

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2203

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19755800**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/08003**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/31126**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 7/64
A 61 K 38/08
A 61 P 7/02
A 61 P 9/10
A 61 P 29/00
A 61 P 37/06

(71) Přihlašovatel:

MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE;

(72) Původce:

Meyer Jörg, Egelsbach, DE;
Nies Berthold, Fränkisch-Crumbach, DE;
Finsinger Dirk, München, DE;
Jonczyk Alfred, Darmstadt, DE;
Kessler Horst, Schwalbach, DE;
Kantlehner Martin, Freising, DE;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Derivát cyklického peptidu jakožto inhibitor
integrinu**

(57) Anotace:

Derivát cyklického peptidu obecného vzorce R - Q- X, kde znamená R cyklo-(Arg-Gly-Asp-Z), přičemž Z je vázán v postranním řetězci na Q, nebo pokud Q chybí, na X, Q chybí nebo znamená $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$, $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$, $-\text{[CO-R}^1\text{-CO-]}_m$, $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n$, $-(\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-})_n$, $-(\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-})_n$ nebo $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-})_n$, $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$, X skupinu $-\text{CO-CH=CH}_2$, $-\text{CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$, $-\text{NH-CH-CH}_2$, $-\text{NH-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ nebo $-\text{NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-SR}^{10}$; Z zbytek aminokyseliny nebo di- nebo tripeptidu, přičemž aminokyseliny jsou voleny ze souboru zahrnujícího Ala, Aan, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Homo-Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a skupinu M a jeho soli je jakožto inhibitor integrinu vhodný pro ošetřování poruch, způsobených implantáty, defektů, zánětů, osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu a arteriosklerózy a pro urychlení integračního procesu implantátu nebo biokompaktibilního povrchu do tkáně.

- 14.06.00

PV 2000 - 2203

01-1134-00-Ma

Derivát cyklického peptidu jakožto inhibitor integrinu

Oblast techniky

Vynález se týká derivátu cyklického peptidu obecného vzorce I



kde znamená

R cyklo-(Arg-Gly-Asp-Z), přičemž Z je vázán v postranním řetězci na Q, nebo pokud Q chybí, na X,

Q chybí nebo znamená $-[CO-R^1-NH-]_m$, $-[NH-R^1-CO-]_m$,
 $-[CO-R^1-CO-]_m$, $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n$,
 $-(NH-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-CO-)_n$,
 $-(NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2-CO-)_n$ nebo
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n-[CO-R^1-NH-]_m$,

X skupinu $-CO-CH=CH_2$, $-CO-C(CH_3)=CH_2$, $-NH-CH=CH_2$,
 $-NH-C(CH_3)=CH_2$ nebo $-NH-(CH_2)_p-SR^{10}$,

Z na sobě nezávisle zbytek aminokyseliny nebo zbytek dipeptidu nebo tripeptidu, přičemž aminokyseliny jsou na sobě nezávisle voleny ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Homo-Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a M,

přičemž tyto aminokyseliny jsou popřípadě derivatizovány a aminokyselinové zbytky jsou navzájem vázány peptidovým způsobem prostřednictvím α -aminoskupin nebo α -karboxylo-

vých skupin,

a skupina M je obsažena vždy,

- M skupinu $\text{NH}(\text{R}^8) - \text{CH}(\text{R}^3) - \text{COOH}$,
- R^1 chybí nebo znamená skupinu R^2 , R^9 , $\text{R}^2 - \text{R}^9 - \text{R}^2$ nebo fenyle-
novou skupinu, která je nesubstituována nebo má jeden
nebo dva substituenty R^5 , přičemž řetězce R^5 jsou vždy na
sobě nezávislé,
- R^2 skupinu alkylenovou s 1 až 10 atomy uhlíku, přičemž jedna
nebo dvě methylenové skupiny jsou popřípadě nahrazeny
atomem síry, skupinou $-\text{CH}=\text{CH}-$ nebo $-\text{C}\equiv\text{C}-$,
- R^3 skupinu $-\text{R}^5 - \text{R}^4$, $-\text{R}^6 - \text{R}^4$ nebo $-\text{R}^7 - \text{R}^4$,
- R^4 skupinu OH , NH_2 , SH nebo COOH ,
- R^5 skupinu alkylenovou s 1 až 6 atomy uhlíku,
- R^6 skupinu alkylfenylenovou se 7 až 14 atomy uhlíku,
- R^7 skupinu alkylfenylalkylenovou s 8 až 15 atomy uhlíku,
- R^8 atom vodíku nebo skupinu A nebo alkylfenylovou se 7 až
12 atomy uhlíku,
- R^9 skupinu cykloalkylenovou se 3 až 7 atomy uhlíku,
- R^{10} atom vodíku nebo skupinu chránící atom síry,
- A skupinu alkylovou s 1 až 6 atomy uhlíku,
- Hal atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu,

m a n na sobě nezávisle 0, 1, 2 nebo 3,

p 1, 2 nebo 3,

přičemž pokud jde o zbytky opticky aktivních aminokyselin a derivátů aminokyselin, jsou zahrnuty D a L formy

a jejich solí.

Dosavadní stav techniky

Podobné deriváty cyklických peptidů jako podle vynálezu jsou popsány například v německém patentovém spise číslo DE 43 10 643 a DE 195 38 741.

Sloučeninu cyklo-(Art-Gly-Asp-Glu(E-Ahx-Cys-NH₂)-D-Val) popsal D. Delforge a kol. (Anal. Biochem. 242, str. 180 až 186, 1996).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je shora charakterizovaný derivát cyklického peptidu jakožto inhibitor integrinu.

Vvynález je založen na poznatku, že sloučeniny obecného obecného vzorce I mají hodnotné vlastnosti, především ty z uvedených sloučenin, které se hodí pro výrobu léčiv.

Zjistilo se, že sloučeniny obecného vzorce I a jejich soli mají velmi hodnotné farmakologické vlastnosti spolu s dobrou snášenlivostí. Působí zvláště jako inhibitory integrinu, přičemž především inhibují vzájemné působení αv -, $\beta 3$ - nebo $\beta 5$ -integrinových receptorů s ligandy, například vazbu fibrinogenu na $\beta 3$ -integrinový receptor. Obzvláštní účinnost vykazují sloučeniny obecného vzorce I v případě integrinů $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha IIb\beta 3$

jakož také $\alpha v\beta_1$, $\alpha v\beta_6$ a $\alpha v\beta_8$.

Toto působení lze doložit například způsobem, který popsal J. W. Smith a kol. (J. Biol. Chem. 265, str. 12267 až 12271, 1990).

Závislost původu angiogeneze na vzájemné působení vaskulárních integrinů a extracelulárních matricových proteinů popsal P.C. Brooks, R.A. Clark a D.A. Cheresh (Science 264, str. 569 až 571, 1994).

Možnost využití inhibice tohoto vzájemného působení a tím navození apoptosy (programované umírání buněk) angiogenních vaskulárních buněk působením cyklického peptidu popsal P.C. Brooks, A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T.-Hu, G. Klier a D.A. Cheresh (Cell 79, str. 1157 až 1164, 1994).

Sloučeniny obecného vzorce I, které blokují interakci integrinových receptorů a ligandů, jako fibrinogen k fibrinogennému receptoru (glykoprotein IIb/IIIa), zabraňují jakožto GPIIb/IIIa antagonisty rozšiřování nádorových buněk metastázováním. Je to doloženo následujícím pozorováním.

K rozšiřování nádorových buněk z lokalizovaného nádoru do vaskulárního systému dochází vytvářením mikroaregátů (mikrothrombů) jako následek vzájemného působení nádorových buněk a krevních destiček. Nádorové buňky jsou odstíněny ochranou v mikroagregátu a nejsou od buněk imunitního systému rozpoznány.

Mikroagregáty se mohou usazovat na stěnách cév, tím usnadňují další penetraci nádorových buněk do tkáně. Jelikož je vytváření mikrotrombů zprostředkováváno vázáním fibrinogenu na fibrinogenové receptory na aktivovaných krevních destičkách, mohou být GPIIa/IIIb antagonisty považovány za účinné inhibi-

tory metastáz.

(Meth)akrylátové skupiny slouží k vazbě peptidů kovalentně na biokompatibilní povrch například implantátu, které mají volné akrylátové nebo methakrylátové skupiny, které mají například výrobky lisované z poly(methylmeth)akrylátu (kostní cementy) nebo vrstvy obsahující akrylát nebo methakrylát, například na kovovém povrchu.

V souhlase s tím thiolové skupiny slouží peptidovým vazbám například na zlaté povrchy.

Vynález se proto týká zvláště sloučenin obecného vzorce I pro kovalentní vázání prostřednictvím funkční skupiny zbytku X na biokompatibilní povrchy.

Pokud znamená X skupinu $-NH-(CH_2)_p-SR^{10}$, je funkční skupinou, která se váže na povrch, skupina SH, pokud znamená R^{10} atom vodíku.

Peptidy podle vynálezu tedy umožňují biofunkcionalizaci biomateriálů, zvláště implantátů pro všechny možné orgány tím, že se povléknou, přičemž se zvláště stimuluje adheze buněčných druhů, které v každém případě mají sklon realizovat tkáňovou integraci vhodného biomateriálu. Použitím takových povlaků se dosahuje po zavedení do těla urychlení a zvýšení integrace různých systémů biomateriály/implantáty se zlepšenou dlouhodobou stabilitou.

Proto se poukazuje také na současně podávanou přihlášku vynálezu, ve které se popisují vhodné biomateriály a jejich povlékání sloučeninami podle vynálezu.

Peptidy podle vynálezu se selektivně váží na integriny. Po imobilizaci na biokompatibilních površích, například na

implantátech, stimulují adhezi buněk, které nesou integriny. Po nanesení sloučenin na povrchy mohou tyto buňky selektivně stimulovat vazbu, která podporuje dosažení integrace implantátu do přírodní tkáně po implantaci. Například osteoblasty, osteoklasty a endotelové buňky jsou buněčnými druhy nesoucími av.

Vynález se tedy týká sloučenin obecného vzorce I jakožto integrinových inhibitorů pro selektivní buněčné obohacení na implantátech.

Po zakotvení na povrchu biokompatibilního implantátu se sloučeniny obecného vzorce I mohou používat jakožto léčiva v humanní a ve veterinární medicíně zvláště se mohou používat jako integrinové inhibitory pro ošetřování poruch, defektů a zánětů způsobených implantáty, jako jsou nepřiměřená nebo zpožděná integrace biomateriálů a implantátů, trombózy způsobená implantáty, poškození kostí a zubů a také osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu, arteriosklerózy, při hojení ran pro napomáhání procesu hojení a také pro urychlení a pro podporu integračních procesů implantátu nebo biokompatibilního povrchu do tkáně.

Sloučeniny obecného vzorce I se mohou používat jakožto antimikrobiálně působící látky při operacích, při kterých se používá biologického materiálu, implantátů, kateteru nebo srdečních stimulátorů. Přitom tyto sloučeniny působí antisepticky. Účinnost antimikrobiální aktivity se může doložit způsobem, který popsal P. Valentin-Weigund a kol. (Infection and Immunity, str. 2851 až 2855, 1988).

Vynález se tak týká sloučenin obecného vzorce I jakožto integrinových inhibitorů pro ošetřování poruch způsobených implantáty, defektů, zánětů a osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu, arteriosklerózy a ta-

ké pro urychlení a podporu integračních procesů implantátu nebo biokompatibilního povrchu do tkáně.

Vynález se také týká použití sloučenin obecného vzorce I pro výrobu léčiv pro ošetřování poruch způsobených implantáty, defektů, zánětů a osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu, arteriosklerózy a také pro urychlení a podporu integračních procesů implantátu nebo biokompatibilního povrchu do tkáně.

Vhodné peptidy obsahující thiozakotvující skupiny, se mohou kovalentně vázat na pozlacené nosiče, jako jsou například implantáty, prostředí pro afinitní chromatografii nebo mikrotitrové destičky.

Vynález se také týká použití nových sloučenin obecného vzorce I v afinitní chromatografii pro eluování vázaných proteinů.

Sloučeniny podle vynálezu se zvláště mohou používat jakožto integrinové ligandy pro eluování integrinů.

Uváděné zkratky zbytků aminokyselin znamenají zbytky následujících aminokyselin:

Abu	4-aminomáselná kyselina
Aha	6-aminohexanová kyselina, 6-aminokapronová kyselina
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Arg	arginin
Cys	cystein
Dab	2,4-diaminomáselná kyselina
Dap	2,3-diaminopropionová kyselina
Gln	glutamin

Glp	pyroglutamová kyselina
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
His	histidin
homo-Phe	homo-fenylalanin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Nle	norleucin
Orn	ornitin
Phe	fenylalanin
Phg	fenylglycin
4-Hal-Phe	4-halogenfenylalanin
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

Kromě toho se ještě uvádějí zkratky, které mají následující význam:

Ac	acetyl
BOC	terc. -butoxykarbonyl
CBZ nebo Z	benzyloxykarbonyl
DCCl	dicyklohexylkarbodiimid
DMF	dimethylformamid
EDCl	N-ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)karbodiimid,
Et	ethyl
FCA	fluoresceinkarboxylová kyselina
FITC	fluoresceinisothiokyanát
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl
FTH	fluoresceinthiomočovina

HOBT	1-hydroxybenzotriazol
HONSu	N-hydroxysukcinimid
Me	methyl
MBHA	4-methylbenzhydrylamin
Mtr	4-methoxy-2,3,6-trimethylfenylsulfonyl
OBu ^t	terc. -butylester
Oct	oktanoyl
OMe	methylester
OE ^t	ethylester
POA	fenoxyacetyl
Pbf	pentamethylbenzofuranyl
Sal	salicyloyl
Su	sukcinylní
TFA	trifluoroctovou kyselinu
Trt	trityl (trifenylmethyl).

Pokud shora uvedené aminokyseliny mohou být v několika enantiomerních formách, například vždy jako podíl sloučenin obecného vzorce I podle vynálezu, všechny tyto formy a také jejich směsi (například DL formy) vynález zahrnuje. Kromě toho mohou být aminokyseliny, například jako podíl sloučenin obecného vzorce I, chráněny o sobě známými chránicími skupinami. Zvláště modifikace případného postranního řetězce argininu například v případě nepeptidových $\alpha\beta_3$ -antagonistů (například R. Keenan a kol., Abstr. Pap. 211 ACS National Meeting, (New Orleans, Sp. st. a.) 1996, MEDI 236) se rovněž mohou používat v případě cyklopeptidů, například benzimidazolových derivátů místo guanidinové skupiny.

Sloučeniny podle vynálezu zahrnují také tak zvané prodrogové deriváty, to znamená například alkylovými nebo acylovými skupinami, cukry nebo oligopeptidy obměněné sloučeniny obecného vzorce I, které se v organismu rychle štěpí na účinné sloučeniny podle vynálezu. Do této skupiny patří také biologicky odbouratelné polymerní deriváty sloučenin podle vynálezu po-

14.05.00

psané v literatuře (například J. Pharm. 115, str. 61 až 67, 1995).

Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají shora uvedený význam, nebo její soli spočívá podle vynálezu v tom, že

a) pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I, kde

- Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n$ nebo
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n\text{-[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
X skupinu $-\text{CO-CH=CH}_2$ nebo $-\text{CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ a
R má shora uvedený význam

i)

se sloučenina obecného vzorce II



kde R má shora uvedený význam, nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce III



kde

- Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n$ nebo
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n\text{-[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
X znamená skupinu $-\text{CO-CH=CH}_2$ nebo $-\text{CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ a
L znamená atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu,

nebo

ii) se sloučenina obecného vzorce IV



kde

- Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n$ nebo
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n\text{-[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$ a
R má shora uvedený význam,
nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce V

L-X

(V)

kde znamená

- X skupinu $-\text{CO-CH=CH}_2$ nebo $-\text{CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ a
L atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní
funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu,

nebo

b) pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I, kde

- Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$ nebo
 $-\text{[CO-R}^1\text{-CO-]}_m$, $-(\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-})_n$ nebo
 $-(\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-})_n$,
X skupinu $-\text{NH-CH=CH}_2$ nebo $-\text{NH-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ nebo
 $-\text{NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-SR}^{10}$
 R^{10} skupinu chránící atom síry a
R má shora uvedený význam,

i)

se sloučenina obecného vzorce VI

R-L

(VI)

kde znamená

- L atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní
funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu a
R má shora uvedený význam,
nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce VII

H-Q-X

(VII)

14.06.00

kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$ nebo
 $-(\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-})_n$ nebo
 $-(\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-})_n$,

X znamená skupinu $-\text{NH-CH=CH}_2$ nebo $-\text{NH-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ nebo
 $-\text{NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-SR}^{10}$

R^{10} znamená skupinu chránící atom síry

nebo

ii) se sloučenina obecného vzorce VIII

R-Q-L

(VIII)

kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$ nebo
 $-\text{[CO-R}^1\text{-CO-]}_m$, $-(\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-})_n$ nebo
 $-(\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-})_n$,

L znamená atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo
 rektivní funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu a

R má shora uvedený význam,

nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce IX

H-X

(IX)

kde znamená

X skupinu $-\text{NH-CH=CH}_2$ nebo $-\text{NH-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ nebo
 $-\text{NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-SR}^{10}$ a

R^{10} skupinu chránící atom síry,

nebo

c) se sloučenina obecného vzorce I uvolňuje ze svých funkčních
 derivátů zpracováním solvolyzačním nebo hydrogenolyzačním
 činidlem,

a/nebo se zásaditá sloučenina nebo kyselá sloučenina obecného
 vzorce I převádí na svoji sůl zpracováním kyselinou nebo
 zásadou.

Shora uvedené symboly R, Q, X a L mají význam uvedený u obecných vzorců I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII a IX pokud není jinak vysloveně uvedeno.

Ve shora uvedených vzorcích se míní alkylem především skupina methylová, ethylová, propylová, isopropylová, butylová, isobutylová, sek.butylová nebo terc.butylová, dále také pentylová, 1-, 2- nebo 3-methylbutylová, 1,1-, 1,2- nebo 2,2-dimethylpropylová, 1-ethylpropylová, hexylová, 1-, 2-, 3- nebo 4-methylpentylová, 1,1-, 1,2-, 1,3-, 2,2-, 2,3- nebo 3,3-dimethylbutylová, 1- nebo 2-ethylbutylová, 1-ethyl-1-methylpropylová, 1-ethyl-2-methylpropylová a 1,1,2- nebo 1,2,2-trimethylpropylová skupina.

Symbol R^1 znamená skupinu R^2 , R^9 , $R^2-R^9-R^2$ nebo fenylenovou skupinu, která je nesubstituována nebo má jeden nebo dva substituenty R^5 , přičemž řetězce R^5 jsou vždy na sobě nezávislé, nebo R^1 chybí. Symbol R^1 znamená zvláště skupinu alkylenovou s 1 až 10 atomy uhlíku.

Alkylenovou skupinou je s výhodou skupina methylenová, ethylenová, butylenová, pentylenová nebo hexylenová, dále také heptylenová, oktylenová, nonylenová nebo decylenová.

Alkylenfenylovou skupinou je s výhodou skupina benzylová nebo fenethylová.

Alkylenfenylalkylenovou skupinou je s výhodou skupina 4-methylenbenzylová nebo 4-ethylenbenzylová skupina.

Symbol Q znamená s výhodou například zbytek kyseliny 6-aminohexanové (6-aminokapronové), jantarové kyseliny, skupinu $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)$, $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)CO-(CH_2)_5-NH-$, $-(CO-CH_2)_5-NH-)_2$ nebo

14.08.00



Symbol M znamená s výhodou Dap, Ser, Cys, Asp, D-Asp, Dab, homoserin, homocystein, Glu, D-Glu, Thr, Orn, Lys, D-Lys, 4-aminomethyl-Phe nebo 4-aminomethyl-D-Phe.

Uvedené aminokyseliny nebo aminokyselinové zbytky ve výnamu Z mohou být také derivatizovány, přičemž jsou výhodnými N-methylové, N-ethylové, N-propylové, N-benzylové nebo C α -methylové deriváty. Deriváty Asp a Glu jsou zvláště methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, terc.butyl-, neopentyl- nebo benzylestery postranních karboxylových skupin a přidavně jsou výhodnými deriváty Arg, které mohou být substituovány na skupině -NH-C(=NH)-NH₂- skupinou acetylovou, benzoylovou, methoxykarbonylovou nebo ethoxykarbonylovou.

Symbol Z znamená s výhodou skupinu M dále s výhodou homo-Phe-M, fenylglycin, D-Phe-M, D-Trp-M, D-Tyr-M, D-Phe-Lys, D-Phe-D-Lys, D-Trp-Lys, D-Trp-D-Lys, D-Tyr-Lys, D-Tyr-D-Lys, D-Phe-Orn, D-Phe-Dab, D-Phe-Dap, D-Phe-D-Orn, D-Phe-D-Dab, D-Phe-D-Dap, D-Phe-4-aminomethyl-Phe, D-Phe-4-aminomethyl-D-Phe, D-Trp-4-aminomethyl-Phe, D-Trp-4-aminomethyl-D-Phe, D-Tyr-4-aminomethyl-Phe, D-Tyr-4-aminomethyl-D-Phe, D-Phe-Asp, D-Phe-D-Asp, D-Trp-Asp, D-Trp-D-Asp, D-Tyr-Asp, D-Tyr-D-Asp, D-Phe-Cys, D-Phe-D-Cys, D-Trp-Cys, D-Trp-D-Cys, D-Tyr-Cys, D-Tyr-D-Cys, Phe-D-Lys, Trp-D-Lys, Tyr-D-Lys, Phe-Orn, Phe-Dab, Phe-Dap, Trp-Orn, Trp-Dab, Trp-Dap, Tyr-Orn, Tyr-Dab, Tyr-Dap, Phe-4-aminomethyl-D-Phe, Trp-4-aminomethyl-D-Phe, Tyr-4-aminomethyl-D-Phe, Phe-D-Asp, Trp-D-Asp, Tyr-D-Asp, Phe-D-Cys, Trp-D-Cys, Tyr-D-Cys, Phg-M, D-Phe-Lys-Gly, D-Phe-M-Gly, D-Trp-Lys-Gly, D-Trp-M-Gly, D-Tyr-Lys-Gly, D-Tyr-M-Gly, D-Phe-Val-Lys, D-Phe-Gly-Lys, D-Phe-Ala-Lys, D-Phe-Ile-Lys, D-Phe-Leu-Lys, D-Trp-Val-Lys, D-Trp-Gly-Lys, D-Trp-Ala-Lys,

D-Trp-Ile-Lys, D-Trp-Leu-Lys, D-Tyr-Val-Lys,
D-Tyr-Gly-Lys, D-Tyr-Ala-Lys, D-Tyr-Ile-Lys,
D-Tyr-Leu-Lys.

Skupinou $-R^5-R^4$ je s výhodou skupina 2-, 3- nebo 4-hydroxybenzylová, 2-, 3- nebo 4-aminobenzylová, 2-, 3- nebo 4-merkapto-benzylová, 2-, 3- nebo 4-karboxybenzylová, dále také skupina 2-, 3- nebo 4-hydroxyfenethylová, 2-, 3- nebo 4-aminofenethylová, 2-, 3- nebo 4-merkaptofenethylová, nebo 2-, 3- nebo 4-karboxyfenethylová.

Cykloalkylenovou skupinou je s výhodou skupina cyklopropylenová, 1,2- nebo 1,3-cyklobutylenová, 1,2- nebo 1,3-cyklopentylenová, 1,3- nebo 1,4-cyklohexylenová nebo 1,2-, 1,3- nebo 1,4-cykloheptylenová skupina.

Symbol R^{10} znamená skupinu chránící atom vodíku nebo síry, například tritylovou skupinu.

Skupinou chránící aminoskupinu se míní s výhodou skupina acetylová, propionylová, butyrylová, fenylacetylová, benzoylová, toluylová, skupina POA, methoxykarbonylová, ethoxykarbonylová, 2,2,2-trichlorethoxykarbonylová, BOC, 2-jodethoxykarbonylová, CBZ ("karbobenzoxyskupina"), skupina 4-methoxybenzyloxykarbonylová, skupina FMOC, Mtr, benzylová skupina, Pbf nebo Pmc.

Atomem halogenu se míní atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu.

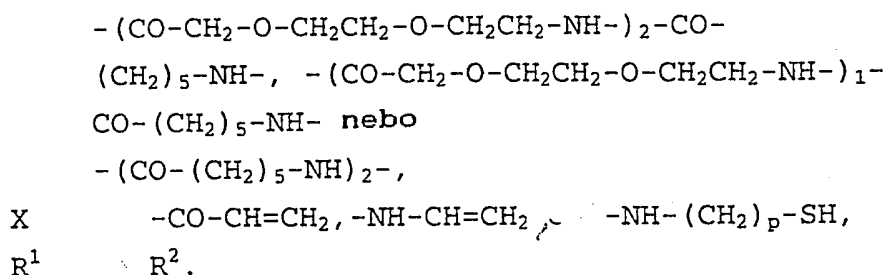
Sloučeniny obecného vzorce I mohou mít jedno nebo několik chirálních center a mohou být proto v různých stereoizomerních formách. Obecný vzorec I všechny tyto formy zahrnuje.

14.06.00

Vynález se tedy týká zvláště sloučenin obecného vzorce I, ve kterých alespoň jeden ze symbolů má shora uvedený výhodný význam. Některými výhodnými skupinami sloučenin obecného vzorce I jsou následující sloučeniny dílčích vzorců Ia až If, kde zvláště neuvedené symboly mají význam uvedený u obecného vzorce I, přičemž znamená v obecném vzorci

- a) Z D-Phe-M, Phe-M, D-Trp-M, Trp-M, D-Tyr-M, Tyr-M, D-Phg-M, Phg-M, D-homo-Phe-M, homo-Phe-M, D-Phe-Lys-Gly;
- b) Z D-Phe-M, Phe-M, D-Trp-M, Trp-M, D-Tyr-M, Tyr-M, D-Phg-M, Phg-M, D-homo-Phe-M, homo-Phe-M, D-Phe-Lys-Gly,
X $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, / $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SH}$;
- c) Z D-Phe-M, Phe-M, D-Trp-M, Trp-M, D-Tyr-M, Tyr-M, D-Phg-M, Phg-M, D-homo-Phe-M, homo-Phe-M, D-Phe-Lys-Gly,
X $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SH}$,
- d) Z D-Phe-M, Phe-M, D-Trp-M, Trp-M, D-Tyr-M, Tyr-M, D-Phg-M, Phg-M, D-homo-Phe-M, homo-Phe-M, D-Phe-Lys-Gly,
X $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SH}$,
R¹ R²,
- e) R cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-M) nebo D-Phe-Lys-Gly,
X $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ or $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SH}$,
- f) R cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-M) nebo D-Phe-Lys-Gly,
Q $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}$, $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$,
 $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$,

14.06.00



Sloučeniny obecného vzorce I a výchozí látky pro jejich přípravu se připravují o sobě známými způsoby, které jsou popsány v literatuře (například ve standardních publikacích jako Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart), a to za reakčních podmínek, které jsou pro jmenované reakce známy a vhodné. Přitom se může také používat o sobě známých, zde blíže nepopisovaných variant.

Výchozí látky se mohou popřípadě vytvářet in situ, to znamená že se z reakční směsi neizolují, nýbrž se reakční směsi ihned používá pro přípravu sloučenin obecného vzorce I.

Sloučeniny obecného vzorce I se s výhodou připravují reakcí sloučenin obecného vzorce II se sloučeninami obecného vzorce III.

Sloučeniny obecného vzorce II a obecného vzorce III jsou zpravidla známy. Pokud nejsou známy, mohou se připravovat o sobě známými způsoby.

Ve sloučenině obecného vzorce III znamená L s výhodou předaktivovanou skupinu karboxylové kyseliny, s výhodou zbytek halogenidu karboxylové kyseliny, symetrického nebo směsného anhydridu nebo aktivního esteru. Skupiny tohoto typu pro aktivaci karboxylové skupiny při typické acylační reakci jsou v literatuře popsány (například ve standardních publikacích jako Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart). Aktivované estery se výhodně vytvářejí

14.05.00

in situ například adicí HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu. Symbol L znamená s výhodou atom vodíku, fluoru, chloru, bromu nebo -ON-sukcinimidovou skupinu.

Reakce se zpravidla provádí v inertním organickém rozpouštědle, v přítomnosti činidla vázajícího kyselinu, s výhodou organické zásady, jako je DIPEA, triethylamin, dimethylanilin, pyridin nebo chinolin nebo v přítomnosti nadbytku karboxylové sloučeniny obecného vzorce III.

Příznivé může být také přidání hydroxidu, uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy nebo jiné soli slabé kyseliny alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy, s výhodou draslíku, sodíku, vápníku nebo cesia.

V závislosti na reakčních podmínkách je reakční doba několik minut až 14 dní, reakční teplota je přibližně -30 až 140 °C, zpravidla -10 až 90 °C a zvláště přibližně 0 až přibližně 70 °C.

Jakožto inertní rozpouštědla jsou vhodné například uhlovodíky jako hexan, petroether, benzen, toluen nebo xylen; chlorované uhlovodíky jako trichlorethylen, 1,2-dichlorethan nebo tetrachormethan, chloroform nebo dichlormethan; alkoholy jako methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol nebo terc.butanol; ethery jako diethylether, diisopropylether, tetrahydrofuran (THF) nebo dioxan; glykoletary jako ethylenglykolmonomethylether nebo ethylenglykolmonoethylether (methylglykol nebo ethylglykol), ethylenglykoldimethylether (diglyme); ketony jako aceton nebo butanon; amidy jako acetamid, dimethylacetamid, dimethylformamid (DMF); nitrily jako acetonitril; sulfoxidy jako dimethylsulfoxid (DMSO); sirouhlík; organické karboxylové kyseliny jako je kyselina mravenčí nebo octová; nitrosloučeniny jako nitromethan nebo nitrobenzen; estery jako ethylacetát; voda nebo směsi těchto rozpouštědel.

14.05.00

Sloučeniny obecného vzorce I se také mohou připravovat reakcí sloučenin obecného vzorce IV se sloučeninami obecného vzorce V.

Sloučeniny obecného vzorce IV a obecného vzorce V jsou zpravidla známé. Pokud nejsou známé, mohou se připravovat o sobě známými způsoby.

Ve sloučenině obecného vzorce V znamená L s výhodou předaktivovanou skupinu karboxylové kyseliny, s výhodou zbytek halogenidu karboxylové kyseliny, symetrického nebo směsného anhydridu nebo aktivního esteru. Skupiny tohoto typu pro aktivaci karboxylové skupiny při typické acylační reakci jsou v literatuře popsány (například ve standardních publikacích jako Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart). Aktivované estery se výhodně vytvářejí in situ například adicí HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu. Symbol L znamená s výhodou atom vodíku, fluoru, chloru, bromu nebo -ON-sukcinimidovou skupinu.

Reakce sloučeniny obecného vzorce IV se sloučeninou obecného vzorce V se provádí za stejných podmínek reakční doby, teploty a v inertním organickém rozpouštědle jako reakce sloučeniny obecného vzorce II a obecného vzorce III.

Sloučeniny obecného vzorce I se také mohou připravovat reakcí sloučenin obecného vzorce VI se sloučeninami obecného vzorce VII.

Sloučeniny obecného vzorce VI a obecného vzorce VII jsou zpravidla známé. Pokud nejsou známé, mohou se připravovat o sobě známými způsoby.

Ve sloučenině obecného vzorce V znamená L s výhodou předaktivovanou skupinu karboxylové kyseliny, s výhodou zbytek ha-

14.05.00

halogenidu karboxylové kyseliny, symetrického nebo směsného anhydridu nebo aktivního esteru. Skupiny tohoto typu pro aktivaci karboxylové skupiny při typické acylační reakci jsou v literatuře popsány (například ve standardních publikacích jako Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart). Aktivované estery se výhodně vytvářejí in situ například adicí HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu. Symbol L znamená s výhodou atom vodíku, fluoru, chloru, bromu nebo -ON-sukcinimidovou skupinu.

Reakce sloučeniny obecného vzorce VI se sloučeninou obecného vzorce VII se provádí za stejných podmínek reakční doby, teploty a v inertním organickém rozpouštědle jako reakce sloučeniny obecného vzorce II a obecného vzorce III.

Sloučeniny obecného vzorce I se také mohou připravovat reakcí sloučenin obecného vzorce VIII se sloučeninami obecného vzorce IX.

Sloučeniny obecného vzorce VIII a obecného vzorce IX jsou zpravidla známe. Pokud nejsou známe, mohou se připravovat o sobě známými způsoby.

Ve sloučenině obecného vzorce VIII znamená L s výhodou předaktivovanou skupinu karboxylové kyseliny, s výhodou zbytek halogenidu karboxylové kyseliny, symetrického nebo směsného anhydridu nebo aktivního esteru. Skupiny tohoto typu pro aktivaci karboxylové skupiny při typické acylační reakci jsou v literatuře popsány (například ve standardních publikacích jako Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart). Aktivované estery se výhodně vytvářejí in situ například adicí HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu. Symbol L znamená s výhodou atom vodíku, fluoru, chloru, bromu nebo -ON-sukcinimidovou skupinu.

14.05.00

Reakce sloučeniny obecného vzorce VIII se sloučeninou obecného vzorce IX se provádí za stejných podmínek reakční doby, teploty a v inertním organickém rozpouštědle jako reakce sloučeniny obecného vzorce II a obecného vzorce III.

Cyklické sloučeniny obecného vzorce II se mohou připravovat cyklizací lineárních sloučenin například způsobem popsaným v německém patentovém spise číslo DE 43 10 643 nebo v publikaci Houben-Weyl, 1.c., svazek 15/II, str. 1 až 806 (1974), nebo způsobem, který popsal S. Zimmer, E. Hoffmann, G. Jung a H. Kessler (Liebig's Ann. Chem. str. 497 až 501, 1993). Lineární peptidy se mohou připravovat například způsobem, který popsal R.B. Merrifield (Angew. Chemie, 97, str. 801 až 812, 1985).

Lineární sloučeniny s otevřeným řetězcem, jako jsou například sloučeniny obecného vzorce III, se mohou také připravovat o sobě známými způsoby přípravy aminokyselin a peptidů, například také syntézou v pevné fázi, kterou popsal R.B. Merrifield (B.F. Gysin a R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 94, od str. 3012, 1972).

Sloučeniny obecného vzorce I se dále mohou připravovat uvolněním ze svých funkčních derivátů solvolýzou, zvláště hydrolýzou nebo hydrogenolýzou.

Pro solvolýzu nebo pro hydrogenolýzu jsou jako výchozí látky vhodné sloučeniny, které mají místo jedné nebo několika volných aminoskupin a/nebo hydroxylových skupin odpovídající chráněné aminoskupiny a/nebo hydroxylové skupiny, s výhodou sloučeniny, které místo jednoho H-atomu, který je spojen s N-atomem mají skupinu chránící aminoskupinu, například sloučeniny, které odpovídají obecnému vzorci I, avšak místo NH_2 skupiny mají skupinu NHR' (kde R' znamená skupinu chránící aminoskupinu, například skupinu BOC nebo CBZ).

Dále jsou jako výchozí látky vhodné sloučeniny, které místo H-atomů hydroxylové skupiny mají skupinu chránící hydroxylovou skupinu, například sloučeniny, které odpovídají obecnému vzorci I, avšak místo hydroxyfenylové skupiny mají R' 'O-fenylovou skupinu (kde R' ' znamená skupinu chránící hydroxylovou skupinu).

V molekule výchozí látky může být také několik stejných nebo různých skupin chránících aminoskupinu a/nebo hydroxyskupinu. Pokud molekula obsahuje navzájem odlišné chránící skupiny, mohou se v mnoha případech tyto chránící skupiny selektivně odštěpovat.

Výraz "skupina chránící aminoskupinu" je obecně znám a jde o skupiny, které jsou vhodné k ochraně (k blokování) aminoskupiny před chemickými reakcemi, které jsou však snadno odstranitelné, když je žádoucí reakce na jiném místě molekuly provedena. Typické pro takové skupiny jsou zvláště nesubstituované nebo substituované skupiny acylové, arylové, aralkoxymethylové nebo aralkylové. Jelikož se skupiny, chránící aminoskupinu, po žádoucí reakci (nebo po sledu reakcí) odstraňují, nemá jejich druh a velikost rozhodující význam. Výhodnými jsou však skupiny s 1 až 20 a zvláště s 1 až 8 atomy uhlíku. Výraz "acylová skupina" je zde vždy míněn v nejširším slova smyslu. Zahrnuje acylové skupiny odvozené od alifatických, aralifatických, aromatických nebo heterocyklických karboxylových nebo sulfonových kyselin, jakož zvláště skupiny alkoxykarbonylové, aryloxykarbonylové a především aralkoxykarbonylové. Jakožto příklady takových acylových skupin se uvádějí skupiny alkanoylové jako acetylová, propionylová, butyrylová skupina; aralkanoylové jako fenylacetylová skupina; aroylové jako benzoylová nebo toluylová skupina; aryloxyalkanoylové jako fenoxycetylová skupina (POA); alkoxykarbonylové, jako skupina methoxykarbonylová, ethoxykarbonylová, 2,2,2-trichlorethoxykarbonylová, terc.-butoxykarbonylová (BOC), 2-jodethoxykarbonylová; aralko-

xykarbonylové jako skupina benzyloxykarbonylová ("karbobenzyxy"-CBZ), 4-methoxybenzyloxykarbonylová nebo 9-fluorenylmethoxykarbonylová (Fmoc) skupina a arylsulfonylové jako skupina 4-methoxy-2,3,6-trimethylfenylsulfonylová (Mtr). Výhodnými skupinami, chránícími aminoskupinu, jsou skupiny BOC a Mtr a také skupina CBZ, Fmoc, benzylová a acetylová skupina.

Výraz "skupina chránící hydroxyskupinu" je obecně rovněž znám a jde o skupiny, které jsou vhodné k ochraně (k blokování) hydroxyskupiny před chemickými reakcemi, které jsou však snadno odstranitelné, když je žádoucí reakce na jiném místě molekuly provedena. Typické pro takové skupiny jsou shora uvedené nesubstituované nebo substituované skupiny arylové, aralkylové nebo acylové dále také skupiny alkylové. Jelikož se skupiny, chránící hydroxyskupinu, po žádoucí reakci (nebo reakčním sledu) odstraňují, nemá jejich druh a velikost rozhodující význam. Výhodnými jsou však skupiny s 1 až 20 a zvláště s 1 až 10 atomy uhlíku. Jakožto příklady skupin chránících hydroxylovou skupinu, se uvádějí skupina benzylová, p-nitrobenzylová, p-toluensulfonylová, terc.butylová a acetylová, přičemž jsou obzvláště výhodnými skupina benzylová a terc.butylová. Skupiny COOH v kyselině asparagové a glutamové jsou především chráněny ve formě svých terc.butylesterů (například Asp(OBut)).

Uvolňování sloučenin obecného vzorce I z jejich funkčních derivátů se daří - podle použité chránící skupiny - například silnými kyselinami, jako je zvláště kyselina trifluoroctová a chloristá avšak také jinými silnými anorganickými kyselinami, jako je kyselina chlorovodíková nebo sírová, silnými organickými karboxylovými kyselinami, jako je trichloroctová kyselina nebo sulfonovými kyselinami, jako je kyselina benzen-sulfonová nebo p-toluensulfonová. Je možné, nikoliv však vždy nutné provádět reakci v přítomnosti přídavného inertního rozpouštědla. Jakožto inertní rozpouštědla jsou vhodné organické

například karboxylové kyseliny, jako je kyselina octová, ether, jako je tetrahydrofuran (THF) nebo dioxan, amidy, jako je dimethylformamid (DMF), halogenované uhlovodíky, jako je dichlormethan, dále také alkoholy, jako je methanol, ethanol nebo isopropanol jakož také voda. V úvahu mohou přicházet také směsi těchto rozpouštědel. Kyseliny trifluoroctové se s výhodou používá v nadbytku bez přísady dalších rozpouštědel, kyseliny chloristé ve formě směsi kyseliny octové a 70% kyseliny chloristé v poměru 9 : 1. Reakční teplota pro odštěpení je účelně přibližně 0 až přibližně 50 °C, s výhodou 15 až 30 °C (teplota místnosti).

Skupina BOC, OBut, Pbf, Pmc a Mtr se může například s výhodou odštěpovat kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu nebo přibližně 3 až 5n kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu při teplotě 15 až 30 °C, zatímco skupina FMOC přibližně 5 až 50% roztokem dimethylaminu, diethylaminu nebo piperidinu v dimethylformamidu při teplotě 15 až 30 °C.

Tritylová skupina se používá ke chránění aminokyselin histidin, asparagin, glutamin a cystein. Odštěpování chránicí skupiny se provádí podle žádoucího konečného produktu systémem trifluoroctová kyselina/10 % thiofenolu, přičemž se tritylová skupina od uvedených aminokyselin odštěpí. Při použití systému trifluoroctová kyselina/anisol nebo trifluoroctová kyselina/thioanisol se odštěpí pouze tritylová skupina z histidinu, asparaginu a glutaminu, zůstává však na postranním řetězci Cys. Skupina Pbf (pentamethylbenzofuranylová) se používá ke chránění Arg. Odstraňuje se za použití například trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu.

Hydrogenolyticky odstranitelné chránicí skupiny (například skupiny CBZ nebo skupina benzylová) se mohou odštěpovat například zpracováním vodíkem v přítomnosti katalyzátoru (například katalyzátoru na bázi ušlechtilého kovu, jako palla-

dium, účelně na nosiči, jako na uhlí). Jakožto rozpouštědlo se hodí shora uvedená rozpouštědla, zvláště například alkoholy, jako methanol nebo ethanol nebo amidy jako dimethylformamid. Hydrogenolýza se zpravidla provádí při teplotě přibližně 0 až 100 °C, za tlaku přibližně 0,1 až 20 MPa, s výhodou při teplotě 20 až 30 °C, za tlaku přibližně 0,1 až 1 MPa. Hydrogenolýza CBZ skupiny se daří například dobře na 5 až 10% palladiu na uhlí v methanolu, nebo za použití amoniumformátu (místo vodíku) na palladiu na uhlí v systému methanol/dimethylformamid při teplotě 20 až 30 °C.

Zásada obecného vzorce I se může kyselinou převádět na příslušnou adiční sůl s kyselinou, například reakcí ekvivalentního množství zásady a kyseliny v inertním rozpouštědle, jako je například ethanol a následným odpařením rozpouštědla. Pro tuto reakci přicházejí v úvahu zvláště kyseliny, které poskytují fyziologicky přijatelné soli. Může se používat anorganických kyselin, jako jsou kyselina sírová, dusičná, halogenovodíkové kyseliny, jako chlorovodíková nebo bromovodíková, fosforečné kyseliny, jako kyselina ortofosforečná, sulfaminová kyselina a oorganické kyseliny, zvláště alifatické, alicyklické, aralifatické, aromatické nebo heterocyklické jednosytné nebo několikasytné karboxylové, sulfonové nebo sírové kyseliny, jako jsou kyselina mravenčí, octová, propionová, pivalová, diethyloctová, malonová, jantarová, pimelová, fumarová, maleinová, mléčná, vinná, jablečná, citronová, glukonová, askorbová, nikotinová, isonikotinová, methansulfonová, ethansulfonová, ethandisulfonová, 2-hydroxyethansulfonová, benzensulfonová, p-toluensulfonová, naftalenmonosulfonová a naftalendisulfonová a laurylsírová kyselina. Soli s fyziologicky nevhodnými kyselinami, například pikrátů, se může používat k izolaci a/ nebo k čištění sloučenin obecného vzorce I.

Na druhé straně se sloučeniny obecného vzorce I reakcí se zásadou mohou převádět na své fyziologicky vhodné soli ko-

14.08.00

vové nebo amoniové. Jakožto soli přicházejí v úvahu zvláště soli sodné, draselné, hořečnaté, vápenaté a amoniové, dále substituované amoniové soli, například dimethylamoniové, diethylamoniové, diisopropylamoniové, monoethanolamoniové, diethanolamoniové, nebo diisopropylamoniové, cyklohexylamoniové, dicyklohexylamoniové, dibenzylethylendiamoniové, dále například soli s argininem nebo s lysinem.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení. Teploty se uvádějí vždy ve stupních Celsia, teplotou místnosti se míní teplota 22 °C. Výraz "zpracování obvyklým způsobem" v následujících příkladech praktického provedení znamená:

Popřípadě se přidává voda, popřípadě podle konstituce konečného produktu se hodnota pH nastavuje na 2 až 10, reakční směs se extrahuje ethylacetátem nebo dichlormethanem, provádí se oddělení organické fáze a její vysušení síranem sodným, filtrace, odpaření a čištění chromatografií na silikagelu a/ nebo krystalizací. Hodnoty R_f jsou na silikagelu: eluční činidlo: systém ethylacetát/meethanol 9:1.

RT je retenční doba (v minutách) při HPLC v následujících systémech:

[A]

sloupec: YMC ODS A RP 5C₁₈ (250 x 4,6 mm);

eluční činidlo A: 0,1 % TFA ve vodě

eluční činidlo B: 0,1 % TFA v acetonitrilu,

průtok: 1 ml/min

gradient 0 až 50 % B /30 min

[B]

jako [A]

gradient 5 až 50 % B /30 min

[C]

jako [A]

gradient 10 až 50 % B /30 min

Hmotová spektrometrie (MS):

EI (elektronová rázová ionizace M^+)

FAB (bombardování rychlými atomy) $(M+H)^+$

ESI (elektrosprejová ionizace) $(M+H)^+$

Výrazem DMPP pryskyřice se míní 4-(2',4'-dimethoxyfenylhydroxymethyl)fenoxypryskyřice, která umožňuje například syntézu peptidů chráněných na postranním řetězci; výraz TCP pryskyřice znamená tritylchloridpolystyrenovou pryskyřici.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

a)

Přidá se 0,2 mmol anhydridu jantarové kyseliny do roztoku 0,1 mmol cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys) ("A") [připravitelného cyklizací (H-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(Z)-Arg(Pbf)-Gly-OH na cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(Z) a selektivním odstraněním skupiny Z hydrogenolýzou] v 5 ml dimethylformamidu. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu pěti hodin a po obvyklém zpracování se získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N^{ϵ} -Su)) ("B").

b)

Rozpustí se 1 ekvivalent cysteaminhydrochloridu a 1 ekvivalent trifenylmethanolu v ledové kyselině octové při teplotě 60 °C a zpracovává se za míchání 1,1 ekvivalentu eheterátu fluoridu boritého. Reakční směs se míchá po dobu jedné hodiny a zpracováním obvyklým způsobem se získá Trt-cysteaminhydrochlorid ("C").

Reakcí "B" s "C" v dichlormethanu za přidání EDCI hydrochloridu se po zpracování obvyklým způsobem získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N^{ϵ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-S-Trt)). Po

odstranění chránicích skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH)); RT [B] 18,3; FAB 763.

Podobně reakcí "C" s cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N -Su)-Gly) a odstraněním chránicích skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH)Gly).

Příklad 2

a)

Přidá se 1,2 ekvivalentu akrylylchloridu při teplotě 0 °C do suspenze 10 mmol 6-aminohexanové kyseliny a 1,8 ekvivalentu hydroxidu vápenatého ve vodě. Reakční směs se zfiltruje a obvyklým zpracováním se získá 6-akrylamidohexanová kyselina ("D").

b)

Roztok 10 mmol "D" a 1 ekvivalentu n-hydroxysukcinimidu v 50 ml dichlormethanu se zpracovává při teplotě 0 °C 1,2 ekvivalenty EDCI hydrochloridu a reakční směs se míchá po dobu jedné hodiny. Přidá se 10 µl ledové kyseliny octové a obvyklým zpracováním směsi se získá HOBT 6-akrylamidohexanoát ("E").

c)

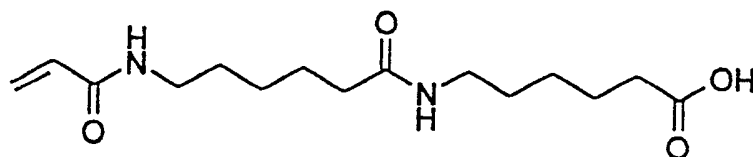
Reakcí "A" s "E" v dimethylformamidu se po zpracování obvyklým způsobem získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)). Po odstranění chránicích skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)); RT [A] 22,8; ESI 771.

Podobně se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)Gly).

Příklad 3

a)

Přidá se 2 mmol "E", rozpuštěného ve směsi ethanolu a chloroformu, při teplotě 0 °C do roztoku 10 mmol 6-aminohexanové kyseliny ve vodném fosforečnanu sodném jakožto pufru (hodnota pH 8). Směs se zfiltruje a obvyklým zpracováním se získá 6-(6-akrylamidohexanoylamido)hexanová kyselina ("F")



b)

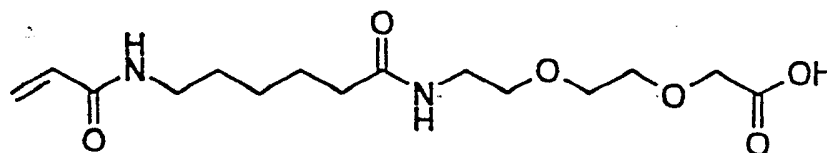
Reakcí "A" s "F" v dimethylformamidu za přidání EDCI hydrochloridu se obvyklým zpracováním získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N^ε-CO-(CH₂)₅-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)). Po odstranění chránicích skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-(CH₂)₅-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)). RT [C] 23,5; ESI 884.

Podobně se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-(CH₂)₅-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂) Gly).

Příklad 4

a)

Kopulací 6-akrylamidohexanové kyseliny na systém [2-(2-aminoethoxy)ethoxy]octová kyselina-pryskyřice TCP za přidání HOBt a TBTU v NMP se získá systém (2-[2-(6-akrylamidohexanoylamido)ethoxy]ethoxy)octová kyselina-pryskyřice DMPP. Pryskyřice se promyje systémem dichlormethan/kyselina octová/trifluor-ethanol (6:3:1) a tak se získá (2-[2-(6-akrylamidohexanoylamido)ethoxy]ethoxy)octová kyselina ("G").

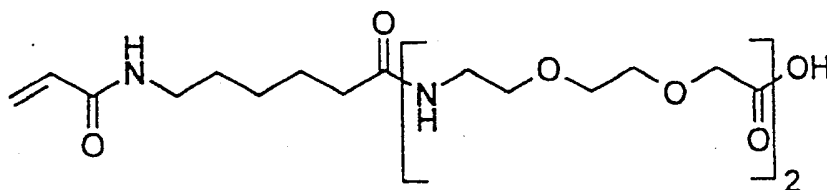


b)

Reakcí "G" s "A" v dimethylformamidu za přidání EDCI hydrochloridu se obvyklým zpracováním získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)). Po odstranění ochranných skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)); RT [C] 22,5; ESI 916.

Podobně se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)-Gly).

Podobně se reakcí (2-[2-(2-(2-[2-(6-akrylamidohexanoylamido)ethoxy]ethoxy)acetylamo)ethoxy]ethoxy)octové kyseliny



s "A" získá cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Lys(N^ε-(CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH)₂-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)). Po odstranění ochranných skupin se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-(CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH)₂-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)); RT [C] 22,75; ESI 1061.

Podobně se získá cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH)₂-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)-Gly).

Příklad 5

Podobně jako podle příkladu 1 se reakcí ("G")-cyklopeptidů

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Val-Lys)

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-Lys)

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-Lys)

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-D-Lys)

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Cys)

14.08.00

cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Dab)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-D-Cys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-D-Cys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Phe-D-Lys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Trp-D-Lys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Tyr-D-Lys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Phe-D-Cys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Phe-Dab)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Trp-D-Cys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-Tyr-D-Cys)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-D-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-D-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-D-Orn)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-Dab)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-Dab)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-Dap)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-Dap)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Dap)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Trp-D-Dap)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Tyr-D-Dap)
 cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-D-Dap)

a) s anhydridem jantarové kyseliny, b) s "C" a c) po odstranění ochranných skupin získají následující sloučeniny:

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Dab(N^γ-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Trp-D-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Tyr-D-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))

cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-Dab(N^{γ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Trp-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Tyr-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Orn(N^{δ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Dab(N^{γ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Dab(N^{γ} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Dap(N^{β} -CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH)).

Podobně jako podle příkladu 2 se reakcí ("G")-cyklopeptidů

a) s "E" a b) po odstranění ochranných skupin získají následující sloučeniny:

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys(S-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Dab(N^{γ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Cys(S-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Cys(S-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Trp-D-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Tyr-D-Lys(N^{ϵ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Cys(S-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Phe-Dab(N^{γ} -CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Trp-D-Cys(S-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-Tyr-D-Cys(S-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Om(N^δ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Dab(N^γ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Dab(N^γ-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Trp-D-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-D-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂))
 cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-D-Dap(N^β-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)).

Test buněčné adheze

Zkoumá se adheze myšších MC3T3 H1 osteoblastových kultur in vitro na RGD peptidem povlečené povrchy. V průběhu testu se naočkovává 50 000 buněk/cm², inkubuje se v prostředí prostém séra při teplotě 37 °C za 95% vlhkosti ovzduší po dobu jedné hodiny a stanovuje se podíl ulpělých buněk.

Mírou (%) ulpělých buněk se rozumí poměr ulpělé buňky/naočkované buňky x 100. Dále se uvádí
 peptid: míra ulpělých buněk [%]

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)): 11.3;

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-(CH₂)₅-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)): 92.4;

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)): 109.0;

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂CH₂CO-NH-CH₂CH₂-SH)): 86.2;

cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N^ε-CO-CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH)₂-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂)): 110.5.

14.05.00

Průmyslová využitelnost

Derivát cyklopeptidu jako inhibitor integrinu vhodný pro výrobu farmaceutických prostředků zvláště pro profylaxi a ošetřování implantáty navozených potíží, osteolytických nemocí, trombózy, trombózy, srdečního infarktu a arterosklerózy.

14.05.00
PV 2000-2203

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Derivát cyklopeptidu obecného vzorce I



kde znamená

R cyklo-(Arg-Gly-Asp-Z), přičemž Z je vázán v postranním řetězci na Q, nebo pokud Q chybí, na X,

Q chybí nebo znamená $-[CO-R^1-NH-]_m$, $-[NH-R^1-CO-]_m$,
 $-[CO-R^1-CO-]_m$, $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n$,
 $-(NH-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-CO-)_n$,
 $-(NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2-CO-)_n$ nebo
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n-[CO-R^1-NH-]_m$,

X skupinu $-CO-CH=CH_2$, $-CO-C(CH_3)=CH_2$, $-NH-CH=CH_2$,
 $-NH-C(CH_3)=CH_2$ nebo $-NH-(CH_2)_p-SR^{10}$,

Z na sobě nezávisle zbytek aminokyseliny nebo zbytek dipeptidu nebo tripeptidu, přičemž aminokyseliny jsou na sobě nezávisle voleny ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Homo-Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a M,

přičemž tyto aminokyseliny jsou popřípadě derivatizovány a aminokyselinové zbytky jsou navzájem vázány peptidovým způsobem prostřednictvím α -aminoskupin nebo α -karboxylových skupin,

a skupina M je obsažena vždy,

14.05.00

- M skupinu $\text{NH}(\text{R}^8) - \text{CH}(\text{R}^3) - \text{COOH}$,
- R^1 chybí nebo znamená skupinu R^2 , R^9 , $\text{R}^2 - \text{R}^9 - \text{R}^2$ nebo fenyle-
novou skupinu, která je nesubstituována nebo má jeden
nebo dva substituenty R^5 , přičemž řetězce R^5 jsou vždy na
sobě nezávislé,
- R^2 skupinu alkylenovou s 1 až 10 atomy uhlíku, přičemž jedna
nebo dvě methylenové skupiny jsou popřípadě nahrazeny
atomem síry, skupinou $-\text{CH}=\text{CH}-$ nebo $-\text{C}\equiv\text{C}-$,
- R^3 skupinu $-\text{R}^5 - \text{R}^4$, $-\text{R}^6 - \text{R}^4$ nebo $-\text{R}^7 - \text{R}^4$,
- R^4 skupinu OH , NH_2 , SH nebo COOH ,
- R^5 skupinu alkylenovou s 1 až 6 atomy uhlíku,
- R^6 skupinu alkylenfenylenovou se 7 až 14 atomy uhlíku,
- R^7 skupinu alkylenfenylalkylenovou s 8 až 15 atomy uhlíku,
- R^8 atom vodíku nebo skupinu A nebo alkylenfenylovou se 7 až
12 atomy uhlíku,
- R^9 skupinu cykloalkylenovou se 3 až 7 atomy uhlíku,
- R^{10} atom vodíku nebo skupinu chránící atom síry,
- A skupinu alkylovou s 1 až 6 atomy uhlíku,
- Hal atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu,
m a n na sobě nezávisle 0, 1, 2 nebo 3,
- p 1, 2 nebo 3,

14.08.00

přičemž pokud jde o zbytky opticky aktivních aminokyselin a derivátů aminokyselin, jsou zahrnuty D a L formy

a jeho soli.

2. Derivát cyklopeptidu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je

- a) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-CO-CH}_2\text{CH}_2\text{CO-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-SH))}$,
- b) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-CO-CH}_2\text{CH}_2\text{CO-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-SH)Gly)}$
- c) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH-CO-CH=CH}_2\text{))}$;
- d) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH-CO-CH=CH}_2\text{))}$.
- e) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH-CO-CH=CH}_2\text{))}$;
- f) $\text{cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(N}^{\epsilon}\text{-(CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH)}_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH-CO-CH=CH}_2\text{))}$;

a jeho fyziologicky přijatelné soli.

3. Způsob přípravy derivátu cyklopeptidu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam a jeho soli, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

- a) pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I, kde
 - Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n$ nebo
 $-(\text{CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-})_n\text{-[CO-R}^1\text{-NH-]}_m$,
 - X skupinu $-\text{CO-CH=CH}_2$ nebo $-\text{CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$ a
 - R má shora uvedený význam

i)

se sloučenina obecného vzorce II

14.08.00



kde R má shora uvedený význam, nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce III



kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-[CO-R^1-NH-]_m$,
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n$ nebo
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n-[CO-R^1-NH-]_m$,

X znamená skupinu $-CO-CH=CH_2$ nebo $-CO-C(CH_3)=CH_2$ a

L znamená atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu,

nebo

ii) se sloučenina obecného vzorce IV



kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-[CO-R^1-NH-]_m$,
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n$ nebo
 $-(CO-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-)_n-[CO-R^1-NH-]_m$ a

R má shora uvedený význam,

nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce V



kde znamená

X skupinu $-CO-CH=CH_2$ nebo $-CO-C(CH_3)=CH_2$ a

L atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu,

nebo

b) pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I, kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-[NH-R^1-CO-]_m$ nebo
 $-[CO-R^1-CO-]_m$, $-(NH-CH_2-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2-CO-)_n$ nebo

14.06.00

$-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$,

X skupinu $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ nebo
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SR}^{10}$

R^{10} skupinu chránící atom síry a

R má shora uvedený význam,

i)

se sloučenina obecného vzorce VI

R-L

(VI)

kde znamená

L atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo rektivní
 funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu a

R má shora uvedený význam,

nechá vá reagovat se sloučeninou obecného vzorce VII

H-Q-X

(VII)

kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$ nebo
 $-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$ nebo
 $-(\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$,

X znamená skupinu $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ nebo
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SR}^{10}$

R^{10} znamená skupinu chránící atom síry

nebo

ii) se sloučenina obecného vzorce VIII

R-Q-L

(VIII)

kde

Q chybí nebo znamená skupinu $-\text{[NH-R}^1\text{-CO-]}_m$ nebo
 $-\text{[CO-R}^1\text{-CO-]}_m$, $-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$ nebo
 $-(\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$,

L znamená atom chloru, bromu, jodu nebo volnou nebo
 rektivní funkčně obměněnou hydroxylovou skupinu a

14.05.00

R má shora uvedený význam,
nechává reagovat se sloučeninou obecného vzorce IX



kde znamená

X skupinu $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ nebo
 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{SR}^{10}$ a

R^{10} skupinu chránící atom síry,

nebo

c) se sloučenina obecného vzorce I uvolňuje ze svých funkčních derivátů zpracováním solvolýzačním nebo hydrogenolýzačním činidlem,

a/nebo se zásaditá sloučenina nebo kyselá sloučenina obecného vzorce I převádí na svoji sůl zpracováním kyselinou nebo zásadou.

4. Derivát cyklopeptidu podle nároku 1 obecného vzorce I pro kovalentní vazbu prostřednictvím funkční skupiny symbolu X na biokompatibilní povrchy.

5. Derivát cyklopeptidu podle nároku 4 obecného vzorce I jakožto integrinový inhibitor pro selektivní obohacování buněk na implantátech.

6. Derivát cyklopeptidu podle nároku 4 nebo 5 obecného vzorce I jakožto integrinový inhibitor pro ošetřování poruch, způsobených implantáty, defektů, zánětů, osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu a arteriosklerózy a pro urychlení integračního procesu implantátu nebo biokompatibilního povrchu do tkáně.

7. Použití derivátu cyklopeptidu podle nároku 6 obecného

14.06.00

vzorci I pro výrobu léčiv k ošetřování poruch, způsobených implantáty, defektů, zánětů, osteolytických poruch, jako je osteoporóza, trombózy, srdečního infarktu a arteriosklerózy a pro urychlení integračního procesu implantátu nebo biokompatibilního povrchu do tkáně.

8. Použití derivátu cyklopeptidu podle nároku 1 obecného vzorce I pro kovalentní vázání na biokompatibilní povrchy.

9. Použití derivátu cyklopeptidu podle nároku 1 obecného vzorce I v afinitní chromatografii.