

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

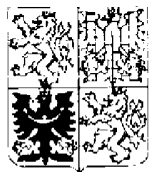
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

4028-90

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 08. 90**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.08.89**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **89/394727**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 7/02

C 07 K 7/22

A 61 K 38/08

(71) Přihlášovatel:

THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND, New Orleans, LA. US;

(72) Původce:

Coy David H., New Orleans, LA. US;

Moreau Jacques-Pierre, Upton, MA. US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA, Jívanská 1/1273.
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Lineární peptid

(57) Anotace:

Lineární peptid, který je analogem přírodně se vyskytující, biologicky účinné látky P má aktivní polohu a vazebnou polohu, která zajišťuje vázání tohoto peptidu na receptor příslušné buňky. Analog má nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi aminokyselinovým zbytkem aktivní polohy s přílehlým aminokyselinovým zbytkem, nebo syntetický L-aminokyselinový nebo .gamma.-aminokyselinový zbytek, nahrazující dvě aminokyselinové zbytky aktivní polohy.

CZ 4028-90 A3

Lineární peptid

OBLAST TECHNIKY

Vynález se týká peptidů pro terapeutické účely a zvláště se týká analogů přírodně se vyskytujícího peptidu P.

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Peptidová látka P (SP) má četná farmakologická působení, včetně vasodilatačního a tlak snižujícího působení, kontrahuje nevaskulární hladké svaly, stimuluje sekreci slinivky a pankreasu, depolarizuje různé neurony a uvolňování histaminu z buněk. Je domněnka, že se SP podílí na různých fyziologických funkcích (z nichž četné jsou spojeny s navozováním bolesti). Tyto funkce zahrnují regulaci peristaltiky a aktivity hladkých svalů v gastrointestinálním traktu, regulaci sekrece slinivky a pankreasu, regulaci zánětlivé odezvy špatné funkce periferní tkáně, neurotransmisi a regulaci neuroimunomodulace. Mantyh a kol., /1989/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5193 popisuje přítomnost látky P receptorů na straně zranění v centrálním nervovém systému a domnívá se, že SP může být zahrnuta v regulaci odezvy poškození centrálního nervového systému, jakož také v periferní tkáni. Látka P je také proliferativním činidlem, stimulujícím proliferaci fibroblastů, T-lymfocytů, endotheliálních buněk, buněk hladkých svalů a astrocytů.

4749

Látka SP patří do rodiny bioaktivních peptidů známých jako tachykininy. Struktura, účinnost a funkce látky SP a jiných tachykininů jsou diskutovány v práci Payana, /1989/ Ann. Rev. Med. 40: 341. Jak uvádí Payan, látka SP se podílí na obecných farmakologických vlastnostech a konservuje koncovou karboxylovou sekvenci /Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, kde X znamená rozvětvený alifatický nebo aromatický aminokyselinový zbytek/ s jinými tachykininy. Základní biologické účinnosti a schopnost vázat se na receptor spočívá v karboxylové koncové sekvenci těchto peptidů. Selektivita ke specifickému receptoru tachykininu je stanovena aminokyselinovou koncovou sekvencí peptidů, jak uvádí Iverson a kol., /1989/ The Tachykinin System /Tachykininový systém/; Abstrakt zveřejněn na 11. americkém symposiu o peptidech. Konservace karboxylové koncové sekvence sahá přes látku SP a jiné savčí tachykininy k ostatním bioaktivním peptidům, jak je uvedeno v tabulce I.

Četné deriváty SP, vytvářené modifikací postranního řetězce a/nebo D-aminokyselinovou substitucí, působí jako SP receptorové antagonisty. Folkers v americkém patentovém spise číslo 4 481 139 popisuje P antagonisty, připravené D nebo L aminokyselinovou substitucí. Tyto antagonisty zahrnují undekapeptidový analog spantid /D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂/, jakož také analogy látky P. Jensen a kol., /1988/ Am. J. of Physiol. 254: G883, charakterizuje schopnost různých SP antagonistů inhibovat působení bombesinu. Jensen a kol. studovali čtyři SP analogy:

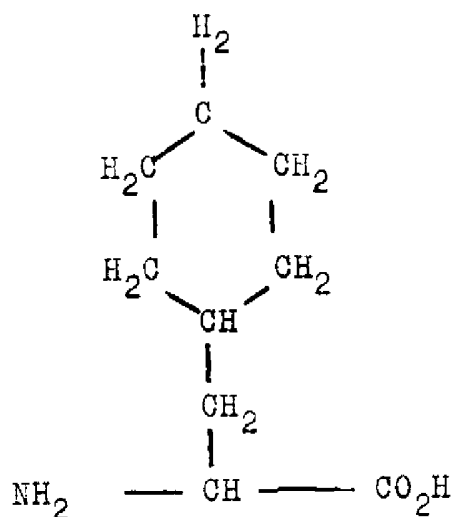
Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Phe-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂,
Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂,
D-Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ a
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂. Jen-
sen a kol. také studoval dva analogy SP a první tři aminoky-
selinové zbytky vypuštěné, D-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-
-Leu-Met-NH₂ a D-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-D-Trp-Met-NH₂.
Žádný z těchto receptor vázajících peptidů však není speci-
fický k SP receptoru. Všechny inhibují b₁ombesinem stimulo-
vané uvolňování amylasy. Jensen a kol. usoudili, že "schopnost
inhibovat působení b₁ombesinu je obecnou vlastností SP ana-
logů, že mají také funkci jakožto SP receptorové antagonis-
ty a že SP receptorové antagonisty jsou každý inhibován pů-
sobením bombesinu funkcí jakožto bombesinové receptorové an-
tagonisty".

Woll a kol., /1988/ Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 1857
zjistili, že P antagonist D-Arg-Pro-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-
-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ je mocný bombesinový antagonist v buň-
kách "murine Swiss 3T3".

Agonisty a antagonisty širokého spektra biologicky ú-
činných peptidových hormonů, včetně látky F, byly syntetizo-
vány zavedením modifikace peptidových vazeb do peptidového
hormonu, viz Spatola /1983/ v publikaci Chemistry and Bio-
chemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins /Chémie a
biochemie aminokyselin, peptidů a bílkovin/ /B. Weinstein
vyd./ M. Dekker, New York and Basel, str. 267 až 357.

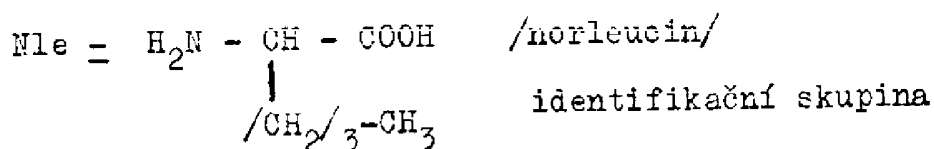
Dále používané /neobvyklé/zkratky mají tento význam:

cyklohexyl-Ala = cyklohexylalanin

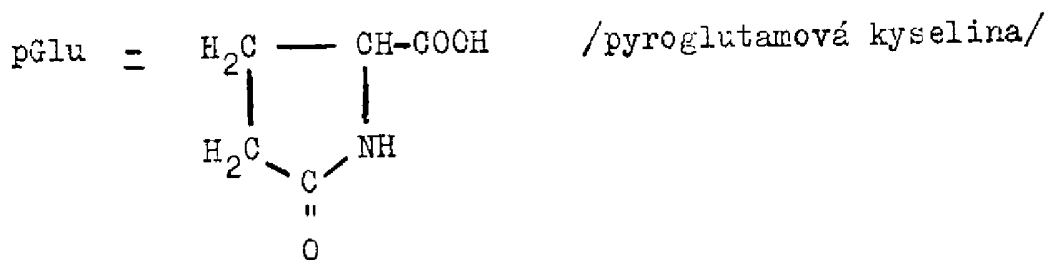


identifikační skupina

Lys- ξ -NHR = lysin, kde ξ -N atom nese skupinu R, kde R znamená atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku, fenylalkylovou skupinu se 7 až 10 atomy uhlíku, skupinu COE, kde E znamená alkylovou skupinu s 1 až 20 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu s 3 až 20 atomy uhlíku, alkinylovou skupinu s 3 až 20 atomy uhlíku, fenyllovou skupinu, naftylovou skupinu nebo fenylalkylovou skupinu se 7 až 10 atomy uhlíku, nebo R znamená acylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku.

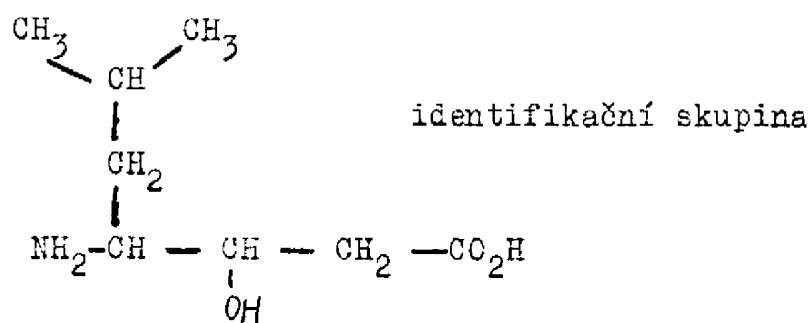


Nal = naftylalanin

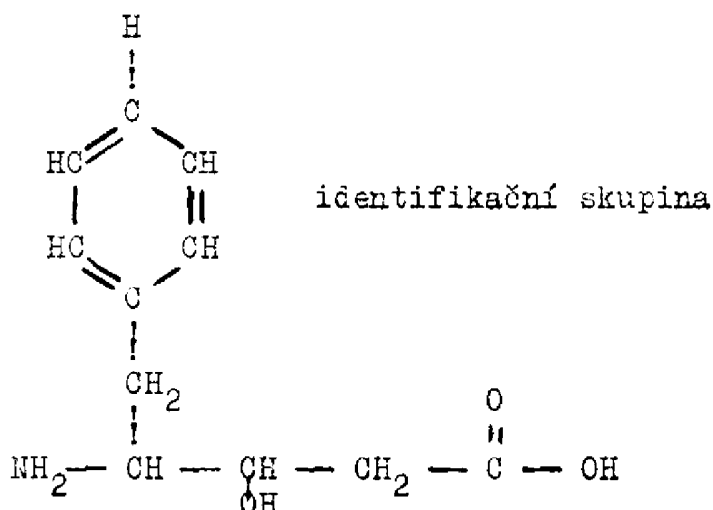


Sar = sarkosin

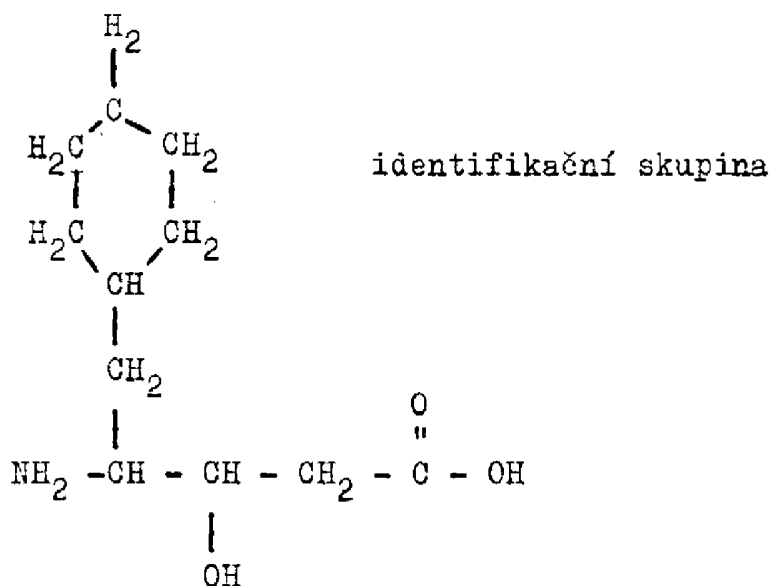
Sta /statin/ = /3S,4S/-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanová kyselina^a, která má chemickou strukturu



AHPPA = /3S,4S/-4-amino-3-hydroxy-5-fenylpentanová kyselina, která má chemickou strukturu



ACHPA = /3S,4S/-4-amino-5-~~cyklohexyl~~cyklohexyl-3-hydroxypentanová kyselina, která má chemickou strukturu



SP = Arg-Pro-Lys-Ile-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ /látky P/.

Podstata vynálezu

Obecného vzorce

Obecně je předmětem vynálezu lineární /neč/křivý/ peptid, který je analogem přírodní se vyskytující, biologicky účinné látky P mající aktivní polohu a vazebnou polohu zodpovědnou za vázání peptidu k receptoru na cílové buňce. Analog má jednu z následujících modifikací: /a/ nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi aminokyselinovým zbytkem aktivní polohy a sousedním aminokyselinovým zbytkem, /b/ náhradu dvou aminokyselinových zbytků uvnitř aktivní polohy syntetickým aminokyselinovým zbytkem, například statinem, ANPPA, AchPA, β -aminokyselinovým nebo γ -aminokyselinovým zbytkem, /c/ vypuštění aminokyselinového zbytku v aktivní poloze a modifikace aminokyselinového zbytku mimo aktivní polohu nebo /d/ přítomnost N-koncového aminokyselinového zbytku, který není přírodně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem uvedeného přírodně se vyskytujícího peptidu /kde β - nebo γ -není stanovenou aminokyselinou, nýbrž to je α -aminokyselina/.

V případě výhodného provedení je analog schopen působit jako konkurenční inhibitor přírodně se vyskytující látky P vázáním na receptor a uskutečněním jedné z modifikací selhává in vivo biologická účinnost přírodně se vyskytujícího peptidu.

Ve výhodném provedení je aktivní polohou lineárního peptidu karboxylový koncový polovinový lineární peptid. Lineární peptid má jednu z následujících modifikací: nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi aminokyselinovým zbytkem aktivní polohy a přilehlým aminokyselinovým zbytkem, /b/ náhradu dvou aminokyselinových zbytků

uvnitř aktivní polohy syntetickým aminokyselinovým zbytkem, například statinem, AHPPA, ACHPA, β -aminokyselinovým zbytkem nebo γ -aminokyselinovým zbytkem, /c/ vypuštění aminokyselinového zbytku v aktivní poloze a modifikace aminokyselinového zbytku mimo aktivní polohu nebo /d/ přítomnost N-koncového aminokyselinového zbytku, který není přírodně se vyskytující-
^{amina}
cím aminokyselinovým zbytkem uvedeného přírodně se vyskytující-
cího, biologicky účinného peptidu.

Podle výhodného provedení je aktivní polohou lineárního peptidu karboxylový koncový polovinový lineární peptid. Lineární peptid má jednu z následujících modifikací, /a/ nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi karboxylovým koncovým aminokyselinovým zbytkem a přilehlým aminokyselinovým zbytkem nebo /b/ statin nebo AHPPA nebo ACHPA, β -aminokyselinový nebo γ -aminokyselinový zbytek místo přírodně se vyskytujícího karboxylového koncového zbytku a přilehlého aminokyselinového zbytku.

Podle výhodného provedení má analog látky P jednu z následujících modifikací, /a/ nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi karboxylovým koncovým aminokyselinovým zbytkem a přilehlým aminokyselinovým zbytkem nebo /b/ statin nebo AHPPA nebo ACHPA, β -aminokyselinový nebo γ -aminokyselinový zbytek místo přírodně se vyskytujícího karboxylového koncového zbytku a přilehlého aminokyselinového zbytku.

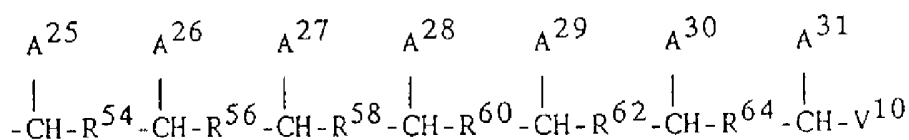
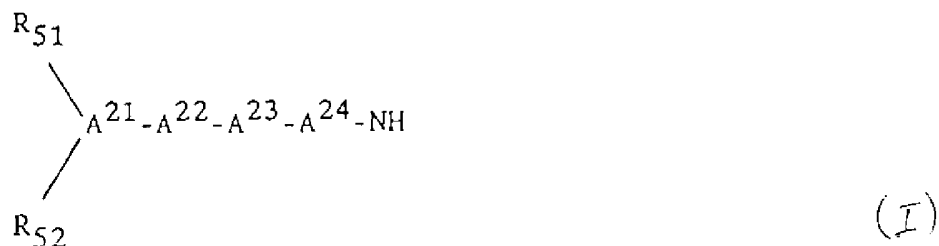
Podle výhodných provedení je lineární peptid analogem látky P s aktivní polohou v karboxylové koncové polovině

lineárního peptidu. Analog látky P má jednu z následujících modifikací: /a/ nepeptidovou vazbu místo peptidové vazby mezi karboxylovým koncovým aminokyselinovým zbytkem a přiléhajícím aminokyselinovým zbytkem nebo /b/ statin nebo AHPPA nebo ACHPA nebo β -aminokyselinový nebo γ -aminokyselinový zbytek místo přírodně se vyskytující karboxylové koncové skupiny a přilehlé aminokyselinové skupiny.

Lineárními peptidy pro zavedení nepeptidové vazby mezi dvě přírodní aminokyselinové zbytky nebo pro náhradu dvou přírodních aminokyselinových zbytků syntetickými aminokyselinovými zbytky ~~β -aminokyselinovými nebo γ -aminokyselinovými zbytky~~ nebo pro vypuštění /"des"/ C-koncového aminokyselinového zbytku, vhodnými pro vytvoření nebo pro podporu antagonistické účinnosti jsou lineární peptidy, u kterých je účinnost spojena se dvěma C-koncovými aminokyselinovými zbytky aminokyselinového řetězce. Proto aktivní poloha přírodně se vyskytujícího peptidu, jehož je analogem peptidů podle vynálezu, zahrnuje s výhodou alespoň aminokyselinový zbytek v karboxykoncové polovině peptidu, a lineární peptid podle vynálezu má aminokyselinový zbytek ve své karboxykoncové polovině. Modifikace může být zavedena v oblasti zahrnuté ve vázání receptoru nebo v nevázájící oblasti.

Výrazem "nepeptidová vazba" se míní, že atom uhlíku, podílející se na vazbě mezi dvěma zbytky, je redukován z karboxylového uhlíku na methylenový uhlík, to je $\text{CH}_2\text{-NH}$; nebo méně výhodněji $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CO}$ nebo CO-CH_2 . /Podrobně o chemii nepeptidových vazeb pojednává Coy a kol.,

X Lineární peptid obecného vzorce I je tedy přednětým
výsledkem:



kde

- A^{21} je D nebo L izomér Arg nebo Lys
 A^{22} je D nebo L izomér Pro
 A^{23} je D nebo L izomér Lys
 A^{24} je D nebo L izomér Pro
 A^{25} je identifikační skupina D nebo L izoméru Gln
 A^{26} je identifikační skupina D nebo L izoméru Gln
 A^{27} je identifikační skupina D-Trp nebo identifikační skupina D nebo L izoméru Phe
 A^{28} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze súboru β -Nal, Phe, o-X-Phe, kde X je F, Cl, Br, NO_2 , OH nebo CH_3 , nebo p-X-Phe, v kterém X je F, Cl, Br, NO_2 , OH nebo CH_3
 A^{29} je identifikační skupina aminokyseliny D-Trp nebo identifikační skupina D nebo L izoméru Phe
 A^{30} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze skupiny Leu, Nle, Ala, Val nebo Ile
 A^{31} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze skupiny Leu, Nle, Ala, Val nebo Ile
 R^{54} je CO-NH nebo CO-NH₂
 R^{56} , R^{62} a R^{64} jsou nezávisle CO-NH nebo CH₂-NH
 R^{58} je CO-NR⁶⁹, v kterém R^{69} je H nebo C₁₋₁₂ alkyl nebo CH₂-NH
 R^{60} je CO-NH a
 V^{10} je



v kterých každý R_{66} , R_{67} a R_{68} je nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl nebo C_{12-20} naftylalkyl a R^{51} a R^{52} , které jsou v ázané na α -aminodusíkový atom N-koncové aminokyseliny jsou nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl nebo COE_{24} , kde E_{24} je C_{1-20} alkyl, C_{3-20} alkenyl, C_{3-20} alkynyl, fenyl, naftyl nebo C_{7-10} fenylalkyl za podmínky, že ~~je~~^{jestliže} jeden ze symbolů R^{51} a R^{52} je COE_{24} , druhý musí být atom vodíku, přičemž nejméně jeden ze symbolů R^{56} , R^{58} , R^{62} nebo R^{64} je CH_2NH , nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

A^{28} , $R_{59}H$ a R_{60} vypuštěn, dále za podmínky, že v případě, kdy A^{28} , $R_{59}H$ a R_{60} jsou vypuštěny, musí R_{63} znamenat skupinu $CH_2_{20}/CH_2/n_{10}-CO-NH$, dále za podmínky, že v případě, kdy R_{64} znamená skupinu obecného vzorce $CH_2_{20}/CH_2/n_{10}-V^{12}$, musí být A^{31} , $R_{65}H$ a V^{10} vypuštěny, dále za podmínky, že v případě, kdy A^{31} , $R_{65}H$ a V^{10} jsou vypuštěny, musí R_{64} znamenat skupinu obecného vzorce $CH_2_{20}/CH_2/n_{10}-V^{12}$ a jejich farmaceuticky vhodné soli.

Jakožto příklady výhodných peptidů se uvádějí:

~~Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L/CH₂-NH/Leu-NH₂~~
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L/CH₂-NH/Leu-Nle-NH₂,
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L/CH₂-NH/Nle-NH₂.
Nepeptidové vazby, ve kterých je peptidová vazba redukována, jsou zde symbolizovány výrazem "^L/CH₂-NH/" nebo "^L/".

Vynález se také týká antagonisty látky P vzorce
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L/CH₂-NH/Leu-Leu-NH₂.

SP antagonisty podle vynálezu jsou užitečné při ošetřování nemocných trpících nemocemi zahrnujícími neurogení záněty, například ^zreumatoidní arthritida, ulcerativní kolitida, ekzema a Crohnova nemoc. SP antagonisty podle vynálezu jsou užitečné jakožto antiproliferativní činidla například při ošetřování malých buněčných plicních karcinomů nebo poruch zahrnujících proliferaci fibroblastů. Antiproliferativní vlastnosti SP antagonistů podle vynálezu také umožňují jejich použití při prevenci poruch, kdy je třeba usnadnit regeneraci nervů. Působení antagonistů podle vynálezu na neurotransmisí umožňuje jejich používání jakožto neopiátových analgetik. Jejich použití jako neopiátových analgetik umožňuje obnovení

odezvy na opiáty. Antagonisty podle vynálezu jsou také užitečné jakožto antisekretační činidla, působí například na slinivku a na pankreas.

V případě sloučenin shora uvedených vzorců, kde ~~R₁, R₂~~, ~~R₃~~ až ~~R₁₃~~, R₅₁, R₅₂, R₆₆ až R₆₈ nebo R₇₀ až R₇₂ jsou aromatickou, lipofilní skupinou, může být jejich účinnost in vivo dlouhodobá a uvolňování sloučeniny podle vynálezu na cílovou tkáň může být usnadněno.

Identifikační skupina α -aminokyseliny /pro případ pyroglutamátu, viz níže/ je atom nebo skupina atomů, jiné než α -karbonylový uhlíkový atom, β -aminodusíkový atom, nebo atom vodíku, vázaná na asymetrický α -uhlíkový atom. Pro ilustraci příklady je identifikační skupinou alaninu methylová skupina, identifikační skupinou valinu skupina CH_3/CH , identifikační skupina lysinu je $H_3N^+/CH_2/$ skupina a identifikační skupinou fenylalaninu je skupina C_6H_5/CH_2 . Identifikační skupina β - nebo γ -aminokyseliny je analogový atom nebo skupina atomů vázaných na β - nebo γ -uhlíkový atom. Pokud není identifikační skupina aminokyseliny specifikována, může to být α , β , nebo γ . V případě pyroglutamátu je identifikační skupina $-NH-CO-CH_2-CH_2-$.

Další charakteristiky a přednosti vynálezu jsou zřejmé z následujícího popisu jeho výhodných provedení. Vynález také objasňují následující obrázky, které však vynález nijak neomezuje.

Na obr. 1 je dvojice grafů objasňujících vliv pseudopeptidů spantidu, D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ /levý panel/ a SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ /pravý panel/ na Sp-stimulované uvolňování amylasy z pankreatické acini.

Na obr. 2 je graf ukazující vliv Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L [CH₂-NH] ^{Leu-NH₂ I} na SP-stimulované uvolňování amylasy z pankreatické acini.

Na obr. 3 je dvojice grafů objasňujících schopnost různých SP a spantidových pseudopeptidů inhibovat vázání ¹²⁵I-BH-látky P k pankreatické acini.

Na obr. 4 je graf ukazující schopnost SP a spantidových pseudopeptidů inhibovat vázání ¹²⁵I-[Tyr⁴]bombesinu k pankreatické acini.

Vynález dále objasňuje popis struktury, přípravy a použití výhodných forem provedení vynálezu.

Peptidy podle vynálezu mají všechny modifikace, například nepeptidovou vazbu v alespoň jedné udané poloze, ve které se atom uhlíku podílí na vazbě mezi dvěma zbytky a je redukován z karbonylového uhlíku na methylenový uhlík. Způsob redukce peptidové vazby, který vede k nepeptidové vazbě, popsal Coy a kol., ^{US patent č. 4803461} ~~americká přihláška vynálezu číslo 879348~~. Peptidy podle vynálezu se mohou zpracovávat na formu farmaceuticky vhodných solí. Jakožto příklady výhodných solí se uvádějí soli s farmaceuticky vhodnými kyselinami, jako je například kyselina octová, mléčná, maleinová, citronová, jablečná, as-

korbová, jantarová, benzoová, salicylová, methansulfonová, toluensulfonová a pamoová a jako jsou dále polymerní kyseliny, například kyselina třísllová nebo karboxymethylcelulóza a soli s anorganickými kyselinami, jako jsou halogenovodíkové kyseliny, například kyselina chlorovodíková, a dále jako je kyselina sírová nebo fosforečná.

Látka P, antagonist Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L/CH₂NH/Leu-NH₂, se připravuje dále uvedeným způsobem.

Ostatní analogy látky P se mohou připravovat vhodnými modifikacemi následně popsaného způsobu přípravy.

První stupeň je příprava Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L/CH₂-NH/Leu-benzhydrylaminové pryskyřice jakožto meziproduktu.

Benzhydrylaminopolystyrenová pryskyřice /Vega Biochemicals, Inc./ /0,97 g, 0,5mmol/ ve formě chloridového iontu se vnese do reakční nádoby Beckmanova 990B peptidového syntetizéru naprogramovaného k provedení následujícího reakčního cyklu: /a/ methylenchlorid; /b/ 33% trifluoroctová kyselina /TFA/ v methylenchloridu /2 krát po 1 a 25 min/; /c/ methylenchlorid; /d/ ethanol; /e/ methylenchlorid; a /f/ 10% triethylamin v chloroformu.

Neutralizovaná pryskyřice se míchá s α -t-butoxykarbonyl-/Boc/-leucinem a s diisopropylkarbodiimidem /1,5mmol v obou případech/ v methylenchloridu po dobu jedné hodiny a vzniklá aminokyselinová pryskyřice se pak cykluje ve stupni /a/ až /f/ shora uvedeným programem promývání. Butoxykarbonyl-leucinaldehyd /1,25 mmol/, připravený způsobem podle Fehrentze a Castra. Synthesis. str. 676 /1983/. se rozpustí

v 5 ml suchého dimethylformamidu /DMF/ a přidá se do pryskyřičné trifluoroctové solné suspenze, načež se přidá 100 mg /2 mmol/ kyanoborohydridu sodného /Sasaki and Coy, Peptides 8: 119 - 121 /1987/; Coy a kol./. Míchá se po dobu jedné hodiny, pak se zjistí negativní reakce pryskyřičné směsi na ninhydrin /1 min/, dokládající dokonalou derivatizaci volné aminoskupiny.

Pak se postupně kopulují následující aminokyseliny /1,5 mmol/ v přítomnosti diisopropylkarbodiimidu /1,5 mmol/ a získaná aminokyselinová pryskyřice se cykluje stupni promývání/deblokovaní /a/ až /f/ stejnou procedurou, jak shora popsáno: butoxykarbonyl-Gly /Boc-Gly se kopuluje jakožto 6M nadbytek p-nitrofenylesteru/, Boc-Phe, Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-Gln, /Boc-Gln se kopuluje jakožto 6 M nadbytek p-nitrofenylesteru/, Boc-Pro, Boc-Lys, Boc-Pro a Boc-Arg. Hotová pryskyřice se pak promyje methanolem a vysuší se na vzduchu.

Shora připravená pryskyřice /1,6 g, 0,5 mmol/ se smíchá s anisolem /5 ml/ a s bezvodým fluorovodíkem /35 ml/ při teplotě 0 °C a míchá se po dobu 45 minut. Nadbytek fluorovodíku se rychle odpaří v proudu suchého dusíku, volný peptid se vysráží a promyje se etherem. Surový peptid se rozpustí v minimálním objemu 2M kyseliny octové a čistí se na sloupci /2,5 x 90 cm/ Sephadexu G-25, který se eluuje 2M kyselinou octovou, následuje preparativní středně tlaková chromatografie na sloupci /1,5 x 45 cm/ oxidu křemičitého Vydac C₁₈ /10 až 15 mikrometrů/, který se eluuje s lineárními

gradienty acetonitrilů v 0,1% trifluoroctové kyselině za použití kontroloru gradientu Eldex Chromatrol /průtoková rychlost 1 ml/min/. Popřípadě se analogy dále čistí opětovou chromatografií na téže koloně s mírnými modifikacemi za pří-
padných mírných modifikací podmínek gradientu. Homogenity peptidu se dosahuje chromatografií v tenké vrstvě a analytickou fázovou reverzní vysokotlakou kapalinovou chromatografií; dosahuje se 97% i vyšší čistoty. Analytické stanovení aminokyselin udává očekávané poměry aminokyselin. Přítomnost redukované peptidové vazby demonstrována hmotovou spektroskopií za bombardování rychlým atomem. V každém případě analog vykazuje dobrý výtěžek molekulárního iontu odpovídající vypočtené molekulové hmotnosti.

Statinový, AHPPA, ACHPA, β -aminokyselinový nebo γ -aminokyselinový zbytek se zavádí stejným způsobem jako pří-
rodní α -aminokyselinový zbytek kopulací jako v případě Boc-aminokyselin /butoxykarbonylamínokyselin/. Statin nebo Boc-statin se může připravovat způsobem, který popsal Rich a kol. 1978, J. Org. Chem. 43, 3624; Rich a kol., 1988, J. Org. Chem. 53: 869; a Rich a kol., 1980, J. Med. Chem. 23: 27. AHPPA se může připravovat způsobem, který popsal Hui a kol., 1987 J. Med. Chem. 30: 1287. ACHPA se může připravovat způsobem, který popsal Schuda a kol., 1988, Journal of Organic Chemistry 53: 873. Boc-kopulované syntetické aminokyseliny jsou dostupné u společnosti Nova Biochemicals /Švýcarsko/, Bachem /Torrance, Kalifornie/ a CalBiochem /San Diego, Kalifornie/.

Další sloučeniny se mohou připravovat, jak shora uvedeno, a mohou se zkoušet se zřetelem na účinnost jakožto agonisty nebo antagonisty následujícím programem zkoušky.

Fáze 1 - Uvolňování amylasy z pankreatického acini

SP stimuluje uvolňování amylasy v pankreatickém acini. Stimulace nebo inhibice uvolňování amylasy pankreatickým acini se využívá jakožto míra případné účinnosti peptidu jakožto agonistu nebo antagonistu. Dispergovaná acini z pankreasu živočišného se suspenduje ve 150 ml standardního inkubačního roztoku. Uvolňování amylasy se měří způsobem, který popsal Gardner a kol., 1977, J- Physiol. 270: 439/. Aktivita amylasy se stanoví způsobem, který popsal Ceska a kol., 1969, Clin. Chim. Acta 26: 437 a Ceska a kol., 1969, Clin. Chim. Acta 26: 445/ za použití Phadebasovy reagentie. Uvolňování amylasy se vypočte jako procento účinnosti amylasy v acini na začátku inkubace, která se uvolní do extracelulárního prostředí v průběhu inkubace.

Fáze 2 - ^{kompitivní} ~~Konkurenční~~ inhibice ¹²⁵I-Bolton-Hunter-SP vazby

Vázání ¹²⁵I-Bolton-Hunter-SP /¹²⁵I-BH-SP/ k dispergovanému pankreatickému acini se měří způsobem, který popsal Jensen a kol., 1984, Biochem. Biophys. Acta 804: 181 a Jensen a kol., 1988 Am. J. Physiol. 254: G883. Inkubace obsahují 0,125 nM ¹²⁵I-BH-SP a 0,1% bacitracin jakožto standardní inkubační pufr a udržují se po dobu 30 minut na teplotě 37 °C. ^{4itel} Nenasytovaná vazba ¹²⁵I-BH-SP je množství radioaktivity

spojení s acini v případě, kdy inkubace obsahuje 0,125 nM ^{125}I -BH-SP plus 1 μM neznačeného SP. Všechny dané hodnoty jsou pro ^{titel} nasycenou vazbu, to znamená, že se vazby měří se samotným ^{125}I -BH-SP /celková vazba/. Ve všech případech se ^{titel} nenasyčená vazba podílela na celkové vazbě méně než 30 %.

Fáze 3 - ^{Kompetitivní} ~~Konkurenční~~ inhibice vazby ^{125}I -[Tyr⁴] Bombesin

Připraví se ^{125}I -[Tyr⁴] Bombesin /2200 Ci/mmol/ za použití modifikovaného způsobu, který popsal Jensen a kol., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 6139. Rozpustí se jodo-Gen /mg/ v 5 ml chloroformu a 5 mikrolitrů tohoto roztoku /1 mikrogram jodo-Genu/ se převede do nádoby v proudu dusíku. Do této nádoby se přidá 50 mikrolitrů dihydrogenfosfátu draselného /KH₂PO₄/ /hodnota pH 7,4/, 6 mikrogramů [Tyr⁴] bombesinu v 5 mikrolitrech vody a 1 mCi Na¹²⁵I, promísí se a inkubuje se po dobu 6 minut při teplotě 4 °C, přidá se jodační směs do nádoby 1M dithiothreitolu a inkubuje se při teplotě 80 °C po dobu 60 minut. Jodinační směs se pak vnese na Sep-Pak a eluuje se 0,25 M tetraethylamoniumfosfátu /TEAP/ a pak 50% /objem/objem/ systémem acetonitril - 0,25 M tetraethylamoniumfosfát. ^{125}I -[Tyr⁴] bombesin se čistí reversní fázovou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií /HPLC/ a eluuje se.

Jakožto výsledky zkoušek shora popsaných zkoušených peptidů se uvádí: Četné analogy látky P nebo spantidu jakožto antagonistu látky P, přičemž každý obsahuje nepeptidovou vazbu, se mohou připravovat a zkoušet jedním nebo několika

způsoby, jako je popsáno v odstavcích fáze 1 až fáze 3. Látka P má strukturu Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^{Gln}-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂. Spantid je analog SP. Struktura spantidu je D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂. Stimulace inhibice uvolňování amylasy z dispergovaného pankreatického acini se používá jakožto zkouška pro Sp agonistovou účinnost nebo AP antagonistovou účinnost. Při koncentraci 10 μM, 9 až 10 SP a spantidem odvozené pseudopeptidy selhávají při stimulaci uvolňování amylasy, pokud jsou přítomny samotné /tabulka II/. Jeden peptid, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L-[CH₂-NH]-Leu-Leu-NH₂, /10 μM/ má agonistovou účinnost, způsobující trojnásobný vzrůst uvolňování amylasy /tabulka II/. Každý z 9 pseudopeptidů bez agonistové účinnosti se zkouší se zřetelem na účinnost jako SP antagonist. Při koncentraci 10 μM každý ze spantidu odvozeného pseudopeptidových analogů inhibuje 1 nM-SP-stimulované uvolňování amylasy. /Tabulka II/. Tři SP pseudopeptidy, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L-[CH₂-NH]-Leu-NH₂, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L-[CH₂-NH]-Gly-Leu-Leu-NH₂ a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L-[CH₂-NH]-Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ způsobují inhibici /tabulka II/.

Relativní schopnost každého peptidu inhibovat SP-stimulované uvolňování amylasy se stanoví podle vlivu velikosti dávky peptidu na inhibici. Zjišťování inhibiční dávky se provádí pro každý z devíti pseudopeptidů za použití koncentrace SP /1 nM/, která způsobuje polovinu maximální stimulace /Obr.1/.

Výsledky

pro pět od spantidu odvozených pseudopeptidů jsou uvedeny na obr. 1, levý díl. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu L /CH₂-NH/Leu-NH₂ je stejně účinný jako spantid a způsobuje zjištěnou inhibici při ^{0,03} 0,3 μM a polovinu maximální inhibice při 1,8 μM /tabulka III/. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp L /CH₂-NH/Leu-Nle-NH₂ je dvakrát méně účinný /IC₅₀ 3,5 μM, tabulka III/ než spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln L /CH₂-NH/D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 2,6 krát /IC₅₀ 4,7 μM/ méně účinný než spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp L /CH₂-NH/Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 3,5 krát /IC₅₀ 6,4 μM/ méně účinný a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe L /CH₂-NH/D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 17 krát /IC₅₀ 30 μM/ méně účinný než spantid /tabulka III/:

Výsledky pro SP pseudopeptidové analogy jsou uvedeny na obr. 1, pravá část. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu L /CH₂-NH/Leu-NH₂ je nejúčinnějším SP derivátem, způsobujícím zjištěnou inhibici při ^{0,3} 0,3 μM a polovinu maximální inhibice při 7,1 μM /tabulka III, vpravo/. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe L /CH₂-NH/Gly-Leu-Leu-NH₂ a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln L /CH₂-NH/Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ jsou méně účinné, způsobující zjištěnou inhibici při 10 μM. Jsou 7 krát a 46 krát méně účinné než Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu L /CH₂-NH/Leu-NH₂ /tabulka III, vpravo/. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe L /CH₂-NH/Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ nemá žádnou inhibiční účinnost při koncentraci až 30 μM /obr. 1, vpravo/. Nejúčinnější pseudopeptidový antagonist odvozený od SP je Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu L /CH₂-NH/Leu-NH₂ /obr. 1, tabulka II/.

Inhibiční působení nejúčinnějšího pseudopeptidového antagonisty, odvozeného od SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L/[-CH₂-NH-]Leu-NH₂, je ukázáno na obr. 2. Acini se inkubují se vzrůstající koncentrací SP. Uvolňování amylazy je zjistitelné 0,1 nM SP, je poloviční maxima s 1 nM SP2 a je maximální s 10 nM /obr. 2/. Přidání Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L/[-CH₂-NH-]Leu-NH₂ způsobuje paralelní posun vzhůru v křivce odezvy na dávku uvolnění amylazy stimulované SP. Posun je úměrný koncentraci Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L/[-CH₂-NH-]Leu-NH₂ přidaného, nejsou však žádné změny maximální odezvy /obr. 2/. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L/[-CH₂-NH-]Nle-NH₂ poskytuje podobné výsledky, hodnoty nejsou znázorněny.

Vzájemné působení analogů odvozených od Sp a spantidu s receptory, SP pankreatických acini se může schopností peptidu inhibovat vázání ¹²⁵I-BH-SP na acini /viz Tabulka III a obr. 3/.

Le Spantid^μ~~en~~ odvozené pseudopeptidy vykazují četné účinnosti. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L/[-CH₂-NH-]Nle-NH₂ je zhruba stejně účinný jako Spantid a způsobuje zjistitelnou inhibici při 0,03 μM a polovinu maximální inhibice při 2,2 μM /obr. 3, vlevo, tabulka III/. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp ^L/[-CH₂-NH-]Leu-Nle-NH₂ a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L/[-CH₂-NH-]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ jsou dvakrát méně účinné než spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp ^L/[-CH₂-NH-]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂

je třikrát méně účinný / K_i , 6,3 μM / než spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe 4 /CH₂-NH/7D-Trp-Leu-Ile-Ile je 7 krát méně účinný / K_i , 14,7 μM / než spantid /tabulka 3, tabulka III/.

SP odvozené pseudopeptidy také vykazují řadu účinností. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu 4 /CH₂-NH/7Leu-Ile způsobuje zjištěnou inhibici při 0,1 μM a polovinu maximální účinnosti inhibiční při 3 μM . Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly 4 /CH₂-NH/7Leu-Leu-Ile má 1,5 krát nižší účinnost, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe 4 /CH₂-NH/7Gly-Lys-Leu-Ile má 20 krát nižší účinnost a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe 4 /CH₂-NH/7Phe-Gly-Leu-Leu-Ile a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln 4 /CH₂-NH/7Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-Ile jsou více než 62 krát méně účinné než Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu 4 /CH₂-NH/7Leu-Ile.

Na rozdíl od dříve studovaných SP analogů jsou peptidy podle vynálezu specifické pro SP receptory.

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu 4 /CH₂-NH/7Leu-Ile se zkoušel se zřetelem na schopnost inhibovat uvolňování ^{aktivované} amylasy /^{žlázy} různými pankreatickými žlázami /tabulka IV/. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu 4 /CH₂-NH/7Leu-Ile /20 μM / inhibuje uvolňování amylasy stimulované Sp, neměné však bombesin, CCK-8, carbachol, VIP, sekretin, CGRP A23187 nebo TIA stimulované uvolňování amylasy.

Nejúčinnější receptorové antagonisty se zkouší se zřetelem na schopnost inhibovat vázání ^{125}I -Tyr⁴/bombesinu na bombesinové receptory pankreatických acini. Spantid in-

hibuje vázání ^{125}I -[Tyr⁴]bombesinu, jak short uvedeno /Jensen a kol., 1988, Am.J.Physiol. 254:G883/, způsobuje polovinu maxima inhibice při $3 \pm 1 \mu\text{M}$ a úplnou inhibici při $100 \mu\text{M}$ /obr. 4/. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L[CH₂-NH]Nle-NH₂ inhibuje ^{125}I -[Tyr⁴]bombesinové vázání avšak je 3 krát méně účinný než spantid způsobující polovinu maximální účinnosti při $10 \mu\text{M}$ /p menší než 0,05 ve srovnání se spantidem/ /obr. 4/. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L[CH₂-NH]^{Leu-NH₂} /nezpůsobuje zjistitelnou inhibici až do koncentrace nad $30 \mu\text{M}$ a má vypočtené K_i $300 \pm 20 \mu\text{M}$. Spantid a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L[CH₂-NH]Nle-NH₂ má 3 až 10 krát nižší afinitu k inhibici ^{125}I -[Tyr⁴]bombesinové vazbě než k ^{125}I -BH-SP.

Schopnost Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ inhibovat vázání ^{125}I -[Tyr⁴]bombesinu je 70 krát nižší než jeho schopnost inhibovat vázání ^{125}I -BH-SP.

Peptidy podle vynálezu se mohou podávat sávcům, zvláště lidem jedním z běžných způsobů /například orálně, parenterálně, transdermálně nebo transmuskulárně/ ve formě přípravků s řízeným uvolňováním za použití biologicky odbouratelného biokompatibilního polymeru nebo micel, golů a liposomů. Peptidy se podávají lidem v dávce $0,5 \mu\text{g/kg/den}$ až 5 mg/kg/den .

Tabulka I

Pět koncových karboxylových zbytků různých biologicky aktivních peptidů

Peptid	Karboxylová koncová sekvence
Bombesin	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
Neuromedin-β	-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
Neuromedin-C	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
Litorin	-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
Neurokinin-A	-PheVal-Gly-Leu-Leu-NH ₂
Neurokinin-B	-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Látka P	-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂

Prototypická tachykininová sekvence -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂

kde X znamená rozvětvený alifatický nebo aromatický aminokyselinový zbytek

V případě podle následující tabulky II se acini inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 30 minut s 1 nM SP a 10 μM koncentracích různých SP a spantidových pseudopeptidových analogů buď samotných nebo v kombinaci. Uvolňování amylasy se vyjadřuje jako procento amylasové aktivity v acini na začátku inkubace, které se uvolňuje do extracelulárního prostředí v průběhu zkoušky. Hodnoty jsou středními hodnotami ± 1 SEM z alespoň pěti jednotlivých zkoušek. Při každé zkoušce se každá hodnota zjišťuje dvakrát. Zkratky mají tento význam: NT- = nezkoušeno jako antagonist jelikož jde o agonist.

Tabulka II

Vliv různých pseudopeptidů odvozených od SP a spantidu na
bazální a SP-stimulované uvolňování amylasy

Přidaný peptid	Uvolňování amylasy /celkové /	
	samotné	SP /1 nM/
žádný	3,4 ± 0,5	6,6 ± 0,7
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- - Gly-Leu ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Leu-NH ₂ /10 /μM/	3,1 ± 0,7	4,3 ± 0,5 ⁺
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- - Gly ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Leu-Leu-NH ₂ /10 /μM/	10,4 ± 1,0 ⁺⁺	NT-agonist
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Gly-Leu-Leu-NH ₂ /10 /μM/	3,1 ± 1,0	5,4 ± 0,7 ⁺
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂ /10 /μM/	3,8 ± 0,7	6,4 ± 0,3
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L /-CH ₂ -NH ₂ - Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂ /10 /μM/	3,1 ± 0,9	6,1 ± 1,0 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe- - D-Trp-Leu ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Nle-NH ₂ /10 /μM/	3,8 ± 0,05	3,6 ± 0,1 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe- - D-Trp ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Leu-Nle-NH ₂ /10 /μM/	3,9 ± 0,8	4,2 ± 0,2 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe ^L /-CH ₂ -NH ₂ /D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ /10 /μM/	4,0 ± 0,5	5,6 ± 0,8 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp ^L /-CH ₂ -NH ₂ /Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ /10 /μM/	4,1 ± 0,5	4,8 ± 1,2 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L /-CH ₂ -NH ₂ - D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ /10 /μM/	3,8 ± 0,3	4,5 ± 0,8 ⁺

⁺ výrazně méně než samotný SP, p menší než 0,05

⁺⁺ výrazně více než při žádné přísadě, p menší než 0,01

Tabulka III

Schopnost SP, spantidu a pseudo~~peptidu~~ inhibovat vázání

^{125}I -En-SP nebo SP-stimulované uvolňování amylasy

Peptid	^{125}I -En-sp K_K nebo K_d / μM	Inhibice 1 Ngsp -stimu- lovaného uvolňování amylasy IC_{50} / μM
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp- - Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH ₂ /spantid/	2,1 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,1
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp- - Phe-D-Trp-Leu $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Leu-NH ₂	2,2 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,25
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp- - Phe-D-Trp $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Leu-NH ₂	3,6 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,6
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp- - Phe $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/D-Trp-Leu-NH ₂	14,7 $\pm$ 2,0	30,0 $\pm$ 5,0
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Phe-D-Trp-Leu-NH ₂	6,3 $\pm$ 3,3	6,4 $\pm$ 1,4
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln $^{\text{L}}$ /CH ₂ - - NH/D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-NH ₂	4,3 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 1,3
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe- - Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ /SP/	0,0025 $\pm$ 0,005	ne-agonist
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe- - Phe-Gly-Leu $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Leu-NH ₂	4,3 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,9 ⁺
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- - Gly $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Leu-Leu-NH ₂	5,6 $\pm$ 2,2	ne-agonist
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Gly-Leu-Leu-NH ₂	41,3 $\pm$ 16,7	větší než 30
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe $^{\text{L}}$ /CH ₂ -NH/Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂	265,0 $\pm$ 88,0	větší než 30
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln $^{\text{L}}$ /CH ₂ - - NH/Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂	310,0 $\pm$ 88,0	větší než 30

Hodnoty jsou středními hodnotami $\pm$ 1SEM Kd hodnot pro SP a získají se ze Scatchardovy analýzy ^{125}I -značeného SP studia vazby hodnot K_i pro agonist nebo pro antagonisty ze studia vazby ^{125}I -BH-SP, přičemž platí rovnice: $K_i = R/(1-R) \cdot (B/S + A)$, kde R je nasytitelná vazba ^{125}I -BH-SP v přítomnosti antagonistu /B/, vyjádřeno jakožto zlomek pro případ, kdy B není obsažen; A je koncentrace ^{125}I -BH-SP /0,125 nM/. B je koncentrace antagonisty, S je K_d SP stanovená Scatchardovou analýzou. "Ne-agonist" znamená, že peptid není zroušen na inhibiční účinnost, pro agonistovou účinnost, pokud je přítomen samotný.

Tabulka IV

Schopnost Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^{11}I -[OH₂-NH₂]-Leu-NH₂ ovlivňovat uvolňování amylasy stimulované různými faktory

uvolňování amylasy /celkové procento/

Faktor	samotné	Leu ^{11}I 10-11-SP 20 μM
žádný	2,7 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,3
látka P /1 nM/	8,7 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 0,5 ⁺
CGK-8 /0,1 nM/	19,7 $\pm$ 4,2	21,6 $\pm$ 4,9
Bombesin /0,3 nM/	14,6 $\pm$ 4,1	14,3 $\pm$ 3,1
karbachol /10 μM /	22,7 $\pm$ 4,1	20,7 $\pm$ 4,3
VIP /0,3 nM/	20,5 $\pm$ 3,5	18,9 $\pm$ 4,2
secretin /0,1 μM /	16,9 $\pm$ 3,6	18,6 $\pm$ 4,1
UGRP /0,1 μM /	12,1 $\pm$ 3,3	12,0 $\pm$ 3,9
A23187 /0,1 μM /	9,9 $\pm$ 1,5	11,6 $\pm$ 1,6
TPA /0,1 μM /	32,2 $\pm$ 5,7	30,2 $\pm$ 5,6

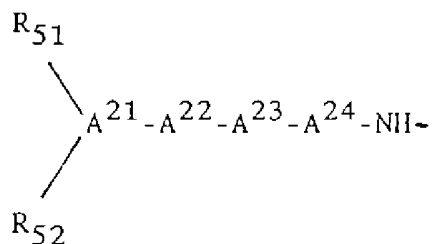
⁺ výrazně menší než faktor samotný p menší než 0,001

Acini se inkubují po dobu 30 minut při teplotě 37 °C s různými látkami k vylučování pankreatového sekretu samotný^e nebo s Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^D [CH₂-NH]₂ Leu-NH₂. V každé zkoušce se každá hodnota stanovuje dvakrát a výsledky jsou středem $\pm$ 1SEM z alespoň čtyř oddělených zkoušek.

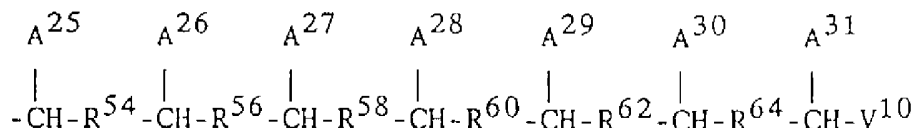
Zkratky mají tento význam: CCK-8, CCK koncový ^{Cys⁶} ^{VIP} ~~ektapeptid~~ cho-
lecystokininu; VIP vazektivní intestinální peptid; CGRP, calcitonin
na gen vztažený peptid; A23187 a TPA 1,2-o-tetradekanoylforbol-1,3-
acetát.

Vynález lze přirozeně různě modifikovat a obměňovat.

1. Lineární peptid obecného vzorce I:

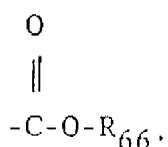


(I)

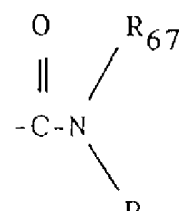


kde

- A^{21} je D nebo L izomér Arg nebo Lys
 A^{22} je D nebo L izomér Pro
 A^{23} je D nebo L izomér Lys
 A^{24} je D nebo L izomér Pro
 A^{25} je identifikační skupina D nebo L izoméru Gln
 A^{26} je identifikační skupina D nebo L izoméru Gln
 A^{27} je identifikační skupina D-Trp nebo identifikační skupina D nebo L izoméru Phe
 A^{28} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze s⁹boru β -Nal, Phe, o-X-Phe, kde X je F, Cl, Br, NO₂, OH nebo CH₃, nebo p-X-Phe, v kterém X je F, Cl, Br, NO₂, OH nebo CH₃
 A^{29} je identifikační skupina aminokyseliny D-Trp nebo identifikační skupina D nebo L izoméru Phe
 A^{30} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze skupiny Leu, Nle, Ala, Val nebo Ile
 A^{31} je identifikační skupina D nebo L izoméru aminokyseliny ze skupiny Leu, Nle, Ala, Val nebo Ile
 R^{54} je CO-NH nebo CO-NCH₃
 R^{56} , R^{62} a R^{64} jsou nezávisle CO-NH nebo CH₂-NH
 R^{58} je CO-NR⁶⁹, v kterém R⁶⁹ je H nebo C₁₋₁₂ alkyl nebo CH₂-NH
 R^{60} je CO-NH a
 V^{10} je



nebo



v kterých každý R_{66} , R_{67} a R_{68} je nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl nebo C_{12-20} naftylalkyl a R^{51} a R^{52} , které jsou vázané na α -aminodusíkový atom N-koncové aminokyseliny jsou nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl nebo COE_{24} , kde E_{24} je C_{1-20} alkyl, C_{3-20} alkenyl, C_{3-20} alkinyl, fenyl, naftyl nebo C_{7-10} fenylalkyl za podmínky, že ~~jak~~ jeden ze symbolů R^{51} a R^{52} je COE_{24} , druhý musí být atom vodíku, přičemž nejméně jeden ze symbolů R^{56} , R^{58} , R^{62} nebo R^{64} je CH_2NH , nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

2. Lineární peptid podle nároku 1 vzorce $H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L[CH_2-NH]Leu-Nle-NH_2$ nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

3. Lineární peptid podle nároku 1 vzorce $H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH_2-NH]Nle-NH_2$ nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

4. Lineární peptid podle nároku 1 vzorce $H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L[CH_2-NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH_2$ nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

5. Lineární peptid podle nároku 1 vzorce $H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH_2-NH]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH_2$ nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

6. Lineární peptid podle nároku 1, kde

A^{29} je identifikační skupina D-Trp.

7. Lineární peptid podle nároku 1, kde

A^{21} je D nebo L izoměr Arg

A^{22} je Pro

A^{23} je Lys

A^{24} je Pro

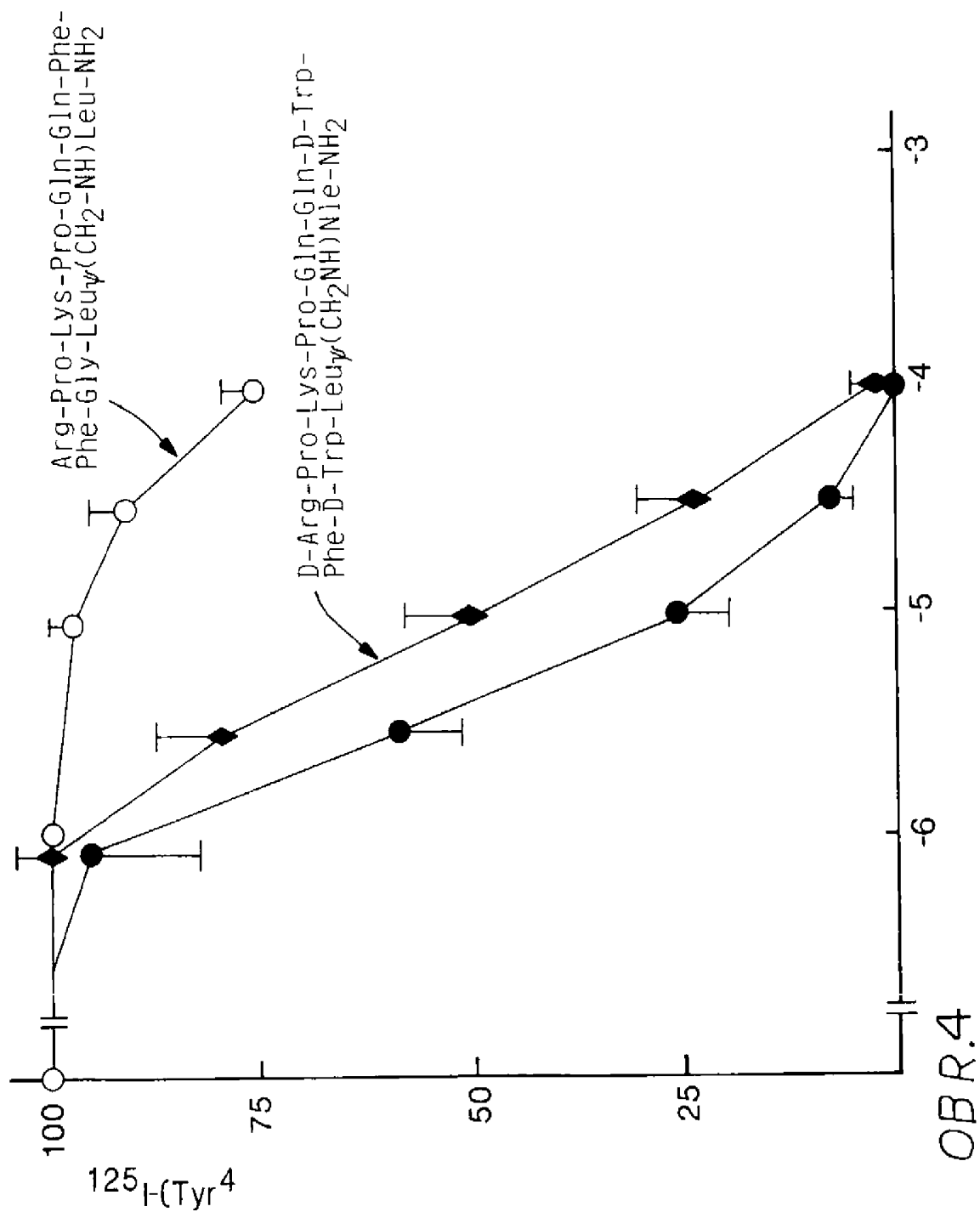
A^{25} je identifikační skupina Gln

A^{26} je identifikační skupina Gln

A^{27} je identifikační skupina Phe nebo D-Trp

76168

- A²⁸ je identifikační skupina Phe
- A²⁹ je identifikační skupina D Trp
- A³⁰ je identifikační skupina Leu
- A³¹ je identifikační skupina Leu alebo Nle.



PROVA
A 001
ORAD
0480

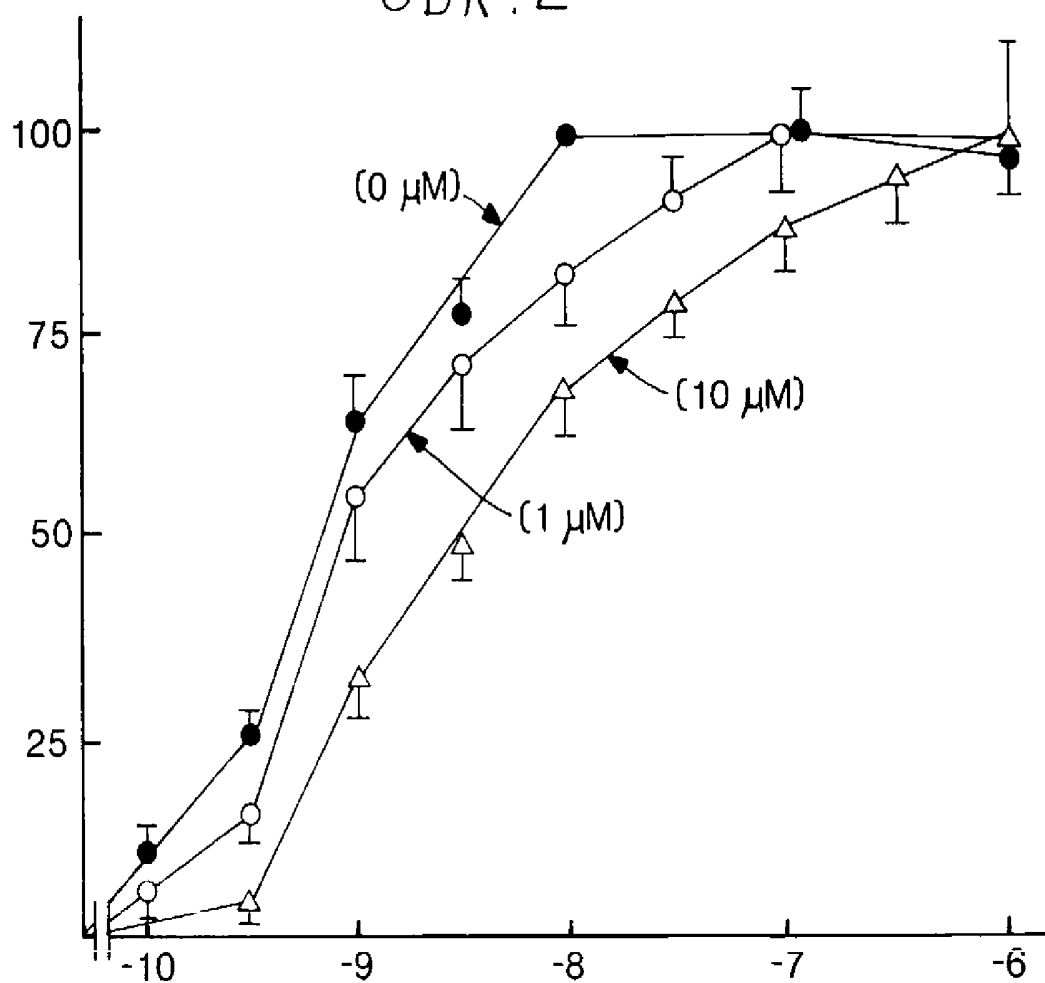
6 IX 60

105150

PATENTSERVIS
PRAHA

051593
09 XI 90
ČSAP
PRO VYVÁŽENÍ
A OBJEVY
PRAHA

OBR. 2



PATENTIS TRVIS
PRAHA

