



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 301015

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 07 K 7/23

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	900888	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	24.08.88, PCT/US88/02922
(22) Inng. dag	23.02.90	(85) Videreføringsdag	23.02.90
(24) Løpedag	24.08.88	(30) Prioritet	24.08.87, US, 88431
(41) Alm. tilgj.	23.04.90		
(45) Meddelt dato	01.09.97		

(73) Patenthaver Board of Regents, The University of Texas System, 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, US  
The Administrators of the Tulane Educational Fund, 6823 St. Charles, New Orleans, LA 70118, US

(72) Oppfinner Karl Folkers, Austin, TX, US  
Cyril Y. Bowers, New Orleans, LA, US  
Anders Ljungquist, Austin, TX, US  
Pui-Fun Louisa Tang, Kowloon, HK  
Minoru Kobota, Yotsukaido-shi, Chiba, JP  
Dong-Mei Feng, Austin, TX, US

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO

---

(54) Benevnelse **Dekapeptid med antioovulatorisk aktivitet**

(56) Anførte publikasjoner NO 880494, EP 97031, EP 225746, EP 277829  
Endocrine Rewieus (1986), vol 7, no. 1, side 44-66  
J. Med. Chem. (1986), vol. 29, side 1846-1851  
Biochem Biophys. Res. Comm., 148-2, 849-856 (1987)  
Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85, 1637-1641

(57) Sammendrag Antid er dekaeptidet, N-Ac-D-S-Nal, D-pClPhe, D-3-Pal, Ser, NicLys, D-NicLys, Leu, ILys, Pro, D-Ala-NH<sub>2</sub>, som er en antagonist til hormonet som frigjør luteiniserende hormon (LHRH). Dette dekaeptid, liksom andre ifølge foreliggende oppfinnelse, har høy antioovulatorisk aktivitet (AOA) og frigjør neglisjerbart histamin. Antid er programfestet for oppskalert produksjon, sikkerhetstesting og evaluering i den forsøksprimat og i klinisk medisin. Tallrike andre peptider med strukturer som er beslektet med strukturen til antid, ble fremstilt og testet. Disse peptidene hadde variasjoner primært i posisjonene 5, 6, 7 og 8. Av disse var N-Ac-D-2-Nal, D-pClPhe, D-3-Pal, Ser, PicLys, cis-DPzACAala, Leu, ILys, Pro, D-Ala-NH<sub>2</sub> en av de sterkest virkende.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse beskriver dekaeptider med antioovulatorisk aktivitet, nærmere bestemt syntetiske analoger av hormonet som frigjør luteiniserende hormon (LHRH). Et viktig fremskritt var syntese av analoger som fungerte som 5 antagonist til LHRH og var tilstrekkelig sterke til å hemme ovulasjon og tillate frigjøringen av bare små mengder histamin. Siden det ikke var noen pålitelig måte å forutsi strukturen til en antagonist på, som har en høy styrke og meget lav 10 histaminfrigjøring, var det nødvendig å utforske forskjellige fremgangsmåter for å oppdage en kombinasjon av strukturelle egenskaper som ville gi en antagonist til LHRH som hadde høy styrke for ovulasjonshemming og meget lav aktivitet for histaminfrigjøring.

Forskjellige peptider slik som substans P, vasoaktivt, intestinallyt peptid, gastrin, somatostatin, så vel som andre, er kjent for å forårsake frigjøring av histamin fra mastceller. Disse cellene er i mange vev, slik som hud, lunge og tarmkrøys, tannkjøtt osv. De fleste celler har granuler som 20 inneholder histamin og andre mediatorer av inflammasjon som kan bli frigjort av peptider og forårsake kapillær utvidelse og øket vaskulær permeabilitet. Da det ble observert at en antagonist til LHRH, f.eks. [Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-4-F-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>]-LHRH, forårsaket ødem i ansiktet og ekstremitetene da 25 den ble gitt til rotter, virket det sannsynlig at slike antagonister, hvis tilført mennesker som et kontraseptisk middel, ville forårsake alvorlig ødem i ansiktet og andre steder i kroppen. Slike bivirkninger ville sannsynligvis forhindre tilførselen av slike antagonister til mennesker.

Den histamininnholdende leukocyt er en basofil som også kan frigjøre histamin når den blir stimulert med mange av de samme peptidene som er nevnt ovenfor. Basofiler skiller seg biokjemisk fra mastceller, og slike forskjeller kan forklare både forutsigbar og ikke forutsigbar histaminfrigjøring som 35 svar på antagonister til LHRH. En antagonist til LHRH, som skal anvendes klinisk for å forhindre ovulasjon, skulle ikke frigjøre signifikante mengder av histamin fra verken mastceller eller basofiler.

Oppdagelsen av bivirkningene, slik som de ødem-

dannende og anafylaktoide virkningene til LHRH-antagonister, gjorde det ønskelig med oppdagelse av nye LHRH-antagonister som forhindret ovulasjon, men som ikke frigjorde signifikant histamin. Disse uønskede bivirkninger har vært observert i 5 rotter, og det er sannsynlig at the Food and Drug Administration ikke ville tillate testing av slike antagonister i mennesker.

Karten et al. (4) har gått igjennom tilgjengelig kunnskap vedrørende de strukturelle karakteristika for sterk 10 histaminfrigjøring av antagonister til LHRH. Noen av de mest viktige funnene er som følger. Den mest sterke LHRH-antagonist i å utløse histaminfrigjøring *in vitro*, involverte en kombinasjon av sterke basiske D-aminosyresidekjeder (Arg eller Lys) i posisjon 6 og i nær tilknytning til Arg<sup>8</sup> og en samling av 15 hydrofobe, aromatiske aminosyrer ved N-enden. Således er det ingen spesifikk aminosyre blant de ti aminosyrene som alene er ansvarlig for histaminfrigjøring. Tvert imot, strukturelle egenskaper som varierte fra N-enden (aminosyrene i de første få posisjoner, 1-4, etc.) og basiske aminosyrer mot C-enden 20 (posisjoner 6 og 8) deltar på en eller annen måte i histaminfrigjøring. Endog D-Ala i posisjon 10 har en viss innflytelse på histaminfrigjøring, grunnen til dette er uklar. Ved seg selv er to basiske sidekjeder i stor nærhet, som i posisjoner 6 og 8, utilstrekkelig alene til å gi høy fri- 25 gjøring av histamin. Samlingen av hydrofobe aminosyrer ved N-enden er utilstrekkelig alene for høy histaminfrigjøringsaktivitet. Endog et heksapeptidfragment har vist moderat histaminfrigjørende styrke. Det synes ikke å være noen korrelasjon mellom antioovulatorisk styrke og histaminfrigjøring til disse 30 antagonister *in vitro*.

I perspektiv kan mesteparten av hele kjeden av slike dekaeptidantagonister ha innflytelse på histaminfrigjøring. Det samme perspektivet synes å være riktig, men til forskjellig grad, når det gjelder høy antioovulatorisk aktivitet. Disse 35 LHRH-antagonister er vanligvis dekaeptider som indikerer at det er ti variabler som må justeres for å oppnå en ønsket antioovulatorisk aktivitet og ti variabler å justere for å eliminere histaminfrigjøringsaktivitet. Det er videre variasjoner

for hver av disse tyve variabler, antallet av mulige peptider som skal designes, syntetiseres og måles blir ikke mulig å beregne. Antakelig kan noen av de ti variabler være fri for antiovulatorisk og histaminfrigjørende aktivitet, mens noen 5 variabler kan overlappes med hensyn til disse to biologiske aktiviteter. Denne situasjon presenterer ekstraordinære vanskeligheter som må løses før en antagonist med høy styrke for antiovulasjon og meget lav styrke for histaminfrigjøring kan produseres.

10 Forskjellige strukturelle forandringer og kombinasjoner av de ti aminosyrene, etterfulgt av målinger med hensyn til både antiovulasjon og histaminfrigjøringsaktiviteter, skulle bli utført i det håp at en sterk antagonist hovedsakelig fri for bivirkninger ville bli oppdaget. Syntesen av nye 15 aminosyrer for å innsette i dekaeptidkjedene skulle også bli undersøkt, siden de vanlig tilgjengelige aminosyrer kanskje ikke kan være tilstrekkelig.

#### Oppsummering av oppfinnelsen

20 I antagonistene ifølge foreliggende oppfinnelse, ble arginin og dets derivat ikke benyttet. Lysin ble overført til derivater med acylgrupper eller med alkylgrupper på E-amino-gruppen. Aminosyren ornitin ble acylert eller alkylert på d-aminogruppen. Både L- og D-formene til lysin og L-formen til 25 ornitin ble benyttet for å syntetisere disse acyl- og alkyl-derivatene. Strukturelt beslektede mellomprodukter ble også syntetisert. Til sammen ble mange nye peptider syntetisert ved hjelp av det basale og minimale konsept på ti variabler for antiovulatorisk aktivitet og ti variabler for histamin- 30 frigjøring, som kan være uavhengige eller delvis overlappende. På en slik basis kan antallet av slike peptider som kan bli designet bli overveldende, og enhver fornuftig prioritering må bli vurdert for å redusere antallet peptider som skal syntetiseres i det håp at en oppdagelse vil bli realisert.

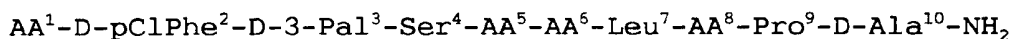
35 Visse peptider ble syntetisert, testet og funnet å være fordelaktige peptider. Blant disse ønskelige peptidene var de følgende to.

[N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-Nic-Lys<sup>6</sup>, Ilys<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH var effektiv når det gjaldt å for-

hindre ovulasjon og frigjorde bemerkelsesverdig lite histamin. [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>, ILys<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH var to ganger så effektiv som peptidet ovenfor og frigjorde ikke mer histamin enn "superagonistene" til LHRH, som for tiden er markedsført av flere farmasøytiske selskaper.

Disse to nye peptidene, og også andre beslektede peptider beskrevet heri, gir en aksepterbart balanse mellom høy antioovulatorisk aktivitet og lav histaminfrigjøring.

Foreliggende oppfinnelse beskriver dekaeptider med antioovulatorisk aktivitet, kjennetegnet ved at de har den generelle formel



15 hvor

AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal, N-Ac-D-pClPhe eller N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe,

AA<sup>5</sup> er Tyr, NicLys, PicLys, MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzcLys, eller c-PzACAla,

AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-PicLys, D-MNcLys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys eller D-PzcLys, eller D-PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla, og

AA<sup>8</sup> er ILys eller IOrn.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også dekaeptider med antioovulatorisk aktivitet, kjennetegnet ved at de har

25 formelen



hvor

30 AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal, N-Ac-D-pClPhe eller N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe,

AA<sup>5</sup> er Tyr, NicLys, PicLys, MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzcLys, eller c-PzACAla,

AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-PicLys, D-MNcLys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys eller D-PzcLys, eller D-PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla,

AA<sup>7</sup> er Aile, Nle, Val, NVal, Abu eller Ala, og

AA<sup>8</sup> er ILys eller IOrn.

Disse dekaeptider inkluderer de som omfatter:

Ser<sup>4</sup>, PicLys<sup>5</sup> og D-PicLys<sup>6</sup>;

N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, Ser<sup>4</sup>, PicLys<sup>5</sup> og Pro<sup>9</sup>;

5 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>  
og D-Ala<sup>10</sup>;

10 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, NicLys<sup>5</sup>, Pro<sup>9</sup>  
og D-Ala<sup>10</sup>;

N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, Leu<sup>7</sup>, Pro<sup>9</sup> og  
D-Ala<sup>10</sup>;

15 D-pClPhe<sup>2</sup>, Pro<sup>9</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup>,  
ILys<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

20 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup>,  
ILys<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>,  
ILys<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

25 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup>,  
IOrn<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

30 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>,  
IOrn<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, MNicLys<sup>5</sup>, D-MNicLys<sup>6</sup>,  
IOrn<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

35 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PzclLys<sup>5</sup>, D-PzclLys<sup>6</sup>,  
IOrn<sup>8</sup> og D-Ala<sup>10</sup>;

N-Ac-D-pClPhe<sup>1</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og ILys<sup>8</sup>;

N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe<sup>1</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og ILys<sup>8</sup>;

5 NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og ILys<sup>8</sup>;

PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup> og ILys<sup>8</sup>;

NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og IOrn<sup>8</sup>;

10 PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup> og IOrn<sup>8</sup>;

MNicLys<sup>5</sup>, D-MNicLys<sup>6</sup> og IOrn<sup>8</sup>;

15 PzCLys<sup>5</sup>, D-PzCLys<sup>6</sup> og IOrn<sup>8</sup>;

Tyr<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og ILys<sup>8</sup>;

Tyr<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup> og IOrn<sup>8</sup>;

20 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup>, ILys<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup> og D-Ala<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>;

25 N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, PicLys<sup>5</sup>, cis D-PzACAla<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup>, ILys<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup> og D-Ala<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>.

Anvendelse av de ovenfor nevnte dekaeptider skjer i en prosess for å hemme ovulasjon i et dyr. Denne prosess omfatter tilførsel til nevnte dyr et dekaeptid som fortrinnsvis har strukturen: N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-Nic-Lys<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup>, ILys<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup> og D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

#### Beskrivelser av foretrukne utførelsesformer

35 Forkortelser og formler anvendt herved inkluderer de følgende:

a	=	alfa
BOC	=	t-butoksykarbonyl
Br-Z	=	o-brombenzyloksykarbonyl

	nBuOAc	=	n-butylacetat
	n-BuOH	=	n-butanol
	c	=	cis
	CDCl <sub>3</sub>	=	deuterokloroform
5	CHCl <sub>3</sub>	=	kloroform
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	=	diklormetan
	CH <sub>3</sub> CN	=	acetonitril
	Cl-Z	=	o-klorbenzyloksykarbonyl
	δ	=	delta
10	DCC	=	dicykloheksylkarbodiimid
	DIEA	=	diisopropyletylamin
	DMF	=	dimetylformamid
	E	=	eta
	Et	=	etyl
15	EtOAc	=	etylacetat
	EtOH	=	etanol
	Et <sub>2</sub> O	=	dietyleter
	HF	=	hydrogenfluorid
	HOAc	=	eddiksyre
20	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	kaliumdihydrogenfosfat
	MeOH	=	metanol
	MgSO <sub>4</sub>	=	magnesiumsulfat
	NH <sub>4</sub> OAc	=	ammoniumacetat
	iPrOH	=	2-propanol
25	py	=	pyridin
	t	=	trans
	TFA	=	trifluoreddiksyre
	THF	=	tetrahydrofuran
30	TOS	=	p-toluensulfonyl
	m	=	mikro
	Z	=	benzyloksykarbonyl
	Abu	=	2-aminosmørsyre
35	ACAla	=	aminosykloheksylalanin
	Aile	=	alloisoleucin
	AnGlu	=	4-(4-metoksyfenylkarbamoyl)-2-amino- smørsyre
	BzLys	=	N <sup>E</sup> -benzoyllysin



	Cit	=	citrullin
	Cl <sub>2</sub> Phe	=	3,4-diklorfenylalanin
	CypLys	=	N <sup>E</sup> -cyklopentyllysin
	DMGLys	=	N <sup>E</sup> -(N,N-dimetylglysyl)lysin
5	Dpo	=	N <sup>d</sup> -(4,6-dimetyl-2-pyrimidyl)ornitin
	Et <sub>2</sub> hArg	=	N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -diethylhomoarginin
	FPhe	=	A-fluorfenylalanin
	HOBLys	=	N <sup>E</sup> -(4-hydroksybenzoyl)lysin
10	ILys	=	N <sup>E</sup> -isopropyllysin
	INicLys	=	N <sup>E</sup> -isonikotinyllysin
	IOrn	=	N <sup>d</sup> -isopropylornitin
	Me <sub>3</sub> Arg	=	N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> ,N <sup>G1</sup> -trimetylarginin
	Me <sub>2</sub> Lys	=	N <sup>E</sup> ,N <sup>E</sup> -dimetyllysin
15	MNicLys	=	N <sup>E</sup> -(6-metylnikotinyl)lysin
	MPicLys	=	N <sup>E</sup> -(6-metylpikolinyl)lysin
	NaCAla	=	3-(4-nikotinylaminocykloheksyl)- alanin
	2-Nal	=	3-(2-naftyl)alanin
20	NicLys	=	N <sup>E</sup> -nikotinyllysin
	NicOrn	=	N <sup>d</sup> -nikotinylornitin
	Nle	=	norleucin, 2-aminoheksansyre
	NMeLeu	=	N-metylleucin
	Nval	=	norvalin, 2-aminopentansyre
25			
	PACAla	=	3-(4-pikolinoylaminosykloheksyl)- alanin
	3-Pal	=	3-(3-pyridyl)alanin
	pClPhe	=	3-(4-klor)fenylalanin
30	PicLys	=	N <sup>E</sup> -pikolinoyllysin
	Pip	=	piperidin-2-karboksylsyre
	PmcLys	=	N <sup>E</sup> -(4-pyrimidinylkarbonyl)lysin
	PmACAla	=	3-[4-(4-pyrimidinylkarbonyl)amino- cykloheksyl]alanin
35			
	PzACAla	=	3-(4-pyrazinylkarbonylaminocyklo- heksyl)alanin
	3-PzAla	=	3-pyrazinylalanin
	PzcLys	=	N <sup>E</sup> -pyrazinylkarbonyllysin

Sar = N-metylglysin  
 TinGly = 3-tienylglysin.

De fleste naturlige aminosyrer erholdt fra Peninsula  
 5 Laboratorier, San Carlos, CA. Hydroksylgruppen til Ser ble  
 beskyttet som benzyleteren, fenolhydroksylgruppen på Tyr som  
 Br-Z-derivatet og E-aminogruppen av Lys som Cl-Z-derivatet,  
 guanidingruppen til Arg og imidazolgruppen til His som TOS-  
 derivatene.  $\alpha$ -aminofunksjonen ble beskyttet som BOC-derivatet.  
 10 BOC-Orn(Z) ble erholdt fra Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.  
 BOC-D-2-Nal, BOC-D-3-Pal, BOC-D-Cl<sub>2</sub>Phe, BOC-pClPhe og BOC-ILys-  
 (Z) dicykloheksylaminsalt ble kjøpt fra Southwest Foundation  
 for Biomedical Research, San Antonio, TX. Benzhydrylamin-  
 hydrokloridresin ble erholdt fra Beckman Bioproducts, Palo  
 15 Alto, CA. Nitrogeninnholdet var omkring 0,65 mmol/g. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ble  
 destillert før bruk.

Foreliggende oppfinnelse involverer strukturen,  
 syntesen og anvendelsen av LHRH-antagonister med høy anti-  
 ovulatorisk styrke og nedsatt aktivitet til å frigjøre histamin  
 20 (1). Disse nye antagonistiske karakteristika er f.eks. D-  
 N<sup>E</sup>-nikotinyllysin (D-NicLys) i posisjon 6 og N<sup>F</sup>-isopropyllysin  
 (ILys) i posisjon 8. Oppløsningen av D-Arg<sup>6</sup>, særlig i kombina-  
 sjon med Arg<sup>8</sup> og en samling av hydrofobe, aromatiske aminosyre-  
 rester ved N-enden, har vært implisert i frigjøringen av  
 25 histamin (2-4).

Andre reduksjoner i anafylaktoid aktivitet ble opp-  
 nådd ved å øke avstanden mellom de positive ladningene i posi-  
 sjon 6 og 8 ved Arg<sup>5</sup> og ved å inkludere et nøytralt residuum i  
 posisjon 6 som i [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, Arg<sup>5</sup>, D-4-  
 30 (p-metoksybenzoyl)-2-aminosmørsyre<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH [2-Nal  
 representerer 3-(2-naftyl)alanin; pClPhe representerer 3-(4-  
 klorfenyl)alanin; 3-Pal representerer 3-(3-pyridyl)alanin] av  
 Rivier et al. (5) og [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-aMepClPhe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, Arg<sup>5</sup>,  
 D-Tyr<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH [aMepClPhe representerer 2-metyl-3-(4-  
 35 klorfenyl)alanin] av Roeske et al. (6). Videre modifikasjoner  
 i posisjon 6 er reduktiv alkylering av D-Lys<sup>6</sup> ved Hocart et al.  
 (7), inkorporering av N,N-diethylhomoarginin av Nestor et al.  
 (9). De cycliske analogene som nylig er syntetisert av Rivier  
 et al., viste ingen reduksjon i histaminfrigjøring sammen-

lignet med de lineære motparter (10).

Av dekaeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse ble to opprinnelig selektert som modeller for videre strukturering. Peptidet [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, D-NicLys<sup>5</sup>, ILys<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH (betegnet antid) hadde en imponerende styrkekombinasjon og lav histaminfrigjøring; anti-ovulatorisk aktivitet (AOA) var 100 % ved 1 µg og 36 % ved 0,5 µg; ED<sub>50</sub> for histaminfrigjøring *in vitro* var bestandig over 300 µg/µl sammenlignet med omkring 0,17 for standardanalogen [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pFPhe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>]-LHRH [pFPhe representerer 3-(4-fluorfenyl)alanin] (5). En annen analog var identisk med antidet, bortsett fra PicLys<sup>5</sup> og D-PicLys<sup>6</sup> (PicLys representerer N-pikoloyllysin); 100 % AOA ved 0,5 µg og 40 % ved 0,25 µg; ED<sub>50</sub>, 93 ± 11.

Inkludert heri er resultatet fra LHRH-analoger med acylerte aminocykloheksylalaninrester i posisjon 6, fra analoger i hvilke Leu<sup>7</sup> er blitt substituert med andre nøytrale residuer, fra en sammenligning av ILys<sup>8</sup> vs. IOrn<sup>8</sup>, og fra tester for oral aktivitet og varighet for antagonistisk aktivitet når gitt oralt eller parenteralt (s.k.)

Smeltepunktene er ikke rettet. NMR-data er rapportert som d-verdier nedfelt fra TMS.

Før acylering ble Z- og Cl-Z-gruppene til Lys og Orn spaltet ved hydrogenolyse i MeOH i nærvær av 10 % Pd/c.

BOC-D-BzLys ble syntetisert ved acylering av BOC-D-Lys med benzoylklorid, som beskrevet for L-isomeren av Bernardi et al. (17).

BOC-DMG-Lys ble fremstilt ved acylering av BOC-Lys med kloracetylklorid ved å anvende den samme metode og ved å reagere det urene produkt fra 10 mmol BOC-Lys i 10 µl THF med 10 µl 40 % vandig dimetylamin. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 15 minutter i isbad og så i 2,5 timer ved værelsestemperatur. Etter avdamping i vakuum ble det grove produkt løst opp i 10 µl H<sub>2</sub>O og applisert på Bio-Rad AG1-X8-kolonne, acetatform, 1 x 25 cm. Kolonnen ble først vasket med 200 µl vann, og så ble produktet eluert med 6 % HOAc og lyofilisert flere ganger for å fjerne HOAc. Utbytte 60-70 %. Amorf masse. R<sub>f</sub> (n-BuOH:py:HOAc:H<sub>2</sub>O = 30:10:3:12) = 0,27. Renhet >95 %. NMR

(CDCl<sub>3</sub>): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,85-1,48, m, 6 H, B, y, d, CH<sub>2</sub>-grupper; 2,6, s, 6 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 3,25, m, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 3,37, s, 2 H, N-CH<sub>2</sub>-CO; 4,15, m, 1 H, a-CH.

De andre acylerte Lys-derivatene i tabellene ble fremstilt fra BOC-D eller L-Lys og den korresponderende p-nitro-fenylester.

p-nitrofenylnikotinat. Til 9,85 g (80 mmol) nikotinsyre og 13,35 g (96 mmol) p-nitrofenol i 250 µl DMF ble tilsatt 16,5 g (80 mmol) DCC med omrøring på isbad. Etter 1 time ved 0 °C og 3 timer ved værelsestemperatur ble urea filtrert fra, og produktet ble utfelt ved tilsetning av et likt volum vann. Filtrering, tørking i vakuum og rekrystallisering fra iPrOH gav 11,22 g, 57 %, hvite nåler, sm.p. 172,5-173 °C (24).

p-nitrofenylisonikotinat ble fremstilt på samme måte, 12 g, 61 %, sm.p. 139-141 °C, sm.p. 137-139 °C (18).

Også p-nitrofenyl-6-metylnikotinat ble fremstilt på samme måte. Utbytte fra 70 mmol 6-metylnikotinsyre: 6,0 g, 33 %, etter rekrystallisering fra MeOH, sm.p. 156-157 °C. R<sub>f</sub> (2 % MeOH i CHCl<sub>3</sub>) = 0,57 NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,7, s, 3 H, CH<sub>3</sub>; 7,36, d, H, py H<sup>5</sup>; 7,45, m, 2 H, H ved siden av oksygen i fenylringen; 8,34, m, 3 H, H ved siden av NO<sub>2</sub>-gruppen i fenylringen overlappende med py H<sup>4</sup>; 9,27, d, 1 H, py H<sup>2</sup>.

p-nitrofenylpikolinat. 4,92 g (40 mmol) pikolinsyre og 5,84 g (42 mmol) p-nitrofenol ble suspendert/oppløst i 200 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Så ble 8,24 g (40 mmol) DCC tilsatt i 20 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> med kraftig omrøring. Omrøring ble fortsatt ved værelsestemperatur i 17 timer. Så ble blandingen filtrert og filtermassen vasket med 30-40 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Råproduktet ble først behandlet med 100 µl Et<sub>2</sub>O med omrøring i isbad og filtrert. Rekrystallisering fra 250 µl iPrOH gav 6,24 g, 63 %, produkt. Sm.p. 154-6 °C (dek.), sm.p. 145-7 °C (18).

Pyrazinkarboksylsyre-p-nitrofenylester. Denne forbindelse ble fremstilt ved å anvende den samme metode som den tidligere forbindelse. Fra 40 mmol pyrazinkarboksylsyre og 44 mmol p-nitrofenol ble det oppnådd 35,2 mmol, 88 %, ester. Sm.p. 180-182 °C (dek.). R<sub>f</sub> (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 49:1) = 0,72. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7,5, m og 8,37, m, 2 H hver, hydrogenen ved siden av oksygenet og nitrogruppen i hhv. fenolringen; 8,84 m, 1 H, pyrazin H<sup>5</sup>; 8,9, d, 1 H, pyrazin H<sup>6</sup>; 9,48, d, 1 H, pyrazin H<sup>3</sup>.

BOC-NicLys. 2,5 g BOC-Lys (L eller D) ble suspendert i 200  $\mu$ l DMF med omrøring. Så ble 1,1 ekvivalent p-nitrofenyl-nikotinat tilsatt og blandingen omrørt ved værelsestemperatur i 36 timer. Blandingen ble så filtrert og filtratet avdampet til tørrhet under redusert trykk for å gi en gul olje. Residuet ble så omrørt med 2 x 5  $\mu$ l Et<sub>2</sub>O i isbad. Den første Et<sub>2</sub>O-fasen ble dekantert, den annen filtrert av. Rekrystallisering fra EtOAc/heksan gav 2,05 g produkt, 58 % (L-form). Sm.p. 138 °C, lit. (17), 138-141 °C, L-form  $[\alpha]_D^{20} = -2,91^\circ$  (MeOH), D-form  $[\alpha]_D^{20} = 3,35^\circ$  (MeOH).

L- og D-BOC-INicLys ble fremstilt på samme tid ved å acylere 10 mmol L- eller D-BOC-Lys med p-nitrofenylisonikotinat i 100  $\mu$ l DMF, 40 timer, værelsestemperatur. Det urene produkt ble fordelt mellom 120  $\mu$ l EtOAc og 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. EtOAc-fasen ble ekstrahert med 2 x 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O og 50  $\mu$ l saltløsning. Den opprinnelige vannfasen ble tilbakeekstrahert med 30  $\mu$ l EtOAc. De kombinerte EtOAc-fasene ble så tørket (MgSO<sub>4</sub>) og avdampet, og residuet ble behandlet med Et<sub>2</sub>O og rekrystallisert som ovenfor til å gi 1,07 g BOC-L-INicLys, 30,5 %. Utbyttet for D-forbindelsen var 1,26 g, 36 %. NMR (aceton d<sub>6</sub>): 1,4, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,8-1,48, m, 6 H, B, y, d, -CH<sub>2</sub>-; 3,44, t, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 4,13, m, 1 H, a-CH; 7,77, m, 2 H, py H<sup>5</sup> og H<sup>3</sup>; 8,70, m, 2 H, py H<sup>2</sup> og H<sup>6</sup>.

L- og D-BOC-PicLys. 1,23 g (5 mmol) L- eller D-BOC-Lys ble omrørt med 1,34 g (5,5 mmol) p-nitrofenylpikolinat i 60  $\mu$ l DMF i 16 timer. Etter filtrering og avdamping ble produktet rensert ved kolonnekromatografi på silikagel på en 4,5 x 32 cm kolonne og løsningsmiddelsystemet var n-Bu-OH:py:HOAc:H<sub>2</sub>O = 30:10:3:12. Produktet ble etter kromatografi løst opp i EtOAc og vasket med H<sub>2</sub>O, saltløsning, tørket og avdampet i vakuum. Utbyttene ble vanligvis 60-70 %. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,43, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,73-1,45, m, 6 H, B, y, d-CH<sub>2</sub>-; 3,47, m, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 4,32, m, 1 H, a-CH; 7,43, m, 1 H, py H<sup>5</sup>, 7,85, m, 1 H, py H<sup>4</sup>; 8,2, m, 1 H, py H<sup>3</sup>; 8,55, m, 1 H, py H<sup>6</sup>.

L- og D-BOC-MNicLys. 10 mmol BOC-Lys og 10,5 mmol p-nitrofenyl-6-metylnikotinat ble tillatt å reagere i 150  $\mu$ l DMF på den vanlige måten. Etter 27 timers filtrering og avdamping gav det en gul olje. Et<sub>2</sub>O-behandling (2 x 50  $\mu$ l) gav 3,3 g

produkt som ble rekrystallisert fra 50  $\mu$ l 20 % MeOH i EtOAc/heksan. Utbytte 2,87 g, 78,6 % (L-form).  $R_f$  (n-BuOH:py:HOAc:H<sub>2</sub>O = 32:10:3:12) = 0,61. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,46, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,9-1,5, m, 6 H, B, y, d-CH<sub>2</sub>; 2,57, s, 3 H, py CH<sub>3</sub>; 3,36, m, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 4,11, m, 1 H, a-CH; 7,22, d, 1 H, py H<sub>5</sub>; 8,08, m, 1 H, py H<sup>4</sup>; 8,95, bred s, 1 H, py H<sup>2</sup>.

L- og D-BOC-PzCLys. Ved å anvende metoden ovenfor ble det oppnådd fra 7,7 mmol pyrazinkarboksylysyre-p-nitrofenylester g 7 mmol BOC-Lys, L eller D, i 100  $\mu$ l DMF, omkring 6 mmol produkt etter rekrystallisering fra iPrOH.  $R_f$  (n-BuOH:py:HOAc:H<sub>2</sub>O = 30:10:3:12) = 0,47. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,9-1,48, m, 6 H, B, y, d-CH<sub>2</sub>-; 3,51, m, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 4,29, m, 1 H, a-CH; 8,52, q, 1 H, pyrazin H<sub>5</sub>; 8,77, d, 1 H, pyrazin H<sup>6</sup>; 9,41, d, 1 H, pyrazin H<sup>3</sup>.

BOC-L-NicOrn. Denne forbindelse ble fremstilt på vanlig måte ved å reagere 7 mmol p-nitrofenylnikotinat med 5 mmol BOC-Orn i 75  $\mu$ l DMF i 36 timer. Avdamping og rekrystallisering fra EtOAc gav 3,5 mmol, 70 %, NicOrn. Sm.p. 143-144 °C.  $R_f$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O = 4:1:2) = 0,70. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 7,46, m, 1 H, py H<sup>5</sup>; 8,27, m, 1 H, py H<sub>4</sub>; 8,69, m, 1 H, py H<sup>6</sup>; 9,05, m, 1 H, py H<sup>2</sup>.

BOC-D-trans-NACAla. 1,43 g (5 mmol) BOC-D-trans-3-(4-aminocykloheksyl)alanin (oppnådd fra Southwest Foundation for Biomedical Research) ble omrørt med 1,35 g (5,5 mmol) p-nitrofenylnikotinat i 60  $\mu$ l DMF i 120 timer i værelsestemperatur. Blandingen ble så filtrert, avdampet, behandlet med Et<sub>2</sub>O i isbad og filtrert igjen. Rekrystallisering ble utført ved å varme opp i 12  $\mu$ l EtOH og tilsette 18  $\mu$ l varmt H<sub>2</sub>O. Dette gav en klar løsning fra hvilken krystaller separerte ved avkjøling. Denne fremgangsmåten ble gjentatt to ganger. Utbytte: 0,98 g, 50 %. Renhet >95 %, sm.p. >220 °C. NMR (DMSO d<sub>6</sub>): 1,46, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,9-1,48, m, 11 H, ring CH<sub>2</sub>, ring CH i posisjon 1 og B-CH<sub>2</sub>; 3,72, m, 1 H, ring CH i posisjon 4; 3,95, m, 1 H, a-CH; 7,48, m, 1 H, py H<sup>5</sup>; 8,16, m, 1 H, py H<sup>4</sup>; 8,67, m, 1 H, py H<sup>6</sup>; 8,96, m, 1 H, py H<sup>2</sup>.

Boc-D-cis-NACAla. 5 mmol Boc-D-cis-3-(4-aminocykloheksyl)alanin (kilde som ovenfor) og 5,5 mmol p-nitrofenylnikotinat ble tillatt å reagere i DMF som ovenfor. Reaksjonstid: 25 timer. Opprensing ble oppnådd ved Et<sub>2</sub>O-behandling som

ovenfor og silikagelkromatografi på en 4,5 x 32 cm kolonne ved bruk av løsningsmiddelsystemet  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{py}:\text{HOAc} = 75:10:10:5$ . Utbytte 1,3 g, 61 %, amorft pulver.  $R_f$  (kolonnesystem) = 0,58. NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1,44, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,95-1,45, m, 11 H, ring  $\text{CH}_2$ , ring CH i posisjon 1 og B- $\text{CH}_2$ ; 4,22, m, 1 H, a-CH; 4,35, m, 1 H, ring CH i posisjon 4; 7,35, 8,24, 8,63 og 8,98, 1 H hver, til- knytninger som for tidligere forbindelse.

BOC-IOrn(Z). Denne forbindelse ble fremstilt fra BOC-Orn(Z) ved reduktiv alkylering med aceton og  $\text{H}_2/\text{Pd}$ , som beskrevet av Prasad et al. (23), etterfulgt av omdannelse til Nd-Z-derivatet med benzylklorformiat i vandig alkali (Schotten-Baumann-betingelser). Opprensing ble oppnådd ved kromatografi på silikagel med  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 85:15$ .  $R_f$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HOAc} = 85:15:3$ ) = 0,8. NMR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1,10, d, 6 H, isopropyl- $\text{CH}_3$ ; 1,40, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,7-1,5, m, 4 H, B,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ; 3,09, m, 2 H, d- $\text{CH}_2$ ; 4,2, m, 1 H, a-CH; 5,10, s, 2 H, benzyl- $\text{CH}_2$ ; 7,3, m, 5 H, aromatisk.

BOC-CypLys(Z). 2,04 g BOC-Lys(Z) ble oppløst i 8  $\mu\text{l}$  syklopentanon og 32  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  som inneholdt 0,22 g NaOH. Hydrogenering ble utført i nærvær av 0,4 g 10 % Pd/C ved 50-60 psi i et Parr-apparat. Etter 4 timer ble hydrogeneringen avbrutt, og 2  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH og 10  $\mu\text{l}$  MeOH ble tilsatt. Hydrogeneringen ble så fortsatt i 16 timer ved 50-60 psi, så filtrering og avdamping. Residuet ble oppløst i 75  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  og vannfasen ekstrahert tre ganger med  $\text{Et}_2\text{O}$  og én gang med heksan. pH ble så justert til 6-7 med HCl og løsningen avdampet i en roterende fordampner, badtemperatur 40 °C. Det resulterende produkt ble så overført til Z-derivatet ved å anvende benzylklorformiat i vandig NaOH (Schotten-Baumann-betingelser). Utbytte: 1,3 g, 58 % totalt.  $R_f$  ( $n\text{-BuOH}:\text{py}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O} = 30:10:3:12$ ) = 0,69. Renhet >95 %. NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,95-1,35, m, 14 H, ring  $\text{CH}_2$  + B,  $\gamma$ , d- $\text{CH}_2$ ; 3,13, bred t, 2 H, E- $\text{CH}_2$ ; 4,34-4,05, m, 2 H, a-CH + ring CH; 5,13, s, 2 H, benzyl- $\text{CH}_2$ ; 7,35, m, 5 H, aromatiske protoner.

Boc-Me<sub>2</sub>Lys, D- og L-. Disse forbindelsene ble fremstilt ved hydrogenolyse av de korresponderende Z- eller Cl-Z-derivater i nærvær av 37 % formaldehyd, hovedsakelig som beskrevet av L. Benoiton (22) for  $\text{N}^a$ -acetylanalogen. Opprensing ble oppnådd ved kromatografi på silikagel med løsningsmiddel-

systemet n-BuOH:py:H<sub>2</sub>O = 2:2:1. Utbyttene er 40-65 % og produktene er amorfe. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,41, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,9-1,5, m, 6 H, B, γ, d-CH<sub>2</sub>; 2,6, s, 6 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 2,8, m, 2 H, E-CH<sub>2</sub>; 4,03, m, 1 H, α-CH.

5            BOC-D-AnGlu. 0,62 g (3 mmol) DCC ble tilsatt den is-avkjølte løsningen med 1,10 g (3 mmol) BOC-D-glutaminsyre-α-benzylester og 0,39 g (3 mmol) p-anisidin i 25 μl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Reaksjonsblandingen ble omrørt og oppvarmet til værelsestemperatur og så omrørt i ytterligere 17 timer. Dicykloheksylurea ble så  
10 filtrert av og CHCl<sub>3</sub> tilsatt til et totalt volum på 125 μl. Denne løsningen ble ekstrahert med 2 x 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, mettet NaHCO<sub>3</sub>, 2 x H<sub>2</sub>O og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Avdamping og rekrystallisering fra EtOH gav 0,99 g, 74 %, produkt. Sm.p. 129,5-131 °C. R<sub>f</sub> (4 % MeOH i CHCl<sub>3</sub>) = 0,53. Dette produkt ble oppløst i 30 μl  
15 MeOH og 10 μl EtOH og hydrogenert i nærvær av 0,3 g Pd/C ved 50 psi i 2,5 timer. Filtrering og avdamping gav et kvantitativt utbytte av BOC-D-AnGlu. Ikke-krystallinsk, renhet >98 %. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 2,35-1,95, m, 2 H, B-CH<sub>2</sub>; 2,6-2,4, m, 2 H, γ-CH<sub>2</sub>; 3,76, s, 3 H, OCH<sub>3</sub>; 4,3, m, 1 H,  
20 α-CH; 6,82 og 7,42, bred d, 2 H hver, aromatiske protoner.

BOC-Me<sub>3</sub>Arg. Først ble N,N,N',S-tetrametylisotiourea fremstilt ved prosedyren til Lecher og Hardy (19). K.p. (15 mm) = 74 °C, lit. (over) 68 °C ved 11 mm. 9 mmol BOC-Orn og 10 mmol tetrametylisotiourea ble oppløst i 15 μl DMF og  
25 2 μl trietylamin og inkubert ved 100 °C i 2 timer og ved værelsestemperatur i 10 timer. Så ble reaksjonsblandingen avdampet til tørrhet og sendt gjennom en silikagelkolonne eluert med iPrOH:trietylamin:H<sub>2</sub>O = 42:6:13. Den hvite massen som ble oppnådd ble oppløst i H<sub>2</sub>O, og løsningen ble surgjort med 6 N  
30 HCl og lyofilisert til å gi 5,5 mmol produkt. R<sub>f</sub> (kolonneelueringsmiddel) = 0,50. NMR (D<sub>2</sub>O): 1,42, s, 9 H, t-butoksygruppe; 2,80, m, 1 H, α-CH; 2,89, s, 3 H, CH<sub>3</sub> på guanidingruppen; 2,96, s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N; 3,25, t, 2 H, d-CH<sub>2</sub>; 1,50, m, 4 H, B, γ-CH<sub>2</sub>.

BOC-Dpo. Av 10 mmol arginin-hydroklorid og 1,72 g  
35 natriumhydrogenkarbonat oppløst i 17 μl H<sub>2</sub>O, 28,6 μl acetylacetone og 28,6 μl EtOH ble det oppnådd 7,5 mmol Dpo ved å følge fremgangsmåten til F.-S. (20). Produktet ble så overført til det korresponderende BOC-derivat ved å anvende di-t-butyl-dikarbonat i 50 % vandig dioksan i nærvær av natriumhydroksid.



Denne reaksjonen gir hovedsakelig et kvantitativt utbytte.  $R_f$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O = 4:1:2) = 0,63. NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45, s, 9 H, t-butoksygruppe; 1,9-1,5, 4 H, B,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>; 2,33, s, 6 H, CH<sub>3</sub>; 3,46, m, 2 H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>; 4,24, m, 1 H,  $\alpha$ -CH; 6,35, s, 1 H, aromatisk H.

5 L- og D-former reagerer på samme måte.

BOC-D-Et<sub>2</sub>hArg. Denne forbindelse ble fremstilt ved metoden til Nestor og Vickery, US patentskrift 4.530.920.  $R_f$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O = 4:1:2) = 0,52.

#### 10 Syntese av decapeptidene

Dekapeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse ble syntetisert ved fast-fase-metoden ved å anvende en Beckman, modell 990, Peptide Synthesizer (1, 11). Benzhydrylaminhydrokloridresin (BHA-resin) ble benyttet som fast fase.

15 Programmet til syntesemaskinen var oppdelt i underprogrammer.

1. Avbeskyttelse: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) 50 % TFA i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som inneholdt 0,1 % indol (1 x vask, 1 eller 2 minutter); 3) 50 % TFA i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som inneholdt 0,1 % indol (avbeskyttelse, 20 minutter); 4) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 vask).

2. Nøytralisering: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) DIEA (10 % i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 3) DIEA (10 % i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (nøytralisering, 5 minutter); 4) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter).

25 3. DCC-kobling: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) aminosyreløsning i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (avlevering, overføring, blanding, 5 minutter); 3) DCC (10 % i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, avlevering og blanding, 180 minutter); 4) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter).

30 4. Aktiv esterkobling: ikke benyttet.

5. Endelig vask: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) i-PrOH (3 x vask, 1 eller 2 minutter); 3) DMF (3 x vask, 1 eller 2 minutter); 4) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x vask, 1 eller 2 minutter).

35 6. Vask etter TFA-behandling: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) i-PrOH (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x vask, 1 eller 2 minutter).

7. Acetylering: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x vask, 1 eller 2 minutter); 2) 25 % Ac<sub>2</sub>O og Py i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x vask, 1 eller

2 minutter); 3) 25 %  $\text{Ac}_2\text{O}$  og Py i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (acetylering, 20 minutter); 4)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x vask, 1 eller 2 minutter).

Den første aminosyren ble bundet til resinet ved hjelp av programsekvens 2-3-5. Før resinet ble plassert i reaksjonsbeholderen, ble resinet vasket i en separat trakt med 25  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /g resin for å fjerne fine partikler. I alle koblingene ble vanligvis et 3-4 gangers overskudd av Boc-aminosyren over nitrogeninnholdet til resinet benyttet. Denne fremgangsmåten resulterte vanligvis i en komplett koblingsreaksjon. Hvis en positiv ninhydrin-fargereaksjon ble observert, ble en annen kobling utført (programsekvens 3-5). Så ble resinet acetykert (programsekvens 7-5).

Den neste aminosyren ble bundet ved hjelp av programsekvens 1-6-2-3-5. For DCC-kobling ble alle aminosyrene oppløst i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Acetylering av aminosyrerestene i posisjon 1 ble utført ved å anvende programsekvens 1-6-2-7-5. Volumet av løsningsmidler og reagenser benyttet for vaskingen og utførelse av kjemiske reaksjoner, var omtrent 10  $\mu\text{l}$ /g resin.

#### 20 Spalting av peptidene fra resinet

Etter at alle aminosyrene var koblet, ble peptidresinet tørket over natten i vakuum. Resinet ble så behandlet med dobbeltdestillert, flytende hydrogenfluorid (10  $\mu\text{l}$ /g resin) som inneholdt 10-25 % destillert anisol eller p-kresol i 1 time ved 0 °C. Så ble HF avdampet under redusert trykk, og residuet ble tørket over natten i vakuum ved hjelp av en oljepumpe. Blandingen ble så ekstrahert flere ganger med  $\text{Et}_2\text{O}$  (25  $\mu\text{l}$ /g resin), så med vann. HOAc, 30 %, 50 %, 10 % og én gang med 25  $\mu\text{l}$  destillert, deionisert vann. Den kombinerte vandige løsning ble lyofilisert til å gi det urene peptid.

#### Rensing og karakterisering av peptidene

De fleste peptider ble rensset ved silikagelkromatografi (1 x 60 cm kolonne) ved å anvende løsningsmiddel-systemene  $\text{nBuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O} = 4:1:2$  eller  $4:1:5$  øvre fase eller  $\text{nBuOAc}:\text{nBuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O} = 2:8:2:3$  etterfulgt av gelfiltrering på "Sephadex G-25" med 6 % HOAc som elueringsmiddel. I tilfellet med utilfredsstillende renhet etter denne prosedyre ble peptidene videre rensset ved semipreparativ HPLC ved å anvende

Waters væskechromatografi utstyrt med et 660 løsningsmiddel-  
programsystem. En 1,2 x 25 cm m-Bondapak C<sub>18</sub>-kolonne ble be-  
nyttet med løsningsmiddelsystem A = 0,1 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 5,0, og B  
= 20 % A + 80 % CH<sub>3</sub>CN. Forskjellige gradienter med økende  
5 mengde av B i 15-25 minutter ble benyttet for å effektuere  
opprensning.

En alternativ opprensningsprosedyre har vært gelfilt-  
rering på "Sephadex G-25" med 6 % HOAc, etterfulgt av kromato-  
grafi på "Sephadex LH 20" (2,5 x 100 cm) med løsningsmiddel-  
10 systemet H<sub>2</sub>O:nBuOH:HOAc:MeOH = 90:10:10:8. Hvis nødvendig ble  
den sistnevnte prosedyre gjentatt 1-2 ganger.

Renheten til peptidene ble bedømt ved tynnsjikts-  
kromatografi på Merck silikagelplater ved å anvende minst fire  
forskjellige løsningsmiddelsystemer. Flekkene ble utviklet med  
15 klorin/o-tolidinreagenset. Det ble også benyttet analytisk  
HPLC. Utstyret var det ovenfor beskrevne, bortsett fra at en  
analytisk m-Bondapak C<sub>18</sub>-kolonne (3,9 mm x 30 cm) ble benyttet.

Aminosyreanalyse ble utført på en Beckman, modell  
118 CL aminosyreanalysator. Prøver på omkring 0,5 µg ble  
20 hydrolysert i 6 N saltsyre i lukkede glassrør i 24 timer ved  
110 °C. Restene ble så avdampet og oppløst i citratbuffer, pH  
2,2, og applisert på analysatoren.

#### Bioassays av peptidene og diskusjon av resultatene

25 Den antioovulatoriske aktivitet, AOA, hos rotter ble  
bestemt som beskrevet av Humphries et al. (12). Hevelses-  
(urticaria)-test ble utført ved å injisere inn i huden 10 µg  
av peptidet i 100 µl saltvann i bedøvde rotter og måle den  
ideelt sirkulære hevelsesrespons og beregne arealet. *In vitro*-  
30 histaminfrigjøringstest ble utført som beskrevet av Karten et  
al. (4).

Resultatene fra disse bioassayene er presentert i  
tabell I og andre tabeller som hører til.

Av peptidene i tabell I hadde 12 en AOA på omkring  
35 90 % eller mer i en dose på 1 µg i foreliggende assay. Av de  
peptidene i tabell I som ble testet for histaminfrigjøring i  
rottemastcellemetoden, hadde 5 ED<sub>50</sub>-verdier på 300 eller mer  
sammenlignet med 0,17 for standardforbindelsen [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>,

D-4-F-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>]-LHRH. Fem tilleggsanaloger hadde ED<sub>50</sub>-verdier som varierte fra 93 til 288, dvs. de frigjorde ikke mer histamin enn klinisk brukte "superagonister".

Av de peptidene i tabell I som ble testet med rotte-  
5 mastcellemetoden, hadde 7 [nr. 4, 23, 24, 43 (antid), 44, 53, 55] både en AOA på omkring 90 % eller mer i 1 µg og en ED<sub>50</sub>-verdi på omkring ≥ 93 µg/ml. Dette inkluderte den sterke analog, nr. 53, som hadde 100 % AOA ved 0,5 µg og 40 % AOA ved 0,25 µg. ED<sub>50</sub>-verdien for denne analogen var 93 ± 28. Det ble  
10 således demonstrert at høy AOA med lav histaminfrigjøring kunne bli funnet i analogene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Strukturelle karakteristika felles for disse 7 peptidene er: 1) et D-Lys-residuum i posisjon 6 som var acylert av den svakt basiske nikotinsyre eller analoger som pikolin-  
15 og 6-metylnikotinsyre, 2) den korresponderende acylerte L-Lys-rest eller det naturlige Tyr i posisjon 5, 3) de acylerte derivatene ILys eller IOrn i posisjon 8, 4) Arg er fraværende fra sekvensen.

#### 20 Biologiske aktiviteter

For bestemmelsen av virkningens varighet ble antagonist gitt s.k. eller oralt til 25 dager gamle hunnrotter på en spesifikk tid før tilførsel av agonisten [D-Qal<sup>6</sup>]-LHRH. Serumnivåene til rotteluteiniserende hormon (LH) og rotte-  
25 follikkelstimulerende hormon (FSH) ble så målt 2 timer etter agonisttilførselen ved hjelp av RIA. Den orale tilførsel ble utført ved tvangsføring med føringsslanger.

#### AOA- og histaminfrigjøringsresultater

30 Tabell IV viser resultater fra AOA og histaminfrigjøring for analogene som inneholder acylerte aminocykloheksylalaninrester. For analogene med NicLys<sup>5</sup>, D-NACAla<sup>6</sup>, IV-1 og IV-2 [NACAla representerer 3-(4-nikotinylaminocykloheksyl)-alanin], analog 2 med cis-D-NACAla<sup>6</sup> er noe mer aktiv, 100 % vs.  
35 70 % AOA ved 1 µg. Analogene IV-7 og IV-8 med NicLys<sup>5</sup>, D-PzACAla<sup>6</sup> [pzACAla representerer 3-(4-pyrazinylkarbonylamino-cykloheksyl)alanin] viser den motsatte rekkefølge med hensyn til aktivitet. Trans-residuet har høyere AOA, 88 % vs. 25 % ved 1 µg.

Analogene IV-3 og IV-4 med PicLys<sup>5</sup>, trans- og cis-PACala<sup>6</sup> [PACala representerer 3-(4-pikolinylaminocykloheksyl)-alanin] er ekvipotente, hhv. 50 og 54 % AOA ved 0,5 µg, mens i tilfellet med PicLys<sup>5</sup>, trans- og cis-PzACala<sup>6</sup> er cis-forbindelsen mer enn to ganger så aktiv. Den første, analog IV-5, er omtrent så sterk som analogene IV-3 og IV-4 (44 % ved 0,5 µg) mens den sistnevnte, analog 6, har hhv. 100 %, 73 % og 29 % AOA ved 0,5, 0,25 og 0,125 µg. Høystyrkeanalogen IV-6 er unik i sammenligning med den lave aktivitet til den strukturelt like analog IV-8.

Analog IV-9 har cis-PzACala<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup> og, skjønt residuene 5 og 6 er reversert, beholdt den høye styrke til analog IV-6, hhv. 90 % og 67 % ved 0,5 og 0,25 µg.

Med hensyn til histaminfrigjøring har alle analoger som er testet *in vitro* lavere ED<sub>50</sub>-verdier enn utgangsforbindelsene. ED<sub>50</sub>-verdiene varierer fra omtrent 30 til omtrent 60 sammenlignet med >300 og 93 ± 11 for antid og analog V-10. Testene for hevelses(*urtica*)-respons viser en variasjon fra 99,5 til 129,6, som er lik med antid (132,7) og analog V-10 (123,0). Mangel på korrelasjon mellom de to testene kan primært reflektere metodevariasjon.

Til oppsummering: for analogene med NicLys<sup>5</sup>-inkorporering av aminocykloheksylalaninderivater i posisjon 6 resulterte det i vesentlig økning i *in vitro*-histaminfrigjøring og uforandret eller redusert AOA. For PicLys<sup>5</sup>-analoger med de samme substitusjoner var det en reduksjon av AOA-styrke i alle tilfeller bortsett fra ett, hvor en betraktelig økning ble observert. Kombinasjonen av PicLys<sup>5</sup> og cis-D-PzACala<sup>6</sup> besitter tydeligvis en viss gunstig struktur. Histaminfrigjøring for PicLys<sup>5</sup>-analoger ble øket med 50-100 %.

I tabell V er resultatene fra substitusjoner i posisjon 7 til analog V-10. Denne posisjon tillater en viss strukturell frihet, skjønt ingen av peptidene viser høyere AOA enn analog V-10. Analoger V-12, V-14 og V-16 som har Aile<sup>7</sup> (allo-*isoleucin*), Val<sup>7</sup> og Abu<sup>7</sup> (2-aminosmørsyre), er ekvipotente med analog V-10. Analog V-16 med den rette kjede Abu<sup>7</sup> er litt mer sterk enn analogene V-13 og V-15 med henholdsvis Nle<sup>7</sup> (*norleucin*) og NVal<sup>7</sup> (*norvalin*) som mer skulle ligne på naturlig

Leu<sup>7</sup>.

For forbindelse V-17 med den lille Ala<sup>7</sup> avtok AOA til 60 % ved 0,5 µg.

Den mest interessante egenskap ved tabell V er *in vitro*-histaminfrigjøringsresultatene. De tre analoger med lignende AOA-styrke som analog V-10 viser markert nedsatt histaminfrigjøring. ED<sub>50</sub>-verdiene for analogene V-12, V-14 og V-16 er hhv. >300, 213 ± 30 og 273 ± 27; det betyr en 2-3 gangers nedgang i histaminfrigjøring oppnådd ved små forandringer i sidekjedestrukturen. Også hevelsesresponsen er nedsatt for alle analoger sammenlignet med V-10.

Det var bemerket tidligere (1) at hvorvidt Ilys eller IO<sup>8</sup> er den beste substitusjon i posisjon 8, er sekvensavhengig. For videre å undersøke dette aspekt, ble IO<sup>8</sup>-analoger korresponderende til noen av de beste peptidene syntetisert og testet. Resultatene i tabell VI indikerer at Ilys<sup>8</sup> kan være bedre. For to av parene var analogene VI-10, VI-19 og VI-12, VI-21, Ilys<sup>8</sup> og IO<sup>8</sup> omtrent likeverdige. For de andre tre par var analogene med Ilys<sup>8</sup> mer aktive, men forskjellene var ikke store. Den største forskjellen var for paret med Val<sup>7</sup>, hvor Ilys<sup>8</sup>-analogen VI-14 viste 90 % AOA ved 0,5 µg vs. 57 % for IO<sup>8</sup>-analogen VI-20.

Analog VI-19 ble testet *in vitro* for histaminfrigjøring. ED<sub>50</sub>-verdien er 42 ± 3,1; dvs. histaminfrigjøringen er to ganger den til analogen med én mer CH<sub>2</sub>-enhet. Hevelsesresponsen forandret seg ikke spesielt, bortsett fra Aile<sup>7</sup> og IO<sup>8</sup>-analog 21 som hadde den lave verdi på 78,6 ± 4,5 sammenlignet med Ilys-analogen 12, som hadde 97,9 ± 2,9.

### 30 Varighet av virkning

Tabell VII viser varigheten av virkningen til antid og to analoger. Da antid ble injisert 44 timer før 50 ng av [D-Qal<sup>6</sup>]-LHRH [Qal representerer 3-(3-kinoly)alanin], en superagonist, i doser på 3, 10 og 30 µg, ble signifikante reduksjoner i serum-LH observert ved de to høyere doser. LH avtok fra 113 ± 11 til 46 ± 12 og 5 ± 0,7 ng/µl. Serum-FSH ble også nedsatt, mest signifikant fra omkring 300 til omkring 300 ng/µl ved 30 µg.

Analog VII-24 [Tyr<sup>5</sup>]-antid og analog IV-6 ble på lignende måte injisert 24 timer før agonisten. Analog VII-24 viste høy aktivitet og reduserte LH-nivået til  $19 \pm 4$ ,  $3 \pm 0,4$  og  $0,3 \pm 0,03$  ng/ $\mu$ l i doser på hhv. 3, 10 og 30  $\mu$ g. De korresponderende tall for analog IV-6 er  $42 \pm 7$ ,  $15 \pm 3$  og  $3,4 \pm 2$  ng/ $\mu$ l. Dette er interessant siden analog IV-6 er betraktelig mer sterk i den antioovulatoriske målemetoden, 73 % ved 0,25  $\mu$ g vs. 45 % ved 0,5  $\mu$ g. Muligens blir analog IV-6 degradert enzymatisk raskere enn analog VII-24. Den lange varighet av virkning til disse analoger s.k. kan også skyldes "depot"-effekter på injeksjonsstedet.

#### Oral aktivitet

Tabell VIII viser varigheten av virkningen til antid etter oral administrasjon. Førtiåtte timer etter tilførsel av 100 eller 300  $\mu$ g dosenivåer av antid var det signifikant reduserte nivåer av LH som var blitt frigjort ved 5 ng [D-Qal<sup>6</sup>]-LHRH s.k. Reduksjoner fra  $21 \pm 3$  til  $4 \pm 0,8$  og  $8 \pm 2$  ng/ $\mu$ l ble hhv. observert. Resultatene er omkring de samme i 24-timers eksperimentet ( $9 \pm 2$  og  $6 \pm 0,3$  ng/ $\mu$ l). Antid synes å besitte betraktelig motstand mot degraderende enzymer. Da antid ble gitt 2 timer før agonisten, ble en sterk nedgang i LH-nivåer observert. I en dose på 30  $\mu$ g ble en signifikant reduksjon av LH-nivået til  $6 \pm 1$  ng/ $\mu$ l observert. Ved 100 og 300  $\mu$ g var nivåene  $1 \pm 0,3$  og  $0,4 \pm 0,4$  ng/ $\mu$ l, dvs. meget lave nivåer. Da 10 ng av agonisten ble benyttet, var resultatene kvalitativt meget like.

Til sammenligning er de tre siste opplysningene i tabell VIII fra eksperimenter med [N-Ac-D-pClPhe<sup>1,2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH, VIII-25, en analog som er blitt rapportert å ha oral aktivitet (16). Disse resultater viser at antid er mer aktivt enn VIII-25, siden en dose på 30  $\mu$ g gitt 2 timer før agonisten reduserte LH-nivået fra  $44 \pm 4$  til  $22 \pm 4$  ng/ $\mu$ l ( $p < 0,01$ ). Verdien for analog VIII-25 er  $39 \pm 6$  (NS). Ved 100  $\mu$ g er de korresponderende tall  $7 \pm 3$  ( $p < 0,001$ ) og  $26 \pm 7$  ( $p < 0,05$ ). FSH-nivåene ble vanligvis senket da antid ble gitt ved  $\pm 2$  timer ved 100 eller 300  $\mu$ g dosenivåer.

Resultatene i tabell IX viser at det er ingen signifikant forskjell mellom tilførsel av antid i vann eller i

maisolje.

Antid er også blitt testet oralt i den antiovulatoriske målemetode (tabell X). AOA-verdiene ved 300, 600 og 1200 µg dosenivåer er hhv. 18, 73 og 100 %. Uttrykt som  
5 ovulerte rotter/totalrotter er tallene 9/11, 3/11 og 0/11. For analog VIII-25 er tallene 9/11, 4/11 og 0/11 blitt rapportert i dosenivåer på hhv. 500, 1000 og 2000 µg (16). Antid var omkring to ganger så aktivt som analog VIII-25.

Tabell XI viser en sammenligning mellom de orale  
10 aktiviteter til antid og en analog. Analogen var betraktelig mindre aktiv.

Etter 15 ng s.k. dose av [D-Qal<sup>6</sup>]-LHRH steg LH-nivået til  $91 \pm 4,6$  ng/µl. Med orale dosenivåer på 30, 100 og 300 µg antid ble reduserte nivåer av LH på hhv.  $75 \pm 3$ ,  $20 \pm 4$  og  $5 \pm$   
15  $1$  ng/µl observert. Analog 4 med PicLys<sup>5</sup> og D-PACAla<sup>6</sup> viste ingen signifikant reduksjon av LH ved 30 og 100 µg nivåer, men det var en reduksjon til  $51 \pm 6$  ng/µl ved en 300 µg dose.

Tabellene XI og XII viser også resultater med antid, f.eks. når 50 ng av agonisten ble benyttet. Sammenligning  
20 mellom disse resultater og data fra eksperimentene som benytter 15 ng agonist, viser en doseresponsrelasjon som er ventet ut fra kompetitiv antagonisme. Ved bruk av 15 ng av agonisten reduserte 100 og 300 µg antid LH-nivået fra hhv.  $115 \pm 15$  ng/µl til  $20 \pm 4$  og  $5 \pm 1$  ng/µl, mens i eksperimentene som benyt-  
25 tet 50 ng agonist, reduserte 300 og 900 µg antid LH til samme nivå ( $19 \pm 3$  og  $5,3 \pm 1,2$  ng/µl).

Tabell XIII viser de biologiske effekter av antid i et dispergert hypofysecellekultursystem.

Strukturene og de biologiske aktiviteter til visse  
30 foretrukne LHRH-analoger som hemmer mer enn 50 % av den ovulatoriske aktivitet til en dose på 0,25 µg, er vist i tabell XIV.

Fysiologiske bruksområder for antagonistene ifølge foreliggende oppfinnelse, slik som antid, ville være å hemme  
35 fertilitet hos både kvinner og menn.

Referansene i den følgende liste er det her henvist til ved hjelp av referansenummer.



Referanser

1. Ljungqvist, A., Feng, D.-M., Tang, P.-F.L., Kubota, M., Okamoto, T., Zhang, Y., Bowers, C.Y., Hook, W.A. & Folkers, K. (1987), Biochem. Biophys. Res. Commun., 148 (2),  
5 849-586.
2. Karten, M.D. & Rivier, J.E. (1986), Endocr. Rev., 7, 44-56.
3. Hook, W.A., Karten, M. & Siraganian, R.P. (1985), Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exptl. Biol., 44, 1323.
- 10 4. Karten, M.D., Hook, W.A., Siraganian, R.P., Coy, D.H., Folkers, K., Rivier, J.E. & Roeske, R.W. (1987) i LHRH and its Analogs; Contraceptive and Therapeutic Applications, Part 2, utg. Vickery, B.H. & Nestor, J.J. Jr. (MTP Press Ltd., Lancaster, England), s. 179-190.
- 15 5. Rivier, J.E., Porter, J., Rivier, C.L., Perrin, M., Corrigan, A., Hook, W.A., Siraganian, R.P. & Vale, W.W. (1986), J. Med. Chem., 29, 1846-1851.
6. Roeske, R.W., Chaturvedi, N.C., Hrinyyo-Pavlina, T. & Kowalzzuk, M. (1987) i LHRH and its Analogs; Contraceptive and Therapeutic Applications, Part 2, utg. Vickery, B.H. & Nestor, J.J. Jr. (MTP Press Ltd., Lancaster, England),  
20 s. 17-24.
7. Hocart, S.J., Nekola, M.W. & Coy, D.H. (1987), J. Med. Chem., 30, 739-743.
- 25 8. Nestor, J.J., Tahilramani, R., Ho, T.L., McRae, G.I. & Vickery, B.H. (1989), J. Med. Chem., 31, 65-72.
9. Bajusz, S. Kovacs, M., Gazdag, M., Bokser, L., Karashima, T., Csernus, V.J., Janaky, T., Guoth, J. & Schally, A.V. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1637-  
30 1641.
10. Rivier, J., Kupryszewski, G., Varga, J., Porter, J., Rivier, C., Perrin, M., Hagler, A., Struthers, S., Corrigan, A. & Vale, W. (1988), J. Med. Chem., 31, 677-682.
11. Folkers, K., Bowers, C.Y., Shieh, H.-M., Liu, Y.-Z., Xiao, S.-B., Tang, P.-F.L. & Chu, J.-Y. (1984), Biochem. Biophys. Res. Commun., 123 (3), 120-123.
- 35 12. Humphries, J. Wan, Y.-P., Folkers, K. & Bowers, C.Y. (1978), J. Med. Chem., 21 (1), 120-123.
13. Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M.,

Igarashi, M., Kanagawa, K. & Matsuo, H. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3874-3878.

14. Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J. & Vale, W. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
5 80, 2794-2798.

15. Sherwood, N.M., Sower, S.A., Marshak, D.R., Fraser, B.A. & Brownstein, M.J. (1986), J. Biol. Chem., 261, 4812-4819.

16. Nekola, M.V., Horvath, A., Ge, L.-J., Coy, D.H.  
10 & Schally, A.V. (1982), Science, 218, 160-161.

17. Bernardi et al., J. Pharm. Pharmacol., 19, 95 (1967).

18. Fife, T.H. og Przystas, T.J., J. Am. Chem. Soc., 107, 1041 (1985).

19. Lecher et al., US 2.872.484, 3. februar 1959,  
15 Chem. Abstr., 53, 11238c.

20. Tjoeng et al., Chem. Ber., 108, 862 (1975).

21. Humphries et al., J. Med. Chem., 21 (1), 120 (1978).

22. Benoiton, L., Can. J. Chem., 42, 2043 (1969).

23. Prasad et al., J. Med. Chem., 19, 492 (1976).

24. Zinner, H. og Fiedler, H., Arch. Pharm., 291 (63), 330 (1958).

25

30

35

Tabell I. Antagonister av LHRH basert på

[( )<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, ( )<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, ( )<sup>5</sup>, ( )<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup>, ( )<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-NH<sub>2</sub>

Nr.	IBR #	Forbindelse								ED <sub>50</sub> µg/ml	
		( ) <sup>3</sup>	( ) <sup>5</sup>	( ) <sup>6</sup>	( ) <sup>8</sup>	AOA %/µg	2,0	Hevelsesområde	m <sup>2</sup> /10 µg		
<u>Analoger med D-NicLys i posisjon 6</u>											
1.	24315	N-Ac-D-2-Nal	D-3-Pal	Tyr	D-NicLys	ILys	45	89	100	79,0±9,2	133±22
2.	24756	"	"	"	"	IOrn	22	71	--	92,2±2,9	>300
3.	25509	"	"	DMGLys	"	ILys	20	--	--	110±3	34±1,1
4.	25510	"	"	PicLys	"	"	64	100	--	116±3,3	39±1,0
5.	25337	N-Ac-D-pClPhe	"	Tyr	"	"	--	100	--	139,9±7,2	198±33*
6.	25338	N-Ac-D-Cl <sub>2</sub> Phe	"	"	"	"	0	89	--	103,9±5,3	311±65*

26

Analoger med NicLys i posisjon 5

7.	25332	N-Ac-D-2-Nal	D-3-Pal	NicLys	D-BzLys	ILys	--	50	--	119,6±6,7	>300
8.	25589	"	"	"	D-PicLys	"	36	--	--	120±7	60±1,4
9.	25647	"	"	"	trans-D-NACAla	"	--	70	--	119,5±3,2	
10.	25648	"	"	"	cis-D-NACAla	"	--	100	--	113,6±10,9	37±1,1
11.	25649	"	"	"	D-PzclLys	"	78	92	--	122,2±5,1	

Analoger med NicLys og D-NicLys i posisjoner 5 og 6

12.	25542	N-Ac-D-2-Nal	D-3-Pal	NicLys	D-NicLys	ILys	36	100	100	132,7±0	300
13.	24933	"	"	"	"	IOrn	88	100	--	136,0±3,4	206±64

301015

Forskjellige analoger

Nr. IBR #	AOA %/µg								Forbindelse			
	( ) <sup>1</sup>	( ) <sup>3</sup>	( ) <sup>5</sup>	( ) <sup>6</sup>	( ) <sup>8</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	10,0	Hevelses- område mm <sup>2</sup> /10	ED <sub>50</sub> µg/ml
14. 25146	N-Ac-D-											
	2-Nal,	D-3-Pal,	INicLys,	D-INicLys,	ILys	--	63	91	--	--	140,3±13,9	15±8,2
15. 25147	"	"	PicLys	D-PicLys	"	40	100	90	--	--	123,0±0	93±28
16. 25386	"	"	MNicLys	D-MNicLys	"	--	56	100	--	--	126,1±6,7	>300*
17. 25508	"	"	DMGLys	D-BzLys	"	--	--	100	--	--	136,6,7	24±0,3
18. 25650	"	"	PzCLys	D-PzCLys	"	--	17	--	--	--	110,2±8,1	288±30

\*I denne testserien hadde standardforbindelsen en ED<sub>50</sub>-verdi på 0,46 i stedet for den vanlige 0,1-0,2.

Tabell II. Analoger med PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>

IBR#	Sekvens										
19.	26100	N-Ac-D-Cl <sub>2</sub> Phe,	D-pClPhe,	D-3-Pal,	Ser,	PicLys,	D-Pic-Lys,	Leu,	Ilys,	Pro,	D-Ala-NH <sub>2</sub>
20.	25934	N-Ac-D-2-Nal	"	"	"	"	"	Val	"	"	"
21.	26118	"	"	"	"	"	"	"	IOrn	"	"
22.	25936	"	"	"	"	"	"	Aile	Ilys	"	"
23.	26178	"	"	"	"	"	"	"	IOrn	"	"
24.	25990	"	"	"	"	"	"	Abu	Ilys	"	"
25.	26179	"	"	"	"	"	"	"	IOrn	"	"
26.	25988	"	"	"	"	"	"	Nle	Ilys	"	"
27.	25989	"	"	"	"	"	"	NVal	"	"	"
28.	26099	"	"	"	"	"	"	Ala	"	"	"
29.	25933	"	"	"	"	"	"	Leu	IOrn	"	"

28

Analoger med PicLys<sup>5</sup>

30.	25897	N-Ac-D-2-Nal	D-pClPhe	D-3-Pal	Ser	PicLys	c-DPzACAla	Leu	Ilys	Pro	D-Ala-NH <sub>2</sub>
31.	26181	"	"	"	"	"	"	"	IOrn	"	"
32.	26325	"	"	"	"	"	"	Val	Ilys	"	"

Analoger med D-PicLys<sup>6</sup>

33.	26180	N-Ac-D-2-Nal	D-pClPhe	D-3-Pal	Ser	c-PzACAla	D-PicLys	Leu	Ilys	Pro	D-Ala-NH <sub>2</sub>
34.	26363	"	"	"	"	Tyr	"	"	IOrn	"	"

Analoger med NicLys<sup>5</sup>

35.	25805	N-Ac-D-2-Nal	D-pClPhe	D-3-Pal	Ser	NicLys	t-D-PzACAla	Leu	Ilys	Pro	D-Ala-NH <sub>2</sub>
36.	25806	"	"	"	"	"	c-D-PzACAla	"	"	"	"
37.	25991	"	"	"	"	"	D-PzclLys	"	IOrn	"	"

301015

Forskjellige substitusjoner i posisjoner 5 og 6

38. 25808	N-Ac-D-2-Nal	D-pClPhe	D-3-Pal	Ser MPicLys	D-M-PicLys	Leu	ILys	Pro	D-Ala-NH <sub>2</sub>
39. 26326	"	"	"	"	C-PzACAla	"	"	"	"
40. 26418	"	"	"	"	Tyr	"	"	"	"

Analoger som blir syntetisert for nærværende

41.	N-Ac-D-2-Nal	D-pClPhe	D-3-Pal	Ser C-PzACAla	D-PicLys	Val	ILys	Pro	D-Ala-NH <sub>2</sub>
-----	--------------	----------	---------	---------------	----------	-----	------	-----	-----------------------

Tabell III. Biologiske data  
 Analoger med PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>

Nr.	IBR #	AOA/ $\mu$ g		1,0	Hevelsesområde mm <sup>2</sup> /10 $\mu$ g	In vitro-histaminfrigjøring ED <sub>50</sub> $\mu$ g/ml $\pm$ SEM
		0,25	0,5			
19.	26100	-	38	-	116,2 $\pm$ 3,7	
20.	25934	43	90	100	97,9 $\pm$ 2,9	213 $\pm$ 30
21.	26118	-	57	-	119,6 $\pm$ 6,6	
22.	25936	43	89	-	97,9 $\pm$ 2,9	>300
23.	26178	-	82	-	78,6 $\pm$ 4,5	
24.	25590	36	100	-	91,0 $\pm$ 5,4	273 $\pm$ 27
25.	26179	-	80	-	101,5 $\pm$ 9,3	
26.	25988	20	77	-	107,0 $\pm$ 6,0	
27.	25989	10	100	-	95,3 $\pm$ 6,0	
28.	26099	-	60	-	103,9 $\pm$ 3,7	
29.	25933	50	90	100	113,0 $\pm$ 0	
<u>Analoger med PicLys<sup>5</sup></u>						
30.	25897	73	100	-	122,8 $\pm$ 5,7	28 $\pm$ 7,5
31.	26181	50	100	-	101,6 $\pm$ 2,2	
32.	26325	73	100	-	127,8 $\pm$ 4,9	
<u>Analoger med D-PicLys<sup>6</sup></u>						
33.	26180	67	90	-	99,5 $\pm$ 4,5	
34.	26363	0	-	-	113,2 $\pm$ 5,5	

			<u>Analoger med NicLys<sup>5</sup></u>	
35.	25805	-	67	129,6±8,8
36.	25806	-	-	101,7±5,0
37.	25991	-	44	104,3±10,5
<u>Analoger med forskjellige substitusjoner i posisjoner 5 og 6</u>				
38.	25808	-	67	106,2±4,3
39.	26326	57	100	115,5±2,4
40.	26418	22	-	95,0±0



Tabell IV

Biologiske data for [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, X<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup>, Ilys<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-IHRH-analoger

Nr.	X	Y	AOA %/µg			1,0	In vitro histaminfrigjøring ED <sub>50</sub> µg/ml ± SEM	Hevelsesområde mm <sup>2</sup> /10 µg
			0,125	0,25	0,5			
IV-1.	NicLys	trans-D-NACAla	-	-	-	70	119, 5±3, 2	
IV-2.	"	cis-D-NACAla	-	-	50	100	101, 8±4, 3	
IV-3.	PicLys	trans-D-PACAla	-	-	50	-	101, 0±3, 0	
IV-4.	"	cis-D-PACAla	-	-	54	-	123, 0±5, 0	
IV-5.	"	trans-D-PzACAla	-	-	44	-	106, 3±4, 3	
IV-6.	"	cis-D-PzACAla	29	73	100	-	122, 8±5, 7	
IV-7.	NicLys	trans-D-PzACAla	-	-	67	88	129, 6±8, 8	
IV-8.	"	cis-D-PzACAla	-	-	-	25	101, 7±5, 0	
IV-9.	cis-PzACAla	D-PicLys	-	67	90	-	99, 5±4, 5	

Tabell V

Biologiske data for [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PicLys<sup>5</sup>, D-PicLys<sup>6</sup>, X<sup>7</sup>, ILys<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH-analoger

Nr.	X	AOA %/µg	1,0	In vitro histaminfrigjøring ED <sub>50</sub> µg/ml ± SEM	Hevelsesområde mm <sup>2</sup> /10 µg
V-10.*	Leu	40	100	93±11	123±0
V-12.	Aile	43	89	>300	97,9±2,9
V-13.	Nle	20	77		107,0±6,0
V-14.	Val	43	90	213±30	97,9±2,9
V-15.	NVal	10	100		95,3±6,0
V-16.	Abu	36	100	273±27	91,0±5,4
V-17.	Ala	-	60		103,9±3,7

33

\*Fra referanse 1

301015

Tabell VI

Biologiske data for [N-Ac-D-2-Nal<sup>1</sup>, D-pClPhe<sup>2</sup>, D-3-Pal<sup>3</sup>, PicLys<sup>5</sup>, X<sup>6</sup>, Y<sup>7</sup>, Z<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH-analoger

Nr.	X	Y	Z	0,25	AOA %/µg	1,0	In vitro histaminfrigjøring ED <sub>50</sub> µg/ml ± SEM	Hevelsesområde mm <sup>2</sup> /10 µg
VI-10.*	D-PicLys	Leu	ILys	40	100	90	93±11	123±0
VI-19.	"	"	IOm	50	90	100	42±3,1	113,0±0
VI-14.	"	Val	ILys	43	90	100	213±30	97,9±2,9
VI-20.	"	"	IOm	-	57	-	-	119,6±6,6
VI-12.	"	Aile	ILys	43	89	-	>300	97,9±2,9
VI-21.	"	"	IOm	-	82	-	-	78,6±4,5
VI-16.	"	Abu	ILys	36	100	-	273±27	91,0±5,4
VI-22.	"	"	IOm	-	80	-	-	101,5±9,3
VI-6.	cis-D-PzACAla	Leu	ILys	73	100	-	28±7,5	122,8±5,7
VI-23.	"	"	IOm	50	100	-	-	101,6±2,2

\*Fra referanse 1

Tabell VII

Varigheten av virkningen til antidi og to analoger tilført subkutant\*

Analog	Injek- sjonstid	Dose µg	0 tid ng sc [D-3- <sup>6</sup> Gal <sup>6</sup> ]-LHRH	+2 timer			p-verdi
				LH ng/ml ± SEM	p-verdi	FSH ng/ml ± SEM	
-	-	-	-	0,4±0,03	<0,001	143±10	<0,001
-	-	-	50	113±11	-	2899±387	-
Antidi	-44 timer	3	50	90±5	NS	2497±155	NS
"	"	10	50	46±12	<0,001	1413±230	<0,01
"	"	30	50	5±0,7	<0,001	311±34	<0,001
VII-24 <sup>+</sup>	-24 timer	3	50	19±4	<0,001	719±123	<0,001
"	"	10	50	3±0,4	<0,001	289±30	<0,001
"	"	30	50	0,3±0,03	<0,001	147±10	<0,001
IV-6 (25897)	"	1	50	91±19	NS	2020±295	NS
"	"	3	50	42±7	<0,001	1298±275	<0,01
"	"	10	50	15±3	<0,001	624±84	<0,001
"	"	30	50	3,4±2	<0,001	273±89	<0,001

\*Gjennomsnitt av ± SEM  
+[Tyr<sup>5</sup>]-antidi

35

Tabell VIII

Varigheten av virkningen til oralt tilført antidi og sammenligning med  
 [N-Ac-D-pCIPhe<sup>1,2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]-LHRH (25).\*

Antagonist	Tid for tilførsel <sup>++</sup> timer	Dose µg	0 tid Agonist <sup>+</sup> dose (sc) ng	+2 timer			p-verdi
				Serum LH ng/ml ± SEM	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi	
	-	-	-	3±1	298±20	<0,001	<0,001
	-	-	5	21±3	796±102	-	-
Antidi	-48	100	5	4±0,8	481±27	<0,001	<0,02
"	-48	300	5	8±2	600±72	<0,01	NS
"	-24	100	5	9±2	596±50	<0,01	NS
"	-24	300	5	6±0,3	462±54	<0,001	<0,02
"	-2	10	5	19±4	588±70	NS	NS
"	-2	30	5	6±1	573±67	<0,001	NS
"	-2	100	5	1±0,3	320±48	<0,001	<0,01
"	-2	300	5	0,4±0,4	327±63	<0,001	<0,01
-	-	-	-	3±1	298±20	<0,001	<0,001
-	-	-	10	44±4	1488±168	-	-
Antidi	-48	100	10	18±2	792±110	<0,001	<0,01
"	-48	300	10	25±3	1021±202	<0,01	NS
"	-24	100	10	24±6	1008±285	<0,02	NS
"	-24	100	10	25±3	1119±71	<0,01	NS

Antagonist	Tid for tilførsel <sup>++</sup> timer	Dose µg	0 tid Agonist <sup>†</sup> dose (sc) ng	Serum LH ng/ml ± SEM	p-verdi	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi
Antid	-2	10	10	51±8	NS	1729±243	NS
"	-2	30	10	22±4	<0,01	1051±141	NS
"	-2	100	10	7±3	<0,001	548±83	<0,001
"	-2	300	10	0,5±0,06	<0,001	251±24	<0,001
VIII-25	-2	10	10	59±11	NS	1794±329	NS
"	-2	30	10	39±6	NS	1470±190	NS
"	-2	100	10	26±7	<0,05	1161±277	NS

\* Vennlig gitt av dr. David Coy

+ [D-Øal<sup>6</sup>]-LHRH

++ Tilført i vann

Tabell IX

Oral aktivitet til antid. Avhengighet av bærer.

Bærer	-2 timer Antagonist dose µg oralt	0 tid Agonist dose ng sc	+2 timer			p-verdi
			LH ng/ml ± SEM	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi	
Vann	-	-	1,1±0,1	243±35	<0,001	<0,001
"	-	50	148±9	3041±238	-	-
"	100	50	44±5	1372±84	<0,001	<0,001
"	300	50	20±4	936±150	<0,001	<0,001
"	900*	50	6,3±3	374±80	<0,001	<0,001
Maisolje	-	-	0,8±0,6	138±6	<0,001	<0,001
"	-	50	115±8	2935±133	-	-
"	100	50	72±12	2148±234	<0,01	<0,02
"	300	50	20±4	792±137	<0,001	<0,001
"	900	50	7±2	599±59	<0,001	<0,001

38

Strategi: -2 timer - antagonist. 0 tid - [D-3-Qal<sup>6</sup>]-LHRH. +2 timer - avliving.

26 dager gamle humrotter. Gjennomsnitt av 6 ± SEM.

\*Fortynnet 1:1 med 10 mM HOAC:vann (svakt skyet) 0,1 ml oralt, andre konsentrasjoner fortynnet med vann.

301015

Tabell X

Oral aktivitet til antidi i den antiovarulatoriske målemetode.\*

Oral dose µg	AOA % hemning (# ovulerte/# rotter)
--	0 (6/6)
300	18 (9/11)
600	73 (3/11)
1200	100 (0/11)

\* i 10 mM eddiksyre:vann (1:1)



Tabell XI

Oral aktivitet til antidi og noen analoger

Antagonist	-2 timer dose µg oral timer	0 tid Agonist dose ng sc	LH ng/ml ± SEM	p-verdi	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi
	-	-	3,4±2,2	<0,001	271±56	<0,001
	-	15	91±4,6	-	2491±146	-
Antidi	30	15	75±3	<0,02	1718±223	<0,02
"	100	15	20±4	<0,001	738±89	<0,001
"	300	15	5±1	<0,001	472±26	<0,001
4	30	15	79±9	NS	1831±249	<0,05
"	100	15	76±6	NS	2175±211	NS
"	300	15	51±6	<0,001	1404±117	<0,001

Antagonist	-2 timer dose µg oral timer	0 tid Agonist dose ng sc	LH ng/ml ± SEM	p-verdi	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi
	-	50	115±15	-	2372±126	-
Antid	30	50	93±7	NS	2262±55	NS
"	100	50	49±7	<0,001	1345±199	<0,001
"	300	50	19±3	<0,001	630±40	<0,001
"	900	50	5,3±1,2	<0,001	450±48	<0,001

Strategi: -2 timer - antagonist

0 tid - [D-3-Qal<sup>6</sup>]-LHRH

+2 timer - avliving.

26 dager gamle hunnrotter. Gjennomsnitt av 6 ± SEM.

Bærer - 10 mM HOAC:vann (1:1) 0,1 ml.

Tabell XII

Oral aktivitet til antid med varierende tidstabeller og doser til en LH-RH-superagonist  
 [NacD2Nal<sup>1</sup>, DpClPhe<sup>2</sup>, D3Pal<sup>3</sup>, NicLys<sup>5</sup>, DnicLys<sup>6</sup>, Ilys<sup>8</sup>, DALa<sup>10</sup>]-LHRH

Antagonist	Dose	Agonist*	LH	p-verdi	FSH	p-verdi
Tid for til- førsel (oral)	µg	Dose (sc)	ng/ml	+2 timer	ng/ml	
timer		0 tid	± SEM		± SEM	
--	--	--	3±1	<0,001	298±20	<0,001
--	--	5 ng	21±3	--	796±120	--
-48	100	5 ng	4±0,8	<0,001	481±27	<0,02
-48	300	5 ng	8±2	<0,01	600±72	NS
-24	100	5 ng	9±2	<0,01	596±50	NS
-24	300	5 ng	6±0,3	<0,001	462±54	<0,02
-2	10	5 ng	19±4	NS	588±70	NS
-2	30	5 ng	6±1	<0,001	573±67	NS
-2	100	5 ng	1±0,3	<0,001	320±48	<0,01
-2	300	5 ng	0,4±0,4	<0,001	327±63	<0,01
--	--	--	3±1	<0,001	298±20	<0,001
--	--	10 ng	44±4	--	1488±168	--
-48	100	10 ng	18±2	<0,001	792±110	<0,01
-48	300	10 ng	25±3	<0,01	1021±202	NS

Antagonist	Tid for til- førsel (oral)	Dose µg	Agonist* Dose (sc)	IH ng/ml ± SEM	p-verdi +2 timer	FSH ng/ml ± SEM	p-verdi
	-24	100	10 ng	24±6	<0,02	1008±285	NS
	-24	300	10 ng	25±3	<0,01	1119±71	NS
	-2	10	10 ng	51±8	NS	1729±243	NS
	-2	30	10 ng	22±4	<0,01	1051±141	NS
	-2	100	10 ng	7±3	<0,001	548±83	<0,001
	-2	300	10 ng	0,5±0,06	<0,001	251±24	<0,001
	-2	10**	10 ng	59±11	NS	1794±329	NS
	-2	30	10 ng	39±6	NS	1470±190	NS
	-2	100	10 ng	26±7	<0,05	1161±277	NS

\* 24270 [D3Qa1<sup>6</sup>]-LHRH

\*\* AH-195-3 NAcDpClPhe<sup>1,2</sup>, DTrp<sup>3</sup>, DALa<sup>10</sup>-LHRH (dr. David Coy)

Gjennomsnitt av 6 ± SEM.

Tabell XIII

Effekt av antidi i den disperse hypofysecellekultur-målemetode

Peptid	Dose nM	LHRH nM	RLH ng/mL ± SEM	p-verdi	IDR50	FSH ng/mL ± SEM	p-verdi	IDR50
Kontroll	--	--	10±0,4	--	--	196±23	--	--
LHRH	--	0,1	40±7	<0,05		221±18	NS	
	--	0,3	80±1	<0,001		562±48	≈0,02	
	--	1,0	118±	NA		802±	NA	
	--	3,0	150±1	<0,001	--	646±123	NS	--
	--	10,0	141±4	<0,001		602±26	<0,01	
	--	30,0	152±7	<0,01		557±15	<0,01	
139-95-20	0,01	3,0	118±11	NS*	0,26:1	546±93	NS*	0,52:1
	0,03	3,0	117±10	NS		499±26	NS	
	0,1	3,0	116±7	<0,05		472±59	NS	
	0,3	3,0	107±11	NS		617±73	NS	
	1,0	3,0	80±2	<0,001		481±17	NS	
	3,0	3,0	34±2	<0,001		233±38	NS	
	10,0	3,0	11±1	<0,001		165±21	NS	

\*p-verdi vs. 3 nM av LHRH

139-95-20 [NacD2NaI<sup>1</sup>, DpClPhe<sup>2</sup>, D3Pal<sup>3</sup>, NiCl<sup>4</sup>ys<sup>5</sup>, DNiCl<sup>5</sup>ys<sup>6</sup>, Ilys<sup>8</sup>, DA<sup>10</sup>]-LHRH

Tabell XIV

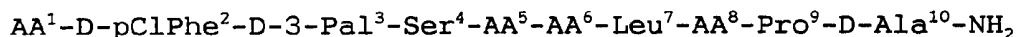
LHRH-analoger med 50 % eller mer AOA ved 0,25 µg

IBR#	Sekvens	AOA/0,25	hevelsesområde	ED <sub>50</sub>
25897	N-Ac-D-2-Nal, DpClPhe, D-3-Pal, Ser, PicLys, C-D-PzACAla, Leu, Ilys, Pro, D-Ala-NH <sub>2</sub>	73	122,8±5,7	28±7,5
26325	" " " " " Val	73	127,8±4,9	
26180	" " " C-PzACAla, D-PicLys Leu	67	99,5±4,5	
26326	" " " C-D-PzACAla	57	115,5±2,4	
26181	" " " PicLys	50	101,6±2,2	
*25933	" " " D-PicLys	50	113,0±0	

P a t e n t k r a v

1. Dekapeptid med antioovulatorisk aktivitet,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har den generelle  
formel

5



hvor

AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal, N-Ac-D-pClPhe eller N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe,

10

AA<sup>5</sup> er Tyr, NicLys, PicLys, MNicLys, MPicLys, INicLys,  
DMGLys eller PzCLys, eller c-PzACAla,

AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-PicLys, D-MNicLys, D-MPicLys, D-  
INicLys, D-BzLys eller D-PzCLys, eller D-PzACAla, D-  
NACAla eller D-PACAla, og

15

AA<sup>8</sup> er ILys eller IOrn.

2. Dekapeptid ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal.

20

3. Dekapeptid ifølge krav 1 eller 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er Tyr.

25

4. Dekapeptid ifølge krav 3,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-  
PicLys, D-MNicLys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys eller D-  
PzCLys.

5. Dekapeptid ifølge krav 4,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>6</sup> er D-NicLys.

30

6. Dekapeptid ifølge krav 1 eller 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, PicLys,  
MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzCLys, og AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys, D-PicLys, D-MNicLys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys  
eller D-PzCLys.

35

7. Dekapeptid ifølge krav 1 eller 2  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, PicLys,  
MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzCLys, og AA<sup>6</sup> er D-

PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla.

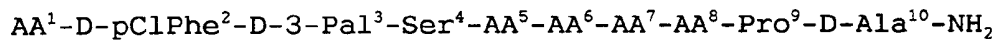
8. Dekapeptid ifølge krav 7,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys eller  
5 PicLys og AA<sup>6</sup> er D-PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla.
9. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er DMGLys, AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 10 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 11 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er INicLys, AA<sup>6</sup> er  
D-INicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 12 Dekapeptid ifølge krav 2,  
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
BzLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 13 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
25 PicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 14 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PzcLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 15 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PzcLys og AA<sup>8</sup> er IOrn.
- 16 Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PzACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.



17. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
NACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 5 18. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er c-  
D-PzACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.
19. Dekapeptid ifølge krav 2,  
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er c-  
D-PzACAla og AA<sup>8</sup> er IOrn.
20. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
15 PACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.
21. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er t-  
D-PzACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.  
20
22. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er c-PzACAla, AA<sup>6</sup> er  
D-PicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 25 23. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er c-PzACAla, AA<sup>6</sup> er  
c-D-PzACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.
24. Dekapeptid ifølge krav 2,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er MPicLys, AA<sup>6</sup> er  
D-MPicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
25. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er DMGLys, AA<sup>6</sup> er D-  
35 BzLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
26. Dekapeptid ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er Tyr, AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.

27. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er Tyr, AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys og AA<sup>8</sup> er IOrn.
- 5 28. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er Tyr, AA<sup>6</sup> er c-D-  
PzACAla og AA<sup>8</sup> er ILys.
29. Dekapeptid ifølge krav 2,  
10 karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
30. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er NicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
15 NicLys og AA<sup>8</sup> er IOrn.
31. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 20 32. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys og AA<sup>8</sup> er IOrn.
- 25 33. Dekapeptid ifølge krav 2,  
karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er MNicLys, AA<sup>6</sup> er  
D-MNicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
34. Dekapeptid ifølge krav 2,  
30 karakteriseret ved at AA<sup>5</sup> er PzCLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PzCLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
35. Dekapeptid ifølge krav 1,  
karakteriseret ved at AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-pClPhe,  
35 AA<sup>5</sup> er Tyr, AA<sup>6</sup> er D-NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.
36. Dekapeptid ifølge krav 1,  
karakteriseret ved at AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe,  
AA<sup>5</sup> er Tyr, AA<sup>6</sup> er D-NicLys og AA<sup>8</sup> er ILys.

37. Dekapeptid med antioovulatorisk aktivitet,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har formelen



5

hvor

AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal, N-Ac-D-pClPhe eller N-Ac-D-Cl<sub>2</sub>Phe,

AA<sup>5</sup> er Tyr, NicLys, PicLys, MNicLys, MPicLys, INicLys,  
DMGLys eller PzCLys, eller c-PzACAla,

10 AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-PicLys, D-MNicolys, D-MPicLys, D-  
INicLys, D-BzLys eller D-PzCLys, eller D-PzACAla, D-  
NACAla eller D-PACAla,

AA<sup>7</sup> er Aile, Nle, Val, NVal, Abu eller Ala, og

AA<sup>8</sup> er ILys eller IOrn.

15

38. Dekapeptid ifølge krav 37,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>1</sup> er N-Ac-D-2-Nal.

39. Dekapeptid ifølge krav 37 eller 38,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er Tyr.

40. Dekapeptid ifølge krav 39,

k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>6</sup> er D-NicLys, D-  
PicLys, D-MNicolys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys eller D-

25 PzCLys.

41. Dekapeptid ifølge krav 40,

k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>6</sup> er D-NicLys.

30 42. Dekapeptid ifølge krav 37 eller 38,

k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, PicLys,  
MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzCLys, og AA<sup>6</sup> er D-  
NicLys, D-PicLys, D-MNicolys, D-MPicLys, D-INicLys, D-BzLys  
eller D-PzCLys.

35

43. Dekapeptid ifølge krav 37 eller 38,

k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys, PicLys,  
MNicLys, MPicLys, INicLys, DMGLys eller PzCLys, og AA<sup>6</sup> er D-  
PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla.

44. Dekapeptid ifølge krav 43,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er NicLys eller  
PicLys og AA<sup>6</sup> er D-PzACAla, D-NACAla eller D-PACAla.
- 5 45. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Val og AA<sup>8</sup> er ILys.
46. Dekapeptid ifølge krav 38,  
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Val og AA<sup>8</sup> er IOrn.
47. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
15 PicLys, AA<sup>7</sup> er Aile og AA<sup>8</sup> er ILys.
48. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Aile og AA<sup>8</sup> er IOrn.  
20
49. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Abu og AA<sup>8</sup> er ILys.
- 25 50. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Abu og AA<sup>8</sup> er IOrn.
51. Dekapeptid ifølge krav 38,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Nle og AA<sup>8</sup> er ILys.
52. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
35 PicLys, AA<sup>7</sup> er NVal og AA<sup>8</sup> er ILys.
53. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er D-  
PicLys, AA<sup>7</sup> er Ala og AA<sup>8</sup> er ILys.

54. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er PicLys, AA<sup>6</sup> er c-  
D-PzACAla, AA<sup>7</sup> er Val og AA<sup>8</sup> er ILys.

5 55. Dekapeptid ifølge krav 38,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at AA<sup>5</sup> er c-PzACAla, AA<sup>6</sup> er  
D-PicLys, AA<sup>7</sup> er Val og AA<sup>8</sup> er ILys.

10

15

20

25

30

35