

Hormone  
waren die  
ersten Wachs-  
tumsfaktoren,  
die als  
unfreiwillige  
Helfer  
des Krebses  
enttarnt wer-  
den konnten.

Erste klinisch im Einsatz befindliche Peptid-Derivate sowie neue Peptidmimetica und das wachsende Verständnis für die räumliche Struktur des Rezeptors lassen eine neue Generation von klinisch wirksamen LHRH-Antagonisten erwarten.

# Chemie und Molekularbiologie bei der Suche nach neuen LHRH-Antagonisten

**Bernhard Kutscher,\* Michael Bernd, Thomas Beckers, Emmanuel E. Polymeropoulos und Jürgen Engel**

*Professor Heribert Offermanns zum 60. Geburtstag gewidmet*

Hormone – und hier besonders die Geschlechtshormone – waren die ersten Wachstumsfaktoren, die als unfreiwillige Helfer des Krebses enttarnt wurden. Der Brustkrebs der Frau und das Prostatacarcinom des Mannes sind die bekanntesten der als hormonabhängig geltenden Tumore. Ein Blick in die Krebsstatistik zeigt, daß der Brustkrebs nach wie vor die häufigste Tumorerkrankung der Frau ist; beim Mann spielt im fortgeschrittenen Alter das

Prostatacarcinom eine ähnlich dominierende Rolle. Die operative Ausschaltung der Hauptproduktionsstätten der Geschlechtshormone Östrogen und Testosteron durch Entfernung der Eierstöcke bzw. durch Kastration sind altbekannte und oft effektive, wenn auch wegen der psychischen Belastung durch solche Eingriffe problematische Therapien. Die moderne Hormontherapie beim fortgeschrittenen Brustkrebs und Prostatacarcinom versucht, dem Patienten

solche unwiderruflichen operativen Eingriffe so lange wie möglich zu ersparen: durch Hormon-Antagonisten, z. B. LHRH-Antagonisten, die das eigentliche Hormon an der Entfaltung seiner wachstumsfördernden Wirkung hindern.

**Stichworte:** Cytostatica · Konformationsanalyse · LHRH-Antagonisten · Peptidmimetica · Rezeptoren

## 1. Einleitung

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Gonadorelin (synonym mit LHRH (luteinizing hormon-releasing hormon) sowie mit Gonadoliberin) spielt mit seinem spezifischen Rezeptor eine zentrale Rolle in der Neuroendokrinologie.<sup>[1]</sup> Das Decapeptid LHRH, entdeckt von A. Schally und R. Guillemin,<sup>[2]</sup> wird in den Zellkörpern hypothalamischer Neuronen gebildet und pulsatil in die Blutbahn sekretiert. Es stimuliert die Ausschüttung der geschlechtsspezifischen Sexualhormone in Testes und Eierstöcken. Intensive Forschung führte zur Erkenntnis, daß spezifische Rezeptoren für LHRH und synthetische Analoga auch in der Hirnanhangdrüse und anderen Geweben (z. B. Tumorzellen)<sup>[3]</sup> sowie in Organen vorhanden sind.

Drei Konzepte der therapeutischen Anwendung haben sich herauskristallisiert. Erstens die Wiederherstellung der normalen Physiologie durch die Gabe von LHRH über Infusionspumpen, um infertile Männer und Frauen mit fehlgesteuerter endogener LHRH-Sekretion zur Fruchtbarkeit zu verhelfen, und zweitens

die Verwendung langanhaltender LHRH-Agonisten, die in Depotform zu einer Desensibilisierung der hypophysären Rezeptoren und damit zu einer Unterbrechung der Signalkaskade führen. Folge ist die biochemische „Kastration“, die gerade bei hormonabhängigen Erkrankungen, wie Prostatakrebs, Brustkrebs und Endometriose, neue Therapiemöglichkeiten eröffnet. Obwohl Superagonisten allgemein gut vertragen werden, ist deren Nachteil ein initialer Stimulus der Hormonsekretion (Östrogen, Testosteron), bevor es zu einer Rezeptorverarmung oder „Down“-Regulierung und einer kurzfristigen Verschlimmerung des Krankheitsbildes kommt.<sup>[4]</sup> Dies hat zur Entwicklung des dritten Konzepts, der Verwendung von LHRH-Antagonisten, geführt.<sup>[5]</sup> Bisher wurden weltweit ca. 5000 LHRH-Analoga synthetisiert und in vitro oder in vivo getestet.<sup>[6a–c]</sup> Während LHRH-Agonisten bereits seit etwa zehn Jahren am Markt sind (siehe Abschnitt 2), befinden sich die am weitesten entwickelten LHRH-Antagonisten noch immer in der Phase der klinischen Erprobung<sup>[7]</sup> (Abb. 1).

In Ergänzung bereits vorliegender Übersichten zu LHRH-Agonisten und -Antagonisten<sup>[8–10]</sup> berücksichtigt dieser Beitrag nicht nur aktuelle Entwicklungen in der Synthese, sondern auch solche hinsichtlich der Etablierung des humanen Rezeptors zur spezifischen Charakterisierung von Wirkstoffen sowie gegenwärtige Ansätze und Fortschritte bei der Suche nach und der Entwicklung von Peptidmimetica.

[\*] Prof. Dr. B. Kutscher, Dr. M. Bernd, Dr. T. Beckers, Dr. E. E. Polymeropoulos, Prof. Dr. J. Engel  
ASTA Medica AG, Konzernforschung  
Weismüllerstraße 45, D-60315 Frankfurt  
Telefax: Int. + 69/4001-2628  
E-mail: Dr\_Bernhard.Kutscher@astamedica.de

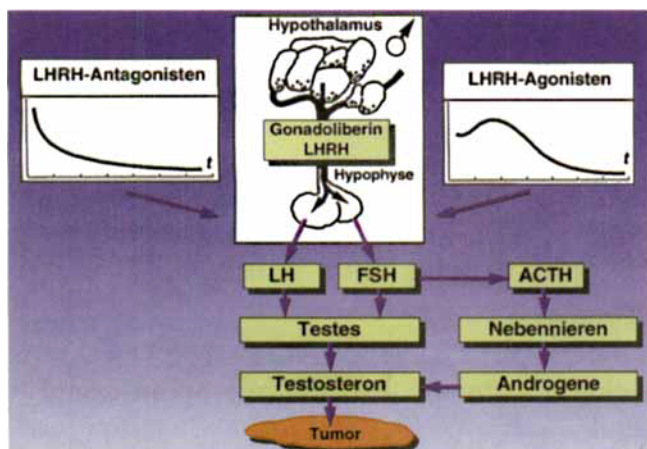


Abb. 1. Antitumorwirkung von LHRH-Agonisten und -Antagonisten beim Mann. FSH = Follikel-stimulierendes Hormon, ACTH = adrenocorticotropes Hormon.

## 2. LHRH-Peptide als Therapeutica

### 2.1. Agonisten

Die ersten Jahre nach der Entdeckung des Gonadorelins waren gekennzeichnet durch die Suche nach stärker wirksamen Agonisten, weil deren therapeutisches Potential beispielsweise als Antitumorwirkstoffe oder in der Gynäkologie offensichtlich war.<sup>[5, 11]</sup> Solche „Superagonisten“ bewirken letztlich sehr effizient eine reversible Unterdrückung der Freisetzung von Steroid-Sexualhormonen. Allen modernen Superagonisten ist der Austausch von Glycin<sup>6</sup> im nativen LHRH gegen andere, immer D-konfigurierte Aminosäuren gemeinsam; einige weisen C-terminal statt Glycinamid einen Ethylamidrest (Buserelin, Leuprorelin) oder Azaglycinamid (Goserelin) auf. In allen klinisch relevanten Superagonisten sind acht von zehn Aminosäuren der

Bernhard Kutscher, geboren 1957, promovierte 1984 nach dem Chemiestudium an der Universität Frankfurt bei Prof. H. Kessler auf dem Gebiet der Peptidsynthese. anschließend wechselte er zur Degussa AG als Laborleiter in der Abteilung Forschung Pharmazeutische Chemie. Seit 1987 leitet er die Abteilung Chemische Forschung Wirkstoffe der ASTA Medica AG, heute die Chemische Forschung. Seit 1992 ist er Lehrbeauftragter an der Technischen Universität München und wurde 1996 zum Honorarprofessor ernannt. Seine Arbeitsgebiete umfassen die Synthese von Peptiden, Phospholipiden und Heterocyclen, die Syntheseautomation sowie die kombinatorische Chemie.



M. Bernd

B. Kutscher

J. Engel

T. Beckers

E. E. Polymeropoulos

Michael Bernd, geboren 1954, schloß sein Chemiestudium an der Universität Frankfurt 1983 mit der Promotion bei Prof. H. Kessler ab. 1984 trat er in die Degussa AG als Laborleiter in der Abteilung Organische Forschung ein, wechselte 1989 zur ASTA Medica AG, wo er als Laborleiter in der Abteilung Chemische Forschung Tumor für die Peptidsynthese verantwortlich ist.

Thomas Beckers, geboren 1961, studierte Biologie mit Schwerpunkt Biochemie an der Universität Frankfurt. Seine Diplomarbeit fertigte er am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt an. Nach der Promotion 1986 bei Prof. J. Engels, Universität Frankfurt, auf dem Gebiet der Molekularbiologie und einem Postdoktorandaufenthalt am Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School in der Arbeitsgruppe von Dr. B. Seed, Boston, wechselte er 1991 zur ASTA Medica AG als Laborleiter in den Bereich Tumorforschung.

Emmanuel E. Polymeropoulos, geboren 1943 in Athen, promovierte 1973 in Physikalischer Chemie an der Rutgers University, New Jersey (USA). Von 1974 bis 1980 war er wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kuhn am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen und anschließend bis 1984 wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Brickmann am Institut für Physikalische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt. Nach einem anderthalbjährigen Aufenthalt in der Abteilung für Physik des Forschungsinstituts „Demokritos“ in Athen ist er seit 1986 bei der ASTA Medica AG für Computeranwendungen in der Abteilung Chemische Forschung verantwortlich.

Jürgen Engel, geboren 1945, absolvierte ein Ingenieurstudium an der Naturwissenschaftlich-technischen Akademie in Isny und begann 1969 mit dem Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Braunschweig. 1979 promovierte er am Institut für Organische Chemie der Universität Braunschweig bei Prof. Dr. H. H. Inhoffen. 1976 bis 1981 war er Laborleiter in der Abteilung Chemische Forschung Wirkstoffe der ASTA Medica AG, 1981 Leiter der Forschungskoordination und 1982 zusätzlich Leiter der Abteilung Chemische Forschung Wirkstoffe. 1987 übernahm er die Hauptabteilung Chemische Forschung/Pharmazeutische Entwicklung und ist seit 1993 Leiter des Zentralbereichs Forschung und Entwicklung der ASTA Medica AG. Seit 1981 hat er einen Lehrauftrag an der Universität Regensburg, er habilitierte 1985 und wurde 1990 zum Professor ernannt. Im Mai 1993 wurde er als Honorarprofessor an die Technische Universität Dresden berufen und ist seit 1996 Vorsitzender der Fachgruppe „Medizinische Chemie“ der GDCh.



Tabelle 1. Struktur von LHRH und am Markt befindlichen LHRH-Agonisten (angegeben sind bei diesen nur die gegenüber LHRH veränderten Aminosäurereste).

Name (Firma)	1	2	3	4	5	Struktur	6	7	8	9	10
LHRH	Glp[a]	His	Trp	Ser	Tyr	Gly		Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>
Buserelin (Hoechst)						D-Ser( <i>t</i> Bu)					Gly-NHEt
Nafarelin (Syntex)						D-(2)Nal					
Leuprorelin (Abbott, Takeda)						D-Leu					Gly-NHEt
Goserelin (Zeneca)						D-Ser( <i>t</i> Bu)					Azagly-NH <sub>2</sub>
Histreltin (Ortho)						D-His(Bzl)					Gly-NHEt
Triptorelin (Ferring)						D-Trp					

[a] Glp = Pyroglutaminsäure.

LHRH-Sequenz konserviert; durch Tausch in maximal zwei Positionen wird die relative biologische Wirkung, beispielsweise die Hormonsuppression bei Tumorpatienten, bis zu einem Faktor von 100 bei subcutaner Applikation gesteigert.<sup>[5, 11, 12a]</sup> Tabelle 1 faßt die wichtigsten derzeit am Markt befindlichen Derivate zusammen. Buserelin<sup>INN</sup> (Profact, Suprecur), Leuprorelin<sup>INN</sup> (Carcinil, Enatone), Triptorelin<sup>INN</sup> (Decapeptyl) und Goserelin<sup>INN</sup> (Zoladex) (Handelsnamen in Deutschland) sind die umsatzstärksten Produkte; weltweit wurden mit diesen Peptiden im Jahre 1994 entsprechende Wirkstoff-Formulierungen im Wert von ca. zwei Milliarden DM umgesetzt; davon über die Hälfte allein von den Firmen Abbott und Takeda mit Leuprorelin. Für die Jahrtausendwende wird ein Gesamtmarktvolumen von etwa 2.4 Milliarden DM für alle LHRH-Indikationen erwartet.<sup>[12b]</sup>

Die jährlichen Produktionsmengen von Peptid-Arzneimitteln liegen in den Größenordnungen von unter 100 kg bei Buserelin und deutlich über 100 kg beim Marktführer Leuprorelin. Die Wirkstoffe werden in dieser Größenordnung nur durch klassische organische Synthese per Fragmentkondensation in Lösung hergestellt. Bei der Firma Hoechst z. B. wird das Nonapeptid Buserelin aus den Bausteinen Glp-His, Trp-Ser-Tyr und D-Ser(*t*-Bu)-Leu-Arg-Pro-NHEt synthetisiert, wobei das N-terminale Dipeptid nach Kupplung von Tri- und Tetrapeptidbaustein zum entsprechenden C-terminalen Heptapeptid zur Gesamtsequenz kondensiert wird. Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Peptidsynthese im technischen Maßstab ist die Beherrschung der jeweiligen physikochemischen Prozeßparameter wie Konzentrationen, Präzipitationen, Separationen, Reaktionstemperaturprofile und Aufreinigungstechniken, welche sich naturgemäß gravierend von denen im Labormaßstab unterscheiden.<sup>[13a]</sup>

## 2.2. Antagonisten

Allen Superagonisten ist als intrinsische Aktivität die anfängliche vorübergehende Stimulation der Gonadotropin-Freisetzung gemein. Zur Vermeidung dieses therapeutisch kontraproduktiven Effekts wurde bald nach der Etablierung von hochaktiven Agonisten auch nach entsprechenden Antagonisten gesucht, die diese initiale Hormonausschüttung nicht bewirken. Ein letztes großes Hindernis für den klinischen Einsatz von hochwirksamen Antagonisten war das immanente anaphylaktische Potential dieser Peptide.

Ausgehend von der Sequenz des nativen LHRH wurden in rascher Folge alle Positionen der Peptidkette auf ihren jeweili-

gen Beitrag zur biologischen Wirkung unter Berücksichtigung der Nebenwirkungen studiert. Die nachhaltigsten frühen Verbesserungen antagonistischer Aktivität ergaben sich mit D-Phe<sup>2</sup> statt Histidin, mit D-Aminosäuren in Position 6 statt Gly<sup>6</sup> und mit D-Ala<sup>10</sup> statt des C-terminalen Glycins. Die schrittweise weitere Optimierung führte zu dem inzwischen bei allen modernen Antagonisten üblichen Schema einer Abfolge von D-Nal<sup>1</sup>-D-Phe(4-Cl)<sup>2</sup>-D-Pal<sup>3</sup> (Nal = 2-Naphthylalanin, Pal = 3-Pyridylalanin) als hydrophobem Cluster sowie immer zu einer D-konfigurierten aromatischen oder aliphatischen, jedoch hydrophilen Aminocarbonsäure<sup>6</sup> und der C-terminalen hydrophilen Sequenz Xxx<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>, bei der Xxx entweder Arginin oder Isopropyllysin ist. Die schrittweise Optimierung ist in mehreren Übersichtsartikeln ausgezeichnet dokumentiert.<sup>[14, 15]</sup>

Antagonisten der zweiten Generation bewirkten im Tierexperiment vorübergehende Ödembildung in Gesicht und Extremitäten infolge z. T. erheblicher Histaminfreisetzung durch Mastzellendegranulation. Beobachtet wurden ferner Cyanosen und eine Beeinträchtigung der Atmung.<sup>[16]</sup> Als Ursache für diese intolerablen Nebeneffekte wurde die Kombination von D-Arginin in Position 6 mit den drei aromatischen Aminosäuren im N-Terminus der Sequenzen angesehen.<sup>[17]</sup> Für die gewünschte biologische Potenz von Antagonisten ist unter anderem eine (*R*)-konfigurierte basische Aminosäure in Position 6 notwendig; der Durchbruch zu nebenwirkungsfreien hochaktiven Antagonisten gelang A. V. Schally mit den Derivaten SB-75 (INN: Cetrorelix) und SB-88 durch Einbau von hydrophilen, nicht-basischen Aminosäuren mit Carbamoylfunktion in den Seitenketten (D-Citrullin<sup>6</sup> (D-Cit<sup>6</sup>), D-Homocitrullin<sup>6</sup>).<sup>[17]</sup> Die biologische Wirkung solcher von nennenswertem anaphylaktischen Potential freien Sequenzen ist ausschließlich auf solche mit (*R*)-konfigurierten Aminosäuren in Position 6 beschränkt; Peptide mit L-Citrullin<sup>6</sup> sind vermutlich wegen des raschen enzymatischen Abbaus in vivo nahezu unwirksam<sup>[18]</sup> (Abb. 2).

Cetrorelix wird heute ausschließlich und mittlerweile im Kilogramm-Maßstab durch klassische Fragmentkondensation in Lösung gewonnen. Zwei langjährig optimierte und detailliert ausgearbeitete konvergente Synthesestrategien führen wahlweise über das N-terminale Tripeptid D-Nal<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal<sup>3</sup> oder das C-terminale Tripeptid Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup> und die jeweils komplementären Heptapeptide Ser<sup>4</sup>-D-Ala<sup>10</sup> bzw. D-Nal<sup>1</sup>-Leu<sup>7</sup> zum geschützten Decapeptid mit *tert*-Butyl-Seitenketten-schutz, an dessen salzsaure Entfernung die Endreinigung durch präparative HPLC anschließt. Die für die biologische Aktivität und zur Vermeidung raschen enzymatischen Abbaus notwendige C- und N-terminale Funktionalisierung des acetylierten De-

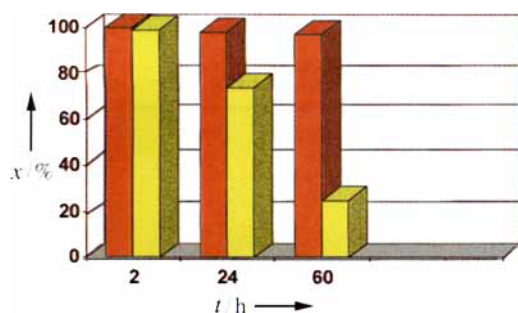


Abb. 2. Stabilität von [D-Cit<sup>6</sup>]SB-75 (Cetrorelix; rot) und [L-Cit<sup>6</sup>]SB-75 (gelb) unter dem Einfluß von Humanserum (HPLC-Peptidgehalt x[%] über 60 h).

capeptidamids wird bereits auf der Stufe der terminalen Tripeptide durch Acetylierung der freien  $\alpha$ -Aminogruppe von Naphtylalanin<sup>1</sup> mit Acetylhydroxysuccinimid bzw. durch Verseifung des endständigen Alaninmethylesters mit Ammoniak in Methanol erreicht.<sup>[13b, c]</sup>

Folkers et al. gelang die sukzessive Verbesserung von aktiven Antagonisten durch konsequente und systematische Modifikationen sowohl in der jeweiligen Sequenzposition als auch von Seitenkettensubstitutionen; die besten Erfolge wurden mit komplexen Substituenten in den Positionen 5, 6 und z. T. 8 erzielt. Ausgehend von Antide, einem hochpotenten, aber schlecht wasserlöslichen Decapeptid mit Nicotinoyl(Nic)-substituiertem Lysin<sup>5</sup> oder mit D-Lysin<sup>6</sup> (Schema 1), wurden die Analoga [Lys(Pic)<sup>5</sup>, D-Lys(6ANic)<sup>6</sup>]Antide = Nictide, [D-3-Qal<sup>1</sup>, c-PzAC-Ala<sup>5</sup>, D-Lys(Pic)<sup>6</sup>, Arg<sup>8</sup>]Antide = Argide und [Lys(Pic)<sup>5</sup>, D-Lys{Sar(Pic)}<sup>6</sup>]Antide = Sartide synthetisiert und hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung charakterisiert<sup>[19–23]</sup> (Pic = Picolinoyl, 6ANic = 6-Aminonicotinoyl, c-PzACAla = *cis*-3-(4-Pyrazinylcarbonylamino-cyclohexyl)alanin, Qal = 3-(3-Chinoly)alanin, Sar = Sarcosin = *N*-Methylglycin).

Flouret et al. berichteten über 104 Analoga von Antide, dessen klinischer Einsatz wegen ungünstiger Löslichkeitseigenschaften stark beeinträchtigt ist. Beschrieben wird der Austausch der Antide-typischen Nicotinoylgruppe gegen eine Vielzahl anderer Acylsubstituenten und der von Lysin gegen andere kurzkettige Aminosäuren wie 2,3-Diaminopropionsäure oder 2,4-Diaminobuttersäure sowie die biologische Wirkung in Abhängigkeit der Modifikationen.<sup>[9]</sup> Xiao et al. synthetisierten einige wirksame Antagonisten (Tx-Serie) mit nichtnatürlichen Aminosäuren in den Positionen 5 und 6; die aktivste Sequenz Tx-44 enthält statt Tyrosin<sup>5</sup> die von Phenylalanin abgeleitete Aminosäure 4-(Morpholinomethyl)phenylalanin (Mop).<sup>[24–26]</sup> Entscheidende Beiträge lieferten Rivier et al., deren Optimierungen zum Decapeptid Azalin mit neuartigen Modifikationen in Position 5 und 6 führten, wo sich aminotriazolsubstituiertes *p*-Aminophenylalanin bzw. Lysin befinden.<sup>[27, 28]</sup> Azalin B dürfte zu den derzeit aktivsten Antagonisten weltweit gehören. Den aktuellen Stand der Arbeiten bei der „Azalin-B-Familie“ dokumentierte Rivier in einer Übersicht.<sup>[29]</sup>

Einen interessanten Ansatz zur Auffindung von gut wasserlöslichen Antagonisten publizierten Roeske et al.<sup>[30]</sup> Synthetisiert wurden Decapeptide mit seitenkettenmodifizierten D-Glu<sup>6</sup>- sowie D-Lys<sup>6</sup>-Derivaten, wobei stark polare und hydrophile Gruppen, z. B. Taurin, verwendet wurden. Die höchste antiovulatorische Aktivität (AOA) wurde bei D-Lys<sup>6</sup>-Substitution mit

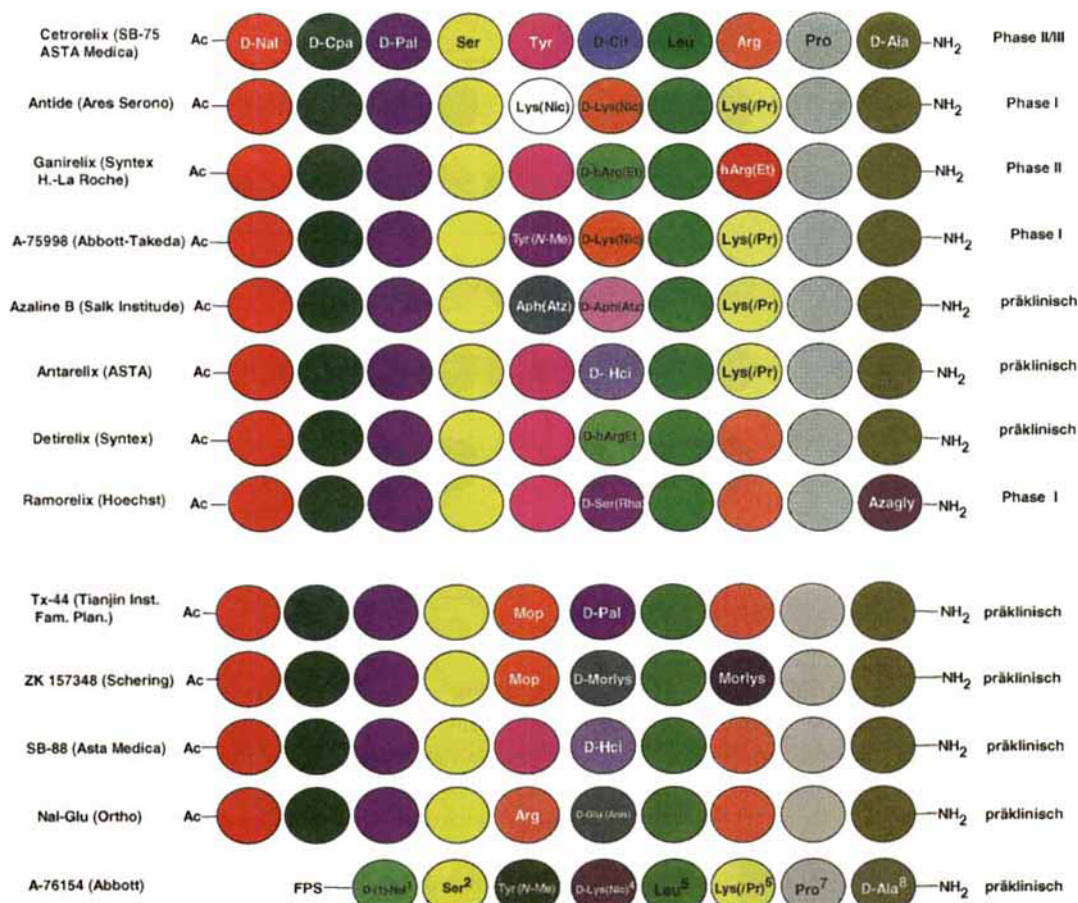
Gulonsäure und D-Glu<sup>6</sup>-Substitution mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) erhalten (75 bzw. 50% AOA, 1  $\mu$ g, Rattenmodell). Deghenghi beschrieb ein hochaktives Decapeptid mit minimaler Histaminfreisetzung und guter Wasserlöslichkeit. Dieses Antarelix benannte Peptid unterscheidet sich von SB-75 (Cetrorelix) durch den Austausch von D-Citrullin<sup>6</sup> gegen D-Homocitrullin<sup>6</sup> und von Arginin<sup>8</sup> gegen Isopropyllysin<sup>8</sup>.<sup>[31, 32]</sup> Durch die Verwendung von Lys(iPr)<sup>8</sup> kann das Histaminfreisetzungspotential weiter verringert werden.

Die Firma Organon bearbeitet nach Lizenznahme den ursprünglich von der Firma Syntex stammenden Antagonisten Ganirelix (RS-26306), ein Decapeptid mit neuartigen alkylmodifizierten D-Aminosäuren und D-Homoarginin-Bausteinen in Position 6 und 8.<sup>[33]</sup> Die Entwicklung einer ähnlichen Vorstufe namens Detirelix ([Arg<sup>8</sup>]Ganirelix) war von Syntex eingestellt worden. Ramorelix (HOE 013) der Firma Hoechst ist ein Peptid-Antagonist mit dem löslichkeitsverbessernden Zucker-Aminosäurebaustein *O*- $\alpha$ -L-Rhamnosyl-D-Serin<sup>6</sup>, seine biologische Aktivität ist für eine klinische Verwendung als Antitumorwirkstoff jedoch möglicherweise unzureichend.<sup>[34, 35]</sup> Die Firma Schering bearbeitete ebenfalls Peptid-Antagonisten mit nicht-proteinogenen Aminosäuren, wie  $\epsilon$ -dialkylierten Lysinresten oder Benzodiazepin-Aminocarbonsäuren.<sup>[36, 37]</sup> ZK-157348 enthält *N*-6-Morpholinolysin in den Positionen 6 (D-Morlys) und 8 (L-Morlys); biologische Daten wurden nicht veröffentlicht. Ein interessanter Ansatz zur Herstellung oral verfügbarer LHRH-Antagonisten wird von der australischen Firma Biotech Pty. verfolgt, die sich mit der Synthese von Antide-Vitamin-B<sub>12</sub>-Konjugaten beschäftigt. Die Derivate ähneln in ihrer In-vitro- und In-vivo-Wirkung Antide, sind aber erheblich besser wasserlöslich und somit parenteral applizierbar.<sup>[38, 39]</sup> In Schema 1 sind relevante Derivate sowie bekannte Kandidaten für die Weiterentwicklung zusammengestellt.

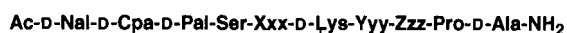
Die Suche nach Peptiden und Peptidmimetica der nächsten, d. h. der „vierten“ Generation mit verbesserter pharmakologischer Wirkung hält weltweit unvermindert an. Außer der klassischen Indikation der Therapie hormonabhängiger Tumore lassen sich mit LHRH-Antagonisten auch nichtmaligne Gewebsveränderungen, z. B. Uterus-Myom oder die benigne Prostata-Hyperplasie (BPH) mit Aussicht auf Erfolg behandeln. In der modernen Reproduktionsmedizin haben LHRH-Antagonisten signifikante Vorteile gegenüber den bisher ausschließlich angewendeten Agonisten.

Die hochaktiven Decapeptide SB-88 und SB-75 (Cetrorelix)<sup>[40]</sup> werden heute in mehreren Laboratorien als Leitstrukturen zur Auffindung stabiler, gut wasserlöslicher Derivate mit lang andauernder In-vivo-Aktivität verfolgt. Bei Peptid-Antagonisten sucht man Cetrorelix-Analoga mit Modifikationen speziell in den Positionen 5, 6 und 7. Dort werden nicht-proteinogene Aminosäuren, D-Alkylderivate und Aminosäuren mit spezifisch variiertem Seitenkette eingesetzt. Charakteristische Substitutionsmuster solcher Modifikationen von Cetrorelixanaloga sind in Abbildung 3 am Beispiel von D-Lys<sup>6</sup> gezeigt.

Die besten Derivate mit jeweils höchster Rezeptoraffinität ergeben sich bislang durch geeignete Modifikationen der  $\epsilon$ -Aminofunktion von D-Lys<sup>6</sup> mit polaren, hydrophilen Carbonsäuren. Mit T-148 fanden Schally et al. eine Sequenz, in der Bisacetyl-2,3-diaminopropionsäure an die  $\epsilon$ -Aminofunktion von [D-Lys<sup>6</sup>]SB-75 gebunden ist und die in vitro hochaktiv ist.<sup>[41]</sup>



Schema 1. Strukturen von ausgewählten LHRH-Antagonisten (als Basis dient Cetrorelix als die klinisch am weitesten entwickelte Substanz). hArg = Homoarginin, Anis = Anisol, Aph = *p*-Aminophenylalanin, FPS = 4-Fluorphenylpropionsäure, Hci = Homocitrullin, Mop = Morpholinomethylphenylalanin, Morlys = *N*-Morpholinolysin, Nic = Nicotinoyl, Rha = Rhamnosyl.



**Xxx = Tyr oder andere Aminosäure**

**Yyy = Leu oder andere Aminosäure**

**Zzz = Arg oder Lys(iPr)**

**R = Carbonsäuren**

### Beispiel : T-148

#### Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Lys(Ac<sub>2</sub>Dap)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>

Abb. 3. Seitenkettenvariation von [D-Lys<sup>6</sup>]Cetrorelix-Analoga. Ac<sub>2</sub>Dap = *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>3</sup>-Diacetyl-2,3-diaminopropionsäure.

Auch Zuckerbausteine vom Typ der D-Glucopyranuronsäuren als D-Lys<sup>6</sup>-Seitenkette führen zu hochaktiven Antagonisten mit langandauernder Hormonsuppression *in vivo*.<sup>[42, 43]</sup> Insertionen von  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren in andere als Position 6 des Peptidgrundgerüsts bewirken im Einzelfall auch höhere Rezeptoraffinität, aber bislang keine Wirkungssteigerung *in vivo*.<sup>[24]</sup>

Ein auffälliges Beispiel für einen deutlichen Wirkungsverlust durch Chiralitätsumkehr an einer sensiblen Stelle des Molekülgerüsts mit charakteristischer Abfolge optisch aktiver Zentren ist D-24308, ein L-Cpa<sup>2</sup>-Analogon von Antarelix (Schema 1):

Mit dem Austausch von D-Cpa<sup>2</sup> durch L-Cpa<sup>2</sup> geht die biologische Aktivität hier völlig verloren.

Als gutes Beispiel für die intensive Forschung nach effektiveren Antagonisten durch Verwendung von Restriktionen, Cyclisierungen und Sequenzverkürzungen seien die Arbeiten von Haviv et al. hervorgehoben.<sup>[44–50]</sup> A-76154 der Firma Abbott ist ein Octapeptid-Antagonist mit einer LHRH-Rezeptoraffinität in der Größenordnung wirksamer Decapeptide wie A-75998 oder „Nal-Glu“.<sup>[51]</sup> Molekulare Restriktionen wie Kopf-Schwanz-Cyclisierungen können bei Peptiden, aber auch bei heterocyclischen Leitstrukturen, mit verbesserter Stabilität und Wirkdauer einhergehen, wenn die Restriktion die bioaktive Konformation einschließt (matched core).<sup>[52]</sup> Ähnliches kann für Dimerisierung und partielle Dimerisierung durch Anbindung geeigneter (Partial-) Sequenzen, z. B. an die D-Lys<sup>6</sup>-Seitenkette, sowie für die Cyclisierung unter Verknüpfung von C-Terminus und Molekülmitte gelten. Folgerichtig wurden einige Cyclopeptide mit LHRH-Sequenzen synthetisiert (siehe Schema 2, 3). Ihre konformativen Eigenschaften werden in Abschnitt 3 diskutiert.

### 3. Struktur und Konformation

Die Modellierung von Peptiden wie LHRH zur „Aufklärung“ der biologisch aktiven Konformation begann bereits



in den siebziger Jahren mit der Entwicklung von Potentialfunktionen, um die Energie- und Entropiebeiträge zu untersuchen, die zur Stabilisierung der Konformation einer Peptidkette in Lösung beitragen.<sup>[53, 54]</sup> Erste NMR-Untersuchungen mit LHRH deuteten auf keine Vorzugskonformation in Lösung hin.<sup>[55, 59, 60]</sup> Monahan et al. erklärten den signifikanten Unterschied zwischen [Ala<sup>6</sup>]LHRH und [D-Ala<sup>6</sup>]LHRH sowohl in der In-vitro- als auch in der In-vivo-Wirkung mit der Bildung einer  $\beta$ -Schleife im Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Segment von LHRH.<sup>[56]</sup> Diese Annahme wurde von Momany<sup>[57, 58]</sup> anhand von empirischen Konformationsanalysen von LHRH und analogen Verbindungen gestützt (Abb. 4). Die Substitution des Segmentes Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> durch ein sterisch eingeschränktes  $\gamma$ -Lactam<sup>[61]</sup> als Modell für eine  $\beta$ II'-Schleife, lieferte eine LHRH-analoge Verbindung, die sowohl in vitro als auch in vivo potenter als LHRH war.

Moleküldynamik(MD)-Simulationsrechnungen von Struthers et al.<sup>[62a, b]</sup> stützten das Vorliegen einer  $\beta$ II-Schleife und deuteten auf eine räumliche Trennung der hydrophoben Seitenketten Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup> und Leu<sup>7</sup> hin, die möglicherweise mit einem hydrophoben Bereich des Rezeptors wechselwir-

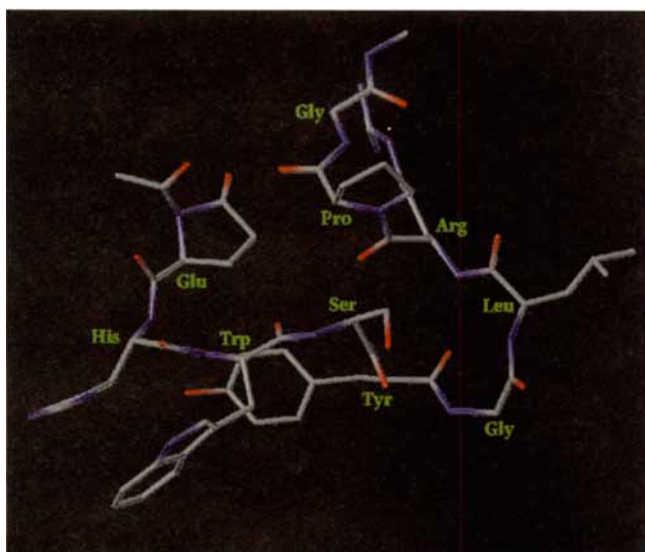
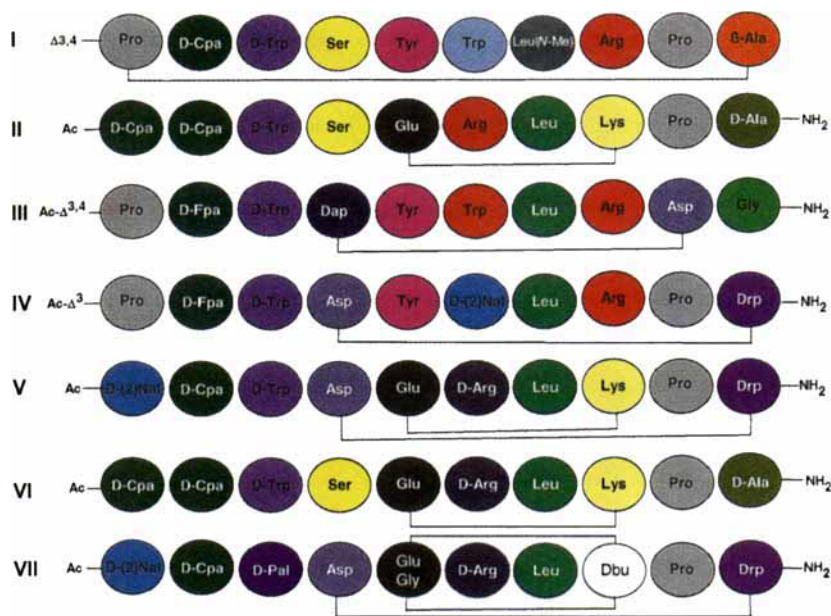


Abb. 4. Konformation von LHRH (reproduziert nach den Angaben in Lit.<sup>[57, 58]</sup>).

ken konnten.<sup>[56]</sup> Diese Rechnungen führten zur Synthese des cyclischen LHRH-Antagonisten cyclo-( $\Delta^{3,4}$ -Pro<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Trp<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>(N-Me)-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>- $\beta$ -Ala<sup>10</sup>-) I (Schema 2), der aber an den Rezeptor schwächer bindet als LHRH. Diese cyclische Verbindung wies zwei  $\beta$ II'-Schleifen auf,<sup>[63]</sup> die durch ein internes Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden. Der stabilisierende Effekt wurde ferner durch die iso-sterische Substitution der CONH- durch CH<sub>2</sub>NH-Gruppen in allen Positionen der Aminosäurekette des Antagonisten

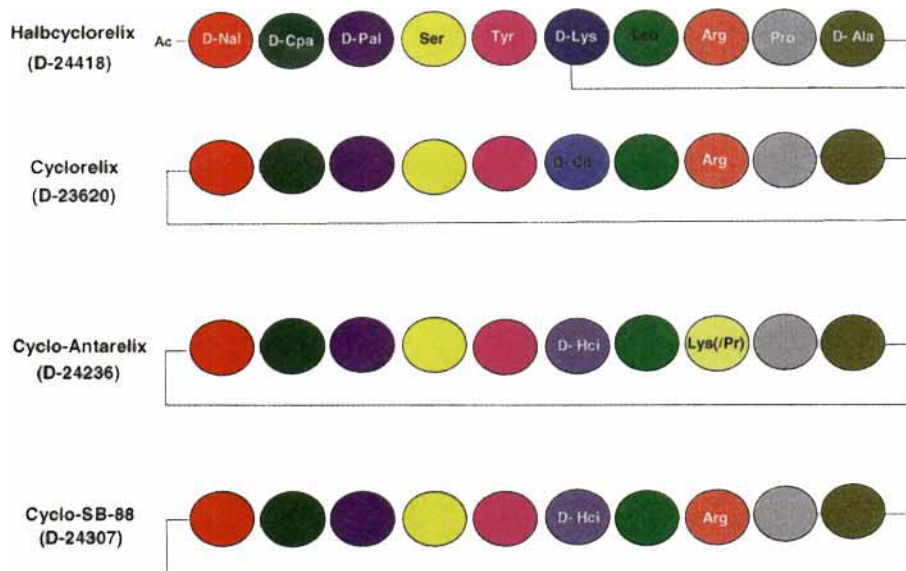


Schema 2. Strukturen von cyclisierten LHRH-Analoga, deren Konformationen aufgeklärt wurden.

[D-Nal<sup>1</sup>(N-Ac),D-Phe<sup>2,3</sup>,D-Arg<sup>6</sup>,Phe<sup>7</sup>,D-Ala<sup>10</sup>]LHRH außer in Position 9 untersucht.<sup>[64a]</sup> Diese Substitution hat eine Verminderung oder gar das Fehlen der antioovulatorischen Aktivität im biologischen Test zur Folge. Allerdings setzt eine derartige Interpretation voraus, daß diese Modifikation nicht zu geänderter Bindung am Rezeptor führt. Es ist allerdings bekannt, daß auch Amidbindungen eines Substrates bei der Bindung am Rezeptor beteiligt sind.<sup>[64b]</sup>

Um die Wechselwirkungen zwischen LHRH-Antagonisten und dem Humanrezeptor besser zu verstehen, wurden Cetrorelix in einer Kopf-Schwanz-Cyclisierung zum cyclischen Cetrorelix („Cyclorelix“) sowie Antarelix zu Cyclo-Antarelix und SB-88 zu Cyclo-SB-88 umgesetzt<sup>[65]</sup> (Schema 3). Alle drei Cyclopeptide binden deutlich schwächer als die linearen Derivate (siehe Abschnitt 5.2). NMR-Untersuchungen in Methanol und DMSO ergaben keine Hinweise auf bevorzugte Konformation(en) für diese cyclisierten Verbindungen, so daß weiterführende Erkenntnisse über die Konformation der rezeptor-gebundenen Verbindung nicht erhalten werden konnten.<sup>[66]</sup> 2D-NMR-Untersuchungen mit LHRH in unterschiedlichen Lösungsmitteln<sup>[67]</sup> und NMR-Untersuchungen mit Cetrorelix in Dimethylsulfoxid (DMSO), Trifluorethanol (TFE), H<sub>2</sub>O und Natriumdodecylsulfat(SDS)/H<sub>2</sub>O<sup>[68]</sup> deuten auf eine bevorzugt gestreckte Konformation von LHRH und eine mögliche Faltung im Segment Tyr<sup>5</sup>-Arg<sup>8</sup> von Cetrorelix hin, die aber keine Ähnlichkeit mit einer  $\beta$ II'-Schleife hat.

Die Suche nach aktiven LHRH-Antagonisten mit eingeschränkten Konformationen wurde von Dutta et al. fortgesetzt.<sup>[69, 70]</sup> Aus der gezielten Cyclisierung linearer Peptide resultierten cyclische Derivate, bei denen die Seitenketten der Aminosäuren in Position 5 und 8 einen Teil des Ringsystems bildeten. Die potenteste Verbindung dieser Reihe war Ac-D-Cpa<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-cyclo(Glu<sup>5</sup>-D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys<sup>8</sup>)-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> II, welche eine dreifach stärkere Ovulationsinhibition im Vergleich zu der der entsprechenden linearen Verbindung aufwies. Als Ergebnis der rechnerischen Konformationsanalyse dieses Antagonisten und seines linearen Analogons



Schema 3. Cyclisierte Analoga von Cetrorelix und strukturverwandten Verbindungen (Codenummern).

wurden bicyclische LHRH-Antagonisten hergestellt, bei denen die Aminosäuren 5 und 8 sowie beide Termini verbrückt wurden.<sup>[71]</sup> Die Untersuchung dieser Verbindungen ergab Strukturen, bei denen eine  $\beta$ -Schleife zwischen Position 3 und 6 vorhanden war (Abb. 5). Da generell die In-vivo-Ergebnisse für die bicyclischen Peptide ungünstiger ausfielen als die für monocyclische 5,8-überbrückte Derivate, war dies ein weiterer Hinweis darauf, daß freie Endgruppen eine wichtige Rolle bei der Bindung am Rezeptor spielen.

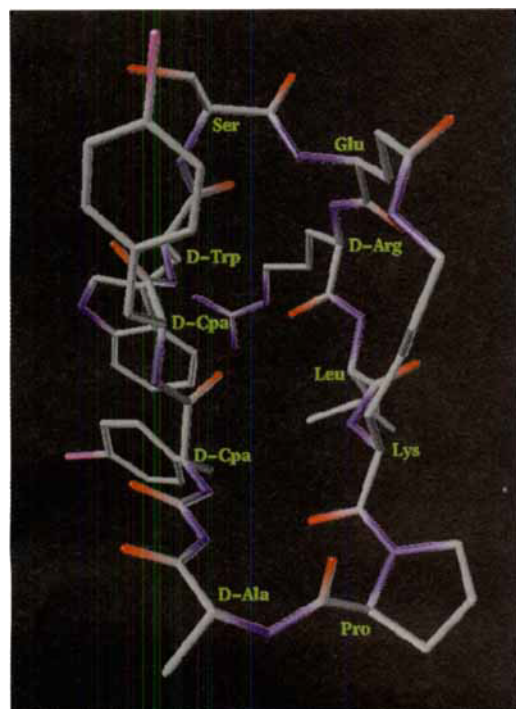


Abb. 5. Konformation des Antagonisten bicyclo(1-10/5-8)-(D-Cpa<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>-D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>) (reproduziert nach den Angaben in Lit.<sup>[71]</sup>).

Einen neuartigen Ansatz zum Design von LHRH-Antagonisten versuchten Struthers et al.,<sup>[72]</sup> die aus der Analyse von MD-Simulationen von **I**<sup>[73]</sup> und – gestützt durch NMR-Untersuchungen – eine vermeintlich rezeptorbindende Konformation für LHRH-Antagonisten vorschlugen. In-vitro-Untersuchungen ergaben für die Bindung am LHRH-Rezeptor allerdings einen  $K_D$ -Wert  $> 100$  nM, der um ein Vielfaches höher war als der  $K_D$ -Wert der Bindung der entsprechenden linearen Verbindung ( $K_D = 0.21$  nM). Zur Erklärung dieser Befunde wurden zwei Annahmen gemacht: 1. Der freie N- und der freie C-Terminus der linearen Derivate spielen eine wichtige Rolle für die Rezeptorbindung. 2. Die Anpassung des cyclischen Antagonisten in der Rezeptorbindungstasche war nicht optimal.

Durch Optimierung gelangte man zum Antagonisten Ac- $\Delta^{3,4}$ -Pro<sup>1</sup>-D-Fpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-cyclo(Dap<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Asp<sup>9</sup>)-Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> **III** (Fpa = 4-Fluorphenylalanin), bei dem die Seitenketten von Dap<sup>4</sup> und Asp<sup>9</sup> verbrückt sind. Die Bindungskonstante von **III** beträgt  $K_D = 55$  nM. Durch Verbrückung der Aminosäuren 4 und 10 wurde Ac- $\Delta^{3,4}$ -Pro<sup>1</sup>-D-Fpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-cyclo(Asp<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-(2)Nal<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Drp<sup>10</sup>)-NH<sub>2</sub> **IV**<sup>[74, 75]</sup> (Drp = 2,3-Diaminopropionsäure) synthetisiert, wobei eine  $\beta$ II'-Schleife im Segment 5–8 durch zwei H-Brücken stabilisiert wird. Außerdem wurde der Einfluß des Einbaus von L-Tic (Tetrahydroisochinolyllalanin) in unterschiedliche Positionen des linearen Antagonisten Ac-D-Nal<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-Pal<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> durch Molekülmechanik-Rechnungen untersucht.<sup>[76]</sup> Die Substitution von D-Tic in Position 6 scheint zur Erhaltung einer  $\beta$ II'-Schleife beizutragen. Es ist bekannt, daß eine D-Aminosäure, die durch L-Aminosäuren flankiert ist, eine  $\beta$ II'-Schleife stark induziert. Die D-Aminosäure besetzt dann die ( $i+1$ )-Position. Besonders stark wirkt D-Pro, das D-Tic entspricht.<sup>[76b]</sup> Weitere mimetische Modelle für  $\beta$ II-Schleifen wurden von Rizo und Gierasch in einem Übersichtsartikel über theoretische Betrachtungen von konformativ eingeschränkten Peptiden diskutiert.<sup>[77]</sup>

Der Effekt der N-Methylierung an  $\alpha$ -Amidbindungen bei LHRH-Agonisten<sup>[78]</sup> und -Antagonisten<sup>[45]</sup> führte zu dem überraschenden Ergebnis der Umwandlung einiger Agonisten in Antagonisten. In der Mehrzahl waren die N-methylierten Agonisten weniger aktiv als die entsprechenden nicht-methylierten. Bei den Antagonisten waren alle Tyr<sup>5</sup>(N-Me)-Derivate überraschend gut wasserlöslich. Insbesondere bei der Sequenz Ac-D-(2)Nal<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-(3)Pal<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>(N-Me)-D-Lys(Nic)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys(*i*Pr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> (**A-75998**) war die Konformationsänderung entscheidend sowohl für die Löslichkeit als auch für die Bindungsaffinität am Rezeptor. Durch die N-Methylierung wird das *cis/trans*-Isomerenverhältnis verändert und die Bildung der H-Brücke verhindert, was zu einer schlechteren Assoziation sowie mäßiger Kristallisation führt.



Zusätzlich wird durch die Methylierung eine Wasserstoffbrückenbindung gebrochen, die sonst zur Stabilisierung der  $\beta$ II-Schleife beiträgt. Ein weitergehender Versuch, durch Methylierung von C $\alpha$ -Atomen gezielt die Konformation von LHRH-analogen Verbindungen zu ändern, wurde von Liff et al. unternommen.<sup>[79]</sup> Solche Substitutionen führten jedoch zu keinen wesentlichen Konformationsänderungen.

Umfangreiche theoretische Konformationsanalysen an nativem LHRH sowie an LHRH-Agonisten und -Antagonisten lieferten Nikiforovich und Marshall.<sup>[80, 81]</sup> Für LHRH wurde eine hohe Flexibilität festgestellt, im Einklang mit bisherigen NMR-Untersuchungen mit linearen Peptiden entsprechender Kettenlänge. Das Fragment Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> nimmt, da Gly wie eine D-Aminosäure fungiert, eine Vorzugskonformation an, ohne jedoch eine ausgeprägte  $\beta$ II-Schleife zu bilden. Rechnungen deuten auf unterschiedliche Konformationen im Segment 5–8 für Agonisten und Antagonisten hin. Die Geometrie der N-terminalen Tripeptide war allerdings bei Agonisten und Antagonisten ähnlich.

Ein weiterer Versuch, die „biologisch aktive Konformation“ von LHRH und Analoga zu bestimmen, wurde durch NMR- und MD-Untersuchungen am konformativ eingeschränkten bicyclischen Antagonisten bicyclo(4-10/5-8)(Ac-D-(2)Nal<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-Asp<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>-D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Dpr<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>) V untergenommen.<sup>[82]</sup> Hier konnte die Existenz einer  $\beta$ II'-Schleife im Segment 5–8 (D-Arg in (i + 1)-Position) belegt werden. Der zusätzliche 5,8-Ringschluß veränderte die Konformation der 4,10-Brücke in der ursprünglichen monocyclischen Verbindung nur unwesentlich. NMR-Untersuchungen an einigen cyclisierten LHRH-Antagonisten und deren linearen Analoga (bester cyclischer Antagonist: Ac-D-Cpa<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-cyclo(Glu<sup>5</sup>-D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys<sup>8</sup>)-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> VI) ergaben eine Struktur, bei der wie in Lit.<sup>[71]</sup> beschrieben eine  $\beta$ -Schleife im Segment 3–6 vorhanden war.<sup>[83]</sup> Darüber hinaus waren die Seitenketten 1 und 10 durch ein Netz aus H-Brücken in unmittelbare räumliche Nähe gekommen. Diese cyclischen Verbindungen wiesen im Antiovulationsassay (AOA) eine höhere Potenz als die entsprechenden linearen Peptide auf.

Neueste Erkenntnisse über die mögliche Konformation von rezeptorgebundenen LHRH-Antagonisten wurden von Rizo et al. in einer Studie mit dem bicyclischen LHRH-Antagonisten bicyclo(4-10/5,5'-8)(Ac-D-(2)Nal<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal<sup>3</sup>-Asp<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>(Gly)-D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Dbu<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Dpr<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>) VII (Dbu = 2,4-Diaminobuttersäure) gewonnen.<sup>[84]</sup> Dieser Antagonist enthält eine  $\beta$ II-Schleife im Bereich Glu<sup>5</sup>-D-Arg<sup>6</sup>, eine  $\beta$ I'-Schleife im Bereich D-Arg<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup> und eine  $\beta$ II-ähnliche Schleife zwischen Pro<sup>9</sup> und der Seitenkette von Dpr<sup>10</sup>. Der Vergleich mit den Ergebnissen aus Lit.<sup>[82]</sup> macht deutlich, daß 4-10/5-8-bicyclische Peptide – trotz doppelter Einschränkung – mehrere, unterschiedliche Konformationen annehmen können.

Die biologischen Aktivitäten der bisher untersuchten cyclisierten LHRH-Agonisten und -Antagonisten waren nie wesentlich höher als die der lineare Derivate. Deutlich wird, daß die Enden frei sein müssen, um sich an der Rezeptorbindung beteiligen zu können. Obwohl NMR-Untersuchungen und MD-Simulationen auf die Existenz einer  $\beta$ -Schleife im Segment 5–8 oder 3–6 hinweisen, bleibt die hohe Flexibilität von Oligopeptiden weiterhin das Hauptproblem bei der Suche nach der biologisch aktiven Konformation und der Opti-

mierung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Es wird immer klarer, daß neue Ansätze zur Lösung dieses Problems erforderlich sind.

## 4. Rezeptorassays

### 4.1. Der pituitäre LHRH-Rezeptor – ein Rhodopsin-ähnlicher G-Protein-gekoppelter Serpentin-Rezeptor

Nach der Isolierung des hypothalamischen Peptides LHRH und dessen Sequenzbestimmung im Jahr 1971 durch A. V. Schally und Mitarbeiter<sup>[2, 85]</sup> gelang erst 1984 die Klonierung der entsprechenden cDNA. Diese kodiert das Vorläuferprotein aus 92 Aminosäuren, aus dem durch proteolytische Prozessierung das Decapeptid gebildet wird.<sup>[86]</sup> Nach intensiver Forschung gelang es 1992 mehreren Arbeitsgruppen, den hochaffinen Rezeptor für LHRH aus der murinen gonadotropen  $\alpha$ T3-1-Zelllinie zu klonieren.<sup>[87, 88]</sup> Diese immortalisierte murine Hypophysenzelllinie zeigt eine recht hohe LHRH-Rezeptor-Expression, was die Isolierung der cDNA durch Expressionsklonierung in Oocyten von *Xenopus laevis* ermöglichte.<sup>[87, 89–91]</sup> Basierend auf der cDNA-Sequenz des murinen LHRH-Rezeptors wurden die homologen cDNA-Gene des Menschen, der Ratte, des Rindes und des Schafs kloniert.<sup>[92–97]</sup> Die Homologie des murinen Rezeptors zu dem der Ratte und dem des Menschen beträgt 97 bzw. 89 %. Der pituitäre, hochaffine Rezeptor für LHRH gehört zur rhodopsinähnlichen Familie von G-Protein-gekoppelten 7-Helix-Rezeptoren, welche auch als Serpentin-Rezeptoren bezeichnet werden (eine Übersicht findet sich bei Iismaa et al.<sup>[98]</sup>). Zu dieser Familie zählen beispielsweise die Rezeptoren für die Peptide Somatostatin, Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH), Cholecystokinin (CCK) sowie für die Neurokinine A und B und für Substanz P.<sup>[99]</sup> Die cDNA des humanen LHRH-Rezeptors kodiert ein Protein aus 328 Aminosäuren. Auffallend ist, daß das Rezeptorprotein nahezu keine C-terminale, cytoplasmatische Domäne (nur zwei Aminosäurereste) aufweist und die für viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typische „Signature-Sequenz“ von DRY<sup>140</sup> nach DRS<sup>140</sup> verändert ist.<sup>[100]</sup> Darüber hinaus wurde das chromosomale Gen des humanen LHRH-Rezeptors, bestehend aus 3 Exons und 2 Introns, kloniert.<sup>[101]</sup>

LHRH induziert sowohl in kultivierten gonadotropen Zellen der Hypophyse als auch in der  $\alpha$ T3-1-Zelllinie eine dosisabhängige Synthese des sekundären Botenstoffs (second messenger) D-myo-Inosit-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) und einen biphasischen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sub>i</sub><sup>2+</sup>] (Abb. 6).<sup>[102]</sup> Da diese Signale durch das Pertussis-Toxin nicht gehemmt werden, konnte eine Beteiligung der G<sub>i</sub>- und G<sub>o</sub>-Subfamilie trimerer G-Proteine ausgeschlossen werden.<sup>[103]</sup> Neuere Arbeiten an der gonadotropen  $\alpha$ T3-1-Zelllinie ergaben, daß die Signalweiterleitung nach Aktivierung des Rezeptors über ein G-Protein des Subtyps G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> erfolgt und so über Phospholipase-C-Subtyp  $\beta$  (PLC $\beta$ ) an den Inositphospholipid-Signalweg koppelt.<sup>[104]</sup> Auch in rekombinanten Zellen ist der heterolog exprimierte LHRH-Rezeptor funktional, d. h., die Stimulation mit Agonisten führt nach G-Protein-Kopplung zur Synthese beispielsweise von InsP<sub>3</sub>.<sup>[93, 105]</sup>

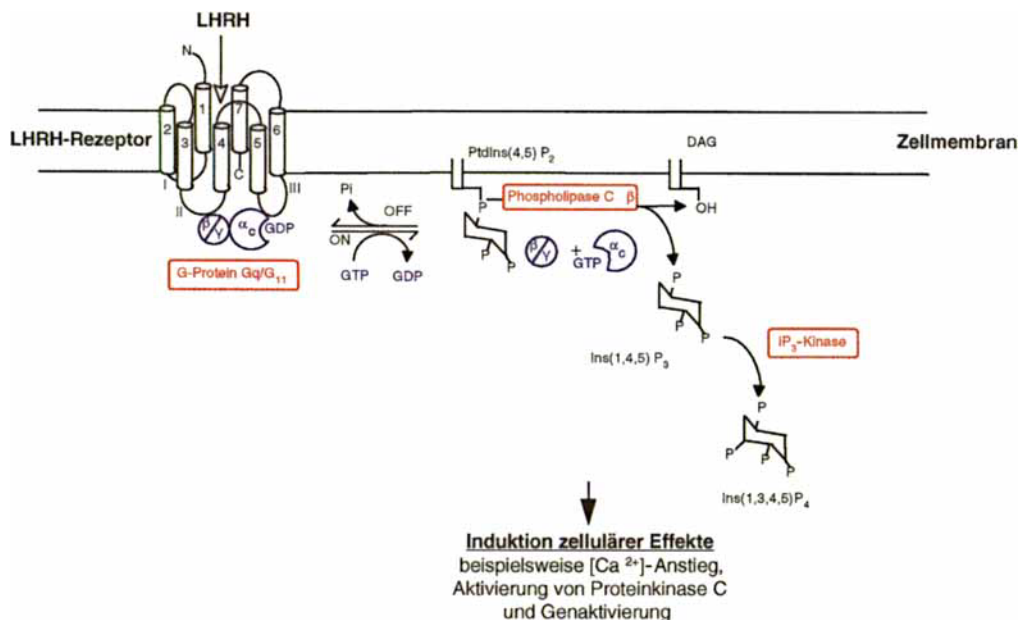


Abb. 6. Vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges des LHRH-Rezeptors. DAG = Diacylglycerol.

#### 4.2. Der humane LHRH-Rezeptor – Klonierung, heterologe Expression und rekombinante Systeme für die Testung von LHRH-Antagonisten

Für die Auffindung und die Charakterisierung von potenten LHRH-Antagonisten für klinische Anwendungen ist die Klonierung des humanen Rezeptors von großer Bedeutung, wird hierdurch doch die Erstellung relevanter, einfacher Testsysteme möglich. In der Vergangenheit wurde eine erste In-vitro-Charakterisierung von Peptid-LHRH-Antagonisten in klassischen Rezeptor-Ligand-Bindungstests mit iodinierten LHRH-Derivaten durchgeführt, zumeist unter Verwendung von grob gereinigten Membranfraktionen aus Ratten-Hypophysen.<sup>[106, 107]</sup> Da verschiedentlich eine speziesabhängige Bindung von LHRH-Derivaten beschrieben wurde, war diese Vorgehensweise pragmatisch, aber nicht unproblematisch.<sup>[97, 108, 109]</sup> Insbesondere wird dies für nichtpeptidische Rezeptorliganden zutreffen, da diese wahrscheinlich auch mit nichtkonservierten Aminosäureresten außerhalb der Peptidbindungstasche des Rezeptorproteins wechselwirken. Dies wurde z. B. für den Neurokinin-1-Rezeptor mit Substanz P als endogenem Ligand und chemisch sehr diversen antagonistischen, nichtpeptidischen Verbindungen gezeigt.<sup>[110]</sup> Aufgrund dieser Überlegungen wurde nun der humane LHRH-Rezeptor stabil in Säugerzelllinien wie Maus-L-Zellen exprimiert. Den Rezeptor überexprimierende Einzelzellklone wurden isoliert und in Rezeptor-Ligand-Bindungstests an intakten Zellen unter physiologischen Bedingungen eine pharmakologische Charakterisierung und Validierung des Testsystems unter Verwendung des authentischen Hormons sowie relevanter LHRH-Superagonisten und -Antagonisten vorgenommen.<sup>[105]</sup> Eine Vielzahl weiterer, strukturell unterschiedlicher Peptid-LHRH-Antagonisten wurden in Wettbewerbsexperimenten mit [<sup>125</sup>I]Cetrorelix auf diese Weise getestet. Das Ergebnis für klinisch relevante und cyclisierte Peptide wird in Abschnitt 5 diskutiert (siehe Abb. 8).

Neben der Bestimmung der Bindungsaffinität, ausgedrückt als Dissoziationskonstante  $K_D$  [nM], ist die Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften eines Liganden von Bedeutung. In frühen Arbeiten wurden hierzu kultivierte primäre Zellkulturen z. B. aus Hühnerhypophysen verwendet, deren Agonist-stimulierte oder Antagonist-inhibierte Freisetzung von luteinisierendem Hormon (LH) man durch ein Radioimmunoassay (RIA) bestimmte.<sup>[109]</sup> Diese verlässliche, aber aufwendige Methode ist durch Bestimmungen von intrazellulären Botenstoffen wie  $InsP_3$  an permanenten Zelllinien oder

entsprechenden Reportergen-Testsystemen vereinfacht worden. In Abbildung 7a ist ein Nachweis von  $InsP_3$  nach Stimulation

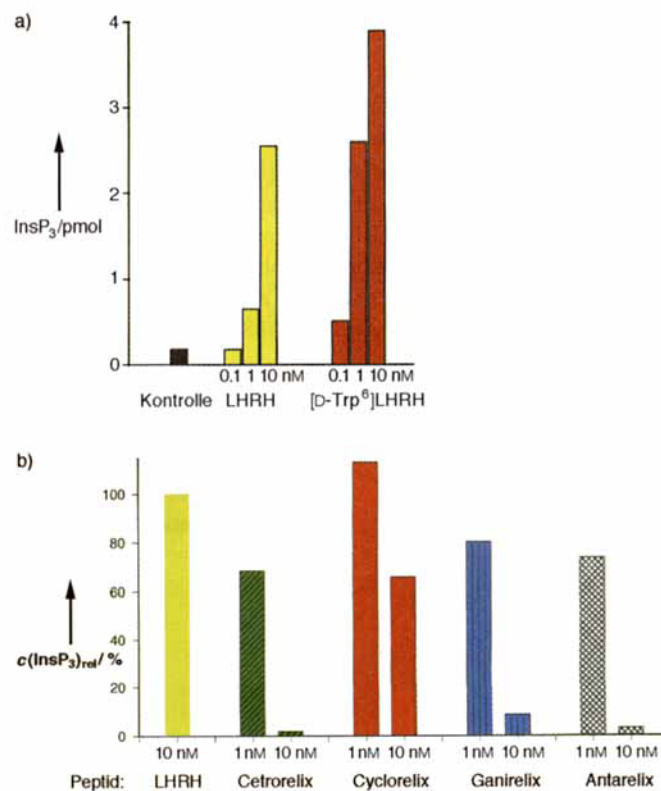


Abb. 7. Charakterisierung der Funktion peptidischer LHRH-Antagonisten. a) Stimulation der  $InsP_3$ -Synthese durch LHRH sowie durch den Superagonisten [D-Trp<sup>6</sup>]LHRH (Triptorelin/Decapeptyl) in Maus-L-Zellen, die den humanen LHRH-Rezeptor überexprimieren. Die  $InsP_3$ -Menge bezieht sich auf  $4 \times 10^6$  Zellen; als Kontrolle wurden nicht mit Peptid stimulierte Zellen verwendet. b) Hemmung der Stimulation von 10 nM LHRH durch einige Antagonisten (1 und 10 nM). Hier ist die zelluläre  $InsP_3$ -Konzentration [%] relativ zu dem spezifisch durch 10 nM LHRH maximal induzierten  $InsP_3$ -Signal angegeben (100% entsprechen 7.63 bzw. 11.68 pmol  $InsP_3$  auf  $4 \times 10^6$  Zellen).

mit LHRH und dem Superagonisten [D-Trp<sup>6</sup>]LHRH beispielhaft für die rekombinante, den humanen LHRH-Rezeptor überexprimierende Zelllinie gezeigt. Das Agonist-stimulierte Signal wird dabei dosisabhängig durch einen Antagonisten wie Cetrorelix bis auf das Niveau nichtstimulierter Zellen verringert (Abb. 7b).<sup>[105]</sup>

Ausgewählte Peptide werden derzeit durch Messung der Testosteronkonzentration im Serum männlicher Ratten *in vivo* getestet. Ein potenter LHRH-Antagonist führt hier bei einer einmaligen subcutanen Applikation zu einer andauernden Testosteronsuppression. Nach unserer bisherigen Erfahrung korreliert die Wirksamkeit im Tier in der Regel gut mit den *in vitro* am humanen LHRH-Rezeptor bestimmten Bindungsaffinitäten. In den Fällen, in denen trotz hoher Bindungsaffinität keine *In-vivo*-Wirksamkeit auftrat, sind vermutlich pharmakokinetische Eigenschaften des Peptids entscheidend. Zukünftig werden auch transgene Tiere für eine *In-vivo*-Testung sehr wichtig werden.

## 5. Vergleichende Untersuchungen

### 5.1. Vergleich klinisch relevanter Antagonisten

Bezüglich ihrer Bindungsaffinität als auch der funktionellen Eigenschaften wurden einige, z. T. klinisch relevante Peptid-LHRH-Antagonisten am humanen LHRH-Rezeptor getestet. Hierbei handelt es sich um Cetrorelix (SB-75, D-20761), SB-88 (D-20455), Antide (Serono), Antarelix (D-23234), Ganirelix (Organon/D-24598) sowie ein sequenzverkürzter Antagonist von Abbott, [Pro<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>]A-76154 (D-24710). In entsprechenden Kompetitionsbindungstests mit [<sup>125</sup>I]Cetrorelix als markiertem Liganden und unterschiedlichen Konzentrationen des zu testenden Peptides wurde die Bindungsaffinität als Dissoziationskonstante  $K_D$  [nM] bestimmt (Abb. 8, Tabelle 2). Danach weist Cetrorelix die größte Affinität zum humanen Rezeptor auf, gefolgt von seinem Analogon SB-88.

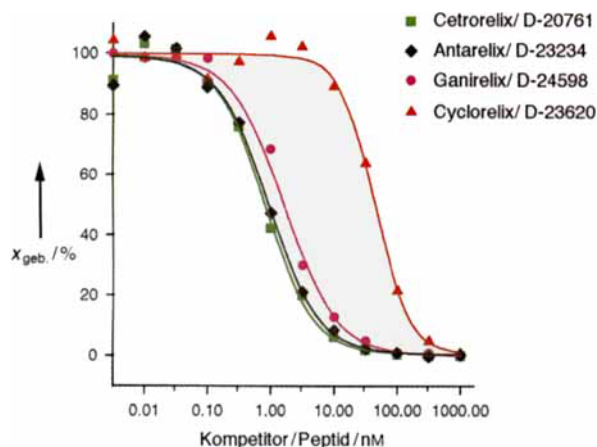


Abb. 8. Bindungsaffinität selektierter peptidischer LHRH-Antagonisten. Dosis-Wirkungs-Kurven entsprechender Kompetitionsbindungstests mit [<sup>125</sup>I]Cetrorelix als markiertem Ligand sind exemplarisch für die Peptide Cetrorelix ( $K_D = 0.18$  nM), Antarelix ( $K_D = 0.26$  nM), Ganirelix ( $K_D = 0.45$  nM) und Cyclorelix ( $K_D = 9.81$  nM) gezeigt. Die Auswertung mehrerer Experimente und eine vergleichende Darstellung der Bindungsaffinitäten ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2. Bindungsaffinitäten klinisch relevanter Peptid-LHRH-Rezeptorantagonisten [a].

Peptid	Bindungsaffinität $K_D$ [nM]
LHRH	$3.610 \pm 0.89$ (4)
Cetrorelix (D-20761)	$0.202 \pm 0.03$ (10)
SB88 (D-20455)	$0.209 \pm 0.002$ (2)
Antarelix (D-23234)	$0.233 \pm 0.04$ (3)
Antide (Bachem)	$0.360 \pm 0.13$ (3)
Ganirelix (D-24598)	$0.405 \pm 0.04$ (2)
[Pro <sup>8</sup> -NH <sub>2</sub> ]A-76154 (D-24710)	$2.371 \pm 0.69$ (2)

[a] Die Bindungsaffinitäten der Peptid-LHRH-Antagonisten wurden in Kompetitionsbindungstests mit [<sup>125</sup>I]Cetrorelix als markiertem Ligand bestimmt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven und die Dissoziationskonstanten  $K_D \pm \sigma_n$  ( $n$  = Zahl der Experimente, angegeben in Klammern) wurden mit dem Programm EBDA/Ligand 3.0[133] berechnet. Zum Vergleich ist die Bindungsaffinität des authentischen Liganden LHRH angegeben.

In einem funktionalen Assay an der für die Radioligand-Bindungstests verwendeten Zelllinie wurden nun selektierte Peptid-Antagonisten getestet (siehe Abb. 7b). Hier bestimmt man die Hemmung der durch Stimulation mit 10 nM LHRH induzierten Synthese von InsP<sub>3</sub> durch den jeweiligen Antagonisten in den Konzentrationen 1 und 10 nM. Auch hier ist Cetrorelix in der Lage, die Bildung des sekundären Botenstoffs am wirksamsten zu hemmen.

### 5.2. Vergleich cyclisierter, antagonistischer LHRH-Derivate

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität am humanen LHRH-Rezeptor wurden die cyclisierten Peptid-LHRH-Antagonisten cyclisiertes Cetrorelix („Cyclorelix“, D-23620), Cyclo-Antarelix (D-24236), Cyclo-SB-88 (D-24307) und partialcyclisiertes Cetrorelix („Halbcyclorelix“, D-24418) getestet. Die entsprechenden Bindungsaffinitäten sind in Form der Dissoziationskonstanten  $K_D$  [nM] in Tabelle 3 angegeben. Alle Cyclopeptid-Analoga der potenten Antagonisten weisen eine deutlich schwächere Bindung als die linearen Vorstufen auf.

Tabelle 3. Bindungsaffinitäten cyclisierter Peptid-LHRH-Rezeptorantagonisten [a].

Peptid	Bindungsaffinität $K_D$ [nM]
Cyclorelix (D-23620)	$12.87 \pm 3.1$
Cyclo-Antarelix (D-24236)	$13.64 \pm 1.69$
Cyclo-SB88 (D-24307)	$24.74 \pm 10.57$
Halbcyclorelix (D-24418)	$10.41 \pm 0.27$

[a] Die Bindungsaffinitäten der cyclisierten LHRH-Antagonisten wurden in einem Kompetitionsbindungstest mit [<sup>125</sup>I]Cetrorelix als markiertem Ligand bestimmt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven und die Dissoziationskonstanten  $K_D \pm \sigma_n$  ( $n$  = Zahl der Experimente, hier  $n = 2$ ) wurden mit dem Programm EBDA/Ligand 3.0[133] berechnet.

## 6. LHRH-Rezeptor-Modellierung

Die Struktur eines Rezeptors, der an ein G-Protein gekoppelt ist, konnte bisher nicht bestimmt werden. Erkenntnisse über die Molekülstruktur und die Funktionalität des Rezeptors wurden nur durch zielgerichtete Mutagenese-Experimente gewonnen.<sup>[111–113]</sup> Durch Molecular-Modeling-Rechnungen kann



die räumliche Struktur eines Rezeptors näherungsweise ermittelt werden. Hoflack et al. haben ein Modell für die Bindung und die Aktivierung des Gonadotrophin-Releasing-Hormons am Rezeptor vorgeschlagen.<sup>[114]</sup> Für den LHRH-Rezeptor wurde ein Modell von Kühne et al.<sup>[115]</sup> entworfen, das sich auf die bekannte Kristallstruktur von Bakteriorhodopsin<sup>[116]</sup> und auf veröffentlichte Befunde über Rinderrhodopsin stützt.<sup>[117, 118]</sup> Durch Homologie-Modeling wurden die Aminosäuren des humanen LHRH-Rezeptors auf die sieben transmembranalen Helices des Bakteriorhodopsins positioniert. In gleicher Weise und unter Berücksichtigung von Daten der Brookhaven Protein-Datenbank wurden die extrazellulären Schleifen modelliert.<sup>[119]</sup> Die Orientierung der Helices konnte durch Hydrophathie-Studien fixiert werden. Nach der Minimierung der Energie des Gesamtmodells mit dem AMBER-Kraftfeld wurde eine MD-Simulation über 100 ps durchgeführt. Unter den Bedingungen dieser Simulation war die Modellstruktur stabil; die relative Anordnung der sieben Helices zueinander änderte sich wenig. Die prolinhaltigen Helices bildeten dabei den typischen „Knick“ für solche Strukturen (Abb. 9). Dieses Modell könnte Aufschlüsse über die biologisch aktive Konformation von LHRH-Agonisten und -Antagonisten ermöglichen und dadurch den Weg zur Optimierung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen vereinfachen.

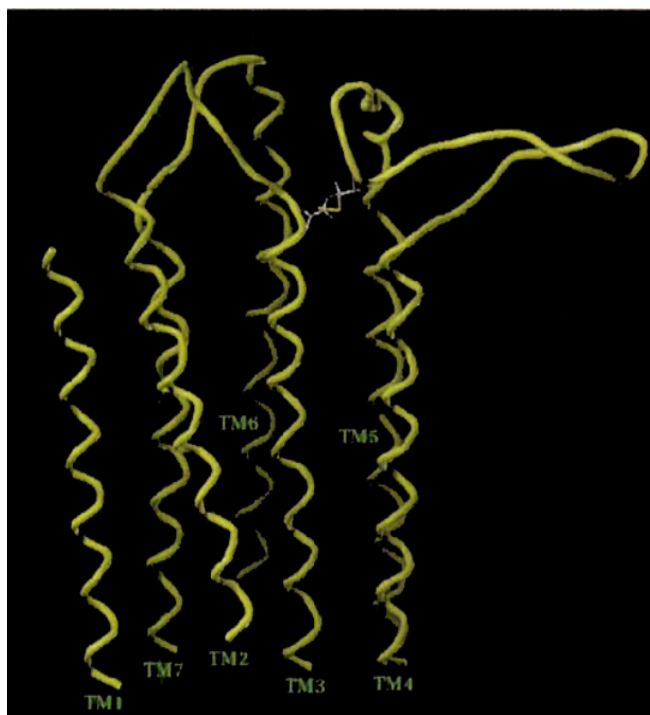


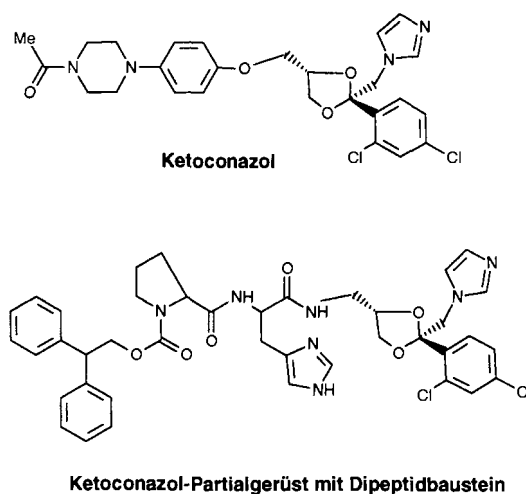
Abb. 9. Energieminimierte Struktur eines Modells des humanen LHRH-Rezeptors.

## 7. Die Suche nach Peptidmimetica für den LHRH-Rezeptor

Die Suche nach Peptidmimetica als Wirkstoffe ist weltweit im Gange; prominente Beispiele dafür sind Angiotensin-II-Antagonisten vom Typ Losartan sowie (substituierte) Benzodiazepine als hochaffine Liganden des Somatostatin-Rezeptors. Eine rasch anwachsende Zahl von Publikationen behandelt Endo-

thelinrezeptor-Antagonisten (Ro 46-2005, L-744453), Wachstumshormon-Analoga (MK-0677), CCK-Antagonisten (MK-329), Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Win-64338) und Substanz-P-Antagonisten (CP-99994).<sup>[120–124]</sup> Intensive Anstrengungen werden speziell auf dem Gebiet der Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten unternommen, um die native Arg-Gly-Asp(RGD)-Sequenz zu ersetzen und zu oral gut wirksamen Substanzen zu gelangen.<sup>[125]</sup>

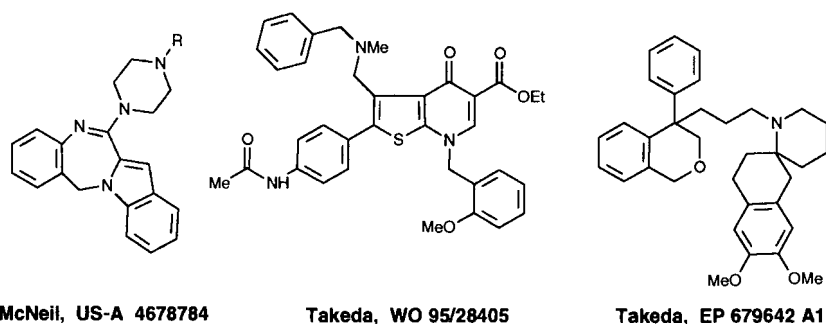
Seit einigen Jahren verstärken sich auch Bestrebungen, LHRH-rezeptoraffine Substanzen zu finden, welche nicht die charakteristischen stoffspezifischen Eigenschaften und auch Nachteile von Peptiden (kurze Halbwertszeit, mangelnde Bioverfügbarkeit) haben, aber dennoch eine hohe Bindungsaffinität aufweisen. Solche Substanzen sollten nach Möglichkeit oral applizierbar und im Organismus hinreichend stabil sein sowie ähnlich günstige pharmakologische Parameter wie Peptid-Antagonisten aufweisen. Mögliche Hinweise auf die LHRH-mimetische Wirkung des Antimycoticums Ketoconazol stammen aus klinischen Untersuchungen zu dessen Einfluß auf Prostatakrebs und Testosteronsuppression.<sup>[126, 127]</sup> Weitergehende Untersuchungen bei der Firma Abbott ergaben eine schwache antagonistische Wirkung von Ketoconazol und modifizierten Analoga (Schema 4) *in vitro* und *in vivo*, wobei die biologische Aktivität solcher Derivate möglicherweise nicht vornehmlich durch LHRH-Antagonismus vermittelt wird.<sup>[128, 129]</sup>



Schema 4. LHRH-Mimetica auf Basis der Ketoconazol-Teilstruktur<sup>[128, 129]</sup>.

Von der Firma Abbott stammen mehrere Publikationen zur mimetischen Stabilisierung und Modifizierung von Peptiden (Pseudo-Peptide), z. B. durch Verwendung von *N*-Alkylamino-säuren, Cyclisierungen und Sequenzverkürzung ohne Wirkungsverlust.<sup>[45, 51, 78, 130]</sup>

Komplexe hochsubstituierte Stickstoff-Heterocyclen scheinen, wie von der Firma McNeil dargelegt (Schema 5), LHRH-antagonistisches Potential aufzuweisen.<sup>[135]</sup> In Patenten der Firma Takeda wurden Benzodiazepine, Benzodiazepinone, heterocyclische benzosubstituierte Alkylamine und kürzlich auch Thienopyridincarbonylsäuren als LHRH-Rezeptorantagonisten mit submikromolarer Rezeptorbindungsinhibierung beschrieben, die unter anderem für die Verwendung als Antitumorstoffe bei hormonabhängigen Tumoren geeignet sind.<sup>[131, 133]</sup>



Schema 5. LHRH-Antagonist-Peptidmimetica [131, 132].

Eine Leitstruktur aus der zuletzt genannten Substanzklasse befindet sich derzeit in präklinischer Prüfung.

Bei ASTA Medica werden ebenfalls Substanzen bearbeitet, die ein hohes Potential als antagonistische LHRH-Mimetica aufweisen sollten. Basierend auf eigenen Arbeiten mit sequenzverkürzten und cyclisierten Peptiden und bestätigt durch jüngste Veröffentlichungen von der Firma Takeda, in denen Cyclopentapeptide mit Affinität zum humanen LHRH-Rezeptor in der Größenordnung von  $IC_{50} = 0.07 \mu M$  beschrieben wurden,<sup>[134]</sup> werden sowohl kurzkettige Cyclopeptide als auch niedermolekulare Mimetica auf Basis kondensierter Heterocyclen synthetisiert und evaluiert. Die Suche nach Leitstrukturen wird dabei durch den Einsatz von Substanzbibliotheken und Hochdurchsatz-Screeningsystemen erleichtert und weiter beschleunigt.<sup>[136, 137]</sup>

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

LHRH-Agonisten sind gut etablierte, umsatzstarke Pharmawirkstoffe mit einem Anwendungsschwerpunkt in der Tumorthherapie und der Gynäkologie. Trotz frühzeitig aufgenommener Suche und intensiver weltweiter Forschungstätigkeit ist derzeit noch kein LHRH-Antagonist auf dem Markt; die besten Chancen dafür werden der am weitesten entwickelten Substanz Cetrorelix, einem Wirkstoff mit verbesserter Selektivität, hoher Stabilität und langer Wirkdauer, eingeräumt.

Durch molekularbiologische Verfahren konnten humane Rezeptorassays etabliert und funktionelle Tests konzipiert werden, so daß klinisch relevanter Antagonisten gezielter optimiert und charakterisiert werden können. Hier konnten intensive Konformationsanalysen sowohl an linearen als auch an cyclisierten Analoga noch keinen Ansatzpunkt für eine Wirkungs- sowie Bioverfügbarkeits-Steigerung liefern. Trotz fortgeschrittener Formulierungsverfahren wurde das Ziel einfacher, kostengünstiger Darreichungsformen hier bisher noch nicht zufriedenstellend erreicht.

Peptidmimetica sind bei ähnlichen Wirkeigenschaften den ihnen zugrundeliegenden Peptiden hinsichtlich Herstellungsaufwand und Applikationsweise in aller Regel klar überlegen; mit den vorhandenen Ansätzen und Leitstrukturen wird die Suche nach solchen pharmakologisch derart bedeutsamen Substanzen künftig noch weiter intensiviert werden, um mit der vierten Generation von LHRH-Derivaten der Herausforderung an die moderne Pharmaforschung erfolgreich begegnen zu können.

Wir danken H. Kessler, Technische Universität München, für zahlreiche NMR-spektroskopische Untersuchungen und Ratschläge bei der Abfassung des Manuskripts sowie A. V. Schally, Tulane University, New Orleans, für die Einführung in das Thema „Endokrinologie“ und seine stetige Unterstützung. Die Zusammenarbeit mit H. Michel und M. Reiländer, Max-Planck-Institut, Frankfurt, sowie G. Krause und R. Kühne, Forschungsinstitut Molekulare Pharmakologie, Berlin, auf dem Gebiet des humanen LHRH-Rezeptors wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF; Förderkennzeichen: 0310697) gefördert.

Eingegangen am 4. November 1996 [A196]

- [1] „The Privileges of a Nobel Laureate“: A. V. Schally, S. M. McCann, *Fertil. Steril.* **1995**, *64*, 452–453.
- [2] a) A. V. Schally, A. Arimura, A. J. Kastin, *Science* **1971**, *173*, 1036–1038; b) H. Matsuo, Y. Baba, R. M. Nair, A. Arimura, A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1334–1339; c) K. Amoss, R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows, R. Guillemin, *ibid.* **1971**, *44*, 205–210; d) Y. Baba, H. Matsuo, A. V. Schally, *ibid.* **1971**, *44*, 459–463.
- [3] G. Emons, A. V. Schally, *Hum. Reprod.* **1994**, *9*, 1364–1379.
- [4] P. M. Conn, W. Crowley, *New Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 93–103.
- [5] G. F. Weinbauer, E. Nieschlag in *Peptides in Oncology I* (Hrsg.: K. Höffgen), Springer, Heidelberg, **1992**, S. 113–136.
- [6] a) A. S. Dutta, *Drugs of the Future* **1988**, *13*, 43–57; b) M. Filicori, C. Flaminigi, *Drugs* **1988**, *35*, 63–82; c) J. J. Nestor, B. H. Vickery, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1988**, *23*, 211–220.
- [7] a) M. T. Goulet, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1995**, *30*, 169–178; b) T. Reissmann, R. Felberbaum, K. Diedrich, J. Engel, A. M. Comaru-Schally, A. V. Schally, *Hum. Reprod.* **1995**, *20*, 1974–1981.
- [8] M. J. Karten in *Modes of Action of GnRH and GnRH Analogs* (Hrsg.: W. F. Crowley, P. M. Conn), Springer, Heidelberg, **1992**, S. 277–297.
- [9] G. Flouret, Z. S. Arnold, T. Majewski, N. H. Petousis, K. Mahan, F. Farooqui, K. A. Blum, D. Konopinska, S. Natarajan, D. Crich, *Pept. Sci.* **1995**, *1*, 89–105.
- [10] P. M. Conn, W. F. Crowley, *Annu. Rev. Med.* **1994**, *45*, 391.
- [11] A. V. Schally in *Cancer Medicine*, 3. Aufl. (Hrsg.: J. F. Holland, E. Frei, R. C. Bast, D. W. Kufe, D. L. Morton, R. R. Weichselbaum), Lea & Febiger, Philadelphia, PA (USA), S. 827–840.
- [12] a) A. V. Schally in *Advances in Gynecology and Obstetrics*, Vol. 6 (Hrsg.: P. Belfort, J. Pinotti, T. K. Eskes), Parthenon, Cornforth, **1989**, S. 3–22; b) *Scrip* **1995**, 2066, 22.
- [13] a) A. Friedrich, G. Jaeger, K. Radscheit, R. Unmann, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 2nd 1992*, **1993**, 47–49; b) A. Kleemann, K. Drauz, J. Engel, B. Kutscher, E. Wünsch, *Proc. Akabori Conf. Ger. Jpn. Symp. Pept. Chem. 4th 1991*, 96–101; c) F. R. Kunz, T. Müller, K. Drauz, *Proc. Akabori Conf. Ger. Jpn. Symp. Pept. Chem. 5th 1994*, 15–16.
- [14] M. J. Karten, J. E. Rivier, *Endocrine Rev.* **1986**, *7*, 44–66.
- [15] R. L. Barbieri, *Trends Endocrinol. Metab.* **1992**, *3*, 30–34.
- [16] R. Schmidt, K. Sundaram, R. B. Thau, C. W. Badrin, *Contraception* **1984**, *29*, 283–289.
- [17] S. Bajusz, V. J. Csernus, T. Janaky, L. Bokser, M. Fekete, A. V. Schally, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 425–435.
- [18] J. Pinski, A. V. Schally, T. Yano, K. Groot, G. Srkalovic, P. Serfozo, T. Reissmann, M. Bernd, W. Deger, B. Kutscher, J. Engel, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 410–417.
- [19] A. Ljungqvist, D. M. Feng, W. Hook, Z. X. Shen, C. Bowers, K. Folkers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8236–8240.
- [20] J. Leal, K. Gordon, D. R. Danforth, R. F. Williams, G. D. Hodgen, *Drugs of the Future* **1991**, *16*, 529–537.
- [21] A. Janecka, T. Janecki, S. M. Shan, C. Bowers, K. Folkers, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2238–2241.
- [22] A. Janecka, A. Ljungqvist, M. Suzuki, J. C. Xu, C. Bowers, K. Folkers, *Med. Chem. Res.* **1991**, *1*, 306–311.
- [23] A. Janecka, T. Janecki, C. Bowers, K. Folkers, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 19–23.
- [24] K. Liu, B. He, S. Xiao, Q. Xia, X. Fang, Z. Wang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 157–160.
- [25] K. Liu, B. He, S. Xiao, Q. Xia, X. Fang, Z. Wang, *Sci. China Ser. B* **1991**, *34*, 201–208.
- [26] Y. Ge, S. Xiao, *Contraception* **1992**, *46*, 131–133.

- [27] P. Theobald, J. Porter, C. Rivier, A. Corrigan, M. Perrin, W. Vale, J. Rivier, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2395–2402.
- [28] J. Rivier, J. Porter, C. Hoeger, P. Theobald, A. G. Craig, J. Dykert, A. Corrigan, M. Perrin, W. A. Hook, R. P. Siraganian, W. Vale, C. Rivier, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4270–4278.
- [29] J. E. Rivier, G. Jiang, J. Porter, C. A. Hoeger, A. G. Craig, A. Corrigan, W. Vale, C. L. Rivier, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2649–2662.
- [30] Z. P. Tian, Y. L. Zhang, P. J. Edwards, R. W. Roeske, *Pept. Proc. Am. Pept. Symp.* **13th**, **1994**, 562–564.
- [31] R. Deghenghi, F. Boutignon, P. Wüthrich, V. Lenaerts, *Biomed. Pharmacother.* **1993**, *47*, 107–110.
- [32] R. Deghenghi (Europeptides), WO 92/19651-A1, **1992**.
- [33] J. Nestor, Jr., R. Tahiramani, T. L. Ho, J. C. Goodpasture, B. H. Vickery, P. Ferrandon, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3942–3948.
- [34] K. Stoeckemann, J. Sandow, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1993**, *119*, 457–462.
- [35] J. Knolle, W. König, G. Breipohl, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 21st 1990* **1991**, 414–415.
- [36] J. Mulzer in *Stereoselective Synthesis* (Hrsg.: E. Ottow, U. Schöllkopf, B.-G. Schulz), Springer, Heidelberg, **1994**, S. 37–61.
- [37] J. Mulzer, F. Schröder, A. Lobbja, J. Buschmann, P. Luger, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1813–1815; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1737–1739.
- [38] G. J. Russell-Jones, S. W. Westwood, P. G. Farnworth, J. K. Findlay, H. G. Burger, *Bioconj. Chem.* **1995**, *6*(1), 34–42.
- [39] G. J. Russell-Jones (Biotech Australia Pty.), WO 94/28015, **1994**.
- [40] T. Reissmann, J. Engel, B. Kutscher, M. Bernd, P. Hilgard, M. Peukert, I. Szeleenyi, S. Reichert, D. Gonzalez-Barcena, E. Nieschlag, A. M. Comarú-Schally, A. V. Schally, *Drugs of the Future* **1994**, *19*, 228–237.
- [41] J. Pinski, T. Yano, T. Janaky, A. Nagy, A. Juhasz, L. Bokser, K. Groot, A. V. Schally, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *41*, 66–70.
- [42] E. Graf von Roedern, Dissertation, Technische Universität München, **1994**; E. von Roedern, H. Kessler, B. Kutscher, M. Bernd, T. Klenner (ASTA Medica), DE 433 8015, US-A 5,556,836, **1995/1996**.
- [43] H. Kessler, E. Graf von Roedern, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 684–686; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 687–689.
- [44] F. Haviv, C. A. Palabrica, E. N. Bush, G. Diaz, E. S. Johnson, S. Love, J. Greer, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2340–2344.
- [45] F. Haviv, T. D. Fitzpatrick, C. J. Nichols, R. E. Swenson, N. A. Mort, E. N. Bush, G. Diaz, A. T. Nguyen, M. R. Holst, V. A. Cybulski, J. A. Leal, G. Bammert, N. S. Rhutasel, P. W. Dod, E. S. Johnson, J. B. Cannon, J. Knittle, J. Greer, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 928–933.
- [46] F. Haviv (Abbott Laboratories), PCT/US 95/02410, **1995**.
- [47] F. Haviv (Abbott Laboratories), WO 95/04540, **1995**.
- [48] F. Haviv (Abbott Laboratories), WO 94/14841, **1994**.
- [49] J. Greer (Abbott Laboratories), WO 94/13313, **1994**.
- [50] F. Haviv (Tap Pharmaceuticals), US-A 5300492, **1994**.
- [51] F. Haviv, T. D. Fitzpatrick, C. J. Nichols, E. N. Bush, G. Diaz, G. Bammert, A. T. Nguyen, E. S. Johnson, J. Knittle, J. Greer, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 701–705.
- [52] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
- [53] H. A. Scheraga, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 195–217.
- [54] S. P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *Israel J. Chem.* **1973**, *11*, 121–152.
- [55] R. Deslauriers, R. Walter, I. C. P. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *53*, 244–250.
- [56] M. W. Monahan, M. S. Amos, H. A. Anderson, W. Vale, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4616–4620.
- [57] F. A. Momany, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2990–2996.
- [58] F. A. Momany, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2996–3000.
- [59] P. L. Wessels, J. Feeney, H. Gregory, J. J. Gormley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1973**, 1691–1698.
- [60] R. Deslauriers, G. C. Levy, W. H. McGregor, D. Sarantakis, I. C. P. Smith, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4335–4343.
- [61] R. M. Freidinger, D. F. Veber, D. Schwenk Perlow, J. R. Brooks, R. Saperstein, *Science* **1980**, *210*, 656–658.
- [62] a) R. S. Struthers, J. Rivier, A. T. Hagler, *Ann. NY Acad. Sci.* **1984**, *439*, 81–96; b) „Design of Peptide Analogs”: R. S. Struthers, A. T. Hagler, J. Rivier in *Conformationally Directed Drug-Design—Peptides and Nucleic Acids as Templates or Targets* (Hrsg.: J. A. V. Schally, M. Gordon), American Chemical Society, Washington DC, **1984**, S. 239–261.
- [63] E. L. Baniak, J. E. Rivier, R. S. Struthers, A. T. Hagler, L. M. Gierasch, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2642–2656.
- [64] a) S. J. Hocart, M. V. Nekola, D. H. Coy, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1820–1824; b) J. Wermuth, S. L. Goldmann, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328–1335.
- [65] B. Kutscher, M. Bernd, T. Beckers, T. Klenner, E. E. Polymeropoulos, M. Bachelin, T. Dierks, H. Kessler, *Proc. Akabori Conf. Ger. Jpn. Symp. Pept. Chem. 6th* **1996**, 127–132.
- [66] H. Kessler, persönliche Mitteilung.
- [67] K. V. R. Chary, S. Srivastava, R. V. Hosur, K. B. Roy, G. Govil, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *158*, 323–332.
- [68] A. Müller, E. Busker, J. Engel, B. Kutscher, M. Bernd, A. V. Schally, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 264–270.
- [69] A. S. Dutta, J. J. Gormley, P. F. McLachlan, J. R. Woodburn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 1114–1120.
- [70] P. K. C. Paul, P. Dauber-Osguthorpe, M. M. Campbell, D. J. Osguthorpe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 1051–1058.
- [71] A. S. Dutta, J. J. Gormley, J. R. Woodburn, P. K. C. Paul, D. J. Osguthorpe, M. M. Campbell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 943–948.
- [72] R. S. Struthers, G. Tanaka, S. C. Koerber, T. Solmajer, E. L. Baniak, L. M. Gierasch, W. Vale, J. Rivier, A. T. Hagler, *Proteins* **1990**, *8*, 295–304.
- [73] „GnRH analogs: Structure-activity relationships”: J. Rivier, C. Rivier, M. Perrin, J. Porter, W. Vale in *LHRH Peptides as Male & Female Contraceptives* (Hrsg.: G. I. Zatuchni, J. D. Shelton, J. J. Sciarra), Harper & Row, Philadelphia, **1991**, S. 13–23.
- [74] J. Rizo, S. C. Koerber, R. J. Bienstock, J. Rivier, A. T. Hagler, L. M. Gierasch, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2852–2859.
- [75] J. Rizo, S. C. Koerber, R. J. Bienstock, J. Rivier, L. M. Gierasch, A. T. Hagler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2860–2871.
- [76] a) S. C. Koerber, M. Ibea, A. T. Hagler, C. L. Rivier, J. E. Rivier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 1035–1041; b) H. Matter, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3347–3359.
- [77] J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387–418.
- [78] F. Haviv, T. D. Fitzpatrick, R. E. Swenson, C. J. Nichols, N. A. Mort, E. N. Bush, G. Diaz, G. Bammert, A. Nguyen, N. S. Rhutasel, H. N. Nellans, D. J. Hoffman, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 363–369.
- [79] M. I. Liff, K. D. Kopple, Z. Tian, R. W. Roeske, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 471–476.
- [80] G. V. Nikiforovich, G. R. Marshall, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 171–180.
- [81] G. V. Nikiforovich, G. R. Marshall, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 181–193.
- [82] R. J. Bienstock, J. Rizo, S. C. Koerber, J. E. Rivier, A. T. Hagler, L. M. Gierasch, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3265–3273.
- [83] D. V. Reddy, B. Jagannadh, A. S. Dutta, A. C. Kunwar, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *46*, 9–17.
- [84] J. Rizo, R. B. Sutton, J. Breslau, S. C. Koerber, J. Porter, A. T. Hagler, J. E. Rivier, L. M. Gierasch, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 970–976.
- [85] H. Matsuo, Y. Baba, R. M. Nair, A. Arimura, A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1334–1339.
- [86] P. H. Seeburg, J. P. Adelman, *Nature* **1984**, *311*, 666–668.
- [87] M. Tsutsumi, W. Zhou, R. P. Millar, P. L. Mellon, J. L. Roberts, C. A. Flanagan, K. Dong, B. Gillo, S. C. Sealfon, *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1163–1169.
- [88] J. Reinhart, L. M. Mertz, K. J. Catt, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21 281–21 284.
- [89] J. J. Windle, R. I. Weiner, P. L. Mellon, *Mol. Endocrinol.* **1990**, *4*, 597–603.
- [90] F. Horn, L. M. Bilezikjian, M. H. Perrin, M. M. Bosma, J. J. Windle, K. S. Huber, A. L. Blount, B. Hille, W. Vale, P. L. Mellon, *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5*, 347–355.
- [91] S. C. Sealfon, B. Gillo, S. Mundamattom, P. L. Mellon, J. J. Windle, E. Landau, J. L. Roberts, *Mol. Endocrinol.* **1990**, *4*, 119–124.
- [92] S. S. Kakar, L. C. Musgrove, D. C. Devor, J. C. Sellers, J. D. Neill, *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **1992**, *189*, 289–295.
- [93] L. Chi, W. Zhou, A. Prikhovzhan, C. Flanagan, J. S. Davidson, M. Golembos, N. Illing, R. P. Millar, S. C. Sealfon, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1993**, *91*, R1–R6.
- [94] K. A. Eidne, R. E. Sellar, G. Couper, L. Anderson, P. L. Taylor, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1992**, *90*, R5–R9.
- [95] U. B. Kaiser, D. Zhao, G. R. Cardona, W. W. Chin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 1645–1652.
- [96] S. S. Kakar, C. H. Rahe, J. D. Neill, *Domest. Anim. Endocrinol.* **1993**, *10*, 335–342.
- [97] N. Illing, G. F. Jacobs, I. I. Becker, C. A. Flanagan, J. S. Davidson, A. Eales, W. Zhou, S. C. Sealfon, R. P. Millar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *196*, 745–751.
- [98] T. P. Iismaa, T. J. Biden, J. Shine, *Molecular Biology Intelligence Unit: G Protein-Coupled Receptors*, Springer, Heidelberg, **1995**.
- [99] W. C. Probst, L. A. Snyder, D. L. Schuster, J. Brosius, S. C. Sealfon, *DNA Cell Biol.* **1992**, *11*, 1–20.
- [100] A. Bairoch, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2241–2245.
- [101] N. C. Fan, C. Peng, J. Krisinger, P. C. K. Leung, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1995**, *107*, R1–R8.
- [102] S. S. Stojilkovic, K. J. Catt, *Recent Prog. Horm. Res.* **1995**, *50*, 161–205.
- [103] S. G. Rhee, K. D. Choi, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12 393–12 396.
- [104] K. P. Hsieh, T. F. Martin, *J. Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1673–1681.
- [105] T. Beckers, K. Marheineke, H. Reiländer, P. Hilgard, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 535–543.
- [106] R. N. Clayton, R. A. Shakespear, J. A. Duncan, J. C. Marshall, P. J. Munson, D. Rodbard, *Endocrinology* **1979**, *105*, 1369–1381.
- [107] E. Loumaye, P. C. Wynn, D. Coy, K. J. Catt, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 12 663–12 671.



- [108] P. J. Wormald, K. A. Eidne, R. P. Millar, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1985**, *61*, 1190–1194.
- [109] R. P. Millar, C. A. Flanagan, R. C. Milton, J. A. King, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21007–21013.
- [110] U. Gether, X. Emonds-Alt, J.-C. Brelière, T. Fujii, D. Hagiwara, C. Garret, T. E. Johansen, T. W. Schwartz, *Mol. Pharm.* **1994**, *45*, 500–508.
- [111] J. S. Davidson, C. A. Flanagan, I. I. Becker, N. Illing, S. C. Sealfon, R. P. Millar, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1994**, *100*, 9–14.
- [112] W. Zhou, C. Flanagan, J. A. Ballesteros, K. Konvicka, J. S. Davidson, H. Weinstein, R. P. Millar, S. C. Sealfon, *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1991–1995.
- [113] W. Zhou, V. Rodic, S. Kitanovic, C. A. Flanagan, L. Chi, H. Weinstein, S. Maayani, R. P. Millar, S. C. Sealfon, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18853–18857.
- [114] J. Hofflack, M. F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, J. M. Bidart, *Drug Des. Discovery* **1993**, *10*, 157–171.
- [115] R. Kühne, G. Krause, E. E. Polymeropoulos, B. Kutscher, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [116] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899–929.
- [117] J. Baldwin, *EMBO J.* **1993**, *12*, 1693–1703.
- [118] J. Baldwin, *J. Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 180–190.
- [119] Protein Data Bank (Ausgabe Januar 1996), Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY (USA).
- [120] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780–1802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699–1720.
- [121] D. C. Rees, *Curr. Med. Chem.* **1994**, *1*, 145–158.
- [122] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267.
- [123] D. Fairlie, G. Abbenante, D. March, *Curr. Med. Chem.* **1995**, *2*, 654–686.
- [124] R. M. Freidinger, *Prog. Drug Res.* **1993**, *40*, 33–89.
- [125] V. Austel, F. Himmelsbach, T. Müller, *Drugs of the Future* **1994**, *19*, 757–764.
- [126] J. Trachtenberg, A. Pont, *Lancet* **1984**, *2*, 433–435.
- [127] S. Bhasin, S. Sikka, T. Fielder, U. Sod-Moriah, H. Levine, R. Swerdloff, J. Rajfer, *Endocrinology* **1986**, *118*, 1229–1232.
- [128] B. De, J. Plattner, E. Bush, H. S. Jae, G. Diaz, E. Johnson, T. Perun, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2036–2038.
- [129] B. De (Abbott Laboratories), US-A 4992421, **1991**.
- [130] F. Haviv, C. A. Palabrica, E. N. Bush, G. Diaz, E. S. Johnson, S. Love, J. Greer, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2340–2344.
- [131] S. Furuya (Takeda Chemical Industries), WO 95/28405, **1995**.
- [132] K. Kato (Takeda Chemical Industries), EP 679642 A1, **1995**.
- [133] G. A. McPherson, *J. Pharmacol. Methods* **1985**, *14*, 213–228.
- [134] C. Kitada (Takeda Chemical Industries), WO 96/34012 A1, **1996**.
- [135] C. Y. Ho (McNeillab Inc.), US-A 4678784, **1987**.
- [136] M. Goulet (Merck + Co, Inc.), WO 97/21435, **1997**.
- [137] S. Furuya (Takeda Chemical Inc.), WO 97/14697, **1997**.