

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045183**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.31**

(51) Int. Cl. **C07K 7/23 (2006.01)**  
**A61K 38/02 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201991738**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.01.19**

(54) **СОЕДИНЕНИЯ (ИММУНОРЕЛИНЫ), СТИМУЛИРУЮЩИЕ GnRH-РЕЦЕПТОРЫ**

(31) **17152456.4**

(56) US-B1-7834141  
US-A1-2004152639  
US-A1-2012045393  
WO-A2-2007144554

(32) **2017.01.20**

(33) **EP**

(43) **2020.02.11**

(86) **PCT/EP2018/051345**

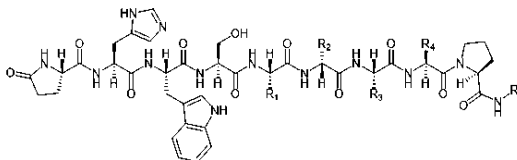
(87) **WO 2018/134370 2018.07.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АйЭсАр ИММБЮН СИСТЕМ  
РЕГЬЮЛЕЙШН ХОЛДИНГ АБ  
(ПАБЛ) (SE)**

(72) Изобретатель:  
**Винквист Ола, Линдх Эмма, Валлин  
Роберт (SE), Грегори Мэт, Мосс  
Стивен (GB)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

(57) Изобретение относится к применению иммуностимулирующих пептидов (иммунорелинов) формулы (I) для лечения рака путем стимулирования иммунной системы путем связывания с рецептором GnRH типа II на Т-клетках, и где рак выбирают из рака надпочечников, рака ануса, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, опухолей головного мозга/ЦНС, рака толстой/прямой кишки, рака пищевода, рака глаза, рака желчного пузыря, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани и гипофарингеального рака, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейроblastомы, неходжкинской лимфомы, рака ротовой полости и орофарингеального рака, остеосаркомы, ретиноblastомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, Меркель-клеточного рака кожи, рака тимуса, саркомы матки, макроглобулинемии Вальденстрема или опухоли Вильмса.



(I)

**B1****045183****045183****B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к ряду новых пептидов, способных стимулировать иммунную систему, названных иммунорелины (immunorhelins). Изобретение также относится к новым пептидам, способным стимулировать GnRH-рецепторы на лейкоцитах. Настоящее изобретение относится к новым соединениям как таковым и соединением для применения в медицине, особенно при лечении вирусных заболеваний, таких как ВИЧ, и иммунотерапевтическом лечении рака. Иммунорелины также можно использовать в качестве иммуномодулирующих адъювантов при вакцинации. Новые стимулирующие GnRH-рецепторы иммунорелины максимизируют модулирующее действие иммунной системы, минимизируя в то же время терапевтически нежелательные эндокринные эффекты. Настоящее изобретение также относится к способам получения иммунорелинов по изобретению, которые имеют улучшенные свойства для применения в медицине.

### Предпосылки создания изобретения

CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются ключевыми медиаторами иммунной реакции и таргетируют главным образом ВИЧ-инфекцию. Существующая антиретровирусная терапия ВИЧ ставится под угрозу соблюдением пациентом режима и схемы лечения, токсичностью лекарственного средства и устойчивостью к лекарственным средствам. Таким образом, в технике существует большая потребность в способах и средствах повышения иммунной компетентности CD4<sup>+</sup> Т-клеток при ВИЧ и при некоторых иммунологически родственных вирусных заболеваниях, а также при раке.

GnRH I (также известный как гонадотропин-высвобождающий гормон или LHRH) представляет собой декапептид со структурой  $\text{ругоGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$ . Он продуцируется как 92 аминокислотный пептид, который модифицирован посттрансляционно с образованием конечного пептида с пироглутаминовой кислотой в аминоконце и карбоксамидом в карбоксильном конце. Давно известно, что он ответственен за высвобождение FSH и LH из передней доли гипофиза, и обычно высвобождается из гипоталамуса в импульсном режиме. Супрафизиологические уровни GnRH I вызывают немедленное повышение секреции FSH and LH, за которым вскоре следует ингибирование секреции FSH и LH. Это имеет место в силу того факта, что высокие уровни GnRH I оказывают ингибирующее действие на рецепторы GnRH I передней доли гипофиза. Таким образом, непрерывное введение GnRH I на высоких нефизиологических уровнях вызывает фармакологическую кастрацию (1). Синтезировано большое число агонистов и антагонистов GnRH I для применения в таких терапевтических областях, как лечение гормоночувствительного рака. Сначала терапевтически использовали соли GnRH I (такие как гидрохлорид гонадорелина и тетаргидрат диацетата гонадорелина). Открытие и разработка других лекарственных средств привели к клиническому применению широкого ряда средств, включая бусерелин, трипторелин, нафарелин, гистрелин и лейпрорелин, каждый из которых имеет улучшения по сравнению с гонадорелином, такие как увеличенный период полувыведения и суперагонизм в отношении рецептора GnRH I.

Сообщается, что GnRH I не только проявляет гормональное действие, но также может стимулировать иммунную систему (2). McClean и McCluggage (3) наблюдали массивную инфильтрацию мелких зрелых лимфоцитов в лейомиомах матки после предоперационного лечения агонистом рецептора GnRH I. Bardsley et al. (4) сделали такое же наблюдение, указывая на стимулирующее действие на миграцию GnRH I на иммунных клетках. Имеются сообщения о хроническом плазмноклеточном эндометрите в образцах гистерэктомии от ВИЧ-инфицированных женщин при ретроспективном анализе (5) и о повышенных уровнях FSH и LH (гипергонадотропических) у ВИЧ-инфицированных мужчин (6-7). Путем введения GnRH I предрасположенным к диабету крысам BB, показывающим СПИД-подобный профиль лимфоцитов, повышали число CD4 Т-лимфоцитов (8).

### Сущность изобретения

У людей имеется два варианта пептида GnRH - GnRH I и GnRH II, кодированных различными генами. Структура GnRH II представляет собой пироглу-Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (отличия от GnRH I подчеркнуты). GnRH II представляет собой негипоталамическую форму, продуцируемую первоначально вне головного мозга, и предполагается, что он вовлечен в неэндокринные аспекты системы GnRH (9). Авторы изобретения неожиданно обнаружили действие стимуляции GnRH II на экспрессию МНС класса I на Т-клетках, что показывает, что GnRH II непосредственно активизирует эти клетки (фиг. 1).

В отличие от других млекопитающих, описан только один оговоренный человеческий GnRH-рецептор - рецептор GnRH типа I. У людей гомолог рецептора GnRH типа II присутствует на гене хромосомы 1q12, но содержит сдвиг рамки и стоп-кодон, и как полагают, функционально не экспрессируется (10). Неожиданно данные авторов предполагают, что GnRH-рецептор на самом деле экспрессируется на Т-клетках, так как они отвечают на стимуляцию GnRH повышенной экспрессией МНС класса I (фиг. 1).

Такие функциональные выводы обоснованы анализом кПЦР (qPCR), где авторы смогли показать экспрессию мРНК рецептора GnRH типа II. Кроме того, относительный уровень экспрессии рецептора GnRH типа II выше по сравнению с уровнями экспрессии рецептора GnRH типа I на наивных Т-клетках и Т-клетках памяти (фиг. 4). Таким образом, авторы изобретения определили, что экспрессия рецептора GnRH типа II является доминантной на Т-клетках, функционально реагирующей на стимул GnRH.

Авторы изобретения также обнаружили, что активировать Т-клетки, ведущие к экспрессии МНС

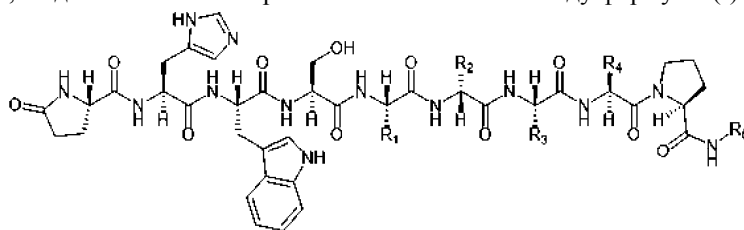
класса I, могут аналоги GnRH I. В последних клинических испытаниях с использованием аналога GnRH I бусерелина как лечения от ВИЧ, ВИЧ-инфицированным мужчинам обеспечивали замещение половых гормонов для минимизации эндокринного действия GnRH I. Такое действие опосредуется связыванием GnRH I с рецепторами GnRH I типа гипофиза, вызывая снижение продуцирования тестостерона и впоследствии импотенцию. Весьма вероятно, что GnRH I, кроме своего эндокринного действия, дает перекрестный сигнал и стимулирует иммунную систему путем связывания с рецептором GnRH типа II на Т-клетках, когда используются высокие кастрирующие уровни аналогов GnRH. Представляет интерес, что связывание GnRH I с рецепторами, экспрессированными в клетках рака молочной железы, отображает низкую аффинность связывания ( $K_d, 1,6-3,0 \times 10(-6) \text{ M}$ ), в то время как центральное связывание GnRH I гипофиза отображает в 1000 раз более высокую аффинность ( $K_d, 4,8 \times 10(-9) \text{ M}$ ) (11).

Вероятно, что различия в аффинности связывания пептидов GnRH I и GnRH II отражает экспрессию рецепторов GnRH типа I, приспособленных для связывания GnRH I на клетках гипофиза, в то время как периферические клетки могут иметь доминирующую экспрессию рецептора GnRH типа II, и, следовательно, низкую аффинность и действие "отмены мишени" связывания GnRH I. Таким образом, неожиданный вывод авторов, что рецептор GnRH типа II является доминирующим рецептором на Т-клетках, является новым и может объяснить физиологию рецепторов GnRH I и GnRH II. Следовательно, путем использования GnRH II-подобных пептидов при лечении ВИЧ можно минимизировать эндокринное действие, а иммуностимулирующее действие выделить и усилить.

На основании таких открытий авторы изобретения получили GnRH II-подобные пептиды, названные иммунорелинами, для того чтобы оптимизировать иммуностимулирующее действие и минимизировать действие на гормональную систему. Эти иммунорелины имеют применение для стимуляции МНС класса I, способного привести к иммунной реакции очищения от инфекционных агентов, таких как ВИЧ, и при лечении рака. Поэтому раскрыто несколько GnRH II-подобных пептидов, которые имеют сильное связывание с рецепторами GnRH II, но предпочтительно более слабое связывание с рецепторами GnRH I, что ведет к сравнимой или более сильной реакции МНС класса I, но более слабому действию "отмены мишени" на стимуляцию или ингибирование гормонов.

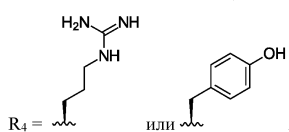
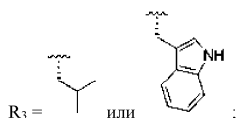
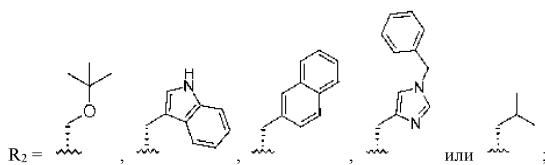
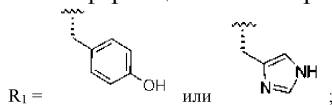
#### Описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к пептидным аналогам человеческого GnRH II. Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к пептиду формулы (I)



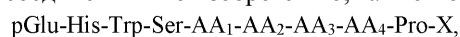
(I)

или его фармацевтически приемлемой соли, и при этом



$R_5 = \text{Me, Et, CH}_2\text{CF}_3, \text{изо-Pr, н-Pr, н-Bu, изо-Bu, втор-Bu, трет-Bu, циклопропил, CH}_2\text{CONH}_2 \text{ или NHCONH}_2.$

Формулу I, относящуюся к соединениям по изобретению, также можно выразить в виде



где AA<sub>1</sub> выбирают из His и Tyr;  
 AA<sub>2</sub> выбирают из D-Ser(OtBu), D-Trp, D-Nal, D-Bhi, и D-Leu;  
 AA<sub>3</sub> выбирают из Leu и Trp; AA<sub>4</sub> выбирают из Arg и Tyr;  
 X выбирают из -NHMe, -NEt, -NHCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -NH-изо-Pr, -NH-н-Pr, -NH-н-Bu, -NH-изо-Bu, -NH-втор-Bu, -NH-трет-Bu, -NH-циклопропила и -NHCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>.

Изобретение не включает указанные далее соединения формулы (I).

Условие	R1	R2	R3	R4	R5
P1					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P2					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P3					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P4					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P5					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P6					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P7					Et
P8					Et
P9					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P10					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P11					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
P12					Et
P13					Et
P14					Et

P15					NHCONH <sub>2</sub>
P16					NHCONH <sub>2</sub>
P17					Et
P18					NHCONH <sub>2</sub>
P19					Et
P20					NHCONH <sub>2</sub>
P21					Et

Исключаются соединения формулы (1), выраженной в виде pGlu-His-Trp-Ser-AA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>-AA<sub>3</sub>-AA<sub>4</sub>-Pro-X, где AA<sub>1</sub> представляет собой His, AA<sub>3</sub> представляет собой Trp, AA<sub>4</sub> представляет собой Tyr, и AA<sub>2</sub> выбирают из D-Leu, D-трет-Bu-Ser и D-Trp, и X представляет собой -NH<sub>2</sub> или NH-NH-CO<sub>2</sub>.

Соединения P1-P15, исключенные из изобретения, также могут быть выражены, как представлено далее.

P1. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P2. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P3. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Trp-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P4. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Trp-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P5. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P6. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P7. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-NHEt

P8. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Tyr-Pro-NHEt

P9. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P10. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P11. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P12. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt

P13. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Leu-Arg-Pro-NHEt

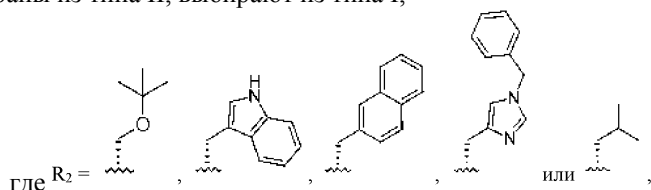
P14. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt

P15. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Arg-Pro-NHNHCONH<sub>2</sub>

Представляющим интерес выбором соединений по изобретению являются соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, в которых

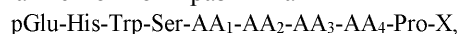
Группа	Тип I	Тип II
R <sub>1</sub>		
R <sub>3</sub>		
R <sub>4</sub>		

и причем по меньшей мере один из R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбирают из типа II, и те из R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub>, которые не выбраны из типа II, выбирают из типа I,



и при этом R<sub>5</sub> = Me, Et, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, изо-Pr, н-Pr, н-Bu, изо-Bu, втор-Bu, трет-Bu, циклопропил или CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>.

Соединения такого выбора также можно выразить как



где AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>4</sub> и X имеют значения, указанные выше, и причем по меньшей мере один из AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub> и AA<sub>4</sub> выбирают из His, Trp и Tyr; остальные AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub> и AA<sub>4</sub> выбирают из Tyr, Leu, Arg, и с исключением соединений P1-P15, описанных выше, и тех других соединений, исключенных в п. 1.

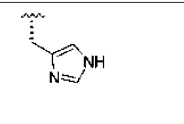
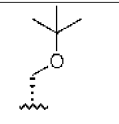
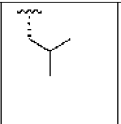
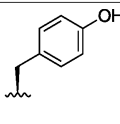
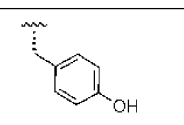
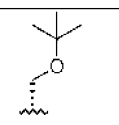
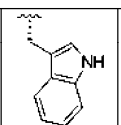
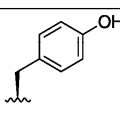
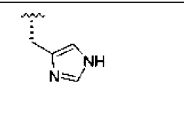
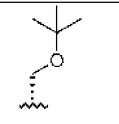
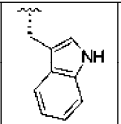
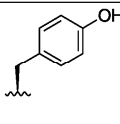
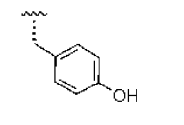
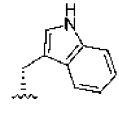
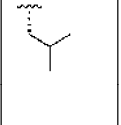
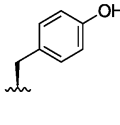
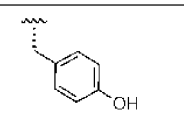
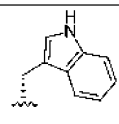
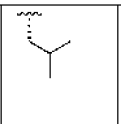
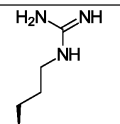
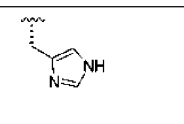
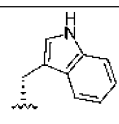
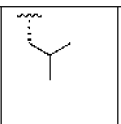
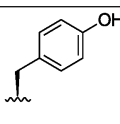
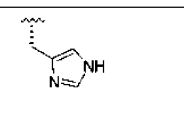
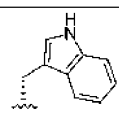
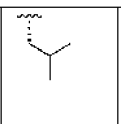
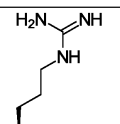
В одном воплощении два из трех R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбирают из типа II согласно списку, приведенному выше, и остальные R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбирают из типа I.

В одном воплощении один из трех R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбирают из типа I согласно списку, приведенному выше, и два из R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбирают из типа II согласно списку, приведенному выше.

Конкретные соединения по изобретению включают соединения, приведенные ниже.

Соединение №	R1	R2	R3	R4	R5
1					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Arg-Pro-Gly-амид					
2					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
3					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					

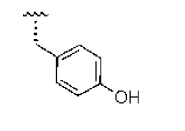
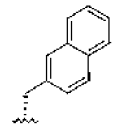
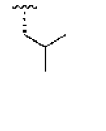
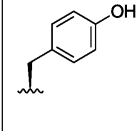
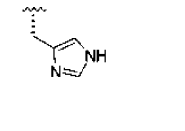
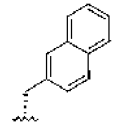
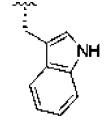
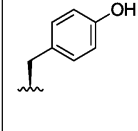
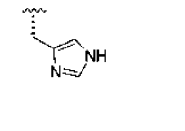
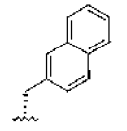
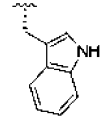
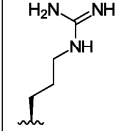
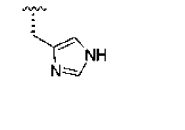
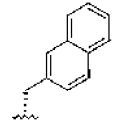
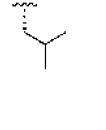
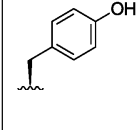
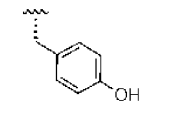
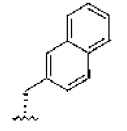
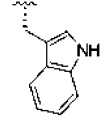
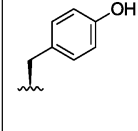
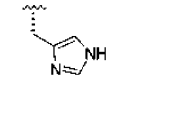
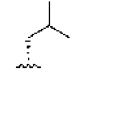
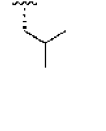
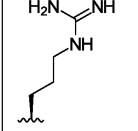
4					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
5					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
6					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Arg-Pro-NHEt					
7					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
8					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Arg-Pro-NHEt					
9					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
10					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(трет-Bu)-Trp-Arg-Pro-NHEt					

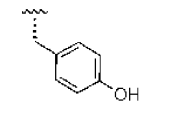
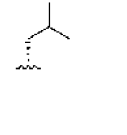
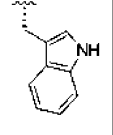
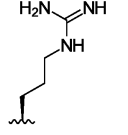
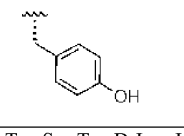
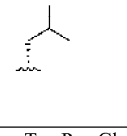
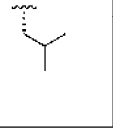
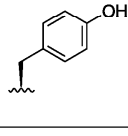
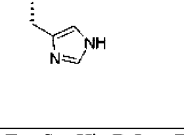
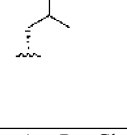
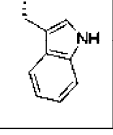
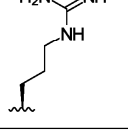
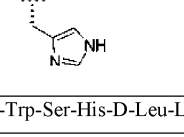
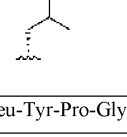
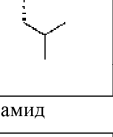
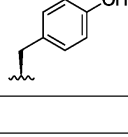
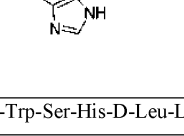
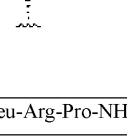
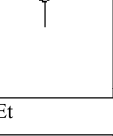
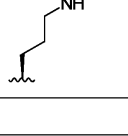
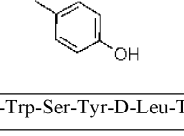
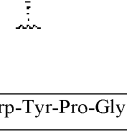
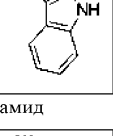
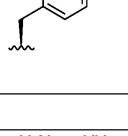
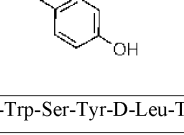
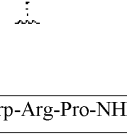
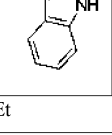
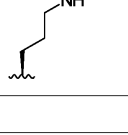
11					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tper-Bu)-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
12					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tper-Bu)-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
13					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(tper-Bu)-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
14					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
15					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHEt					
16					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
17					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHEt					



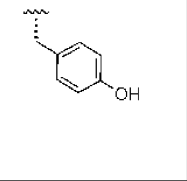
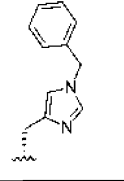
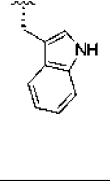
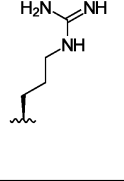
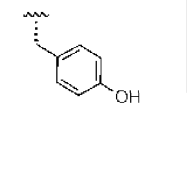
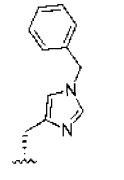
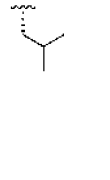
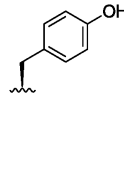
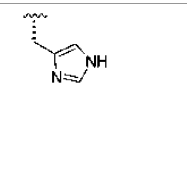
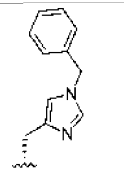
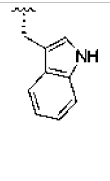
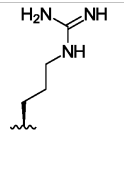
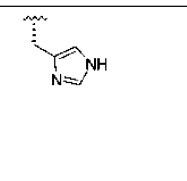
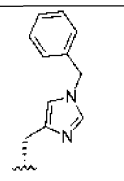
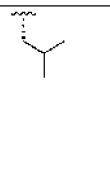
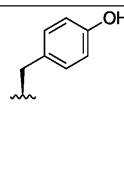
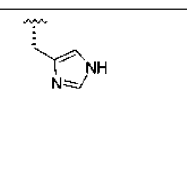
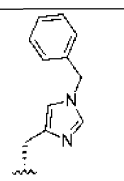

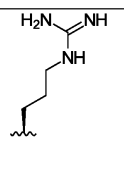
18					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Trp-Arg-Pro-NHEt					
19					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
20					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Trp-Arg-Pro-NHEt					
21					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
22					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
23					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-амид					
24					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					

25					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
26					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Leu-Arg-Pro-NHEt					
27					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
28					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
29					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Leu-Arg-Pro-NHEt					
30					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
31					Et

pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Arg-Pro-NHEt					
32					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
33					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
34					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Arg-Pro-NHEt					
35					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
36					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nal-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
37					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Leu-Arg-Pro-Gly-амид					

38					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Try-D-Leu-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
39					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
40					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
41					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
42					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt					
43					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
44					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Trp-Arg-Pro-NHEt					

45					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
46					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
47					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Arg-Pro-NHEt					
48					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
49					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
50					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
51					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Leu-Arg-Pro-Gly-амид					

52					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
53					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
54					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
55					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Leu-Tyr-Pro-Gly-амид					
56					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Leu-Arg-Pro-NHEt					

57					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
58					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Trp-Arg-Pro-Gly-амид					
59					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
60					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Trp-Arg-Pro-NHEt					
61					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Leu-Tyr-Pro-NHEt					
62					Et
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Bhi-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
63					Et
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
64					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
65					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Trp-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					





или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака путем стимулирования иммунной системы путем связывания с рецептором GnRH типа II на Т-клетках, и где рак выбирают из рака надпочечников, рака ануса, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, опухолей головного мозга/ЦНС, рака толстой/прямой кишки, рака пищевода, рака глаза, рака желчного пузыря, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани и гипофарингеального рака, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротовой полости и орофарингеального рака, остеосаркомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, Меркель-клеточного рака кожи, рака тимуса, саркомы матки, макроглобулинемии Вальденстрема, или опухоли Вильмса.

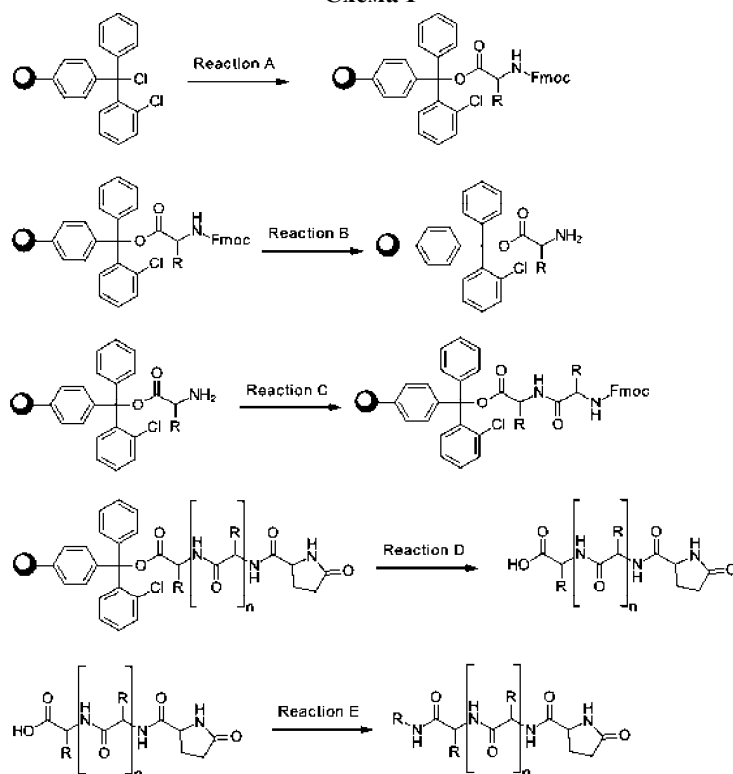
Общие химические методы.

Специалистам будет понятно, что соединения по изобретению можно получить известным способом различными путями. Пути, описанные ниже, являются только иллюстрацией некоторых методов, которые можно использовать для синтеза соединений формулы (I).

Вообще синтетические методы получения соединений по изобретению можно разделить на два метода: жидкофазный синтез и твердофазный синтез. Жидкофазный синтез пептидов включает реагенты, взаимодействующие в фазе раствора. Недостатки этого метода включают трудность в разделении и очистке продуктов. Твердофазный синтез пептидов является более распространенным и имеет ряд преимуществ, включая удобное извлечение и очистку, и возможность автоматизации (Bodanszky et al., *B Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 1976). Разработан ряд смол для синтеза пептидов, позволяющих синтезировать различные пептиды. Они включают хлорметил- и 2-хлортритилполистирольные смолы. Примеры патентов, раскрывающих способы синтеза коротких пептидов, включают US5602231, EP 0518655 и US 6879289.

Когда получают соединение по изобретению с С-концевым амидом, как, например, бусералин, тогда одним способом получения соединений является следующий, отображенный ниже на схеме II. Пептид можно собрать на твердом носителе, обычно используют 2-хлортритилполистирольную смолу, но специалисту в данной области техники будут видны и другие. Загружают первую аминокислоту и затем удаляют защитную группу, открывая реакционноспособную аминогруппу, которую затем используют для сочетания со следующей аминокислотой. В свою очередь можно удалить ее защитную группу и ее присоединить. После нескольких циклов наращивания получают желательную пептидную последовательность. Затем пептид отщепляют от смолы воздействием ТФК или подобных реагентов. Отмечается, что когда в конечном соединении требуется трет-бутильная боковая цепь, важно поддерживать достаточно небольшое время реакции, чтобы она не отщепилась полностью. Некоторые трет-бутильные группы будут отщепляться, но это можно удалить при очистке. Наконец, получают вторичный амид, соединяя пептид по незащищенному С-концу с выбранным первичным амином. В реакциях сочетания обычно используют HBTU и DIPEA, хотя специалист в данной области техники может определить другие активаторы и основания, которые можно использовать в комбинации для образования амидной связи.

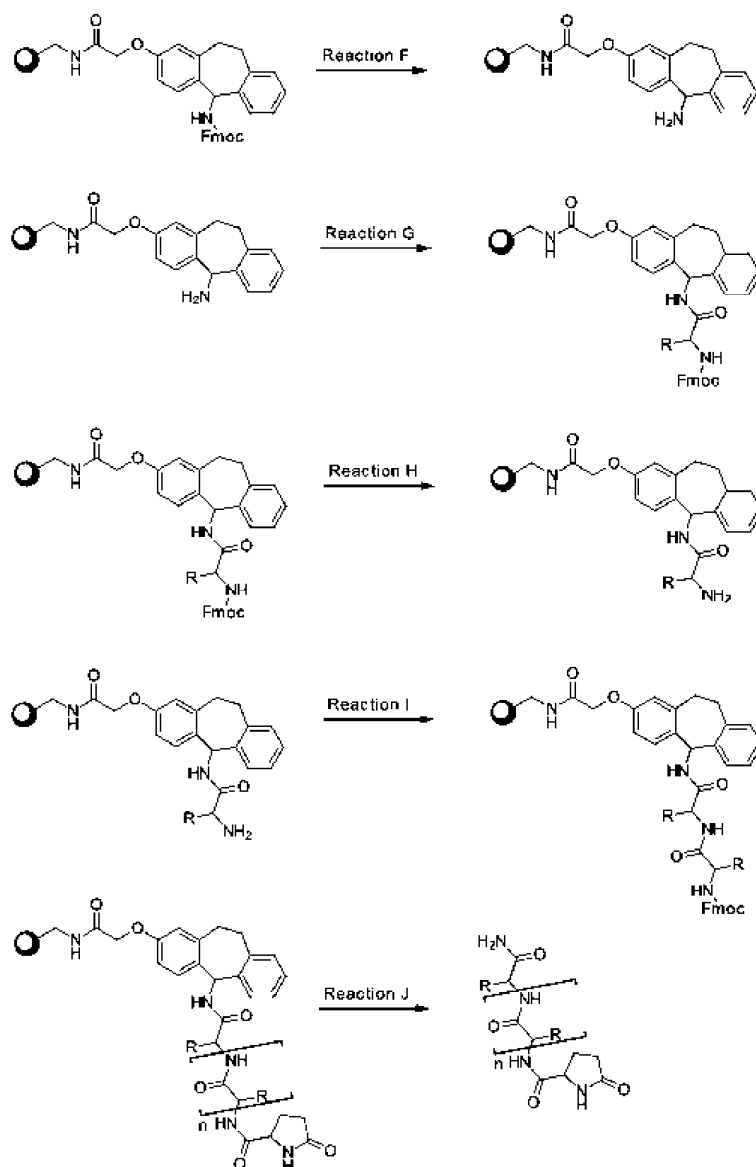
## Схема I



## Reaction - Реакция.

Когда получают соединение с С-концевым первичным амидом, как, например, в трипторелине, тогда способ получения соединений такой, какой следует далее и отображен на схеме II ниже. Пептид можно собрать на твердом носителе, обычно используют смолу Ramage, но специалисту в данной области техники будут видны и другие. Загружают первую аминокислоту и затем удаляют защитную группу, открывая реакционноспособную аминогруппу, которую затем используют для сочетания со следующей аминокислотой. В свою очередь можно удалить ее защитную группу и ее присоединить. После нескольких циклов наращивания получают желательную пептидную последовательность. Затем пептид отщепляют от смолы воздействием ТФК или подобных реагентов. В реакциях сочетания обычно используют НВТУ и DIPEA, хотя специалист в данной области техники может определить другие активаторы и основания, которые можно использовать в комбинации для образования амидной связи.

## Схема II



## Reaction - Реакция.

Соединения формулы (I) можно получить комбинированием способов, описанных выше, и другими методами, известными специалистам в данной области техники. Общее применение соединений по изобретению

Соединения, описанные в настоящем описании, можно использовать в медицине, медицинских исследованиях или при производстве композиции для такого применения. Кроме того, изобретение также относится к соединениям P1-P21, описанным в настоящем описании, для применения в медицине, медицинских исследованиях или при производстве композиции для такого применения. Соответственно, когда далее термин "соединения по изобретению" используется в связи с применением в медицине или фармацевтической композиции, предполагается, что термин также включает соединения P1-P21, при условии, что эти соединения не известны для такого применения.

Кроме того, предполагается, что соединения показывают улучшенные свойства для лечения этих и родственных заболеваний, включая пониженное связывание с рецептором GnRH I по сравнению с рецептором GnRH II.

Соединения по изобретению, раскрытые в настоящем описании, можно использовать для лечения заболеваний, расстройств, состояний и симптомов, где применима стимуляция иммунной реакции, например, при лечении пациентов, инфицированных вирусными агентами, или с вирусными заболеваниями, такими как ВИЧ, альфавирус, арбовирус, болезнь Борна, буниавирус, калицивирус, кондиллома остроконечная, коронавирус, коксаки-вирус, цитомегаловирус, вирус лихорадки Денге, контагиозная эктима, вирус Эпштейна-Барр, инфекционная эритема, хантавирус, вирус геморрагической лихорадки, вирусный гепатит, вирус простого герпеса, вирус герпеса зостер, инфекционного мононуклеоза, гриппа, вирус лихорадки Ласса, кори, свинки, контагиозный моллюск, парамиксовирус, флеботомной лихорадки,

полиомавирус, лихорадки Рифт-Валли, краснухи, медленный вирус, оспы, подострого склерозирующего лейкоэнцефалита, онкогенные вирусные инфекции, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус бешенства и респираторно-синцициальный вирус.

Кроме того, предполагается, что соединения подходят для применения при лечении рака, в частности, рака надпочечников, рака ануса, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, опухолей головного мозга/ЦНС, рака молочной железы, болезни Кастлемана, рака шейки матки, рака толстой/прямой кишки, эндометриального рака, рака пищевода, рака глаза, рака желчного пузыря, гастроинтестинальных карциноидных опухолей, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), гестационной трофобластической болезни, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани и гипофарингеального рака, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, не-мелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, карциноидной опухоли легкого, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротовой полости и орофарингеального рака, остеосаркомы, рака яичников, панкреатического рака, рака полового члена, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, меланомы, Меркель-клеточного рака кожи, рака тонкого кишечника, рака желудка, рака яичка, рака вилочковой железы, рака щитовидной железы, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы, макроглобулинемии Вальденстрема, опухоли Вильмса.

Таким образом, выгодные свойства соединения по изобретению могут включать одно или несколько из следующих свойств:

- улучшенное связывание с рецептором GnRH II по сравнению с рецептором GnRH I;
- улучшенная стимуляция МНС класса I;
- улучшенная иммуномодуляция;
- улучшенная активация антигенпредставляющих клеток;
- улучшенная противораковая активность.

Фармацевтические композиции, включающие соединение по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение по изобретению вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями. Настоящий раздел относится в первую очередь к композиции с новыми аналогами GnRH. В тех случаях, где новые соединения имеют действие на рецептор GnRH I, который нежелателен и вызывает кастрацию подобных действий, могут вводиться совместно композиции, содержащие половые гормоны, известные в технике.

Соединения по изобретению или их композиции могут вводиться любым удобным путем, например, но без ограничения, препарат можно вводить парентерально, перорально, местно или через слизистую (включая трансбуккальный, сублингвальный, трансдермальный, вагинальный, ректальный, назальный пути, в глаза), с помощью медицинского устройства (например, стента), путем ингаляции. Лечение может состоять в одном введении или нескольких введениях в течение некоторого периода времени.

Лечение может осуществляться введением один раз в день, три раза в день, четыре раза в день и т.д., в зависимости от конкретного заболевания, от которого лечат, и массы и возраста пациента, которого лечат. Лечение также может осуществляться непрерывным введением, таким как внутривенное введение путем инфузии по капле.

Хотя возможно введение соединения по изобретению как такового, предпочтительно, чтобы оно присутствовало в фармацевтическом препарате вместе с одним или несколькими приемлемыми носителями. Носитель(и) должен(должны) быть "приемлемым(и)" в смысле совместимости с соединением по изобретению и не вредить его реципиентам. Примеры подходящих носителей описаны подробнее ниже.

Препараты могут быть удобно представлены в подходящей лекарственной форме, включая стандартную лекарственную форму, и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Такие способы включают стадию смешивания вместе активного ингредиента (соединения по изобретению) с носителем, который состоит из одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. Вообще препараты получают путем равномерного и тщательного смешивания активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или теми и другими, и затем при необходимости продукту придают форму.

Соединение по изобретению обычно будет вводиться любым удобным путем введения, обычно пероральным или любым парентеральным путем в форме фармацевтического препарата, включающего активный ингредиент, необязательно в форме нетоксичной органической или неорганической соли присоединения кислоты или основания, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от расстройств и пациента, которого лечат, а также от способа введения, композиции могут вводиться в различных дозах и/или с различной частотой.

Фармацевтические композиции должны быть устойчивы в условиях производства и хранения; так, при необходимости, их следует предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как

бактерии и грибы. В случае жидких препаратов, таких как растворы, дисперсии, эмульсии и суспензии, носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), растительные масла и их подходящие смеси. Например, соединение по изобретению можно вводить перорально, трансбуккально или сублингвально в форме таблеток, капсул, пленок, зернышек, эликсиров, растворов, эмульсий или суспензий, которые могут содержать корригенты или красители.

Препараты согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, причем каждая содержит предварительно установленное количество активного ингредиента, в виде многодозовых единиц, например, в форме таблетки или капсулы; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной жидкости или в неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле. Активный ингредиент также может быть представлен в виде болуса, электуария или пасты.

Растворы или суспензии соединения по изобретению, подходящие для перорального введения, также могут содержать один или несколько растворителей, включая воду, спирт, полиол и т.д., а также один или несколько эксципиентов, таких как рН-регулятор, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, солюбилизаторы, диспергаторы, консерванты, отдушки и т.д. Конкретные примеры включают, например, N,N-диметилацетамид, диспергаторы, например, полисорбат 80, поверхностно-активные вещества и солюбилизаторы, например, полиэтиленгликоль, фозал 50 ПГ (который состоит из фосфатидилхолина, жирных кислот сои, этанола, моно/диглицеридов, пропиленгликоля и аскорбилпальмитата). Препараты согласно настоящему изобретению также могут находиться в форме эмульсий, причем соединение согласно формуле (I) может присутствовать в эмульсии, такой как эмульсия масло-в-воде или эмульсии вода-в-масле. Масло может представлять собой натуральное или синтетическое масло или любое масло-подобное вещество, такое как, например, соевое масло или сафлоровое масло или их комбинации.

Таблетки могут содержать эксципиенты, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза (например, моногидрат лактозы или безводная лактоза), цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция и глицин, бутилированный гидрокситолуол (E321), кросповидон, гипромеллоза, дезинтеграторы, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или маниоковый крахмал), натрия крахмал гликолят, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты, и связующие грануляции, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ), макрогол 8000, сахароза, желатин аравийская камедь. Дополнительно могут быть включены лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк.

Таблетка может быть изготовлена прессованием или формованием, необязательно с помощью одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. Прессованные таблетки можно получить прессованием в подходящей машине активного ингредиента в свободно текущей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанные со связующим (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), лубрикантом, инертным разбавителем, консервантом, дезинтегратором (например, натрия крахмал гликолятом, сшитым повидоном, сшитой натрия карбоксиметилцеллюлозой), поверхностно-активным веществом или диспергатором. Формованные таблетки можно получить формованием в подходящей машине смеси измельченного в порошок соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки, необязательно, могут иметь покрытие или насечку, и могут быть составлены так, чтобы обеспечить медленное или регулируемое высвобождение активного ингредиента, используемого в них, например, с гидроксипропилметилцеллюлозой в различных пропорциях для обеспечения желательного профиля высвобождения.

Твердые композиции подобного типа можно использовать в качестве наполнения в желатиновых капсулах. Предпочтительные эксципиенты в связи с этим включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров соединения по изобретению могут быть соединены с различными подсластителями или корригентами, красящим веществом или красителями, с эмульгаторами и/или суспендирующими агентами и с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, и их комбинациями.

Препараты, подходящие для местного введения во рту, включают лепешки, включающие активный ингредиент в ароматизированной массе, обычно сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; пастилки, включающие активный ингредиент в инертной массе, такой как желатин и глицерин, или сахарозе и аравийской камеди; и полоскания, включающие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические композиции, адаптированные для местного введения, могут быть составлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных повязок, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, присыпок и в подобном виде. Такие композиции можно получить обычными методами с включением активного агента. Таким образом, они также могут включать совместимые обычные носители и добавки, такие как консерванты, растворители для способствования прониканию лекарственного средства, смягчитель в кремах или мазях и этанол или олеилловый спирт для лосьонов. Такие носители могут присутствовать как от примерно 1% до примерно 98% от композиции. Чаще они будут составлять до примерно 80% композиции. Только как пояснение, крем или

мазь получают смешиванием достаточных количеств гидрофильного материала и воды, содержащих примерно 5-10 мас.% соединения, в достаточных количествах для получения крема или мази, имеющих желательную консистенцию.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут быть представлены в виде дискретных пэтчей, предназначенных для сохранения тесного контакта с эпидермисом реципиента в течение продолжительного периода времени. Например, активный агент может быть доставлен из пэтча путем ионтофореза.

Для применений для наружных тканей, например, рта и кожи, композиции предпочтительно применяют в виде местнодействующих мази или крема. При составлении мази активный агент можно использовать с мазевой основой, смешивающейся или с парафиновой или с водой.

С другой стороны, активный агент можно ввести в крем с основой крема масло-в-воде или основой крема вода-в-масле.

Для парентерального введения получают жидкие стандартные лекарственные формы с использованием активного ингредиента и стерильной среды, например, но без ограничения, воды, спиртов, полиолов, глицерина и растительных масел, причем предпочтительна вода. Активный ингредиент, в зависимости от среды и используемой концентрации, может быть в коллоидном состоянии, суспендирован или растворен в среде. При получении растворов активный ингредиент можно растворить в воде для инъекции и профильтровать перед загрузкой в подходящий флакон или ампулу и герметично закрыть.

Преимущественно агенты, такие как местные анестетики, консерванты и буферизирующие агенты, могут быть растворены в среде. Для усиления стабильности композиция может быть заморожена после загрузки во флакон, и вода удалена в вакууме. Затем сухой лиофилизированный порошок герметично закрывают во флаконе, и можно поставить флакон в сопровождении воды для инъекции для восстановления жидкости перед применением.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии. Кроме того, композиции могут находиться в форме стерильных порошков для приготовления для немедленного приема таких стерильных растворов или дисперсий для инъекции. Во всех случаях конечная форма для инъекции должна быть стерильной и должна быть действительно жидкой для легкости введения шприцом.

Парентеральные суспензии получают по существу таким же способом, как растворы, за исключением того, что активный ингредиент суспендируют в среде вместо растворения, и стерилизация не может выполняться фильтрацией. Активный ингредиент можно стерилизовать воздействием этиленоксида перед суспендированием в стерильной среде. Преимущественно в композицию включают поверхностно-активное вещество или смачиватель для облегчения равномерного распределения активного ингредиента.

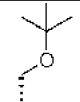
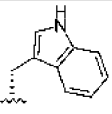
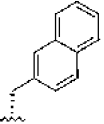
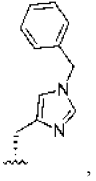

Следует иметь в виду, что кроме ингредиентов, особо упомянутых выше, препараты по настоящему изобретению могут включать другие агенты, известные в технике, имеющие отношение к типу препарата, о котором идет речь, например, агенты, подходящие для перорального введения, могут включать корригенты. Специалисту в данной области техники будет известно, как выбрать подходящий препарат и как его получить (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 Ed. или более позднее). Специалисту в данной области техники также будет известно, как выбрать подходящий путь введения и дозировку.

Специалист в данной области техники будет осознавать, что оптимальное количество и интервал индивидуальных дозировок соединения по изобретению будут определяться характером и степенью состояния, от которого лечат, формой, путем и местом введения, и возрастом и состоянием определенного субъекта, которого лечат, и что врач в конечном счете будет определять соответствующие дозировки для применения. Такая дозировка может повторяться так часто, как требуется. Если проявляется побочное действие, количество и/или частота дозирования могут быть изменены или уменьшены согласно обычной клинической практике.

Все значения %, указанные в настоящем описании, являются % мас./мас., если контекст не требует иного.

### Список последовательностей

Список последовательностей получают согласно стандарту ВОИС ST.25. В списке последовательностей неприродные аминокислоты соединений 1-63 и P1-P21 представлены как соответствующие природные аминокислоты, как указано далее.

Неприродная аминокислота	Соответствующая природная аминокислота
pGlu, пироглутамат	L-глутамат, Glu
 , D-Ser(O-трет-Bu)	L-серин, Ser
 , D-Trp	L-триптофан, Trp
 , D-Nal	L-фенилаланин, Phe
 , D-Bhi	L-гистидин, His
 , D-Leu	L-лейцин, Leu
Pro-Et	L-пролин, Pro
Pro-NHNHCONH <sub>2</sub>	L-пролин, Pro
Gly-NH <sub>2</sub>	Gly

В списке последовательностей вводы 1-63 соответствуют соединениям 1-63, и вводы 64-78 соответствуют соединениям P1-P15. Вводы 78 и 80 соответствуют GnRH I и GnRH II дикого типа. Вводы 81-84 соответствуют праймерам. Вводы 85-89 соответствуют соединениям 64-68. Вводы 90-95 соответствуют соединениям P16-P21. Однако последовательности SEQ ID NO: 1-78 и 85-89, как они стоят в списке последовательностей, т.е., без описанных выше неприродных аминокислот, не заявляются, но включены только для выполнения требований R. 30(1) ЕРС.

Выдержка из свободного текста списка последовательностей.

Для выполнения параграфа 36 стандарта ВОИС ST.25 в основной части описания повторяется свободный текст, включенный под цифровым идентификатором <223> списка последовательностей.

SEQ ID NO	Свободный текст, включенный в <223>
1-78	Искусственный аналог GnRH II
79	GnRH I
80	GnRH II
81	Прямой праймер рецептора GnRH типа I
82	Обратный праймер рецептора GnRH типа I
83	Прямой праймер рецептора GnRH типа II
84	Обратный праймер рецептора GnRH типа II
85-95	Искусственные аналоги GnRH II

Определения.

Единственное число, используемое в настоящем описании, относится к одному или больше, чем одному (т.е. по меньшей мере к одному) из грамматических объектов. Например, "аналог" обозначает один аналог или больше, чем один аналог.

Используемые в настоящем описании термины "иммунорелины" и "соединение(я) по изобретению" используются взаимозаменяемо и относятся к соединениям формулы (I).

Фармацевтически приемлемые соли соединения по изобретению включают обычные соли, образо-

ванные с фармацевтически приемлемыми неорганическими или органическими кислотами или основаниями, а также соли присоединения кислот четвертичного аммония. Более конкретные примеры подходящих солей кислот включают соли кислот хлороводородной, бромоводородной, серной, фосфорной, азотной, перхлорной, фумаровой, уксусной, пропионовой, янтарной, гликолевой, муравьиной, молочной, малеиновой, винной, лимонной, пальмовой (palmoic), малоновой, гидроксималеиновой, фенилуксусной, глутаминовой, бензойной, салициловой, толуолсульфоновой, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, бензолсульфоновой, гидроксинафтойной, иодоводородной, яблочной, steroic, дубильной и подобных кислот. Другие кислоты, такие как щавелевая, которые сами не являются фармацевтически приемлемыми, могут применяться при получении солей, полезных в качестве промежуточных соединений при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых солей. Более конкретные примеры солей подходящих оснований включают соли натрия, лития, калия, магния, алюминия, кальция, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, холина, диэтаноламина, этилендиамина, N-метилглюкамина и прокаина.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Экспрессия МНС класса I после стимуляции Т-клеток GnRH II в возрастающих концентрациях. PBMC от здорового донора стимулируют GnRH II и IL-2 в течение 72 часов. Данные точки представляют среднюю интенсивность флуоресценции экспрессии МНС класса I на CD4<sup>+</sup> Т-клетках (голубые треугольники) или CD8<sup>+</sup> Т-клетках (черные квадраты), измеренную проточной цитометрией.

Фиг. 2. Экспрессия МНС класса I после стимуляции Т-клеток аналогом GnRH I (красная линия) и GnRH II (черная линия) в возрастающих концентрациях. PBMC от здорового донора стимулируют аналогом GnRH I или GnRH II и IL-2 в течение 72 часов. Данные точки представляют среднюю интенсивность флуоресценции экспрессии МНС класса I на CD4<sup>+</sup> Т-клетках (А) или CD8<sup>+</sup> Т-клетках (В), измеренную проточной цитометрией.

Фиг. 3. Экспрессия МНС класса I после стимуляции CD4<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> моноцитов аналогом GnRH I (красная линия) и GnRH II (черная линия) в возрастающих концентрациях. CD14<sup>+</sup> моноциты PBMC от здорового донора стимулируют аналогом GnRH I или GnRH II и IL-2 в течение 72 часов. Данные точки представляют среднюю интенсивность флуоресценции экспрессии МНС класса I на CD4<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> моноцитах, измеренную проточной цитометрией.

Фиг. 4. Экспрессию GnRH-рецептора в человеческих Т-клетках анализируют количественной ПНР в реальном времени. Столбики представляют отношения мРНК GnRHR I или GnRHR II, нормализованные для экспрессии РНК-полимеразы II в сортированных наивных Т-клетках (светлые столбики) или Т-клетках памяти (серые столбики). В качестве положительного контроля используют клеточную линию MCF-7 рака молочной железы (черные столбики).

#### Экспериментальная часть

Общие биологические методы.

Преимущество соединений по изобретению на рецепторы GnRH можно проверить с использованием одного или нескольких методов, описанных ниже.

I. Экспрессия рецепторов GnRH на Т-клетках.

Человеческие наивные Т-клетки и Т-клетки памяти метят флуоресцентным поверхностным маркером антителами CD45RA, CD45RO и CD4 и сортируют с помощью проточной цитометрии. Полную РНК экстрагируют с помощью набора Rnaeasy (Qiagen) и обратно транскрибируют с помощью набора для синтеза кДНК iScript select (Biorad). С матрицы амплифицируют кДНК с помощью SYBR Green (Applied Biosystem) и проводят на CFX96 PCR (Biorad). Отношения мРНК рецептора GnRH типа I и рецептора GnRH типа II нормализуют для экспрессии РНК-полимеразы II в сортированных наивных Т-клетках или Т-клетках памяти. В качестве положительного контроля используют клеточную линию MCF-7 рака молочной железы.

Последовательности праймеров.

Рецептор GnRH типа I

fwd 5'-tgc ctc ttc atc atc cct ct-3'

rev 5'-gca aat gca acc gtc att tt-3'

Рецептор GnRH типа II

fwd 5'-act gtt caa tgg ctg gct gt-3'

rev 5'-gcc ccc aga agt ttc ctt ac-3'

I. Анализ GnRH I против GnRH II.

Соединения испытывают на клетках, полученных для экспрессии рецепторов GnRH типа I или типа II путем трансфекции. На клетки воздействуют меченым соединением GnRH, промывают и затем оценивают, измеряя метку на клетках. Метку измеряют или непосредственно (метку радиоактивный изотоп или флуоресцентную метку) или косвенно (меченный биотином пептид).

Передачу сигнала, вызванную соединениями GnRH, измеряют в клеточных линиях, экспрессирующих рецепторы GnRH типа I и GnRH типа II, соответственно. Соединения GnRH исследуют на их соответствующую аффинность к рецепторам GnRH I и GnRH II с использованием конкурирующих анализов.



Приток кальция измеряют с использованием клеток, меченных Fluo-4-Direct или с использованием проточного цитометра или с помощью микроскопии изображения живой клетки для того, чтобы оценить величины EC50 усиления их действенности. Передачу сигнала также исследуют вестерн-блоттингом с использованием антител к pERK или p-JNK.

Для того чтобы оценить действие клеточной активации на продуцирование LH и FSH и сравнить его со стимуляцией иммунородственных функций, исследуют действие соединений на клетки гипофиза и иммунные клетки, экспрессирующие рецепторы или GnRH типа II или GnRH типа I.

#### II. Анализ иммунной стимуляции.

Действенность соединений по вызыванию активации иммунных клеток можно оценить с использованием анализа, такого как следующий анализ.

Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от здоровых доноров очищают центрифугированием в градиенте плотности фиколла-гипака. Клетки культивируют в среде RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 10% сыворотки плода коровы, 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и IL-2 (100 Е/мл) в течение 72 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки стимулируют GnRH II или аналогами GnRH I в возрастающих концентрациях и анализируют на экспрессию специфических маркеров активации клеточной поверхности CD25, CD69 и MHC класса I моноклональными антителами от BD Pharmingen с использованием проточной цитометрии.

Данные по растворимости и устойчивости (примеры 2 и 3).

Каждое соединение (0,2 мг) добавляют к PBS (pH 7,4, 0,2 мг/мл) и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин и затем встряхивают в течение 20 мин. Берут образец А Т = 0 час (80 мкл) для анализа ЖХ/МС. Затем растворы инкубируют (37°C с перемешиванием) в Techne Roller-Blot Hybridiser HB-3D. Также берут образцы при Т = 4, 24, 96 ч для анализа ЖХ/МС.

Анализ ЖХ/МС проводят на системе ВЭЖХ Agilent HP 1100 HPLC, снабженной диодно-матричным детектором (DAD), одним квадрупольным масс-анализатором Waters ZQ и колонкой Waters X select CSH C18, 2,1 мм × 50 мм, 3,5 мкм. Собирают данные ЖХ/МС для идентичности соединений. Собирают данные площадь LC/UV под кривой (AUC) для каждого соединения при 280 нм в каждый из четырех моментов времени (Т = 0, 4, 24, 96 час). Тенденцию в этих данных интерпретируют для того, чтобы дать каждому соединению оценку растворимости от 1 (хорошая) до 5 (плохая) и оценку устойчивости (Т<sub>1/2</sub>).

Анализ на кальций в клетках CHO-K1 (Genscript).

Образцы растворов испытываемых соединений растворяют в буфере HBSS (с 20 mM буфера HEPES, pH 7,4) для образования 5x рабочих растворов. Используют, когда требуется, набор для анализа FLIPR Calcium 4 от Molecular devices (R8141). Коротко, клетки CHO-K1, экспрессирующие GnRHR (CHO-K1/GnRHR/Gα15, Genscript accession NM\_000406), соответственно культивируют в 10-см чашках и поддерживают при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Клетки CHO-K1, экспрессирующие GnRHR, соответственно высевают в 384-луночные темные планшеты с лунками с прозрачным дном с плотностью 15000 клеток на лунку в 20 мкл среды для роста примерно за 18 часов до дня эксперимента и поддерживают при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Затем в лунки добавляют 20 мкл раствора с красителем, и затем планшеты помещают в инкубатор при 37°C на 60 минут с последующей 15-минутной инкубацией при комнатной температуре. Наконец, в соответствующие лунки аналитического планшета добавляют 10 мкл растворов соединений или контрольного агониста во время считывания на FLIPR. Планшет, содержащий 5x соединения и раствор контрольного агониста, помещают в FLIPR. Растворы добавляют в ячейки планшета автоматически за 20 секунд, и сигнал флуоресценции контролируют в течение еще 100 секунд (21 с - 120 с). Данные регистрируют ScreenWorks (версия 3.1) как файлы FMD с FLIPR и хранят в вычислительной сети GenScript для анализа офлайн. Собирают данные, выполняют анализы с использованием программы ScreenWorks (версия 3.1) и загружают в Excel. Вычисляют среднюю величину считывания за первые 20 секунд как базовую, и вычисляют величины в относительных единицах интенсивности флуоресценции (ΔRFU) вычитая среднюю величину базового значения из максимальных единиц флуоресценции (21 с - 120 с).

Вычисляют % стимуляции из следующего уравнения:

$$\% \text{ стимуляции} = ((\Delta\text{RFU соединения} - \Delta\text{RFU базы}) / (\Delta\text{RFU контрольного агониста} - \Delta\text{RFU базы})) \times 100.$$

Кривые дозовой зависимости строят с помощью четырехпараметрического логистического уравнения с помощью программы GraphPad Prism 6. Уравнение: четырехпараметрическое логистическое уравнение.

$$Y = \text{низ} + (\text{верх} - \text{низ}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) \times \text{наклон}))}$$

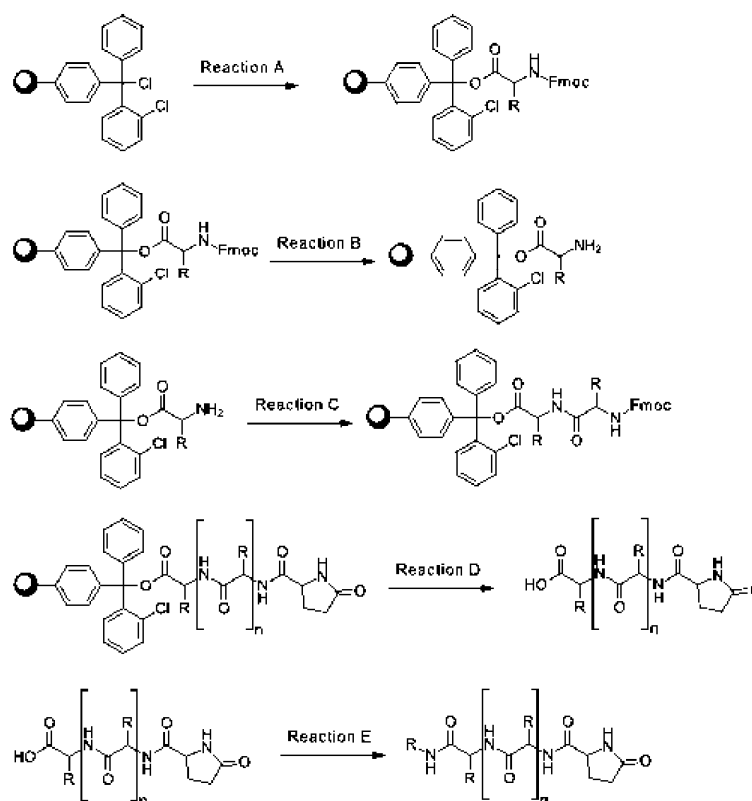
X представляет собой логарифм концентрации. Y представляет собой реакцию.

Материалы.

Если не указано иное, все реагенты, используемые ниже в примерах, получают из коммерческих источников.

Общий способ синтеза.

Способ А.



Reaction - Реакция.

Пептиды получают, используя стандартный твердофазный синтез с Fmoc, как показано на схеме выше. Используют защищенные аминокислоты (Fmoc и трет-Бу или Trt, при необходимости), и выполняют синтез на 2-хлортритилполистирольной смоле. Реакции выполняют в порядке А, В, С с последующими несколькими повторениями В и С для сборки нужного пептида. Когда добавлена последняя аминокислота (пироглутамат - примечание: для этого используют реакцию С, хотя аминокислота не защищена Fmoc), проводят последние две реакции D и E в указанном порядке для генерации соединения по изобретению.

Реакция А. Смолу суспендируют в дихлорметане (10-20 объемных эквивалентов по сравнению со смолой) и перемешивают при комнатной температуре. Аминокислоту, защищенную Fmoc (2 эквивалента), добавляют к 1 эквиваленту смолы в присутствии диизопропилэтиламина (6 эквивалентов). Реакционную смесь перемешивают в течение 0,5 час - 1 часа при комнатной температуре. Смолу собирают фильтрацией и промывают 6 раз ДМФА и затем используют непосредственно на следующей стадии.

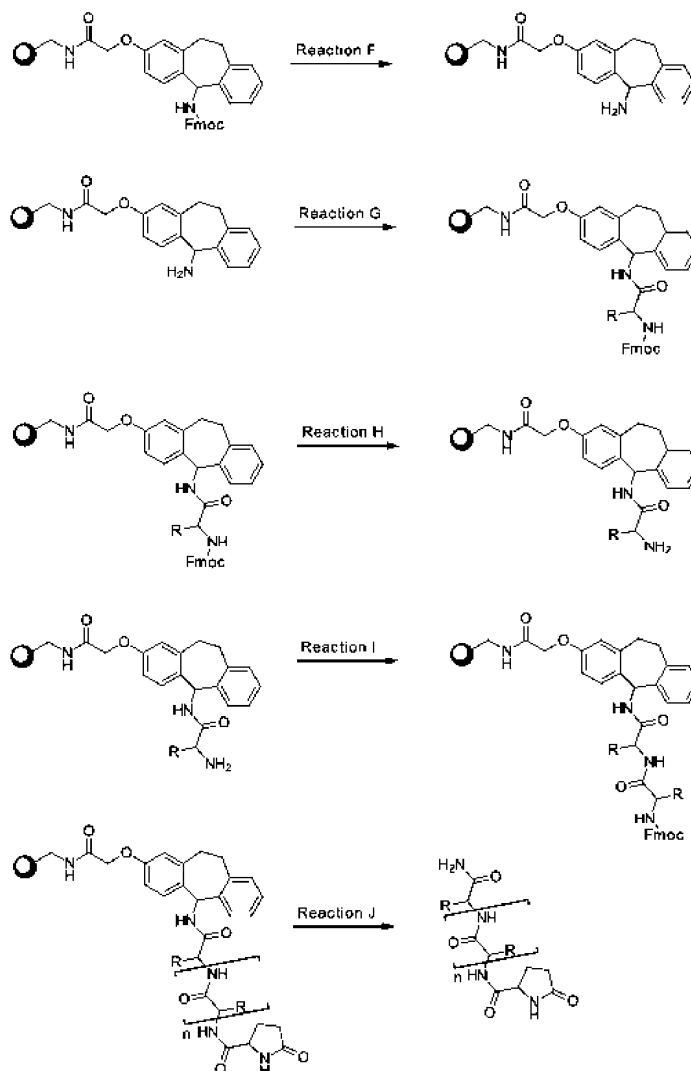
Реакция В. Удаляют защитную группу Fmoc путем обработки пиперидином (20%) в диметилформамиде (5-10 объемных эквивалентов по сравнению со смолой) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают до 1 часа, смолу собирают фильтрацией, и затем смолу промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии.

Реакция С. Защищенную Fmoc аминокислоту (4 эквивалента) растворяют в ДМФА и добавляют DiPEA (2 эквивалента). После перемешивания при комнатной температуре в течение одной минуты смесь добавляют к аминокислоте на носителе смоле (1 эквивалент) из реакции В, обрабатывая добавлением НВТУ (1 эквивалент). Реакционную смесь перемешивают до 1 часа, смолу собирают фильтрацией и промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии. Следующей стадией является или реакция В или реакция D, в зависимости от целевой последовательности.

Реакция D. Защищенный пептид отщепляют от смолы путем обработки 3-5% трифторуксусной кислотой в дихлорметане. Смолу удаляют фильтрацией, и пептид получают осаждением охлажденным на льду диэтиловым эфиром и собирая центрифугированием. Твердое вещество промывают также диэтиловым эфиром и затем сушат в вакууме перед использованием на следующей стадии.

Реакция E. Получают С-концевой амид, растворяя пептид с реакции D (1 эквивалент) в ДМФА, добавляют моноалкиламин (20-50 эквивалентов) и НВТУ (2-3 эквивалента), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре до 3 часов. Реакционную смесь разбавляют водой, и затем сырой пептид очищают так, как подробно описано ниже.

Способ В.



Reaction - Реакция.

Пептиды получают, используя стандартный твердофазный синтез с Fmoc, как показано на схеме выше. Используют защищенные аминокислоты (Fmoc и трет-Бу или Trt, при необходимости), и выполняют синтез на смоле Ramage. Реакции выполняют в порядке F, G, H, I с последующими несколькими повторениями Y для сборки нужного пептида. Когда добавлена последняя аминокислота (пироглутамат - примечание: для этого используют реакцию I, хотя аминокислота не защищена Fmoc), проводят последнюю реакцию Y в указанном порядке для генерации соединения по изобретению.

Реакция F. Смолу Fmoc-Ramage суспендируют в ДМФА (5-10 объемных эквивалентов по сравнению со смолой), содержащем 20% пиперидина. Реакционную смесь перемешивают до 1 часа при комнатной температуре, и смолу собирают фильтрацией, промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии.

Реакция G. Аминокислоту, защищенную Fmoc (5 эквивалентов), растворяют в ДМФА, и добавляют DiPEA (2 эквивалента). После перемешивания при комнатной температуре в течение одной минуты смесь добавляют к аминокислоте на носителе смоле (1 эквивалент) из реакции F, обрабатывая добавлением НВТУ (1 эквивалент). Реакционную смесь перемешивают до одного часа, смолу собирают фильтрацией и промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии.

Реакция H. Удаляют защитную группу Fmoc путем обработки пиперидином (20%) в диметилформамиде (5-10 объемных эквивалентов по сравнению со смолой) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают до 1 часа, смолу собирают фильтрацией, и затем смолу промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии.

Реакция I. Защищенную Fmoc аминокислоту (4 эквивалента) растворяют в ДМФА и добавляют DiPEA (2 эквивалента). После перемешивания при комнатной температуре в течение одной минуты смесь добавляют к аминокислоте на носителе смоле (1 эквивалент) из реакции H, обрабатывая добавлением НВТУ (1 эквивалент). Реакционную смесь перемешивают до одного часа, смолу собирают фильтрацией и промывают 6 раз ДМФА и используют непосредственно на следующей стадии. Следующей стадией

является или реакция Н или реакция J, в зависимости от целевой последовательности.

Реакция J. Защищенный пептид отщепляют от смолы путем обработки 90% трифторуксусной кислотой с 2,5% воды, 2,5% триизопропилсилана и 5% дихлорметана. Смолу удаляют фильтрацией, и пептид получают осаждением охлажденным на льду диэтиловым эфиром и собирая центрифугированием. Затем сырой пептид очищают так, как подробно описано ниже.

Очистка.

Сырые пептиды растворяют по отдельности в смеси ацетонитрил/Н<sub>2</sub>О (1:1, об./об.) и очищают препаративной ВЭЖХ с колонкой с C18 с использованием градиента вода (0,1% ТФК) - ацетонитрил (0,1% ТФК). Конечную чистоту пептидов подтверждают аналитической ВЭЖХ. Пептиды лиофилизируют перед хранением при -20°C.

Анализ соединений - идентичность и чистота.

Метод анализа А.

Для анализа соединения растворяют в смеси метанол:вода (9:1, 0,1 мг/мл), и порцию в 150 мкл помещают в микрофлакон для ВЭЖХ и центрифугируют при 14000 об/мин в течение 3 минут. Затем образец проверяют высокоэффективной жидкостной хроматографией с диодной матрицей (ВЭЖХ-DAD) и детекцией масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС). ВЭЖХ-DAD-МС выполняют с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100, включающей четвертичный насос, автосамплер, печь для колонки и диодно-матричный детектор в сочетании с одним квадрупольным масс-спектрометром Waters ZQ. Так же для всех соединений используют колонку с обращенной фазой Waters Xselect CSH C18, 2,1 мм x 50 мм, размер частиц 3,5 мкм, и соединяют с предохранительной колонкой Waters VanGuard CSH C18, 2,1 мм x 5 мм, размер частиц 3,5 мкм, и фильтром колонки inline, Waters Acquity, 0,2 мкм. Колонку используют при скорости потока 1 мл/мин, поддерживаемую при 60°C. Используемыми растворителями являются 0,17 % муравьиной кислоты в смеси 95% ацетонитрила, 5% воды (растворитель В) и 10 мМ формиат аммония, 0,2% муравьиной кислоты в воде (растворитель А), со следующим градиентом: 5% растворителя В от 0 до 0,2 мин, 5-50% растворителя В от 0,2 до 9,3 мин, 50-95% растворителя В от 9,3 до 9,5 мин, 95% растворителя В от 9,5 до 11 мин, 95-5% растворителя В от 11 до 11,05 мин и восстановление равновесия 5% растворителя В от 11,05 до 11,5 мин. Используют азот в качестве вспомогательного и защитного газа. Источник напряжения устанавливают на 3400 В, устанавливают напряжение на конусе 31 В с газовым потоком 50 л/час, скорость потока осушающего газа 550 л/час и температуру осушающего газа 350°C.

Анализ соединений - растворимость и устойчивость в растворе.

Метод анализа В.

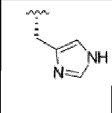
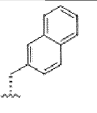
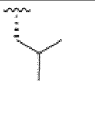
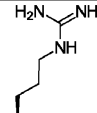
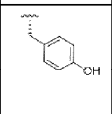
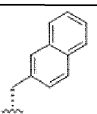
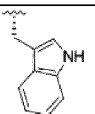
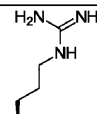
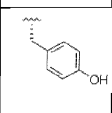
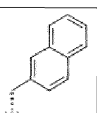
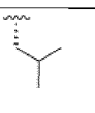
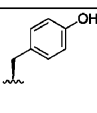
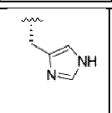
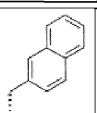
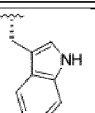
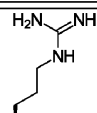
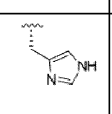
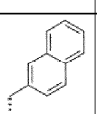
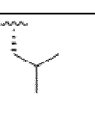
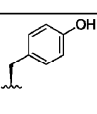
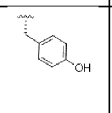
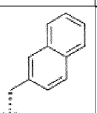
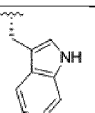
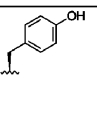
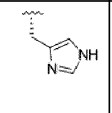
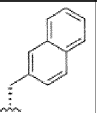
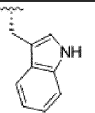
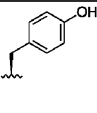
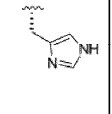
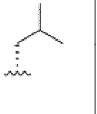

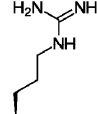
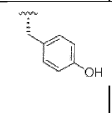
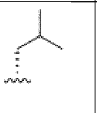
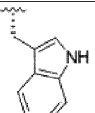
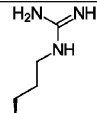
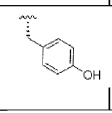
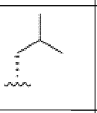

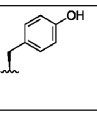
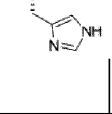
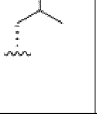
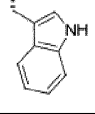
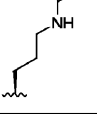
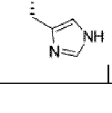
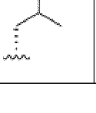
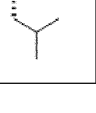
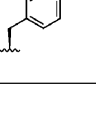
Для анализа на растворимость и устойчивость соединения растворяют (0,2 мг/мл) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, 10 мМ, рН 7,4) и встряхивают при комнатной температуре в течение 20 минут. Берут образец T = 0 (80 мкл) и центрифугируют при 14000 об/мин в течение 3 минут и затем анализируют по методу анализа А, описанному выше. Массу образцов помещают в Techne Roller-Blot HB-3D Rolling Hybridiser при 37°C и извлекают только тогда, когда берут образец (80 мкл) в моменты времени T = 4, 24 и 96 часов. Образцы центрифугируют при 14000 об/мин в течение 3 мин и затем анализируют ВЭЖХ-DAD-МС, как описано выше. Регистрируют площадь UV под кривой при 280 нм в каждый момент времени.

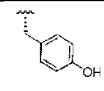

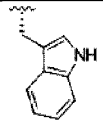
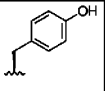
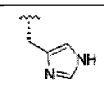

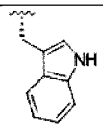
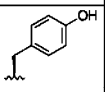
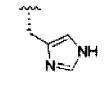
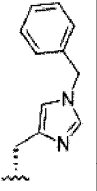

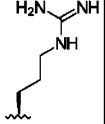
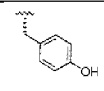
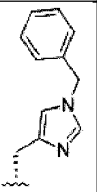

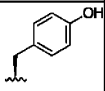
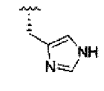
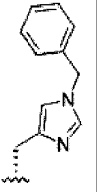
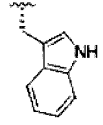
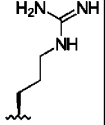
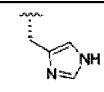
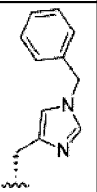

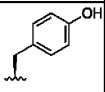
## Примеры

Пример 1. Синтез соединений.

Соединения по изобретению получают согласно способам, изложенным в разделе "Общий метод синтеза".

Номер соединения	R1	R2	R3	R4	R5	Метод синтеза
6					Et	A
8					Et	A
9					Et	A
10					Et	A
11					Et	A
12					Et	A
13					Et	A
14					CH <sub>2</sub> CON H <sub>2</sub>	B
16					CH <sub>2</sub> CON H <sub>2</sub>	B
20					CH <sub>2</sub> CON H <sub>2</sub>	B

23					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
24					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
25					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
27					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
28					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
30					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
33					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	B
42					Et	A
44					Et	A
45					Et	A
47					Et	A
48					Et	A

49					Et	A
50					Et	A
56					Et	A
59					Et	A
60					Et	A
61					Et	A

62					Et	A
63					Et	A
64					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	
65					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	
66					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	
67					Et	
68					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	



Номер соединения	Солевая форма	Время удерживания (метод анализа А)	m/z (метод анализа А)
6	ТФК	4,15	1213,8
8	ТФК	5,5	1312,7
9	ТФК	6,64	1246,8
10	ТФК	4,27	1286,9
11	ТФК	5,35	1220,9
12	ТФК	6,75	1319,7
13	ТФК	5,53	1293,7
14	ТФК	6,13	1318,7
16	ТФК	4,93	1292,8
20	ТФК	4,02	1358,9
23	ТФК	4,79	1296,7
24	ТФК	5,84	1395,7
25	ТФК	7,19	1329,6
27	ТФК	4,91	1369,6
28	ТФК	5,92	1303,8
30	ТФК	7,20	1402,7
33	ТФК	6,00	1376,4
42	ТФК	3,90	1183,8
44	ТФК	5,23	1282,8
45	ТФК	6,35	1216,8
47	ТФК	4,00	1256,8
48	ТФК	5,12	1190,8
49	ТФК	6,56	1290,0
50	ТФК	5,30	1263,7
56	ТФК	3,42	1297,7
59	ТФК	5,22	1330,8
60	ТФК	3,81	1370,6
61	ТФК	4,36	1304,7
62	ТФК	5,60	1403,5
63	ТФК	4,69	1377,7
64	ТФК	6,19	1391,7
65	ТФК	5,09	1366,0
66	ТФК	4,92	1384,7
67	ТФК	4,47	1396,9
68	ТФК	3,83	1285,8

Пример 2. Анализ на растворимость.

Растворимость соединений по изобретению проверяют так, как описано в общих методах. Затем растворимость классифицируют согласно шкале от 1 до 5, где 1 означает наибольшую растворимость и 5 означает наименьшую растворимость.

Номер соединения	Классификация растворимости
Ацетат бусерелина	1
Ацетат трипторелина	2
Ацетат наферелина	2
Ацетат гистрелина	4

Ацетат лейпрорелина	2
Бусерелин-ТФК	2
Трипторелин-ТФК	2
Наферелин-ТФК	1
Гистрелин-ТФК	2
Лейпрорелин-ТФК	1
6	1
8	2
9	1
10	1
11	1
12	4
13	3
14	4
16	2
20	3
23	1
24	5
25	4
33	2
30	1
28	2
27	1
56	1
67	1
59	4
63	5
62	5
61	3
60	2
42	1
44	2
45	2
50	1
49	4
48	2
47	1
68	1
66	5
14	4
65	4
64	5
16	2
20	3

Пример 3. Анализ на устойчивость.

Устойчивость соединений по изобретению в водных средах (PBS, pH 7,4) проверяют так, как описано в общих методах. Затем устойчивость классифицируют по шкале, где  $t_{1/2} > 96$  минут показано как "+", и устойчивость меньше этого показана как "-".

Номер соединения	Классификация устойчивости
6	+
8	+
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
16	+
20	+
23	+
24	-
25	-
33	-
30	=
28	+
27	+
56	+
67	-
59	-
63	-
62	-
61	+
60	+
42	+
44	+
45	+
50	+
49	+
48	+
47	+
68	+
66	+
14	+
65	+
64	-
16	+
20	+

Пример 4. Стимуляция GnRH R.

Способность соединений по изобретению стимулировать GnRHR оценивают, используя анализ на кальций с клетками CHO-K1 (Genscript), см. подробности в общих методах. Затем регистрируют активность как стимуляцию в процентах при 1 мкМ.

Номер соединения	Стимуляция GnRHR при 1 мкМ
Бусерелин	94
Лейпрорелин	107 (n=2)
Госерелин	99

Гонадорелин	102
Нафарелин	100 (n=2)
6	88
8	86
9	78
10	81
11	76
12	80
13	87
14	78
16	76
20	75
23	106
24	87
25	82
33	67
30	12
28	95
27	108
56	96
67	117
59	85
63	77
62	77
61	112
60	102
42	102
44	111
45	105
50	105
49	77
48	118
47	119
68	86
66	83
14	78
65	72
64	50
16	76
20	75

#### Ссылки

1. Gonadotropin secretion and its control. Fink G., The physiology of reproduction, 1998.
2. Immunomodulatory actions of gonadal steroids may be mediated by gonadotropin-releasing hormone. Jacobson J. D. and Ansari M. A., Endocrinology, 2004; 145(1): 330-6.
3. Unusual morphologic features of uterine leiomyomas treated with gonadotropin-releasing hormone agonists: massive lymphoid infiltration and vasculitis. McClean G. and

McCluggage W. G., Int. J. Surg. Pathol., 2003; 11(4): 339-44.

4. Massive lymphocytic infiltration of uterine leiomyomas associated with GnRH agonist treatment. Bardsley V. et al., Histopathology, 1998; 33(1): 80-2.

5. Chronic plasma cell endometritis in hysterectomy specimens of HIV-infected women: a retrospective analysis. Kerr-Layton J. A. et al., Infect. Dis. Obstet Gynecol., 1998; 6(4): 186-90.

6. Serum dihydrotestosterone and testosterone concentrations in human immunodeficiency virus-infected men with and without weight loss. Arver S. et al., J. Androl. 1999; 20(5): 611-8.

7. Prevalence of endocrine dysfunction in HIV-infected men. Brockmeyer G. et al., Horm. Res., 2000; 54(5-6): 294-5.

8. Gonadotropin-releasing hormone increases CD4-T-lymphocyte numbers in an animal model of immunodeficiency. Jacobson J. D. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 1999; 104: 653-8.

9. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. White et al., PNAS 1998; Jan 6; 95(1): 305-9.

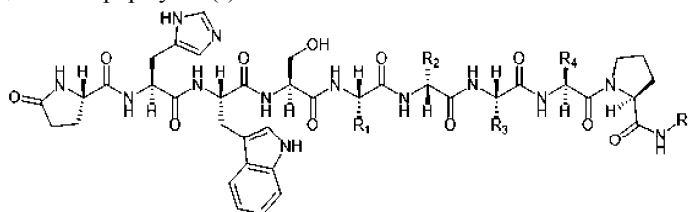
10. A transcriptionally active human type II gonadotropin-releasing hormone receptor gene homolog overlaps two genes in the antisense orientation on chromosome 1q.12. Morgan et al., Endocrinology, 2003 Feb; 144(2): 423-36.

11. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists. Eidne et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1987 Mar; 64(3): 425-32.

Все ссылки, относящиеся к настоящей заявке, включая патент и заявки на патент, включены полностью в настоящее описание в качестве ссылок.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение соединения формулы (I)



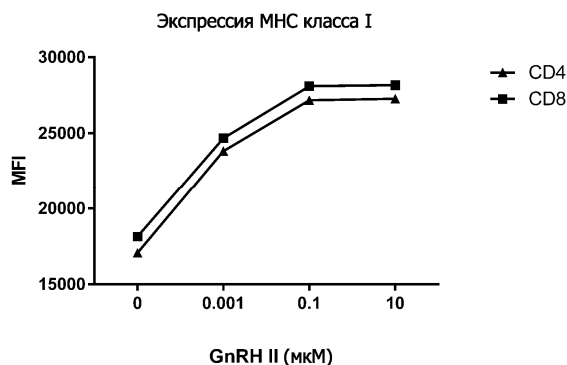
(I)

где соединение выбрано из

Соединение по.	R1	R2	R3	R4	R5
13					Et
13. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Ser(tBu)-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
33					CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
33. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Nal-Trp-Tyr-Pro-Gly-амид					
50					Et
50. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Leu-Trp-Tyr-Pro-NHEt					
63					Et
63. pGlu-His-Trp-Ser-His-D-Bhi-Trp-Tyr-Pro-NHEt					

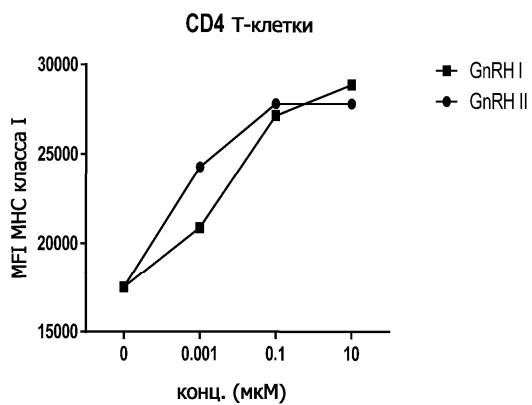
или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака путем стимулирования иммунной системы путем связывания с рецептором GnRH типа II на Т-клетках, и

где рак выбирают из рака надпочечников, рака ануса, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, опухолей головного мозга/ЦНС, рака толстой/прямой кишки, рака пищевода, рака глаза, рака желчного пузыря, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани и гипофарингеального рака, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротовой полости и орофарингеального рака, остеосаркомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, Меркель-клеточного рака кожи, рака тимуса, саркомы матки, макроглобулинемии Вальденстрема, или опухоли Вильмса.

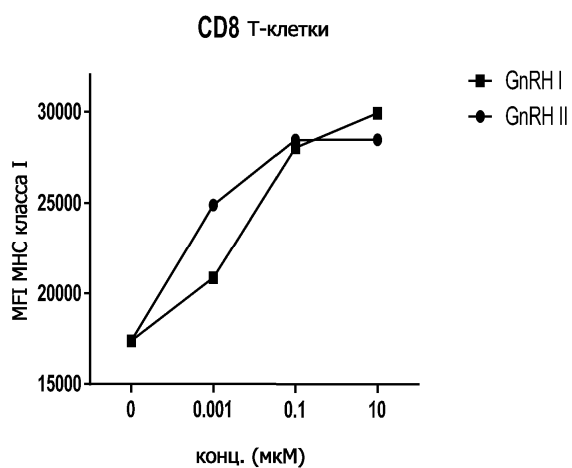


Фиг. 1

045183

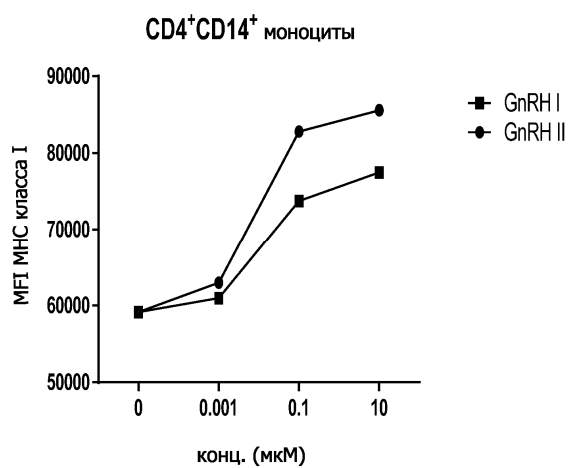


**A**

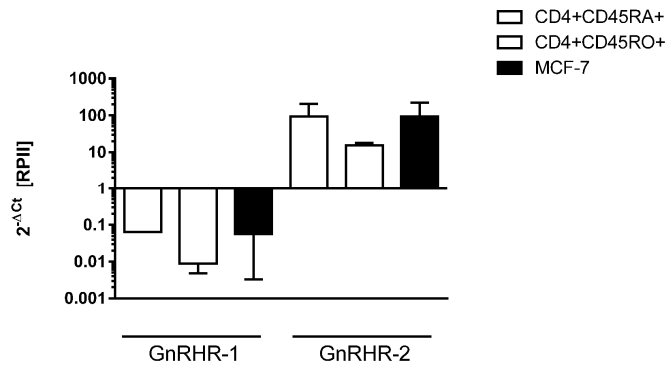


**B**

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

