodė AOA 100 %, esant 1 μg (fiziologiniame tirpale), kas atitinka pradinio junginio (IV) aktyvumą, tuo tarpu HRA sumažėjo per pusę: HRA ED₅₀ buvo 7,4 μg/ml.

Tolesnis DPhe² pakeitimas vietoje DpClPhe² sumažino lipofiliškumą šioje molekulės srityje ir sumažino HRA.

Atrodo, kad Arg⁵-D3Pal⁶-Leu⁷-Arg⁸ (IV) molekulės C-gale vaidina pagrindinį vaidmenį, įjungiant histamino išskyrimą. D3Pal jungia aromatiškumo, bazingumo ir hidrofiliškumo savybes vienoje molekulėje ir, be to, yra stereo-priėmėjas receptoriniam ryšiui LHRH antagonistuose. Panašiai, naujų negamtinių aminorūgščių serijų konstravimas buvo tokio pačio pobūdžio, kaip ir D3Pal, ir įgalino pagerinti LHRH antagonistus, lyginant su (IV) ir (V).

Gamtinių lipofilinių aromatinių aminorūgščių, pavyzdžiui, fenilalanino, modifikavimas pagal žemiau aprašytą metodą "Naujų negamtinių aminorūgščių sintezė", įgalino sukurti naujas aminorūgštis, kurios vienoje molekulėje jungia aromatiškumą, hidrofiliškumą ir bazingumą ir gali būti atvaizduojamos formule:

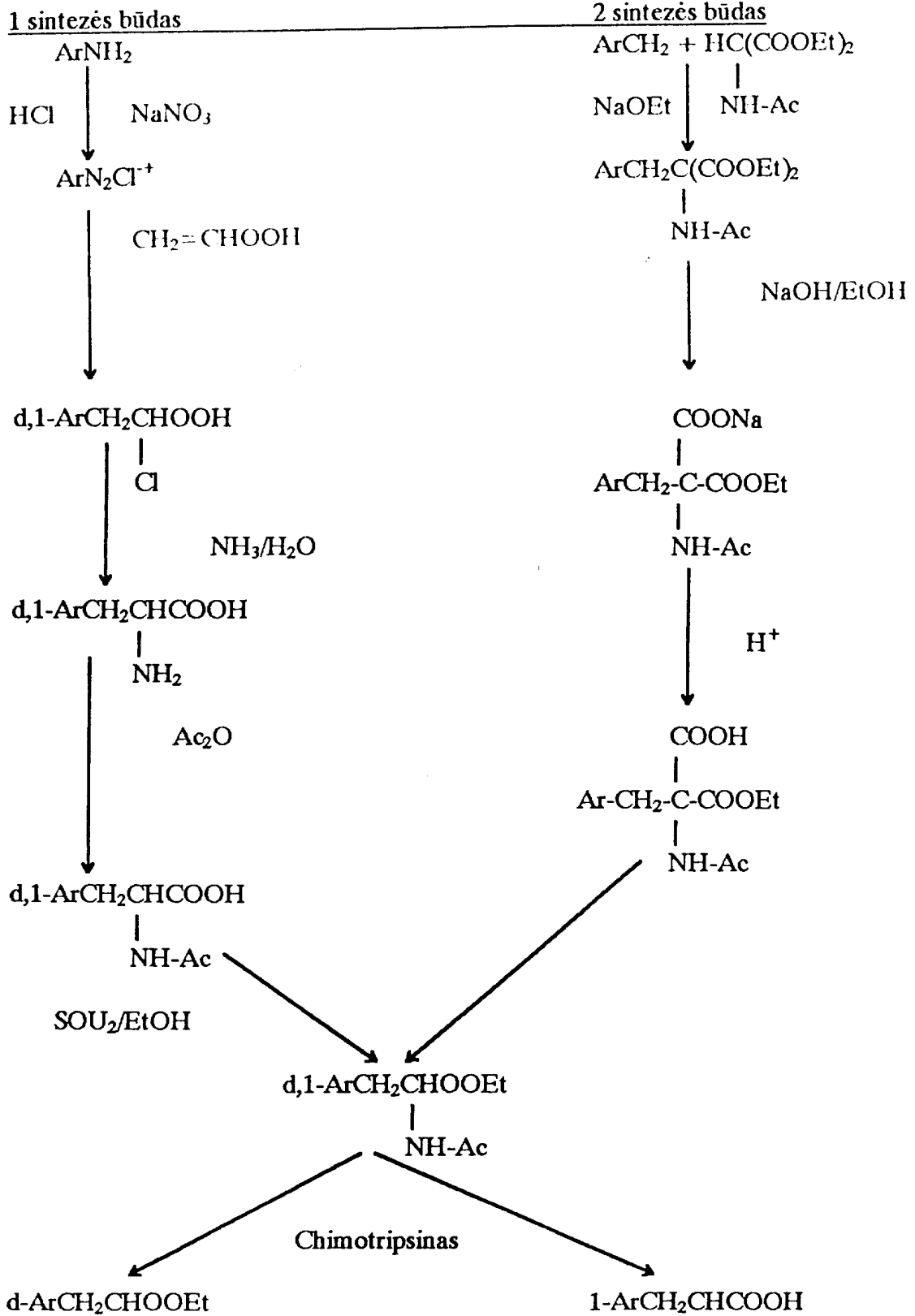
$R_1R_2NCH_2C_6H_4CH_2CH(NH_2)CO_2H$ (VI), kurioje R_1 ir R_2 gali būti tokios pačios arba skirtingos grupės, kurios gali būti atviros grandinės arba ciklinės, o taip pat turėti heteroatomą. Pakeitus R_1 ir R_2 , gali būti gaunamos tokios aminorūgščių serijos, kuriose sistemiškai pakeistas bazingumas ir hidrofiliškumas, arba pakeisti optiniai izomerai. Šių aminorūgščių įvedimas (IV) molekulės 5-, 6- ar 8-je padėtyse davė tris LHRH naujų antagonistų serijas. Biotyrimų rezultatai parodė, kad kiekviena serija turi mažiausiai vieną naują antagonistą, kurio AOA pasireiškia 100 %, esant 1 μg ; šis rezultatas panašus į (IV) molekulės, nors HRA buvo žymiai mažesnis. Kaip pavyzdys buvo (VII): [NAc-D2NaI¹,DpClPhe²,D2Pal³,Ser⁴,Mop⁵,D3Pal⁶,Leu⁷,Arg⁸,Pro⁹,DAIa¹⁰]NH₂, kurio AOA, esant 1 μg , pasireiškia 100 %, HRA ED₅₀ yra 14,7 $\mu\text{g/ml}$, ir šis rezultatas buvo geresnis, negu (V) junginio. Pakeitus Arg⁸ (IV) molekulėje, HRA pasireiškimas buvo tiesiog proporcingas R ilgiui (VI) molekulėje; tuo būdu HRA ED₅₀ gali būti aukštesnis, negu 200 $\mu\text{g/ml}$, ir tokios rūšies junginiai gali būti lengvai ištirpinami vandeniniame tirpale, ir tikimasi, kad klinikoje toks junginys, kaip vaistinė forma, bus panaudojamas be problemų. Iš rezultatų matosi, kad Arg⁸ ar Lys⁸ nebuvo esminiai LHRH antagonistų pasireiškimui. Atitinkamas bazinis centras, esantis 8-je padėtyje, gali užtikrinti aukštą AOA, tuo tarpu indukuojamų mast-ląstelių aktyvumas išskirti histaminą buvo pastebimai sumažėjęs, kai anksčiau minėtas bazinis centras paveikiamas žymių erdvinių trukdymų.

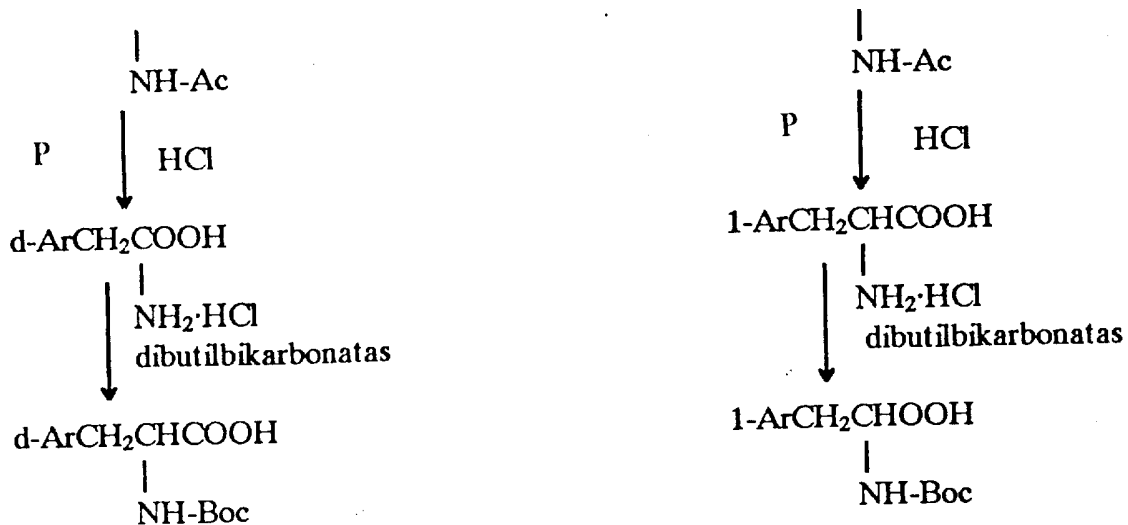
Šis išradimas apima modifikacijas N-gale ir C-gale ir tuo įgalina pagerinti LHRH antagonistus.

Sintezės procesas iliustruojamas tokiu būdu:

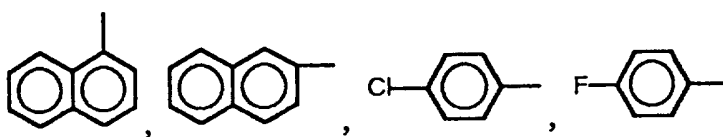
1. Naujų negamtinių aminorūgščių sintezė

Per 60 serijų ir neįeinančių į serijas, D- arba L-aminorūgščių yra sukonstruota ir susintetinta keturiais sintezės būdais, kurių schemas duotos žemiau. Šių negamtinių aminorūgščių struktūra parodyta bendra struktūrine formule, pateikta toje pačioje schemoje. Kai kurios iš šių aminorūgščių pasižymi bazingumu, hidrofiliškumu arba aromatiškumu pasirinktinai, tuo tarpu kitos aminorūgštys turi visas šias savybes vienoje molekulėje.



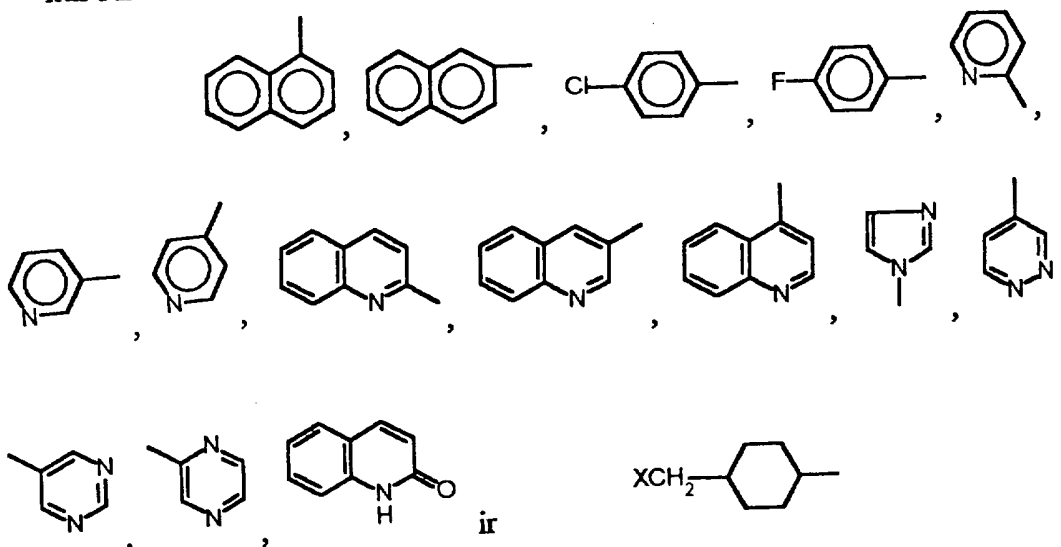


I sintezės būdas D arba L-Ar-CH₂-CH-COOH
 kur Ar=

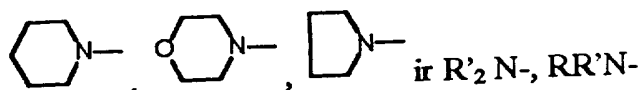


II sintezės būdas D arba L-ArCH₂-CH-COOH
 NH-Boc

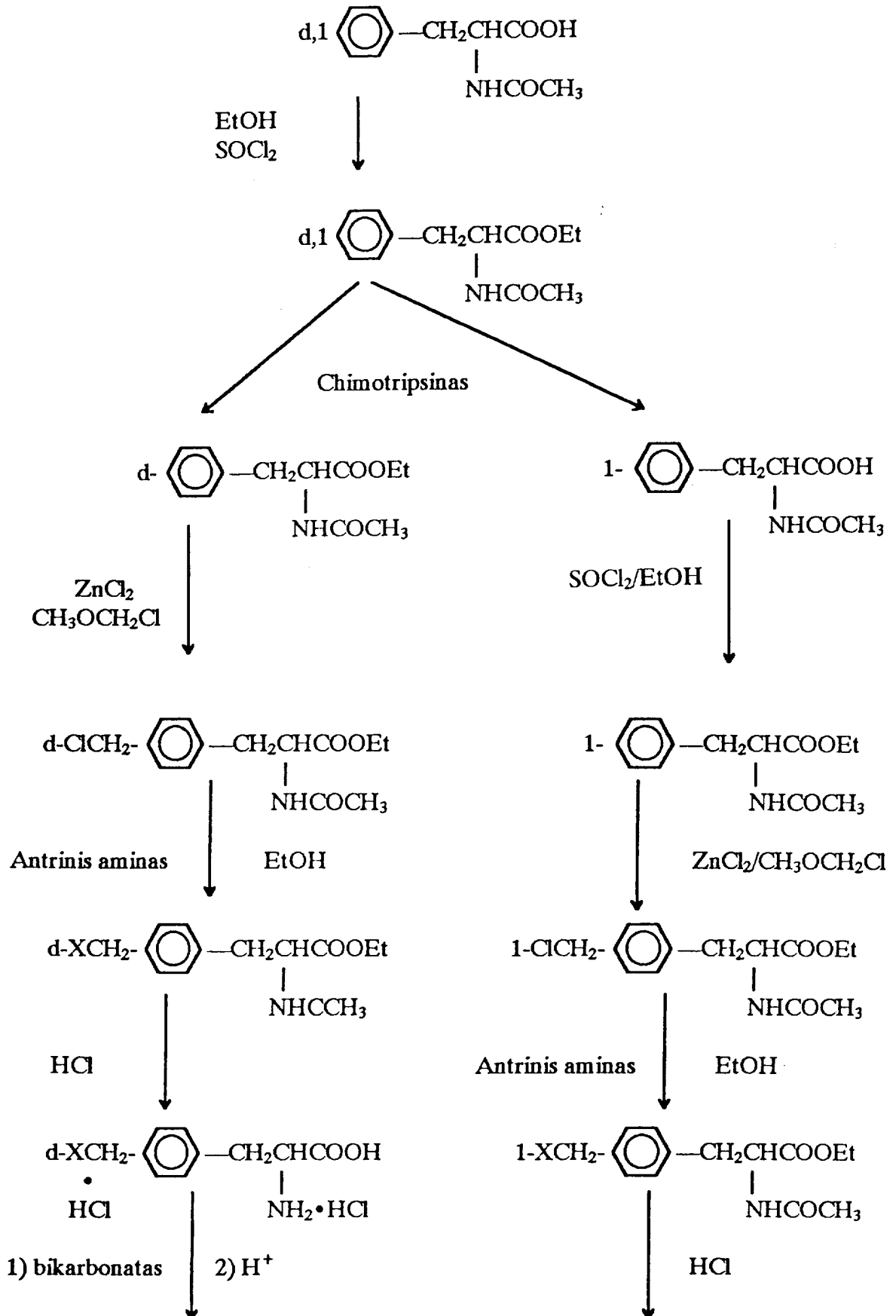
kur Ar=

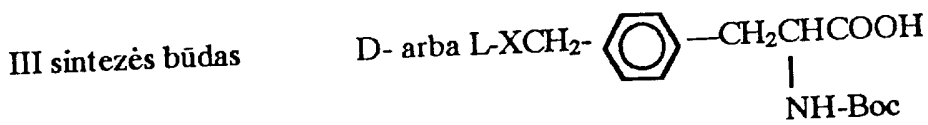
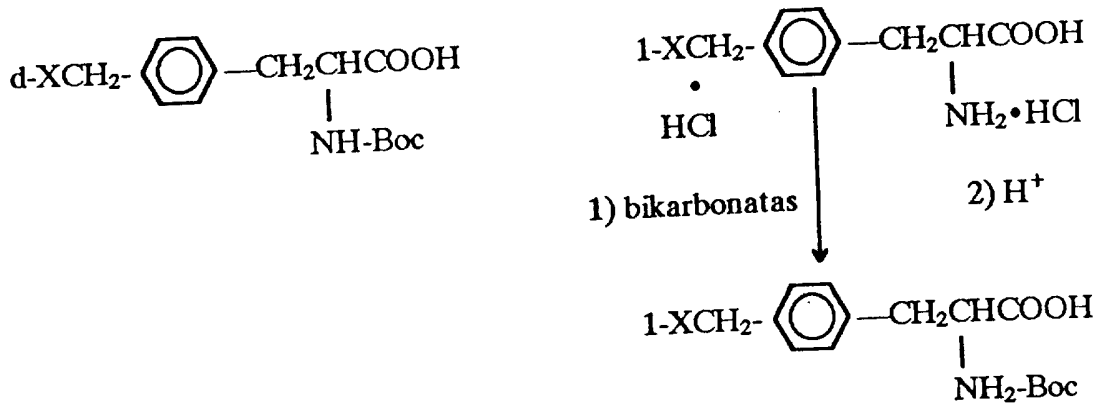


kur X =

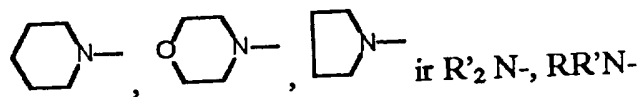


III sintezės būdas

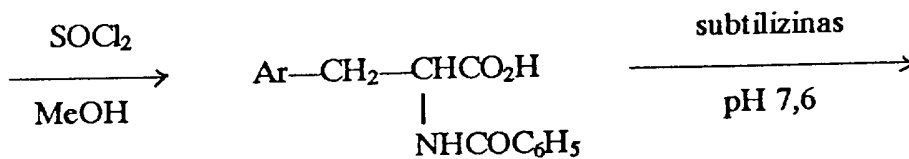
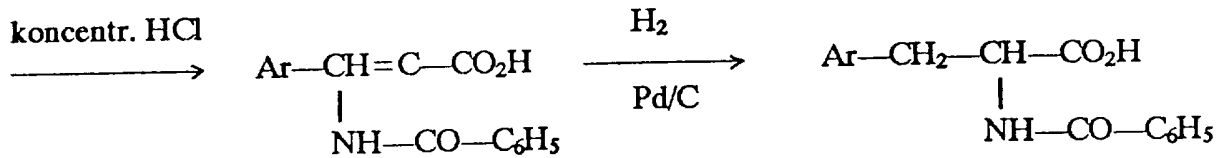
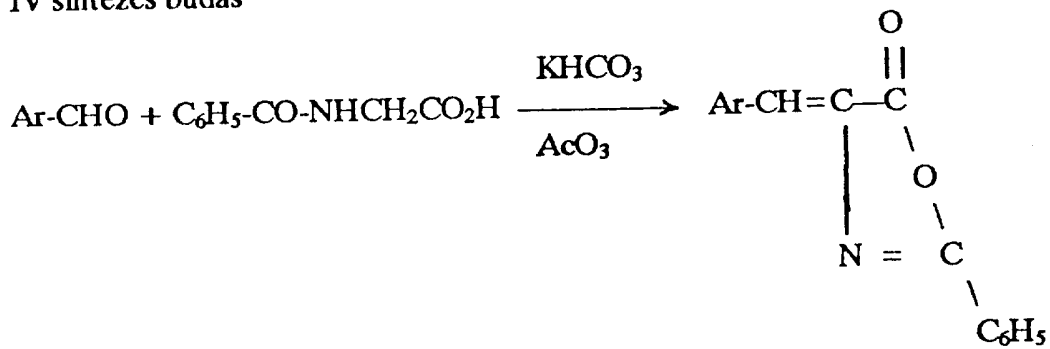


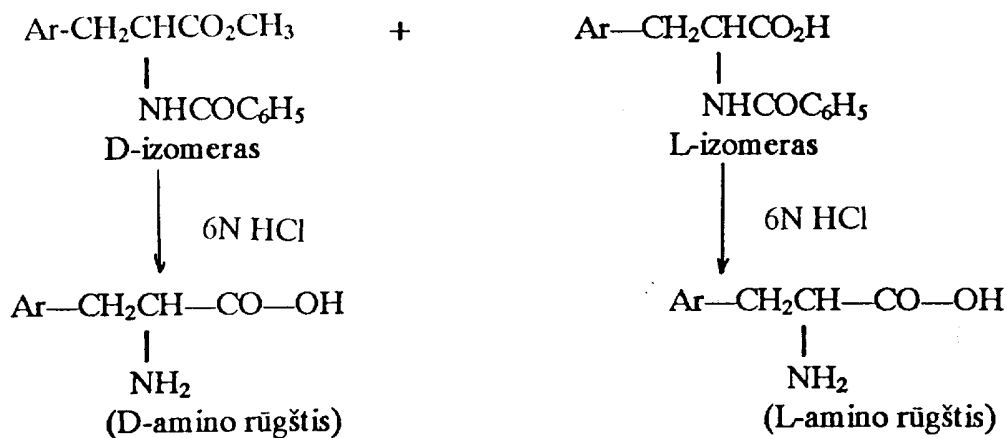


kur X=



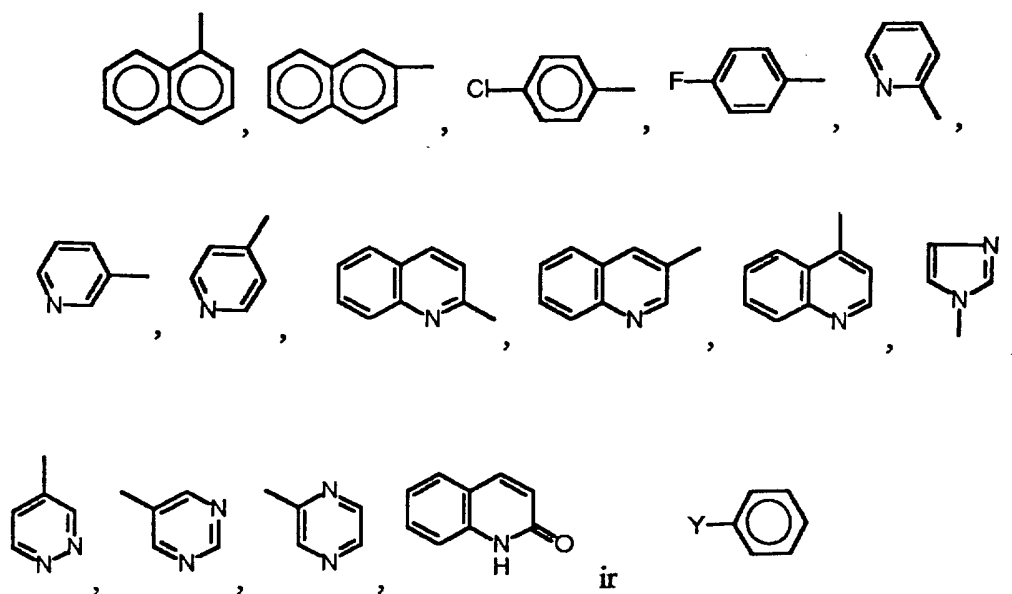
IV sintezės būdas





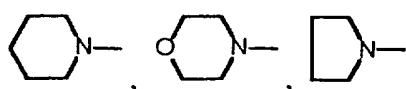
IV sintezės būdas D arba L Ar-CH₂-CH(NH₂)-COOH

kur Ar =



kur Y = (CH₃)₂N-, (CH₃CH₂)₂N-, (CH₃CH₂CH₂)₂N-, $\left(\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \right)_2\text{N-}$,

(CH₃CH₂CH₂CH₂)₂N-,



2. Peptido sintezė

Sintezė pradedama peptido C-gale ant benzhidrilamino hidroklorido dervos nešiklio, naudojant Merrifieldo sukurtą kietos fazės peptidų sintezės metodą. Šiame trijų stadijų procese yra pritvirtinimas, surišimas ir atskėlimas. Dichlormetanas (DCM) yra pagrindinis tirpiklis, naudojamas plovimui po kiekvienos reakcijos stadijos, nors, jeigu reikia, naudojamas ir izopropilo alkoholis (IPA) ir N,N-dimetilformamidas (DMF). Surišimo reakcija vykdoma dicikloheksilkarbodiimido (DCC) pertekliumi, pridėdant adekvatų kiekį 1-hidroksibenzotriazolo (HOBT). Surišimo reakcijos laipsnis sekamas Kaisės ninhidrino metodu. Sekanti sintezės stadija daroma tuo atveju, jei Kaisės testas yra teigiamas. Po galutinio visų reikalingų reakcijų įvykdymo peptido grandinė atskeliama nuo dervos, naudojant bevandenį vandenilio fluoridą (HF), esant anizolui, kol bus atskeltos visos apsauginės grupės. Perplovus etilo acetatu arba eteriu, nevalytas LHRH antagonistų produktas gaunamas, ekstrahuojant vandenine acto rūgštimi, po to liofilizuojama. Šio proceso išeiga per 50 %.

3. Peptido gryninimas

1. Peptidas gryninamas gelfiltracija arba per silikagelio koloną, kurios aukštis yra 60-100 cm, su UV/TLC detektoriumi. Grynas LHRH gaunamas liofilizavus pagrindines frakcijas. Išeiga yra 50-90 %, o švarumas gali būti virš 90 %.

2. Peptidas toliau gryninamas Waters'o didelio efektyvumo skystiniu chromatografu (HPLC), naudojant atvirkščių fazių C-18 kolonėlę (7,8 x 300 mm) (μ -Bondapak 84176). Šioje stadijoje išeiga yra 20-50 %, o grynumas ne mažesnis nei 99 %.

4. Peptido grynumo analizė

1. Plonasluoksnė chromatografinė analizė (TLC)

Chromatografija vykdoma ant plastikinės plokštelės, padengtos silikagelio 60 F254 sluoksniu; plokštelės aukštis 5-10 cm. Penkiose skirtingose tirpiklių sistemose peptidai davė vieną dėmę.

2. Didelio efektyvumo skystinė chromatografinė analizė (HPLC)

Visi peptidai eliuavosi, duodami vieną piką dviejose tirpiklių sistemose, naudojant Waters HPLC sistemą, analitinė kolonėlė (μ -Bondapak 27324); optinis tankis matuotas prie 210 nm. Mėginio dydis - 10-200 μ g.

5. Peptido aminorūgščių analizė

Pagal PICO-TAG metodą, sukurtą Waters'o kompanijos, 50 μ g mėginio, kuris prieš tai 2 val. išdžiovinamas vakuume, buvo pasverta 10^{-5} tikslumu. Ištirpinama vandenyje ir 10 μ g mėginio įpilama į reakcijos vamzdį, kuriame atitinkamai pagal instrukciją įpilta druskos rūgšties 1:1 (turinčios 1 % fenolio). Reakcija vyksta 22-24 val. 105 °C temperatūroje sandarioje talpoje, kuri buvo užpildyta azotu ir vakuumu iš reakcijos vamzdžio pašalintas deguonis. Siekiant gauti aminogrupę, išgarinus druskos rūgšties perteklių, pridedama fenolio izotiocianato. Po to analizuojama HPLC sistema su PICO-TAG aminorūgščių analitine kolonėle, matuojant optinį tankį 254 nm bangoje. Apskaičiuojamas aminorūgščių kiekis ir santykinė molekulinė masė; norint žinoti mėginio aminorūgščių sudėtį, lyginama kiekvienos aminorūgšties integruota sritis su Waters'o H-standartiniu pavyzdžiu. Klasikinis jonų mainų ninhidrino metodas (IEN) buvo naudojamas kaip kontrolė ir davė tokius pačius rezultatus. Tačiau, norint gauti patenkinančius rezultatus, jam reikėjo 10 kartų daugiau medžiagos.

6. Biologinio aktyvumo įvertinimas

Buvo naudotas Korbin'o antiovuliacinis žiurkių metodas. Eksperimente naudotos sveikos, suaugusios SD žiurkių patelės (200-250 g svorio). Visi gyvuliukai buvo laikomi 22-24 °C temperatūroje 14 val. / 10 val. (šviesa/tamsa) režime. Gyvuliukai maitinami įprastu maistu ir vandeniu, jo neribojant. Žiurkės turėjo mažiausiai du nuoseklius 4 dienų estralinius ciklus, kurių metu pagal paimtus iš vaginų tepinėlius buvo nustatyta, ar gyvūnai tinkami naudoti šiame eksperimente. Estralinio ciklo viduryje žiurkėms skirtingomis dozėmis fiziologiniame tirpale injekuoti peptidai (LHRH antagonistai). Kitą dieną žiurkės pjaunamos ir, siekiant nustatyti kiaušialąsčių kiekį, jų kiaušintakiai iš abiejų pusių tiriami preparavimo lupa. Pagal gautą dozę, žiurkės buvo suskirstytos į keletą grupių, apie 10 žiurkių kiekvienoje, taip pat 9-10 žiurkių kontrolinė grupė, kurioms suleistas toks pats kiekis fiziologinio tirpalo. Antiovuliacinis aktyvumas (AOA) išskaičiuojamas pagal lygtį:

$$\text{AOA} = \frac{\text{žiurkių su nesubrendusiomis kiaušialąstėmis skaičius}}{\text{bendras bandomųjų žiurkių skaičius}} \times 100 \%$$

7. Histamino išskyrimo aktyvumo nustatymas

1. Histamino išskyrimo testas (HRT) *in vitro*:

Eksperimente naudotos sveikos, suaugusios žiurkių SD patelės (200-250 g svorio), laikytos vienodose sąlygose. Po anestezijos su CO₂, pilvo ertmė plaunama 50 ml PIPES AC terpe, turinčia 20 vienetų heparino. Nucentrifugavus 200xg 8 min. 4 °C temperatūroje, ląstelės vėl plaunamos ir po to suspenduojamos iki 8-24 x 10⁵ bendro leukocitų sk./ml koncentracijos PIPES AC terpėje. Tokioje suspensijoje yra apie 5-10 % mast-ląstelių. Perplautos ląstelės naudojamos tuoj pat po surinkimo, pašildomos 5 min. 37 °C temperatūroje prieš supilstant į mėgintuvėlius, kuriuose yra po 0,3 ml skiesto peptido. Mišiniai inkubuojami 15 min. 37 °C temperatūroje, ir reakcija sustabdoma, mišinius nucentrifuguojant 400xg 15 min. 4 °C temperatūroje. Po ekstrakcijos n-butanoliu ir n-heptanu, histamino kiekis nuopiluose nustatomas įprastu fluorimetriniu metodu. Histamino kiekis surandamas pagal histamino standartinę kreivę (žr. žemiau). Išskiriamo histamino kiekis procentais gali būti išskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Histamino išskyrimas (\%)} = \frac{E - B}{C - B} \times 100 \%,$$

kurioje E - eksperimentinio mėginio reikšmė, B - mėginio, kuriame yra ląstelės ir buferis, reikšmė ir C - ląstelės, apdorotos HClO₄.

Standartinė kreivė gaunama, nubraižant tiksliai pasverto histamino hidroklorido nuosekliai kintančių koncentracijų tirpalų optinio tankio (OD) reikšmes, išmatuotas fluorimetriškai, kai fluorescencija sužadinama 350 nm banga, o fluorescencijos atsakas registruojamas 450 nm bangoje. Santykinis dydis r, išskaičiuotas iš histamino standartinės kreivės yra 0,9998, ir mažiausia histamino koncentracija, kurią galima išmatuoti, yra 0,5 ng/ml.

Peptido aktyvumo dydis ED₅₀ gali būti išskaičiuojamas iš dozę atitinkančios kreivės, nubraižytos ant pusiau logaritminio popieriaus, atidedant histamino išskyrimo priklausomybę nuo peptido koncentracijos.

Visi peptido pavyzdžiai testuojami su mast-ląstelėmis, paimtomis iš 3 skirtingų žiurkių..

2. Anfilaktoidinis odos testas (CAT):

Šiame eksperimente naudojamos sveikos, suaugusios žiurkių SD patelės (250 g svorio). Žiurkėms daromos Evan'o blue (po 1 ml 0,05 % koncentracijos) tirpalo intraveninės injekcijos. Po to, tuoj pat po 0,05 ml peptido tirpalo (atitinkamai 5, 0.5 ir 0,05 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos) ir fiziologinis tirpalas, kaip kontrolė, suleidžiamas po oda į gyvuliuko užpakalio nuskustą vietą. Praėjus 30 min. po injekcijos, žiurkės pjaunamos, ir nulupama nugaros oda. Pažeistos odos diametrai išmatuojami dvejomis statmenomis kryptimis skriestuvu. Kontrolinės odos diametras paprastai yra mažesnis negu 5,5 mm.

Evan'o blue kiekis, patekęs į odą iš kraujo indų, taip pat gali būti spektrofotometriškai išmatuotas. Pažeistos srities oda išpjaunama ir pamerkiama nakčiai į acetono/fiziologinio tirpalo (7:3, tūris/tūris) mišinį. Kitą dieną nucentrifuguojama, ir Evan'o blue kiekis supernatante išmatuojamas spektrofotometru (UV-260) 610 nm bangoje, lyginant su kontroliniu acetono/fiziologinio tirpalo (7:3, tūris/tūris) mišiniu. Kiekvienas peptidas buvo testuojamas, darant injekcijas trims skirtingoms žiurkėms.

Pagal aukščiau aprašytą metodą buvo sukonstruota ir susintetinta įvairūs nauji LHRH antagonistai. Trumpai tariant, naujos LHRH analogų struktūros gautos kaip atskiros arba sudėtinės medžiagos, sudarytos iš daugelio gamtinių ir negamtinių aminorūgščių, išvardintų ankstesniuose skyriuose.

Dalis naujų LHRH antagonistų pavyzdžių pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė

Dalis pavyzdžių, susijusių su šiuo išradimu

Analogai	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8	AA9	AA10
Pradinis	N-Ac- D2Na	DpClPhe	D3Pal	Ser	Tyr	DArg	Leu	Arg	Leu	DAlaNH ₂
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
					Arg	Arg	DPhe	Pip		
					Arg	DMop		Pip		
					Arg	DPhe		Mop		
					Mop	D3Pal				
			DPip		Mop	DMop		Pip		
					Arg	D3Pal		Pap		
					Arg	D3Pal		Pip		
					DFPhe	D3Pal		Pap		

DPhe	Arg	DPip	Eap
DpClPhe		DMap	Mop
		DMop	Mop
		DPip	Map

1 lentelės tęsinys

DPhe	Arg	D3Pal	
	Eap		Mop
	Tep	DMop	Pep
	Tep	DMap	Mop
	Tep	DEap	
	Tep	DBap	
	Tep	DPap	
	Tep	DTep	
DpFPhe	D3Pal	DMop	Mop
DPhe	Mop	DMop	Eap
		DPip	Pap
		DBap	Pip
	Tep	DMop	Eap
		DTep	
	Tep	DMop	
		DTep	
DpClPhe		DMop	Pip
DpClPhe		DMop	Bap
	Mop		
	Mop	D3Pal	
	Arg	DMop	
	Arg	DPip	
	Arg	DTep	
		D3Pal	Pip
	Arg	D3Pal	Pip
	Arg	D3Pal	Mop
	Arg	D3Pal	Tep
	Arg	D3Pal	Pap
	Arg	DTep	Pip
	Arg	DTep	Tep
DPhe	Arg	DTep	Map
DFPhe	Arg	DTep	Eap
DFPhe	Arg	DTep	Pap
DFPhe	Arg	DTep	Bap
Mep	Tep	DPap	

Šio išradimo *pritaikymas*:

IV	7,55	5,26	0,23	0,21	0,31	0,19	0,65
V	7,90	8,11	0,32	0,30	0,35	0,30	0,69
VII	16,16	9,58	0,17	0,08	0,16	0,40	0,12

Tirpalas A + 80 % acetonitrilo

2 tirpiklių sistema:

Tirpalas A yra 0,01 M KH_2PO_4 vandeninis tirpalas (pH 3)

Tirpalas B yra 20 % tirpalo A + 80 % acetonitrilo

TCL tirpalų sistema:

1. nBuOH/EtOAc/HOAc/H₂O (5:5:1:1)

2. nBuOAc/nBuOH/HOAc/H₂O (2:8:2:3)

3. nBuOH/HOAc/H₂O (4:1:5)

4. nBuOH/HOAc/H₂O (4:1:2)

5. nBuOH/EtOAc/HOAc/H₂O (1:1:1:1)

2. Aminorūgščių analizė

Analizė vykdoma pagal klasikinį IEN ir naują PICO-TAG metodą, ir rezultatai pateikiami 3 lentelėje ir 5, 6 figūrose.

3 lentelė

LHRH antagonistų aminorūgščių sudėtis

Analogai	Metodai	Ser	Arg	Ala	Pro	Leu	Phe	Pal	pClPhe	Nal
IV	IEN	0,86	2,05	1,01	0,99	1,13		+	+	ND
	PICO-TAG	0,92	2,25	0,91	1,01	0,91		+	+	+
V	IEN	0,81	2,02	1,03	1,03	0,12	0,99	+	+	+
	PICO-TAG	0,68	2,26	0,93	1,29	1,04	1,00	+	+	+
VI	IEN	0,91	0,91	1,00	1,00	1,00		+	+	ND

ND: nenustatyta

3. Biotyrimų rezultatai

Biotyrimų rezultatai, parodantys antiovuliacinį aktyvumą, esant skirtingoms dozėms, ir histamino-išskyrimo aktyvumą ED_{50} *in vitro*, pateikiami 4 lentelėje, kurioje, kaip pavyzdžiai, išvardinti 26 antagonistai.

4 lentelė

Biotyrimų rezultatai, testuojant naujus LHRH antagonistus, sukonstruotus pagal tėvinę struktūrą

Pakeistos amino- rūgštys	% AOA/ μg	HRA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\text{ED}_{50} \pm \text{SEM}$
-----------------------------	----------------------	--

		0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	
1	Pradinis		50	75	100		3,5
2	DPhe		29	60	100		7,4±0,98
3	DPhe, DPhe				0		18,5±7,0
4 lentelės tęsinys							
4	DTyr, Lys				40		5,1±2,15
5	DPhe					60	35,0±5,05
6	Map			29			24,8±4,47
7	Eap			43			12,0±0,50
8	Pap			0			9,6±0,19
9	Bap			14			23,5±5,78
10	DMap			12,5			18,3±2,38
11	Tep			14			36,8±5,68
12	Pip	17	33	71	100		9,4±1,63
13	Mop			25	100		14,7±2,70
14	DMap			14			19,5±2,50
15	DEap			14			13,0±1,00
16	DTEp			71			22,5±3,25
17	DPip			0	50	57	7,6±2,48
18	DMop		33	67	100		>11
19	Map			57	100		5,4±1,22
20	Eap				29		56,9±15,1
21	Pap				50	88	70,4±26,8
22	Bap				0		>235
23	Tep				100		6,6±2,13
24	Pip				43		27,5±2,50
25	Mop				71		52,5±17,5
26	DMap				0		28,0±9,00

Pradinė struktūra: [Nac-D2Nal¹,DpClPhe²,D3Pal³,Ser⁴,Arg⁵,D3Pal⁶,Leu⁷,Arg⁸,Pro⁹,DAla¹⁰]NH₂.

SUTRUMPINIMAI

Pateikiami sutrumpinimai, kurie buvo naudojami šio patento dokumento tekste.

Ala	alaninas
AOA	antiovuliacinis aktyvumas
Arg	argininas
Bap	dibutilaminometilfenilalaninas
Boc	t-butiloksikarbonilas
BuOAc	butilo acetatas
CAT	odos anafalaktoidinis testas
DCC	dicikloheksilkarbodiimididas
DCM	dichlormetanas
D2Nal	D-β-(2-naftil)alaninas

D3Pal	D-β-(3-piridil)alaninas
DpClPhe	p-chlor-D-fenilalaninas
DpFPhe	p-fluor-D-fenilalaninas
D6Qal	D-β-(6-chinolil)alaninas
DMF	N,N-dimetilformamidas
Eap	dietilaminometilfenilalaninas
ED ₅₀	efektyvi dozė, duodanti 50 % atsaką
EtOAc	etilo acetatas
FSH	folikulus stimuliuojantis hormonas
Glu	glutamino rūgštis
Gly	glicinas
His	histidinas
HOBT	1-hidroksibenzotriazolas
HPLC	ninhidrino darinių didelio efektyvumo skystinė chromatografija
HRA	histamino-išskyrimo aktyvumas
HRT	histamino-išskyrimo testas
IEN	jonų mainų chromatografija su papildomomis operacijomis
IPA	izopropilo alkoholis
LH	liuteinizacijos hormonas
LHRH	liuteinizacijos hormoną atpalaiduojantis hormonas
Leu	leucinas
Liz	lizinas
Map	dimetilaminometilfenilalaninas
Met	metioninas
Mop	morfolinmetilfenilalaninas
nBuOH	n-butilo alkoholis
NS	fiziologinis tirpalas
Pap	dipropilaminometilfenilalaninas
Phe	fenilalaninas
Pip	piperidinometilfenilalaninas
Pipes	piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonrūgštis)
Pro	prolinas
R _f	dėmės pakilimo aukštis
SEM	standartinė paklaida
Ser	serinas
TFA	trifluoroacto rūgštis
TLC	plonasluoksnė chromatografija
TR	sulaikymo laikas
Trp	triptofanas
Tyr	tirozinas
Tep	tetrahidroperolil-metilfenilalaninas

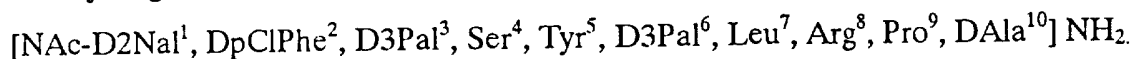
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Liuteinizacijos hormoną atpalaiduojančio hormono (LHRH) antagonistų konstravimo ir sintezės būdas, besiskiriantis tuo, kad naudoja aukšto aktyvumo LHRH antagonistą: [NAc-D2Nal¹, DpClPhe², D3Pal³, Ser⁴, Tyr⁵, Arg⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂ (II) kaip tėvinį junginį ir modifikuojant šios molekulės šarminę ir lipofilinę sritis, siekiant gauti naujus LHRH antagonistus, pasižyminčius aukštu antiovuliaciniu aktyvumu (AOA) ir žemu histaminą išskiriančiu aktyvumu (HRA), pagrįstas jų topologiniu panašumu su neuropeptido molekule, substancija P.

2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (II) molekulėje pritaiko ir pakeičia amino rūgštis Tyr⁵-Arg⁶-Arg⁸ C-gale ir aromatinės amino rūgštis N-gale.

3. Būdas pagal 1 ir 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad atitinkamą bazinę grupę įterpia 2-, 3-, 5-, 6-, 8-je padėtyse ir aukščiau išvardintose padėtyse įjungia negamtines aminorūgštis.

4. Būdas pagal 1 ir 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad D3Pal pakeičia DArg (II) molekulėje ir gauna analogą (III):



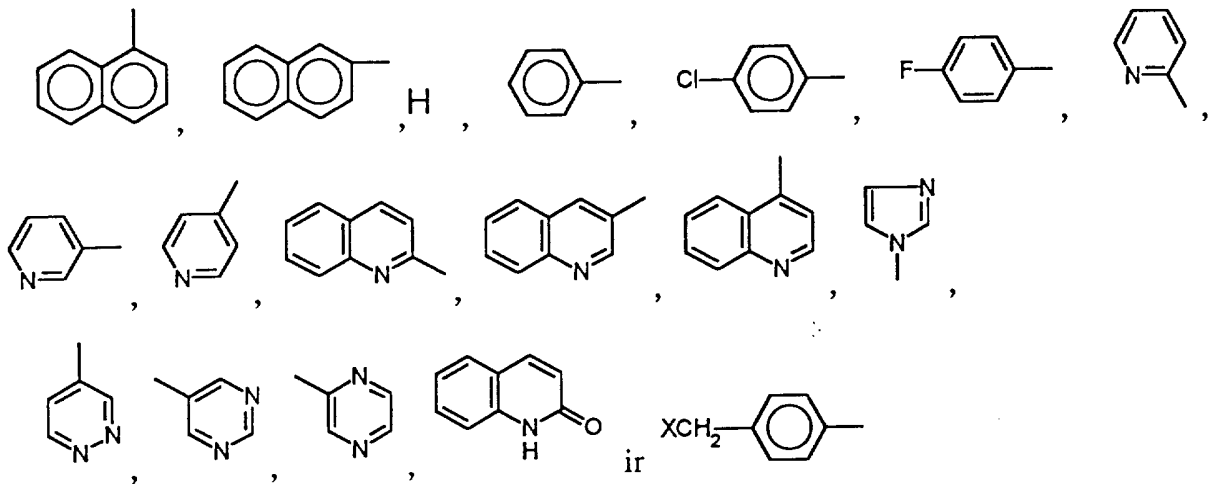
5. Būdas pagal 1 ir 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad Arg⁵, pakeičia vietoje Tyr⁵ (III) molekulėje ir gauna analogą (IV): [NAc-D2Nal¹, DpClPhe², D3Pal³, Ser⁴, Arg⁵, D3Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂.

6. Būdas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad DPhe³ pakeičia vietoje D3Pal³ (IV) molekulėje ir gauna analogą (V): [NAc-D2Nal¹, DpClPhe², DPhe³, Ser⁴, Tyr⁵, D3Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂.

7. Būdas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad DPhe³ pakeičia vietoje D3Pal³ (III) molekulėje ir gauna analogą (VI): [NAc-D2Nal¹, DpClPhe², DPhe³, Ser⁴, Tyr⁵, D3Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂.

8. LHRH antagonistas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jo formulė yra [NAc-D2Nal¹, AA², AA³, Ser⁴, AA⁵, AA⁶, Leu⁷, AA⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂, kurioje AA yra natūralios ar nenatūralios amino rūgštys formulėse D- ar L-ArAla, kuriose

Ar=



kuriose

X =



kuriose

R' = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

R = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

9. LHRH antagonistai pagal 8 punktą, besiskiriantys tuo, kad

AA² = D-pClPhe, D-ArAla, DPhe, Ar-Ala, DXCH₂Phe;

AA³ = D3Pal, Ar-Ala, D-ArAla, DPhe, D-XCH₂Phe;

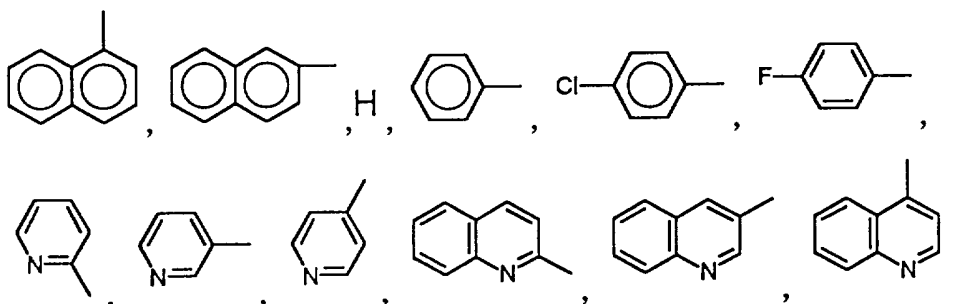
AA⁵ = Arg, DMap, Pip, Tyr, Pal, Mop, Tep, Map, Phe, Eap, Pap, Bap, DMop;

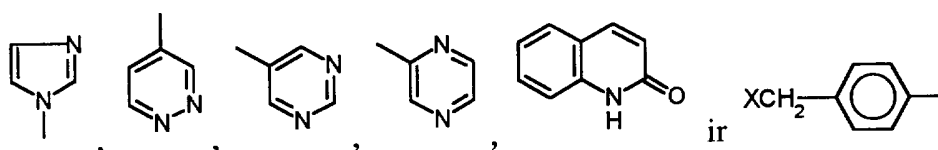
AA⁶ = D3Pal, D-Ar-Ala, D-XCH₂Phe;

AA⁸ = Pip, Mop, Tep, Map, Eap, Pap, Bap, Arg;

kuriose

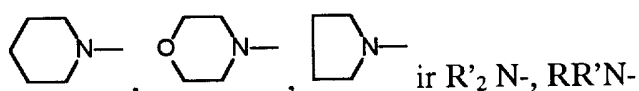
Ar =





kuriose

X =



kuriose

R' = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

R = CH₃-, CH₃CH₂-, C₃H₇-, C₄H₉-, H-;

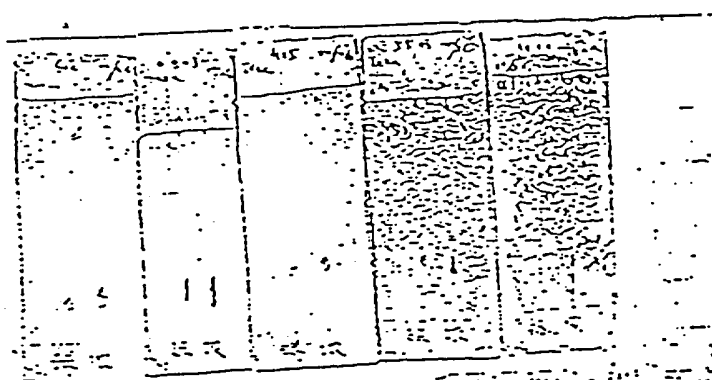
10. LHRH antagonistai pagal 8 arba 9 punktus, skirti panaudoti reprodukcinės endokrininės sistemos sutrikimų, tame tarpe endometriozės, vaikų ankstyvojo lytinio subrendimo, taip pat prostatos vėžio ir krūties vėžio gydymui, bei kaip vyrų ir moterų kontraceptinė priemonė gimimų reguliavimui arba nevaisingumo diagnostikai ir gydymui.

11. LHRH antagonistai pagal 8 arba 9 punktą, besiskiriantys tuo, kad jų vaisto forma yra įprastos injekcinės medžiagos, injekcinės kapsulės ar kitos vaistinės kompozicijos pavidalu.

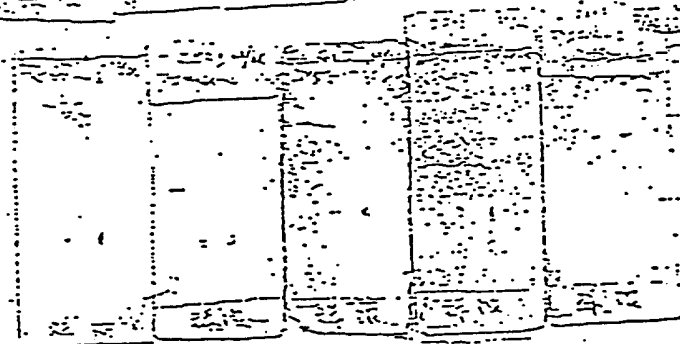
12. Junginys, kurio formulė yra [N-Ac-D²Nal¹, P-Cl-D-Phe², D³Pal³, Ser⁴, Mop⁵, D³Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂ arba [N-Ac-D²Nal¹, P-Phe², D³Pal³, Ser⁴, Mop⁵, D³Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, D-Ala¹⁰] NH₂ arba [N-Ac-D²Nal¹, P-Cl-D-Phe², D³Pal³, Ser⁴, Arg⁵, D³Pal⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, DAla¹⁰] NH₂.

1 piešinėlis: LHRH antagonistų IV, V ir VI TLC analizės rezultatai, chromatografuojami penkiose skirtingose sistemose

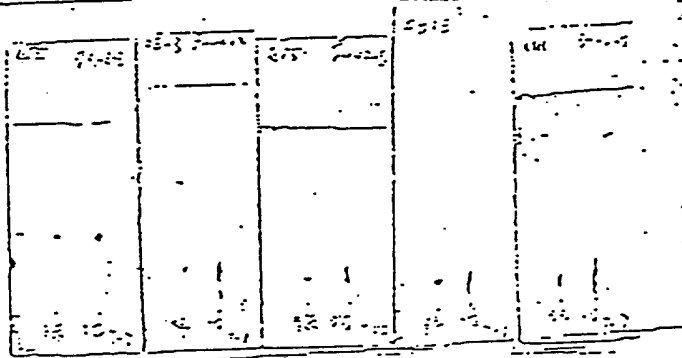
Pavyzdys IV



Pavyzdys V



Pavyzdys VII



2 piešinėlis: Švaraus LHRH antagonisto (IV) HPLC chromatograma, naudojant atvirkščių fazių sorbentus

Sąlygos:

Kolona: μ -Bondapak C18 (3.9 mm x cm)

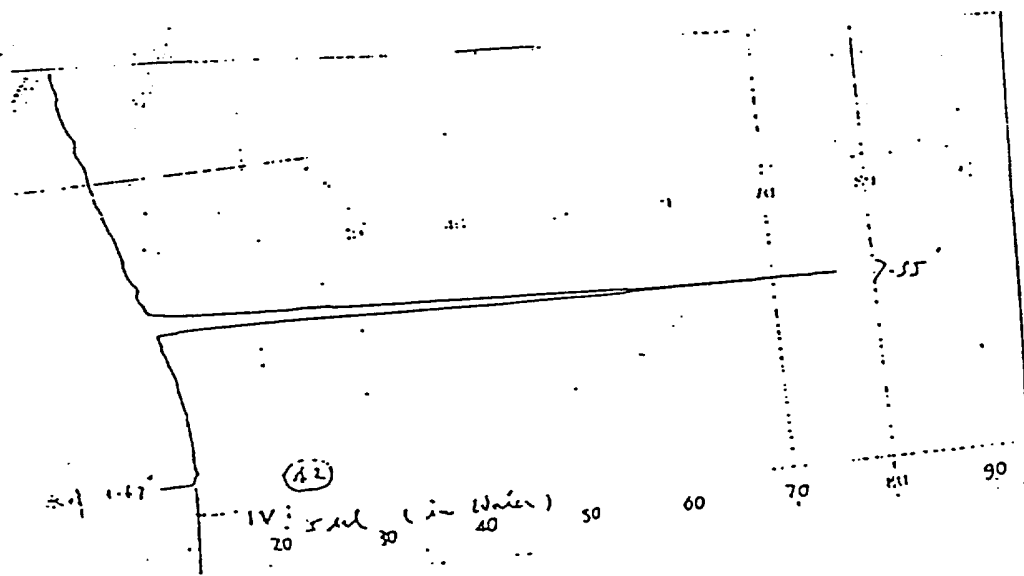
judri fazė: A buferinis tirpalas, 0.1 M NH₄OAc (pH7)

B buferinis tirpalas, 20 % A + 80 % acetonitrilo

gradientas: B nuo 10 iki 100 % per 15 min

pratekėjimo greitis: 2 ml/min

detekcija: UV 229 nm bangoje



3 piešinėlis: LHRH (V) antagonistų gryno pavyzdžio spektras, chromatografuojant HPLC sistemoje

Sąlygos:

Kolona: μ -Bondapak C18 (3.9 mm x 30cm)

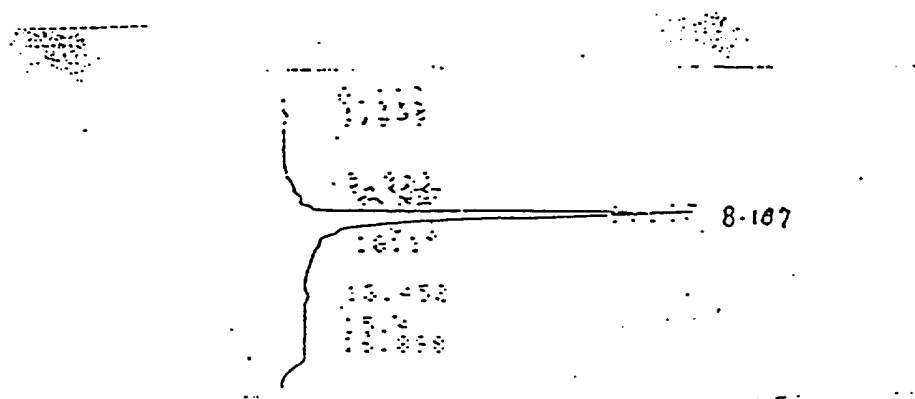
judri fazė: A buferinis tirpalas, 0.1 M KH_2PO_4 (pH3)

B buferinis tirpalas, 20 % A + 80 % acetonitrilo

gradientas: B nuo 40 iki 100 % per 15 min

pratekėjimo greitis: 2 ml/min

detekcija: UV 210 nm bangoje



LT 3971 B

4 piešinėlis: LHRH (VII) antagonistų gryno pavyzdžio spektras, chromatografuojant HPLC sistemoje

Sąlygos:

Kolona: μ -Bondapak C18 (3.9 mm x cm)

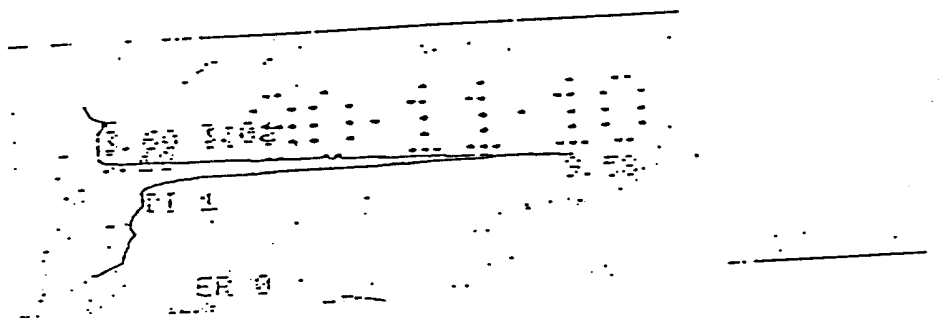
judri fazė: A buferinis tirpalas, 0.1 M KH_2PO_4 (pH3)

B buferinis tirpalas, 20 % A + 80 % acetonitrilo

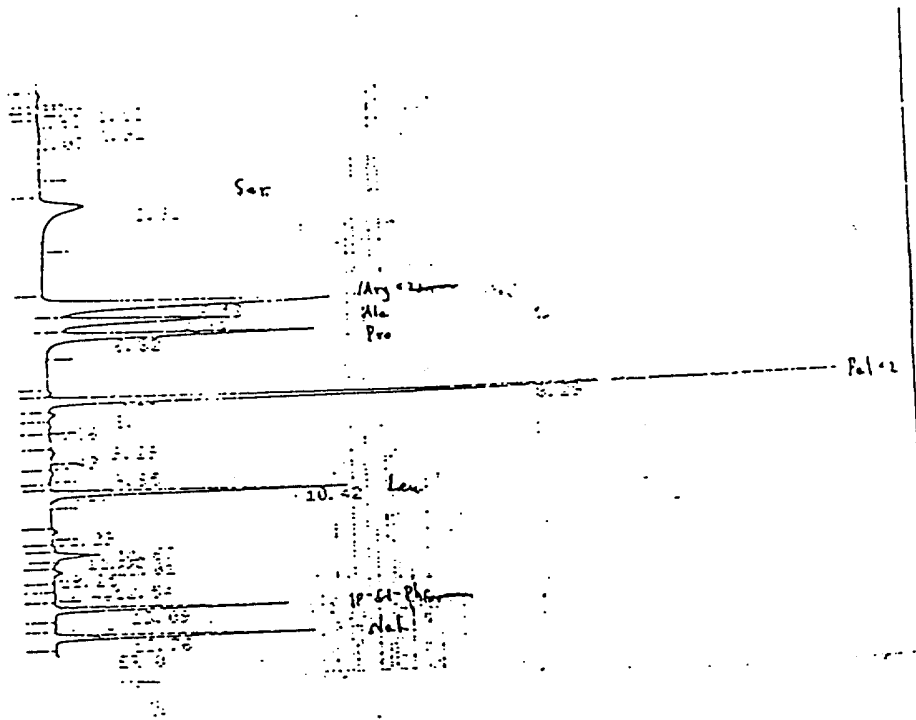
gradientas: pratekėjimo greitis: B nuo 40 iki 100 % per 15 min

pratekėjimo greitis: 1 ml/min

detekcija: UV 210 nm bangoje



5 picšinėlis: LHRH (IV) antagonisto spektras PICO-TAGIM sistemoje



6 piešinēlis: LHRH (V) antagonisto spektras PICO-TAGIM sistemoje

