

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

284 783

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3979-90**

(22) Přihlášeno: **13. 08. 90**

(30) Právo přednosti:
14. 08. 89 DE 89/3926822

(40) Zveřejněno: **18. 03. 92**
(Věstník č. 3/92)

(47) Uděleno: **08. 01. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
C 07 K 7/18
A 61 K 38/00

(73) Majitel patentu:

HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce vynálezu:

Henke Stephan dr., Hofheim am Taunus,
DE;
Breipohl Gerhard dr., Frankfurt am Main,
DE;
Knolle Jochen dr., Kriftel, DE;
Schölkens Bernward prof. dr.,
Kelkheim/Taunus, DE;
Gerhards Hermann dr., Hofheim am
Taunus, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Žitná 25, Praha 1,
11504;

(54) Název vynálezu:

**Peptid, způsob jeho výroby a
farmaceutický prostředek tuto látku
obsahující**

(57) Anotace:

Řešení se týká peptidu obecného vzorce I,
A-B-C-E-F-K-(D)-Phe-G-M-F-I (II),
ve kterém mají jednotlivé symboly významy, uvedené
v popisné části a způsobu jeho výroby postupným
budováním nebo reakcí fragmentu s volnou C-termi-
nální karboxylovou skupinou nebo jeho aktivované-
ho derivátu s odpovídajícím fragmentem s volnou
N-termiální aminoskupinou. Dále se týká farma-
ceutického prostředku pro ošetření patologických
stavů, způsobených, vyvolaných nebo podporova-
ných bradykininem a bradykininu příbuznými pepti-
dy.

CZ 284 783 B6

Peptid, způsob jeho výroby a farmaceutický prostředek tuto látku obsahujícíOblast techniky

5

Vynález se týká peptidů s antagonistickým účinkem vůči bradykininu, způsobu jejich výroby a farmaceutických prostředků tyto látky obsahujících.

10 Dosavadní stav techniky

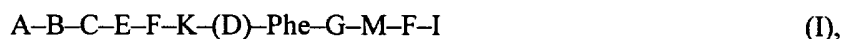
Peptidy s uvedeným účinkem byly popsány ve WO 86/07263. Jde o látky, v nichž je v peptidovém hormonu bradykininu nebo v některém z jeho analogů nahrazen mimo jiné L-Pro v poloze 7 D-aminokyselinou, jako je D-Phe, D-Thi, D-Pal, CDF, D-Nal, MDY, D-Phg, D-His, D-Trp, D-Tyr, D-hPhe, D-Val, D-Ala, D-His, D-Ile, D-Leu a DOMT.

15

Úkolem předloženého vynálezu je získání nových peptidů se stejnými účinky.

20 Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou peptidy obecného vzorce I,



25

ve kterém

A znamená atom vodíku, (D)- nebo (L)-H-Arg, (D)- nebo (L)-H-Lys nebo (D)- nebo (L)-H-Orn,

30

B znamená Arg, Orn nebo Lys, přičemž guanidinová skupina nebo aminoskupina v postranním řetězci je popřípadě substitována atomem vodíku, alkanoylovým zbytkem o 1 až 8 atomech uhlíku, aryloylovým zbytkem o 7 až 14 atomech uhlíku, mono- až tricyklickým heteroaryloylovým zbytkem o 3 až 9 atomech uhlíku s heteroatomy, vybranými ze skupiny zahrnující N, O a S, alkylsulfonylovým zbytkem o 1 až 8 atomech uhlíku nebo arylsulfonylovým zbytkem o 6 až 12 atomech uhlíku, přičemž aryl, heteroaryl, aryloyl, arylsulfonyl a heteroaryloyl může být substituován 1, 2, 3 nebo 4 stejnými nebo různými zbytky ze skupiny zahrnující methylovou skupinu, methoxyskupinu a atom halogenu,

35

C znamená Pro-Pro-Gly, Hyp-Pro-Gly nebo Pro-Hyp-Gly,

40

E znamená Phe nebo Thia,

F znamená Ser, Hser, Lys, Leu, Val, Nle, Ile nebo Thr,

45

K znamená přímou chemickou vazbu,

M znamená přímou chemickou vazbu,

G znamená zbytek heterocyklického systému vzorce IV,

50



ve kterém R^4 a R^5 tvoří společně s atomy, na které jsou vázány heterocyklický monocyklický nebo bicyklický kruhový systém, přičemž tento kruhový systém je zvolený ze skupiny zahrnující kyselinu pyrrolidin-2-karboxylovou, kyselinu piperidin-2-karboxylovou, kyselinu 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylovou, kyselinu cis- a trans-dekahydroisochinolin-3-karboxylovou, kyselinu cis-endo, cis-exo, trans-oktahydroindol-2-karboxylovou, cis-endo-, cis-exo, trans-oktahydrocyklopentan[b]pyrrol-2-karboxylovou a kyselinu hydroxyprolin-2-karboxylovou,

F znamená Arg,

I znamená hydroskupinu a

(D)-Phe znamená D-fenylalanin

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Dále je předmětem předloženého vynálezu způsob výroby peptidů obecného vzorce I, při kterém se

a) uvede do reakce fragment s volnou C-terminální karboxylovou skupinou nebo jeho aktivovaný derivát s odpovídajícím fragmentem s volnou N-terminální aminoskupinou, nebo se

b) peptid buduje postupně,

načež se ve sloučenině, získané v provedení a) nebo b) popřípadě odštěpí ochranné skupiny, dočasně zavedené a popřípadě se takto získaná sloučenina obecného vzorce I převede na některou ze svých fyziologicky přijatelných solí.

Peptidy obecného vzorce I jsou vhodné jako léčiva, obzvláště pro výrobu léčiv pro ošetření patologických stavů, vyvolaných nebo podporovaných bradykininem a bradykininu příbuznými peptidy.

Předmětem vynálezu je také farmaceutický přípravek pro ošetření patologických stavů, způsobených, vyvolaných nebo podporovaných bradykininem a bradykininu příbuznými peptidy, který jako účinnou látku obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I.

Pokud není uvedeno jinak, znamená zkratka zbytku aminokyseliny bez uvedení konfigurace tento zbytek v L-formě.

Pokud není výslovně uvedeno jinak, mohou být alkylové zbytky přímé nebo rozvětvené, což platí také pro odvozené zbytky, jako je například alkoxy skupina, aralkylová skupina nebo alkanoylová skupina.

Arylovým zbytkem se 6 až 12 uhlíkovými atomy je výhodně fenylová, naftylová nebo bifenylová skupina. Obdobné platí i pro odvozené zbytky, jako je například aryloxyskupina, aralkylová skupina nebo aroylová skupina.

Atomem halogenu je výhodně atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu, výhodně atom chloru.

Ze solí připadají v úvahu především soli s fyziologicky přijatelnými aminy nebo anorganickými nebo organickými kyselinami, jako je například kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, fosforečná, maleinová, fumarová, citronová, vinná nebo octová.

Uvedené peptidy je možno získat pomocí postupů známých z chemie peptidů, uvedených například v publikaci Houben–Weyl, Methoden der organischen Chemie, sv. 15/2, výhodně syntézou v pevné fázi, například podle publikace B. Merifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963) nebo R. C. Sheppard, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 118 (1983), je možno užít také ekvivalentních postupů. Z ochranných skupin pro α -aminokyseliny je možno užít urethanové ochranné skupiny, například terc.butyloxykarbonyl (Boc), fluorenylmethyloxykarbonyl (Fmoc). V případě, že k zábraně vedlejších reakcí nebo pro získání zvláštních postupů je toho zapotřebí, je možno ještě chránit také funkční skupiny postranního řetězce aminokyseliny vhodnými ochrannými skupinami, uvedenými například v T. W. Greene, „Protective Groups in Organic Synthesis“, přičemž se v první řadě užije Arg(Tos), Arg(Mts), Arg(Mtr), Arg(Pmc), Asp(OBzl), Asp(OBut), Cys(4-MeBzl), Cys(Acm), Cys(SBut), Glu(OBzl), Glu(OBut), His(Tos), His(Fmoc), His(Dnp), His(Trt), Lys(Cl-Z), Lys(Boc), Met(O), Ser(Bzl), Ser(But), Thr(Bzl), Thr(But), Trp(Mts), Trp(CHO), Tyr(Br-Z), Tyr(Bzl) nebo Tyr(But).

Při syntéze v pevné fázi se začíná na C-terminálním zakončení peptidu vazbou chráněné aminokyseliny na odpovídající pryskyřici. Výchozí materiál tohoto typu je možno získat vazbou chráněné aminokyseliny na polystyrenovou nebo polyakrylamidovou pryskyřici, modifikovanou chlormethylovou skupinou, hydroxymethylovou skupinou, benzhydrylamínoskupinou (BHA) nebo methylbenzhydrylamínoskupinou (MBHA) pomocí esterové nebo amidové vazby. Uvedené pryskyřice se běžně dodávají. Pryskyřice, modifikované BHA nebo MBHA jsou vhodné v případě, že výsledný peptid má mít na C-terminálním zakončení volnou amidovou skupinu. V případě, že peptid má mít na C-terminální zakončení sekundární amidoskupinu, užije se pryskyřice s chlormethylovými nebo hydroxymethylovými skupinami a odštěpení se provádí odpovídajícími aminy. V případě, že se například má získat ethylamid, je možno odštěpit peptid od pryskyřice ethylaminem, přičemž štěpení ochranných skupin na postranním řetězci se pak provádí jinými reakčními činidly. V případě, že v peptidu mají zůstat butylové ochranné skupiny na postranním řetězci aminoskupiny, provádí se syntéza při použití ochranné skupiny Fmoc pro dočasné blokování α -aminoskupiny aminokyseliny, například postupem, uvedeným v R. C. Sheppard, J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1982, 587, přičemž guanidinová funkce arginu se chrání protonací použitím pyridiniumchloristanu a ochrana další aminokyseliny v postranním řetězci se provádí katalytickou hydrogenací podle A. Felix a další. J. Org. Chem. 13, 4194 (1978) nebo působením sodíku v kapalném amoniaku podle W. Roberts, J. Am. Chem. Soc. 76, 6203 (1954), těmito postupy je možno odstranit použitou benzylovou ochrannou skupinu.

Po odštěpení ochranné skupiny na aminoskupině aminokyseliny, vázané na pryskyřici vhodných reakčním činidlem, například kyselinou trifluoroctovou v methylenchloridu v případě použití skupiny Boc nebo 20% roztokem piperidinu v dimethylformamidu v případě ochranné skupiny Fmoc se pak postupně váží v požadovaném pořadí další chráněné aminokyseliny. Jako meziprodukty vznikají peptidy, vázané na pryskyřici a chráněné na N-terminální zakončení, ochranná skupina se před vazbou dalšího derivátu aminokyseliny odstraní.

Jako vazné činidlo je možno užít různá aktivační činidla, běžně užívaná při syntéze peptidů a popsaná například v publikaci Houben–Weyl, Methoden der organischen Chemie, sv. 15/2, zejména jde o karbodiimidy jako N,N'-dicyklohexylkarbodiimid, N,N'-diisopropylkarbodiimid, nebo N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid. Vazbu je možno provést přímo přidáním derivátu aminokyseliny a aktivačního reakčního činidla a popřípadě přísady, potlačující racemisaci, jako je například 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), popsány v publikaci W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2054 (1970), nebo je možno předběžně aktivovat derivát aminokyseliny jako symetrický anhydrid nebo jako HOBt- nebo HOOBt-ester a roztok aktivované látky přidat ve vhodném rozpouštědle k peptidu, navázanému na pryskyřici.

Vazba a aktivace derivátu aminokyseliny některých se svrchu uvedených aktivačních činidel se provádí například v dimethylformamidu, N-methylpyrrolidonu nebo methylchloridu nebo ve směsi uvedených rozpouštědel. Aktivovaný derivát aminokyseliny je možno užít v 1,5 až 4násobném přebytku. V případě, že dojde k neúplné vazbě je možno vaznou reakci opakovat, aniž by bylo nutné nejprve odblokovat α -aminoskupinu peptidu, vázaného na pryskyřici.

Průběh vazné reakce je možno ověřit reakcí s ninhydrinem, například podle publikace E. Kaiser a další, Anal. Biochem. 34, 595 (1970). Syntézu je možno provádět také automaticky, například při použití automatického zařízení, jako je Peptid-Synthesizer Modell 430 A (Applied Biosystems), přičemž je možno užít programu, dodaného výrobcem nebo je možno užít vlastního programu. Vlastní program se užívá zejména při použití derivátu aminokyseliny s ochrannou skupinou Fmoc.

Po získání peptidu uvedeným způsobem je možno peptid od pryskyřice odštěpit vhodným reakčním činidlem, například plynným fluorovodíkem, zvláště u peptidů, získaných s použitím Boc, nebo kyselinou trifluoroctovou, zvláště pro peptidy, získané s použitím Fmoc. Tato reakční činidla odštěpují nejen peptid od pryskyřice, nýbrž také ochranné skupiny na postranních řetězcích derivátu aminokyselin. Tímto způsobem se získá peptid ve formě volné kyseliny, není-li použita pryskyřice, modifikovaná BHA nebo MBHA. V případě použití těchto pryskyřic se získá peptid po odštěpení fluorovodíkem nebo kyselinou trifluormethansulfonovou, jako amid kyseliny. Další postupy pro výrobu amidů peptidů byly popsány v DE P 37 11 866.8 a P 37 43 620.1. V tomto případě se amid peptidu odštěpí od pryskyřice středně silnou kyselinou, obvykle užívané při syntéze peptidů, například kyselinou trifluoroctovou, přičemž se přidávají ještě látky, které mohou vázat kationty jako fenol, kresol, thiokresol, anisol, thioanisol, ethandithio, dimethylsulfid, ethylmethylsulfid a podobně jednotlivě nebo ve směsi. Kyselina trifluoroctová může být užita ve vhodném rozpouštědle, například methylenchloridu.

V případě, že není zapotřebí odstranit terc.butylové nebo benzylové ochranné skupiny na postranních řetězcích peptidu, je možno peptid odštěpit z modifikované nosné pryskyřice 1% kyselinou trifluoroctovou v methylenchloridu podle publikace R. C. Sheppard, J. Cehm. Sod., Chem. Comm. 1982, 587. V případě, že mají zůstat zachovány některé terc.butylové nebo benzylové ochranné skupiny na postranních řetězcích, užije se vhodné kombinace syntézy a odštěpení.

Při syntéze peptidů s C-terminální amidoskupinou nebo omega-amino nebo omega-guanidin-alkylovou skupinou se rovněž užije modifikovaná nosná pryskyřice podle uvedené Sheppardovy publikace. Po syntéze se peptid, plně chráněný na postranním řetězci od pryskyřice odštěpí a pak se uvede do reakce klasickým způsobem v roztoku s odpovídajícím aminem, omega-amino-alkylamin nebo omega-guanidinalkylamin, přičemž je možno případné další funkční skupiny dočasně chránit obvyklým způsobem.

Další postup pro výrobu peptidů s omega-aminoalkylovou skupinou byl popsán v EP 264 802.

Peptidy obecného vzorce I je možno získat s výhodou postupu s použitím pevné fáze podle dvou obecných postupů použitých ochranných skupin.

Syntéza byla prováděna na automatickém zařízení Peptidsynthesiser Modell 430 A (Applied Biosystems) při použití ochranných skupin Boc nebo Fmoc k dočasné ochraně α -aminoskupin.

Při použité ochranné skupiny Boc bylo užito programu, dodaného výrobcem.

Syntéza peptidu s volnou karboxylovou skupinou na C-terminálním zakončení byla prováděna na 4-(hydroxymethyl)fenylacetamidomethyl polystyrenové pryskyřici s navázanou Boc-amino-

kyselinou (Applie Biosystems) podle publikace R. B. Merrifield, J. Org. Chem. 43, 2845 (1978). Pro výrobu amidu peptidu bylo užito pryskyřice MBHA téhož výrobce.

- Jako aktivační činidlo byl použit N,N'-dicyklohexylkarbodiimid nebo N,N'-diisopropylkarbodiimid. Aktivace byla prováděna ve formě symetrického anhydridu, HOBt- nebo HOObt-esteru v methyldichloridu, směsi methyldichloridu a dimethylformamidu nebo NMP. Pro vazbu bylo užito 2 až 4 ekvivalentů aktivovaného derivátu aminokyseliny. V případě, že vazba proběhla neúplně, byl postup opakován.
- Při použití ochranné skupiny Fmoc k dočasné ochranné α -aminoskupiny byl postup prováděn při použití téhož zařízení, avšak s použitím vlastního programu. Syntéza byla prováděna na p-benzyloxybenzylalkoholové pryskyřici podle publikace S. Wang, J. Am. Chem. Soc. 95, 1328 (1973), (Fa. Bachem) způsobem podle publikace E. Atherton a další, J. C. S. Chem. Comm. 1981, 336, pryskyřice byla esterifikována odpovídající aminokyselinou. Aktivace derivátu aminokyseliny ve formě HOBt- nebo HOObt-esteru probíhala přímo v dodaném zásobníku přístroje pro aminokyselinu přidáním roztoku diisopropylkarbodiimidu v dimethylformamidu k předem získané směsi derivátu aminokyseliny a HOObt nebo HOBt. Je možno užít také OObt-ester aminokyseliny, chráněný Fmoc, jak je popsáno v EP 247 573. Odštěpení ochranné skupiny Fmoc bylo prováděno 20% roztokem piperidinu v dimethylformamidu v reakční nádobě. Reaktivní derivát aminokyseliny byl užit v přebytku 1,5 až 2,5 ekvivalentu. V případě, že došlo k neúplné vazbě, byla vazba opakována stejně jako při použití metody Boc.

- Peptidy obecného vzorce I mají jednotlivě nebo ve směsi antagonistický účinek vůči bradykininu. Tento účinek je možno prokázat na různých modelech, uvedených v Handbook of Exp. Pharmacol, sv. 25, Springer Verlag, 1970, str. 53 – 55, například na izolované děloze krysy, tenkém střevu morčete nebo na izolované plicní tepně morčete.

- Pro zkoušky peptidu obecného vzorce I na izolované plicní tepně morčete se morče (Dunkin Hartley) s hmotností 400 až 450 g usmrtí ranou do týla.

- Hrudní koš se otevře a opatrně se vypreparuje plicní tepna. Okolní tkáň se opatrně odstraní a tepna se spirálně rozřízne v úhlu 45°.

- Proužek tepny s délkou 2,5 cm a šířkou 3 až 4 mm se upevní do orgánové lázně s objemem 10 ml, naplněné Ringerovým roztokem následujícího složení:

složka	mmol/l
NaCl	154
KCl	5,6
CaCl ₂	1,9
NaHCO ₃	2,4
glukóza	5,0

- Roztokem se nechá probublávat směs 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého, teplota roztoku je 37 °C, pH 7,4, zatížení proužku 1,0 g.

- Isotonické změny koncentrace se zaznamenávají pomocí páčky příslušným zařízením (HF-Modem, Hugo Sachs) a registrují kompenzačním pisátkem (BEC, Goerz Metrawatt SE 460).

- Po 1 hodině pro dosažení rovnovážného stavu se provádí vlastní pokus. Po době, při níž dosáhne proužek maximální citlivosti k roztoku s obsahem 2×10^{-7} molu/l bradykininu (bradykinin vede k kontrakci proužku) se nechávají působit peptidy vždy 10 minut v dávce 5×10^{-8} až

1×10^{-5} mol/l a pak se znovu přidá bradykinin a určuje se pokles jeho účinku ve srovnání s kontrolami.

5 K průkazu parciálního antagonistického účinku se užijí peptidy v dávkách 1×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l.

Pro sloučeninu H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH byla prokázána hodnota $IC_{50}[M] = 1,4 \cdot 10^{-8}$.

10 Peptidy obecného vzorce I je možno užít při všech patologických stavech, vyvolaných nebo podporovaných bradykininem a příbuznými peptidy. Jde například o úrazy, poranění, spáleniny, dále o vyrážky, erytemy, otoky, anginy, artritidy, astma, alergie, rýmu, šok, záněty, nízký krevní tlak, bolestivé stavy, svědivé stavy a změny pohyblivosti spermatu.

15 Vynález se rovněž týká použití peptidů obecného vzorce I k léčbě a k výrobě farmaceutických prostředků.

Tyto farmaceutické prostředky obsahují peptidy obecného vzorce I jednotlivě nebo ve směsi spolu s anorganickými nebo organickými farmaceutickými nosiči.

20 Peptidy je možno podávat enterálně nebo parenterálně, například podkožně, nitrosvalově nebo nitrožilně, pod jazyk do kůže, do nosu, rektálně, intravaginálně, do dutiny ústní nebo inhalací. Dávka účinné látky závisí na druhu teplokrevného živočicha, tělesné hmotnosti, stáří a způsobu podání.

25 Farmaceutické prostředky je možno získat běžným způsobem tvorbou roztoku, směsi, granulátu nebo dražováním.

30 Pro perorální podání nebo pro podání na sliznici se účinné látky mísí s vhodnými přísadami, jako jsou nosiče, stabilizátory nebo inertní ředidla a běžným způsobem se zpracovávají na vhodné lékové formy jako tablety, dražé, kapsle, vodné, alkoholové nebo olejové suspenze nebo roztoky. Z inertních nosičů je možno použít například arabskou gumu, oxid hořečnatý, uhličitán hořečnatý, fosforečnan draselný, mléčný cukr, glukózu, stearyl fumarát hořečnatý nebo škroby, zejména kukuřičný škrob. Příprava může probíhat granulací za sucha nebo za vlhka. Z olejových
35 nosičů nebo rozpouštědel padají v úvahu například rostlinné nebo živočišné oleje, jako slunečnicový olej, rybí tuk.

Prostředek pro místní podání může být vodný nebo olejový roztok, lotion, emulze, želé, mast nebo krém nebo popřípadě sprej, obvykle se přidává polymer ke zlepšenému přilnutí prostředku.

40 Při podání do nosu se sloučeniny mísí s běžnými přísadami, jako jsou stabilizátory nebo inertní ředidla a obvyklým postupem se připraví vhodná léková forma, jako vodný, alkoholový nebo olejový roztok nebo suspenze. K vodným prostředkům pro podání do nosu je možno přidat látky, tvořící cheláty, kyselinu ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctovou, citronovou, vinnou nebo jejich soli. K podání do nosu je možno užít dávkovacího rozprašovače nebo je možno prostředek
45 podávat jako nosní kapky s podílem, zvyšujícím viskozitu nebo ve formě gelu nebo krému.

Pro použití k inhalaci se užije rozprašovací zařízení nebo tlakového balení při použití inertního nosného plynu.

50 Pro nitrožilní, podkožní, epikutánní nebo intradermální podání se uvádějí účinné látky nebo jejich soli, přijatelné z fyziologického hlediska do roztoku, suspenze nebo emulze, popřípadě

spolu s běžnými pomocnými látkami, například k dosažení isotonického roztoku nebo úplně pH, použít je možno také pomocná rozpouštědla, emulgátory a další pomocné látky.

5 Vzhledem ke krátkému poločasu uvedených látek v tělesných tekutinách je účelné použít retardovaných prostředků v injekčním podání. Lze užít například olejové krystalické suspenze, mikrokapsle, tyčinky nebo implantáty, přičemž je možno užít kompatibilních polymerů, které se v organismu odbourávají, například kopolymerů kyseliny polymléčné a polyglykolové nebo lidského albuminu.

10 Dávka pro místní a inhalační podání je roztok s obsahem účinné látky 0,01 až 5 mg/ml, systemického podání se užívá dávka 0,01 až 10 mg/kg.

Vysvětlení zkratk:

15 Zkratky, užívané pro aminokyseliny odpovídají běžnému označení třemi písmeny, které se užívá v chemii peptidů podle Europ. J. Biochem. 138, 9 (1984). V průběhu přihlášky bylo dále použito následujících zkratk:

	Acm	acetamidomethyl
20	eta-Ahx	eta-aminohexanoyl
	Aoc	cis, endo-2-azabicyklo[3:3.0]oktan-3S-karbonyl,
	Boc	terc.butyloxykarbonyl
	But	terc.butyl
	Bzl	benzyl
25	CDF	chlor-(D)-fenylalanyl
	Cha	cyklohexylalanyl
	Chg	cyklohexylglycyl
	Cl-Z	4-chlorbenzyloxykarbonyl
	DMF	dimethylformamid
30	DOMT	O-methyl-(D)-threonyl
	Dnp	2,4-dinitrofenyl
	Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
	MDY	O-methyl-(D)-tyrosyl
	Me	methyl
35	4-Mebzl	4-methylbenzyl
	Mtr	4-methoxy-2,3,6-trimethylfenylsulfonyl
	Mts	mesitylen-2-sulfonyl
	Nal	naftylalanyl
	NMP	N-methylpyrrolidin
40	Npg	neopentylglycyl
	Oic	cis-endo-oktahydroindol-2-karbonyl
	Opr	isoxazolidin-3-ylkarbonyl
	Pal	pyridylalanyl
	Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
45	Tbg	terc.butylglycyl
	TFA	kyselina trifluoroctová
	Tcs	4-methylfenylsulfonyl
	This	2-thienylalanyl
	Tic	1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-ylkarbonyl
50	Trt	trityl

V následujícím příkladu je osvětlena nejvýhodnější metoda pro výrobu peptidů obecného vzorce I v pevné fázi.

Při provádění tohoto postupu bylo užito následujících derivátů aminokyseliny:

5 Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Boc-(D)-Arg-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmo-Hyp-OH, Fmoc-Pro-
OObt, Fmoc-Gly-OObt, Gmoc-Phe-OObt, Fmoc-Ser(tBu)-OObt, Fmoc-(D)-Phe-OH, Fmoc-
Gln-OH, Fmoc-Aoc-OH, Fmoc-Thia-OH, Fmoc-Opr-OH, Fmoc-(D)-Asn-OH, Fmoc-β-Ala-
OH, Fmoc-Oic-OH.

10 Příklad 1

H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH

15 Tato látka byla vyrobena na automatickém syntetizátoru peptidů Peptid-Synthesizer Modell
430 A (Fa Applied Biosystems) při použití metody Fmoc a při použití p-benzyloxy-
benzylalkoholové pryskyřice, esterifikované Fmoc-Arg(Mtr)-OH (Fa-Novabiochem), množství
skupin, tvořících ester bylo 0,5 mmol/g pryskyřice. Byl užit 1 g pryskyřice a syntéza byla
prováděna při použití modifikovaného programu metodou Fmoc.

20 V zásobnících zařízení bylo uloženo vždy 1 mmol derivátu aminokyseliny s volnou karbo-
xylovou skupinu a 0,95 mmol HOObt. Předběžná aktivace aminokyselin byla prováděna přímo
v zásobnících rozpuštěním ve 4 ml DMF a přidáním 2 ml, 0,55 M roztoku diisopropyldiimidu
v DMF.

25 HOObt-estery dalších aminokyselin byly rozpuštěny v 6 ml NMP a pak navázány stejně jako in
situ předem aktivované aminokyseliny na pryskyřici, předem zbavenou ochranné skupiny 20%
roztokem piperidinu v DMF. Po skončení postupu byl peptid odštěpen od pryskyřice za
současného odstranění ochranné skupiny na postranním řetězci kyselinou trifluoroctovou při
30 použití thioanisolu a ethandithiolu k vazbě kationtu. Zbytek po působení kyseliny trifluoroctové
byl opakovaně digerován s ethylesterem kyseliny dusíkové a odstředěn. Usazenina byla
chromatografována na prostředku Sephadex LH 20 při použití 10% kyseliny octové. Frakce
s obsahem čistého peptidu byly čištěny a lyofilizovány.

MS(FAB): 1292,4 (M+H).

35

Analogicky jako je popsáno v příkladě 1 se vyrobí sloučeniny podle následujících příkladů 2 a 3.

40 Příklad 2

H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thia-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH

MS (FAB) = 1292,7.

45

Příklad 3

H-(D)-Arg-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-(D)-(p-Cl)Phe-Oic-Arg-OH

50 Ms (FAB) = 1305,0.

V následujícím jsou uvedeny hodnoty IC_{50} , které demonstrují velmi vybranou účinnost sloučeniny podle předloženého vynálezu. Tyto hodnoty byly stanoveny pomocí metody, popsané výše.

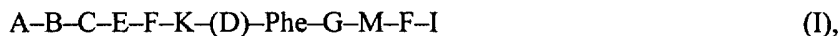
5

Př.	Sloučenina	IC_{50} (M)
1	H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH	$1,4 \times 10^{-8}$
2	H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thia-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH	$1,4 \times 10^{-8}$
3	H-(D)-Arg-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-(D)-(p-Cl)Phe-Oic-Arg-OH	$8,0 \times 10^{-8}$

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Peptid obecného vzorce I,



ve kterém

25

A znamená atom vodíku, (D)- nebo (L)-H-Arg, (D)- nebo (L)-H-Lys nebo (D)- nebo (L)-H-Orn,

30

B znamená Arg, Orn nebo Lys, přičemž guanidinová skupina nebo aminoskupina v postranním řetězci je popřípadě substituována atomem vodíku, alkanoylovým zbytkem o 1 až 8 atomech uhlíku, aryloylovým zbytkem o 7 až 14 atomech uhlíku, mono- až tricyklickým hetero-aryloylovým zbytkem o 3 až 9 atomem uhlíku s heteroatomy, vybranými ze skupiny zahrnující N, O a S, alkylsulfonylovým zbytkem o 1 až 8 atomech uhlíku nebo arylsulfonylovým zbytkem o 6 až 12 atomech uhlíku, přičemž aryl, heteroaryl, aryloyl, arylsulfonyl a hetero-aryloyl může být substituován 1, 2, 3 nebo 4 stejnými nebo různými zbytky ze skupiny zahrnující methylovou skupinu, methoxyskupinu a atom halogenu,

35

C znamená Pro-Pro-Gly, Hyp-Pro-Gly nebo Pro-Hyp-Gly,

40

E znamená Phe nebo Thia,

F znamená Ser, Hser, Lys, Leu, Val, Nle, Ile nebo Thr,

K znamená přímou chemickou vazbu,

45

M znamená přímou chemickou vazbu,

G znamená zbytek heterocyklického systému vzorce IV,

50



ve kterém R^4 a R^5 tvoří společně s atomy, na které jsou vázané heterocyklický monocyklický nebo bicyklický kruhový systém, přičemž tento kruhový systém je zvolený ze skupiny zahrnující kyselinu pyrrolidin-2-karboxylovou, kyselinu piperidin-2-karboxylovou, kyselinu 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylovou, kyselinu cis- a trans-dekahydroisochinolin-3-karboxylovou, kyselinu cis-endo-, cis-exo-, trans-oktahydroindol-2-karboxylovou, cis-endo-, cis-exo, trans-oktahydrocyklopentan[b]pyrrol-2-karboxylovou a kyselinu hydroxyprolin-2-karboxylovou,

10 F znamená Arg,

I znamená hydroxyskupinu a

(D)-Phe znamená D-fenylalanin

15

a jeho fyziologicky přijatelné soli.

20 2. Způsob výroby peptidu obecného vzorce I podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se

a) uvede do reakce fragment s volnou C-terminální karboxylovou skupinou nebo jeho aktivovaný derivát s odpovídajícím fragmentem s volnou N-terminální aminoskupinou, nebo se

25

b) peptid buduje postupně,

načež se ve sloučenině, získané v provedení a) nebo b) popřípadě odštěpí ochranné skupiny, dočasně zavedené a popřípadě se takto získaná sloučenina obecného vzorce I převede na některou ze svých fyziologicky přijatelných solí.

30

3. Peptid obecného vzorce I podle nároku 1 jako léčivo.

35 4. Peptid obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření patologických stavů, vyvolaných nebo podporovaných bradykininem a bradykininu příbuznými peptidy.

40 5. Farmaceutický přípravek pro ošetření patologických stavů, způsobených, vyvolaných nebo podporovaných bradykininem a bradykininu příbuznými peptidy, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako účinnou látku obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I podle nároku 1.

45

Konec dokumentu
