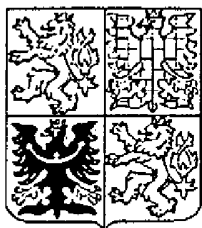


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 4013-92

(13) A3

5(51)

C 07 K 7/26

A 61 K 37/43

(22) 23.07.91

(32) 23.07.91, 24.07.90, 27.07.90

(31) 91US/9105208, 90/557226, 90/558120

(33) WO, US, US

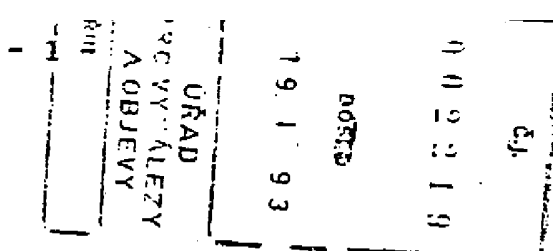
(40) 16.02.94

(71) POLYGEN HOLDING CORPORATION, Wilmington,  
Delaware, US;

(72) Bowers Cyril Y., New Orleans, Louisiana, US;  
Hubbs John C., Kingsport, Tennessee, US;  
Foster Charles H., Kingsport, Tennessee, US;  
Cody Wayne L., Saline, Missouri, US;  
Moman Frank A., Wellesley, Maine, US;

(54) Polypeptidové sloučeniny se schopností  
uvolňovat růstový hormon.

(57) Polypeptidové sloučeniny promotující uvolňování růstového hormonu při podání zvířatům, které mají obecný vzorec  $A_1-A_2-A_3-Trp-A_5-A_6-Z$ , ve kterém znamená:  $A_1$  His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr,  $A_0$ -His nebo  $A_0-3(NMe)His$ , kde  $A_0$  představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce L- $A_0$ , kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar;  $A_2$  znamená  $D^{nn}$ -Nal nebo DPhe;  $A_3$  znamená Ala, Gly nebo Ser;  $A_5$  znamená DPhe, D/L<sup>bn</sup>(Me)Phe nebo (NMe)DPhe;  $A_6$  znamená B-G nebo G, kde B a G mají různé významy; Z znamená koncovou skupinu na koncovém uhlíku polypeptidu nebo C-koncovou aminokyselinu nebo kyseliny plus koncovou skupinu, přičemž Z je  $-CONR^1R^2$ ,  $-COOR^1$  nebo  $-CH_2OR^1$ ,  $-Gly-Z'$ ,  $Lys-Z'$ ,  $-Cys-Z'$ ,  $-Gly-Tyr-Z'$  nebo  $-Ala-Tyr-Z'$ , kde  $Z'$ ,  $R^1$  a  $R^2$  mají různé významy. Do rozsahu rovněž náleží farmaceutický prostředek obsahující výše uvedené peptidy, použití uvedených peptidů pro přípravu léčiv promotujících uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu v krvi a způsob přípravy uvedených peptidů.



Polypeptidové sloučeniny se schopností uvolňovat růstový hormon.

### Oblast techniky

Vynález se týká nových polypeptidových sloučenin, které jestliže jsou podány zvířatům promotují uvolňování růstového hormonu. Do rozsahu vynálezu rovněž náleží způsob promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu u zvířat jestliže se jim podá specifická polypeptidová sloučenina uvolňující tento růstový hormon.

### Dosavadní stav techniky

Zvýšení hladiny růstového hormonu (v tomto textu bude někdy používána pro označení růstového hormonu zkratka GH) u savců po podání sloučeniny uvolňující růstový hormon vede ke zvýšení tělesné hmotnosti a ke zvýšení produkce mléka, jestliže se po podání dosáhne dostatečného zvýšení hladiny růstového hormonu. Kromě toho je třeba poznamenat, že zvýšení hladiny růstového hormonu u savců může být dosaženo pomocí běžně známých činidel uvolňujících růstový hormon, jako jsou například v přírodě se vyskytující hormony uvolňující růstový hormon.

Toto zvýšení hladiny růstového hormonu u savců je možno rovněž dosáhnout aplikací peptidů uvolňujících růstový hormon, které jsou známy z dosavadního stavu techniky, například z patentů Spojených států amerických č. 4 223 019, 4 223 020, 4 223 021, 4 224 316, 4 226 857, 4 228 155, 4 228 156, 4 228 157, 4 228 158, 4 410 512, 4 410 513,

4 411 890 a 4 839 344.

Podle dosavadního stavu techniky byly ke zvýšení hladiny růstového hormonu rovněž použity protilátky endogenního inhibitoru uvolňování růstového hormonu, somatostatinu (SRIF). Podle této metody se hladina růstového hormonu zvyšuje odstraňováním endogenního inhibitoru uvolňování růstového hormonu (SRIF) ještě předtím, než se dostane do hypofýzy, kde inhibuje uvolňování růstového hormonu.

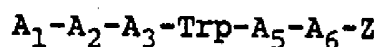
Každá z těchto metod, při které se promotuje zvyšování hladiny růstového hormonu, vyžaduje použití látek, jejichž syntéza a/nebo izolování ve stavu dostatečně čistém k tomu, aby tyto látky mohly být podávány určeným zvířatům, je nákladné. V této oblasti tedy vyvstává potřeba vyvinout relativně jednoduché polypeptidové sloučeniny s krátkým řetězcem, které by měly schopnost promotovat uvolňování růstového hormonu, neboť takovéto sloučeniny by bylo možno snadno připravit bez vynaložení velkých nákladů, dále by takové sloučeniny byly snadno modifikovatelné chemicky a/nebo fyzikálně, a rovněž tak by bylo možno je snadno vyčistit a formulovat. Dalším požadavkem je aby tyto sloučeniny měly výborné vlastnosti z hlediska jejich transportovatelnosti.

Vzhledem k dosavadnímu stavu techniky v této oblasti je zřejmé, že je potřeba vyvinout k promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu v krvi zvířat takové polypeptidové sloučeniny, které mají krátký řetězec. Z jiného hlediska by bylo rovněž vhodné vyvinout takové polypeptidové sloučeniny, kterých by bylo možno využít k promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového

hormonu v krvi zvířat.

Podstata vynálezu

Podle uvedeného vynálezu byla zjištěna skupina nových polypeptidových sloučenin, které promotují uvolňování růstového hormonu u zvířat. Tyto polypeptidové sloučeniny mají obecný vzorec :



ve kterém znamená :

$A_1$  His, 3(NMe)His,  $A_0$ -His,  $A_0$ -3(NMe)His, Ala, Tyr nebo His-Ala,

kde  $A_0$  představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce



kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar,

ve výhodném provedení představuje  $A_0$  libovolnou v přírodě se vyskytující aminokyselinu, konkrétně  $A_0$  představuje Ala, Lys nebo Glu

$A_2$  znamená  $D^A$ Nal nebo DPhe,

$A_3$  znamená Ala, Gly nebo Ser,

$A_5$  znamená DPhe, D/L<sup>4</sup>(Me)Phe nebo (NMe)DPhe,

$A_6$  znamená B-G nebo G,

kde B představuje libovolnou v přírodě se vyskytující aminokyselinu, dipeptidy libovolných v přírodě se vyskytujících

058873  
 DOŠLO  
 14. X. 93  
 URAD  
 NÁRODNÍHO  
 VÝZKUMNÉHO  
 ÚSTAVU  
 BIOLOGIE  
 PRAHA

aminokyselin nebo  $H_2N-(CH_2)_n-CO_2H$  (kde  $n = 2-12$ ) a

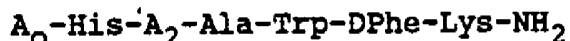
G znamená Arg, iLys, Lys nebo Orn,

Z znamená koncovou skupinu na koncovém uhlíku  $-CONR^1R^2$ ,  $-COOR^1$  nebo  $-CH_2OR^1$  (kde  $R^1$  znamená vodík, alkylovou skupinu obsahující 1 až asi 6 atomů uhlíku, cykloalkylovou skupinu obsahující 3 až asi 8 atomů uhlíku, alkenylovou skupinu obsahující 2 až asi 8 atomů uhlíku nebo arylovou skupinu obsahující 6 až asi 12 atomů uhlíku, a  $R^2$  je definován jako  $R^1$ , přičemž tyto substituenty mohou být stejné nebo rozdílné),  $-Gly-Z'$ ,  $-Met-Z'$ ,  $-Lys-Z'$ ,  $-Cys-Z'$ ,  $-Gly-Tyr-Z'$  nebo  $-Ala-Tyr-Z'$ ,

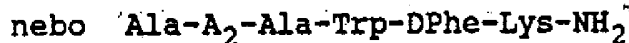
kde  $Z'$  představuje skupiny  $-CONR^1R^2$ ,  $-COOR^1$  nebo  $-CH_2OR_1$  (ve kterých  $R^1$  a  $R^2$  mají stejný význam jako bylo uvedeno shora),

přičemž do skupiny těchto sloučenin rovněž náleží organické a anorganické farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto polypeptidů.

Ve výhodném provedení podle uvedeného vynálezu mají uvedené peptidové sloučeniny obecný vzorec :

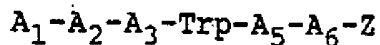


(například  $Ala-His-A_2-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH_2$ )



Podle ještě výhodnějšího provedení představuje  $A_2 D^{\beta}Nal$ . Tyto peptidové sloučeniny je možno použít k promotování uvolňování a zvýšení hladiny růstového hormonu v krvi zvířat, ve výhodném provedení se tyto peptidy používají u lidí, přičemž se těmto subjektům podává účinné množství tohoto peptidu.

Podstata uvedeného vynálezu tedy spočívá v objevení skupiny několika polypeptidových sloučenin s krátkým řetězcem, které promotují uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu v krvi zvířat. Tyto polypeptidové sloučeniny, které náleží do rozsahu uvedeného vynálezu jsou definovány, jak již bylo výše uvedeno, obecným vzorcem :



ve kterém mají  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_5$ ,  $A_6$  a  $Z$  shora uvedený význam, přičemž

$A_1$  představuje His, 3(NMe)His (to znamená, že imidazolový kruh je methylován v poloze 3), His-Ala,  $A_0$ -His, Ala, Tyr nebo  $A_0$ -3(NMe)His,

kde  $A_0$  představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce



kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar, přičemž ve výhodném provedení  $A_1$  znamená His, Ala, His-Ala,  $A_0$ -His nebo Ala, a ještě výhodněji  $A_1$  znamená His nebo  $A_0$ -His,

ve výhodném provedení představuje  $A_0$  libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, přičemž ještě výhodněji  $A_0$  znamená Ala, Lys nebo Glu a podle ještě výhodnějšího provedení  $A_0$  znamená Ala,

$A_2$  znamená  $D^A$ Nal nebo DPhe, přičemž ve výhodném provedení  $A_2$  znamená  $D^A$ Nal,

$A_3$  znamená Ala, Gly nebo Ser, přičemž ve výhodném provedení  $A_3$  znamená Ala,

$A_5$  znamená DPhe, D/L<sup>β</sup>(Me)Phe nebo (NMe)DPhe, přičemž ve výhodném provedení  $A_5$  znamená DPhe

$A_6$  znamená B-G nebo G,

kde B představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, dipeptidy libovolných v přírodě se vyskytujících aminokyselin (jako je například Ala-Lys, Ala-Ala, Ala-Leu) nebo  $H_2N-(CH_2)_n-CO_2H$ , kde  $n = 2-12$  a

G znamená Arg, iLys, Lys nebo Orn, přičemž ve výhodném provedení B znamená libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu nebo  $H_2N(CH_2)_nCO_2H$ , kde  $n = 4$  až 8,

přičemž ve výhodném provedení  $A_6$  znamená G, Ala-Lys nebo Ala-Ala-Lys, a podle ještě výhodnějšího provedení  $A_6$  představuje G, nejvýhodněji  $A_6$  představuje Lys,

Z znamená koncovou skupinu na koncovém uhlíku polypeptidového řetězce nebo aminokyselinu nebo aminokyseliny na koncovém uhlíku plus koncovou skupinu, přičemž Z je  $-CONR^1R^2$ ,  $-COOR^1$  nebo  $-CH_2OR^1$ , kde  $R^1$  znamená vodík, alkylovou skupinu obsahující 1 až asi 6 atomů uhlíku, cykloalkylovou skupinu obsahující 3 až asi 8 atomů uhlíku, alkenylovou skupinu obsahující 2 až asi 8 atomů uhlíku nebo arylovou skupinu obsahující 6 až asi 12 atomů uhlíku, a  $R^2$  je definován jako  $R^1$ , přičemž tyto substituenty mohou být stejné nebo rozdílné,

přičemž ve výhodném provedení  $R^1$  znamená H nebo alkylovou skupinu obsahující 1 až asi 6 atomů uhlíku, a

Z může rovněž znamenat -Gly-Z', -Met-Z', -Lys-Z', -Cys-Z', -Gly-Tyr-Z' nebo -Ala-Tyr-Z',

kde Z' představuje skupiny  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ ,  $-\text{COOR}^1$  nebo  $-\text{CH}_2\text{OR}^1$  ve kterých  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^2$  mají stejný význam jako bylo uvedeno shora),

ve výhodném provedení Z představuje skupiny  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ ,  $-\text{COOR}^1$  nebo  $\text{CH}_2\text{OR}^1$ .

Do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží farmaceuticky přijatelné organické nebo anorganické adiční soli odvozené od libovolných výše uvedených polypeptidů.

Použité zkratky pro zbytky aminokyselin odpovídají standardnímu označení podle peptidové nomenklatury :

Gly	=	glycin
Tyr	=	L-tyrosin
Ile	=	L-isoleucin
Glu	=	L-glutamová kyselina
Thr	=	L-threonin
Phe	=	L-fenylalanin
Ala	=	L-alanin
Lys	=	L-lysin
Asp	=	L-aspartová kyselina
Cys	=	L-cystein
Arg	=	L-arginin
Gln	=	L-glutamin
Pro	=	L-prolin
Leu	=	L-leucin
Met	=	L-methionin
Ser	=	L-serin
Asn	=	L-asparagin
His	=	L-histidin
Trp	=	L-tryptofan
Val	=	L-valin
DOPA	=	3,4-dihydroxyfenylalanin .

Met(O) = methioninsulfoxid  
Abu =  $\alpha$ -aminomáselná kyselina  
iLys = N<sup>ε</sup>-isopropyl-L-lysin  
4-Abu = 4-aminomáselná kyselina  
Orn = L-ornithin  
D<sup>α</sup>Nal =  $\alpha$ -naftyl-D-alanin  
D<sup>β</sup>Nal =  $\beta$ -naftyl-D-alanin  
Sar = sarkosin.

Uvedená tři písmena označující zkratku aminokyseliny, před kterými je uvedeno písmeno "D", znamenají že se jedná o D-konfiguraci zbytku aminokyseliny, a zkratky, před kterými je uvedeno označení "D/L" označují směr D- a L-konfigurace uvedené aminokyseliny. Pro účely uvedeného vynálezu se předpokládá, že glycin je zahrnut pod označením "v přírodě se vyskytující L-aminokyseliny".

Bazické, neutrální nebo kyselé zbytky aminokyseliny, které je možno použít pro aminokyseliny A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub> a A<sub>6</sub> představují zbytky se značnou možností kontrolování fyzikálně-chemických vlastností požadovaného konečného peptidu. Tato flexibilita poskytuje významnou výhodu při formulování a aplikování požadovaného peptidu libovolnému subjektu. Dalšího rozšíření flexibility je možno rovněž dosáhnout vhodným výběrem zbytků R a Z, čímž se dosáhne dalšího zlepšení kontroly fyzikálně-chemických vlastností požadované sloučeniny.

Ve výhodném provedení podle vynálezu se při praktické aplikaci jako sloučenin uvolňujících růstový hormon používá následujících látek :

$A_1-A_2$ -Ala-Trp-DPhe- $A_6$ -Z, jako  
 $A_0$ -His- $A_2$ -Ala-Trp-DPhe- $A_6$ -Z,  
His-Ala- $A_2$ -Ala-Trp-DPhe- $A_6$ -Z,  
Ala- $A_2$ -Ala-Trp-DPhe- $A_6$ -Z, a  
His- $A_2$ -Ala-Trp-DPhe- $A_6$ -Z, a

organické nebo anorganické adiční soli odvozené od těchto sloučenin. Ve výhodném provedení podle vynálezu představuje  $A_2$   $D^{\alpha}$ Nal. Ještě výhodnějšími sloučeninami jsou

$A_0$ -His- $D^{\beta}$ Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> (zejména  
(Ala-His- $D^{\alpha}$ Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>), a  
His- $D^{\beta}$ Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>, a

organické nebo anorganické adiční soli odvozené od libovolného z uvedených peptidů.

Tyto sloučeniny podle uvedeného vynálezu se obvykle snadno připravují, projevují schopnost promotovat zvýšení hladiny růstového hormonu v séru a jsou vhodné pro běžné komerční využití a výrobu v průmyslovém měřítku. Kromě toho je nutno uvést, že tyto sloučeniny podle vynálezu jsou výhodné rovněž i z toho hlediska, že jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou vhodné pro účinné aplikování na široký okruh různých zvířat v důsledku flexibility těchto polypeptidových sloučenin, které je dosahováno různými substitucemi na různých polohách těchto polypeptidových sloučenin, výběrem N-koncových, C-koncových a centrálních částí těchto polypeptidových sloučenin, které mohou být polární, neutrální nebo nepolární povahy, takovým způsobem, aby byly kompatibilní s požadovanou metodou aplikace.

Tyto peptidy obvykle projevují vysoký stupeň účinnosti při promotování zvýšení hladiny růstového hormonu v séru v porovnání s většinou ekvivalentních peptidů s různými zbytky aminokyselin na A<sub>2</sub>-poloze. Uvedené D<sup>β</sup>Nal peptidy obvykle představují nejvýhodnější sloučeniny vzhledem k jejich vysoké účinnosti.

Nejvýhodnějšími peptidy podle uvedeného vynálezu jsou :

His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> a  
A<sub>0</sub>-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> (jako je  
Ala-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>) a  
A<sub>0</sub>-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>, jako je  
Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>, a

organické nebo anorganické adiční soli odvozené od uvedených sloučenin.

U těchto sloučenin bylo prokázáno, že projevují vysokou účinnost pokud se týče promotování zvýšení hladiny růstového hormonu v séru.

Sloučeniny podle uvedeného vynálezu je možno použít ke zvýšení hladiny růstového hormonu v krvi u zvířat, přičemž se dosáhne zvýšení produkce mléka u krav, zvýšení tělesné hmotnosti u zvířat, jako například u savců (to znamená u lidí, ovcí, hovězího dobytka a vepřů) a rovněž tak i u ryb, drůbeže a dalších obratlovců a korýšů, a dále zvýšení produkce vlny a/nebo srsti u dalších zvířat. Rozsah přírůstku tělesné hmotnosti závisí na pohlaví a stáří daného druhu zvířete, na množství a charakteru podávané sloučeniny uvolňující růstový hormon, na způsobu podávání a podobně.

Tyto nové polypeptidové sloučeniny podle uvedeného vynálezu je možno připravit obvyklými metodami známými z dosavadního stavu techniky, které se používají pro přípravu peptidů v roztoku nebo v pevné fázi, nebo jinými klasickými metodami podle dosavadního stavu techniky. Syntéza těchto sloučenin v pevné fázi se provádí od C-koncové části peptidu. Vhodné výchozí látky je možno například připravit připojením požadované alfa-aminokyseliny na chlormethylovanou pryskyřici, hydroxymethylovou pryskyřici, benzhydrylaminovou (BHA) pryskyřici nebo na para-methyl-benzhydrylaminovou (p-Me-BHA) pryskyřici. Jedna z těchto chlormethylových pryskyřic se prodává pod ochrannou známkou Biobeads SX-1, což je produkt firmy Bio Rad Laboratories, Richmond, Kalifornie. Postup přípravy hydroxymethylové pryskyřice je popsán v Chem. Ind. (Londýn) 38, 1597 (1966), autor Bodansky a kol., přičemž postup zde uvedený je možno pro průmyslovou aplikaci získat od firmy Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, Kalifornie.

Po počátečním připojení je možno chránicí skupinu alfa-aminoskupiny odstranit použitím vhodného acidického reakčního činidla, jako je například roztok kyseliny trifluoroctové (TFA) nebo kyseliny chlorovodíkové (HCl) v organickém rozpouštědle, přičemž zpracování se provádí při teplotě místnosti. Po odstránění chránicí skupiny alfa-aminoskupiny se postupně napojí zbývající chráněné aminokyseliny v požadovaném pořadí. Každá chráněná aminokyselina se obvykle uvádí do reakce v asi trojnásobném přebytku, přičemž se používá vhodného aktivátoru karboxylové skupiny, jako je například dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo diisopropylkarbodiimid (DIC), což se provádí v roztoku, jako například v roztoku methylenchloridu ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) nebo

dimethylformamidu (DMF) nebo ve směsích těchto látek.

Po dokončení požadované sekvence aminokyselin je možno požadovaný peptid odštěpit od pryskyřicového nosiče zpracováním s takovým reakčním činidlem jako je například fluorovodík (HF), čímž se dosáhne nejenom odštěpení peptidu od pryskyřice, ale rovněž i odbourání obvykle používaných chránících skupin bočního řetězce. V případě použití chlormethylové pryskyřice nebo hydroxymethylové pryskyřice se po fluorovodíkovém zpracování získá volná peptidová kyselina. V případě, že se použije BHA nebo p-Me-BHA pryskyřice, potom se po fluorovodíkovém zpracování získá přímo volný peptidamid.

Postup prováděný v pevné fázi, který byl popsán ve shora uvedeném textu, je velice dobře znám z dosavadního stavu techniky, viz. Stewart a Young, Solid Phase Peptide Synthesis : Second Edn. (Pierce Chemical Co., Rockford, Il. 1984).

Některé z metod probíhajících v roztoku, kterých je možno použít k syntetické přípravě peptidových látek podle uvedeného vynálezu, jsou uvedeny v publikaci Peptide Synthesis, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1976, autoři Bodansky a kol.

Předpokládá se, že je výhodnější provádět syntetický postup přípravy uvedených peptidů metodou v rozpouštědlové fázi, při které probíhá kondenzační reakce přinejmenším dvou peptidových fragmentů.

Tato výše uvedená metoda zahrnuje kondenzaci peptidového fragmentu

X-A<sub>1</sub>-Y

s peptidovým fragmentem

U-V-W

kde všechny boční řetězce aminokyselin s výjimkou A<sub>1</sub> jsou neutrální nebo chráněné,

a ve kterých znamená :

X Prot. nebo Prot.-A<sub>0</sub>, kde Prot. je N-koncová chránicí skupina,

Y znamená A<sub>2</sub>-Q, Ala-A<sub>2</sub>-Q, A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-Q, Ala-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-Q, A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-Q, Ala-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-Q, Ala-Q nebo -Q, přičemž

jestliže Y je Q, potom U je J-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub> nebo J-Ala-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>,

jestliže Y je Ala-Q, potom U je J-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>,

jestliže Y je A<sub>2</sub>-Q nebo Ala-A<sub>2</sub>-Q, potom U je J-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>,

jestliže Y je A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-Q nebo Ala-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-Q, potom U je J-A<sub>4</sub>,

jestliže Y je A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-Q nebo Ala-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-Q, potom U je J,

V je A<sub>5</sub> nebo Z, přičemž

jestliže V je A<sub>5</sub>, potom W je A<sub>6</sub>-Z nebo Z,

jestliže V je Z, potom W není přítomen, a

A<sub>1</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub> a Z mají stejný význam jako bylo shora

uvedeno.

V uvedeném případě A<sub>2</sub> znamená D<sup>β</sup>Nal nebo DPhe a A<sub>4</sub> je Trp.

Q je koncová karboxyskupina peptidového fragmentu, přičemž představuje -OR<sup>3</sup> nebo -M, kde M je zbytek, který je schopen nahrazení nukleofilní částí obsahující dusík, a R<sup>3</sup> je vodík, alkylová skupina obsahující jeden až asi 10 atomů uhlíku, arylová skupina obsahující 6 až asi 12 atomů uhlíku nebo aralkylová skupina obsahující 7 až asi 12 atomů uhlíku,

J znamená aminové zakončení uvažovaného fragmentu, přičemž představuje vodík nebo chránicí skupinu, která nebrání kondenzační reakci, jako je například benzylová skupina.

V dalším postupu se odstraní chránicí skupiny. V alternativním provedení je možno pro další kondenzační reakci za účelem přípravy většího peptidu použít chráněný peptid, získaný shora uvedeným postupem.

Tato výhodná metoda je podrobněji popsána v patentové přihlášce Spojených států amerických č. , podané 24. července 1990, autoři John C. Hubbs a S.W. Parker, o názvu "Process for Synthesizing Peptides", uvedené zde jako odkazový materiál.

Do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží postup promotování uvolňování a/nebo zvýšení hladiny růstového hormonu v krvi zvířat. Podstata tohoto postupu spočívá v tom, že se zvířatům podává účinné množství přinejmenším jednoho výše uvedeného polypeptidu.

Sloučeniny podle uvedeného vynálezu je možno podávat orálně, parenterálně (intramuskulárně, i.m.), intraperitoneálně (i.p.), intravenózně (i.v.) nebo subkutánně (s.c.) pomocí injekcí, dále nazálně, vaginálně, rektálně nebo sublinguálně, přičemž tyto sloučeniny je možno formulovat do dávkových forem, které jsou vhodné pro každou jednotlivou metodu podávání. Ve výhodném provedení podle uvedeného vynálezu se používá parenterálního podávání.

Mezi pevné dávkové formy pro orální podávání náleží kapsle, tablety, pilulky, prášky a granule. Při přípravě

těchto pevných dávkových forem se účinná látka smíchává s přinejmenším jedním inertním nosičovým materiálem, jako je například sacharóza, laktóza nebo škrob. Tyto dávkové formy mohou rovněž obsahovat, jak je to běžné v obdobných jiných případech v tomto oboru, další látky kromě uvedených inertních nosičových látek, jako jsou například maziva, například stearát hořečnatý. V případě kapslí, tablet a pilulek může dávková forma rovněž obsahovat tlumící činidla... Tablety a pilulky je možno formulovat společně s obduktory (což jsou látky napomáhající uvolňování účinné látky ve střevech).

Mezi kapalnými dávkovými formami pro orální podávání je možno zařadit emulze, roztoky, suspenze, sirupy, elixíry obsahující inertní ředidla všeobecně známá a používaná v tomto oboru, jako je například voda. Kromě výše uvedených ředících látek mohou tyto prostředky obsahovat rovněž pomocné látky, jako jsou například smáčecí činidla, emulgační a suspenzační činidla a sladidla, esence a vonné přísady.

Prostředky podle uvedeného vynálezu pro parenterální podávání zahrnují sterilní vodné nebo nevodné roztoky, suspenze nebo emulze. Jako příklad nevodných rozpouštědel nebo vehikulů je možno uvést propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje, jako je například olivový olej a kukuřičný olej, dále želatina a organické estery používané pro injekce, jako je například ethylester kyseliny olejové. Tyto dávkové formy mohou rovněž obsahovat přídavné látky, jako jsou například konzervační přísady, smáčecí, emulgační a dispergační činidla. Tyto prostředky je možno sterilizovat, například filtrací přes filtr zachycující bakterie, vpravením sterilizačních činidel do

těchto prostředků, ozářováním těchto prostředků nebo zahříváním těchto prostředků. Rovněž je možno tyto prostředky bezprostředně před použitím připravovat v prostředí sterilní vody nebo v jiném sterilním médiu vhodném pro injekce.

Tyto nové sloučeniny podle uvedeného vynálezu jsou rovněž vhodné k podávání v kombinaci s hormony uvolňujícími růstový hormon (jako jsou například v přírodě se vyskytující hormony uvolňující růstový hormon, analogy a funkční deriváty těchto látek) a rovněž v kombinaci s jinými sloučeninami, které promotují uvolňování růstového hormonu, jako jsou například peptidy uvolňující růstový hormon (viz například patent Spojených států amerických č. 4 880 778, který je zde uveden jako odkazový materiál). Tyto kombinace představují zejména výhodné formy, pomocí kterých se podávají peptidy k uvolňování růstového hormonu podle uvedeného vynálezu, neboť tyto kombinace promotují uvolňování mnohem většího množství růstového hormonu než by odpovídalo součtu jednotlivých účinků pro každou jednotlivou složku přítomnou v uvedené kombinaci, to znamená, že tato kombinace poskytuje synergický účinek vzhledem k jednotlivým složkám. Další detaily týkající se podávání kombinací obsahujících peptidy uvolňující růstový hormon jsou popsány ve výše uvedeném patentu. Těmito synergicky působícími sloučeninami jsou ve výhodném provedení sloučeniny, které účinkují jako agonisty receptoru hormonu uvolňujícího růstový hormon, nebo inhibují účinek somatostatinu. Tento synergismus může být binární, to znamená může k němu docházet mezi sloučeninou podle uvedeného vynálezu a jednou synergicky účinnou látkou, nebo může být přítomna více než jedna synergicky účinná sloučenina.

Množství podávaného polypeptidu nebo kombinace polypeptidů podle uvedeného vynálezu se pohybuje v širokých mezích v závislosti na různých faktorech, jako například na konkrétním zvířeti, které je ošetřováno pomocí těchto peptidů, na stáří a pohlaví, na požadovaném terapeutickém účinku, na způsobu podávání a na tom, jaký konkrétní polypeptid nebo kombinace polypeptidů se používá. Ve všech těchto případech se ovšem používá takové dávky, která je účinná k promotování uvolňování nebo zvýšení hladiny růstového hormonu v krvi zvířete, kterému je podávána tato látka. Obvykle se tato dávka celkově podávaného peptidu pohybuje v rozmezí od 0,1  $\mu\text{g}$  do 10 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Výhodné používané množství je možno snadným způsobem určit empiricky, což může provést každý odborník pracující v daném oboru na základě informací uvedených v tomto popisu.

Například v případě podávání uvedených látek lidem, jestliže se použije intravenózního podávání, se výhodné množství pohybuje v rozmezí od asi 0,1  $\mu\text{g}$  do 10  $\mu\text{g}$  celkového množství polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti, podle ještě výhodnějšího provedení je toto množství v rozmezí od asi 0,5  $\mu\text{g}$  do asi 5  $\mu\text{g}$  celkového množství polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti a ještě výhodnější je toto množství v rozmezí od asi 0,7  $\mu\text{g}$  do asi 3,0  $\mu\text{g}$  celkového množství polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti.

V případě, že se používá kombinací obsahujících peptidy uvolňující růstový hormon, potom je možno použít nižších množství tohoto peptidu. Například je možno uvést, že v případě kombinování peptidu podle uvedeného vynálezu například se synergicky působící sloučeninou ze skupiny I podle patentu Spojených států amerických č. 4 880 778, jako je například GHRH, potom se výhodné množství peptidu

podle uvedeného vynálezu pohybuje v rozmezí od asi 0,1  $\mu\text{g}$  do asi 5  $\mu\text{g}$  (jako je například Ala-His-D <sup>$\beta$</sup> Nal-Ala-Trp-DPhe-A<sub>6</sub>-Z, Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A<sub>6</sub>-Z nebo His-D <sup>$\beta$</sup> Nal-Ala-Trp-DPhe-A<sub>6</sub>-Z) na kilogram tělesné hmotnosti, přičemž množství synergicky působící sloučeniny (jako je například GHRH) se pohybuje v rozmezí od asi 0,5  $\mu\text{g}$  do asi 15,0  $\mu\text{g}$  na kilogram tělesné hmotnosti, podle ještě výhodnějšího provedení je toto množství peptidu podle uvedeného vynálezu v rozmezí od asi 0,1  $\mu\text{g}$  do asi 3  $\mu\text{g}$  a množství synergicky působící sloučeniny je v rozmezí od asi 1,0  $\mu\text{g}$  do asi 3,0  $\mu\text{g}$  na kilogram tělesné hmotnosti.

V případě použití orálního způsobu podávání je zapotřebí obvykle použít většího množství polypeptidu. Například v případě orálního způsobu podávání u lidí se dávkové množství obvykle pohybuje v rozmezí od asi 30  $\mu\text{g}$  do asi 600  $\mu\text{g}$  polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti, podle ještě výhodnějšího provedení je toto množství v rozmezí od asi 70  $\mu\text{g}$  do asi 500  $\mu\text{g}$  celkového podílu polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti, podle ještě výhodnějšího provedení je toto množství v rozmezí od asi 100  $\mu\text{g}$  do asi 350  $\mu\text{g}$  celkového podílu polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti a podle ještě výhodnějšího provedení je toto množství od asi 200  $\mu\text{g}$  do asi 300  $\mu\text{g}$  celkového podílu polypeptidu na kilogram tělesné hmotnosti. U krav je třeba použít přibližně stejného dávkovaného množství polypeptidu jako u lidí, zatímco u krys jsou zapotřebí dávky vyšší. Přesné dávkované množství je možno snadno určit empirickým způsobem na základě informací uvedených v tomto popisu.

Obecně je možno uvést, jak již rovněž bylo uvedeno výše, že při podávání kombinace obsahující peptidy

uvolňující růstový hormon je možno použít nižších dávek jednotlivých sloučenin uvolňujících růstový hormon v porovnání s dávkami nutnými v případě jednotlivě použitých sloučenin uvolňujících růstový hormon za účelem dosažení stejného účinku vzhledem k synergickému působení dosahovanému v případě použití uvedené kombinace.

Do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží prostředky obsahující jako účinnou látku organickou nebo anorganickou adiční sůl odvozenou od výše uvedených polypeptidů a kombinace těchto látek, popřípadě společně s nosičovým materiálem, ředidlem, matricí s pomalým uvolňováním nebo povlakem.

Do skupiny organických nebo anorganických adičních solí odvozených od sloučenin uvolňujících růstový hormon podle uvedeného vynálezu, které náleží do rozsahu tohoto vynálezu, je možno zařadit soli organických částí jako je například acetát, trifluoracetát, oxalát, valerát, oleát, laurát, benzoát, laktát, tosylát, citrát, maleinan, fumarát, sukcinát, vlnan, naftenát a podobné další zbytky, a dále anorganických částí, jako jsou prvky ze skupiny I (to znamená soli alkalických kovů), skupiny II (to znamená soli kovů alkalických zemin), amonné a protaminové soli, zinek, železo a podobné další prvky, s opačnými ionty, jako je například chlorid, bromid, síran, fosforečnan a podobné další ionty, a rovněž tak i s organickými částmi uvedenými výše.

Farmaceuticky přijatelné soli představují výhodné sloučeniny v případech, kdy se tyto látky podle uvedeného vynálezu podávají lidem. Mezi tyto soli je možno zařadit netoxické soli alkalických kovů, kovů alkalických zemin a

amonné soli, které jsou běžně používány a připravovány ve farmacii, přičemž těmito solemi jsou například sodné soli, draselné soli, lithné soli, vápenaté soli, hořečnaté soli, barnaté soli, amonné soli a protaminové soli, připravované metodami běžně známými z dosavadního stavu techniky. V rozsahu tohoto termínu jsou rovněž zahrnuty netoxické adiční soli s kyselinami, které se obvykle připraví reakcí sloučenin podle uvedeného vynálezu se vhodnou organickou nebo anorganickou sloučeninou. Jako reprezentativní příklad těchto solí je možno uvést hydrochloridy, hydrobromidy, sulfáty, hydrogensulfáty, acetáty, oxaláty, valeráty, oleáty, lauráty, boráty, benzoáty, laktáty, fosfáty, tosyláty, citráty, maleinany, fumaráty, sukcináty, vinany, naftyláty a podobné další látky.

#### Příklady provedení vynálezu

Polypeptidové sloučeniny podle uvedeného vynálezu a postup jejich přípravy budou v dalším ilustrovány s pomocí konkrétních příkladů, které ovšem nijak neomezují rozsah tohoto vynálezu.

#### P ř í k l a d      1

Postup syntézy peptidů uvolňujících růstový hormon.

Podle tohoto provedení se postupovalo tak, že se hydrochlorid paramethylbenzhydrylaminové (pMe-BHA.HCl) pryskyřice umístil do reakční nádoby běžné obchodně dostupného automaticky pracujícího zařízení na syntetickou přípravu peptidů. Tato pryskyřice byla substituována volnými aminovými skupinami v rozsahu až asi 5 mmolů na gram.

Sloučeniny byly připraveny nakondenzováním jednotlivých aminokyselin, přičemž se vycházelo od konce peptidové sekvence s karboxyskupinou, za použití vhodného aktivačního činidla, jako je například *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC). Alfa-aminoskupina jednotlivých aminokyselin byla chráněna například *t*-butoxykarbonylovým zbytkem (*t*-Boc), přičemž reakční funkční skupiny bočního řetězce byly chráněny způsobem uvedeným v následující tabulce č. 1.

TABULKA č. 1

Chránící skupiny bočního řetězce vhodné pro syntézu peptidů v pevné fázi

---

arginin	$N^{\text{G}}$ -tosyl
kyselina aspartová	O-benzyl
cystein	S- <i>para</i> -methylbenzyl
glutamová kyselina	O-benzyl
histidin	$N^{\text{im}}$ -tosyl
lysin	$N^{\text{e}}$ -2,4-dichlorbenzyloxykarbonyl
methionin	S-sulfoxid
serin	O-benzyl
threonin	O-benzyl
tryptofan	$N^{\text{im}}$ -formyl
tyrosin	O-2,6-dichlorbenzyl

---

Ještě před přidáním počáteční aminokyseliny byla pryskyřice promíchána ve třech cyklech (v každém cyklu po dobu asi jednu minutu) s dichlormethanem ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; asi 10 ml/gram pryskyřice), potom byla neutralizována *N,N*-diisopropylethylaminem (DIEA) promícháním ve třech

cyklech (v každém cyklu po dobu asi dvou minut) v dichlormethanu (v poměru 10 : 90; asi 10 ml/gram pryskyřice) a potom byl tento podíl promíchán ve třech cyklech (pokaždé asi jednu minutu) s dichlormethanem (v množství asi 10 ml/gram pryskyřice). Počáteční aminokyselina a každá další aminokyselina byla nakondenzována na pryskyřici za použití předem připraveného symetrického anhydridu, za použití asi trojnásobku vhodné chráněné aminokyseliny vzhledem k celkové vazebné kapacitě pryskyřice a asi 1,5-násobku DCC vzhledem k celkové vazebné kapacitě pryskyřice ve vhodném množství dichlormethanu. V případě aminokyselin s malou rozpustností v dichlormethanu byl přidán N,N-dimethylformamid (DMF) za účelem dosažení homogenního roztoku. Obecně je možno uvést, že symetrický anhydrid byl připraven až 30 minut před zavedením do reakční nádoby při teplotě místnosti nebo při teplotě nižší. Dicyklohexylmočovina, která se tvořila během přípravy symetrického anhydridu byla odstraněna odfiltrováním roztoku při gravitačním spádu do reakční nádoby. Průběh kondenzace aminokyseliny na pryskyřici byl monitorován obvyklým způsobem za použití běžně používaného barevného testu a reakčních činidel, jako je například ninhydrin (který reaguje s primárními a sekundárními aminy). Po dokončení kondenzace chráněné aminokyseliny na pryskyřici (>99 %) byla chránicí skupiny alfa-aminoskupiny odstraněna zpracováním s acidickým reakčním činidlem (nebo činidly). Všeobecně používané reakční činidlo sestávalo z roztoku trifluoroctové kyseliny (TFA) a anisolu v dichlormethanu (v poměru 45 : 2 : 53). Úplný postup připojování každého jednotlivého zbytku aminokyseliny na pryskyřici je uveden v následující tabulce č. 2.

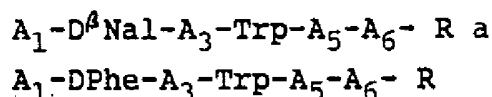
TABULKA č. 2

Postup připojování jednotlivých aminokyselin na pryskyřici

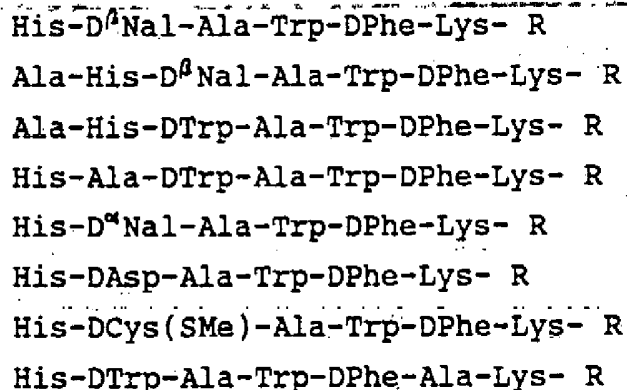
Reakční činidlo	Míchací cykly	Doba míchání v jednom cyklu
1. Dichlormethan	3	1 minuta
2. TFA, anisol, dichlormethan	1	2 minuty
3. TFA, anisol, dichlormethan (45:2:53)	1	20 minut
4. Dichlormethan	3	1 minuta
5. DIEA, dichlormethan (10 :90)	3	2 minuty
6. Dichlormethan	3	1 minuta
7. Předem připravený symetrický anhydrid	1	15-120 minut*
8. Dichlormethan	3	1 minuta
9. Iso-propanol	3	1 minuta
10. Dichlormethan	3	1 minuta
11. Monitorování průběhu kondenzační reakce**		
12. Opakování stupňů 1-12 pro každou jednotlivou aminokyselinu		

- \* Doba kondenzace závisí na jednotlivé aminokyselině
- \*\* Míru kondenzace je možno obecně monitorovat barevným testem. V případě, že je kondenzace neúplná, může být tato stejná aminokyselina opětne kondenzována tak, že se opakuje postup podle stupňů 7-11. V případě, že je kondenzace úplná, je možno kondenzovat další aminokyselinu.

Pomocí této výše uvedené metody syntézy peptidů je možno podle uvedeného vynálezu připravit nové polypeptidy vázané na pryskyřici, kterými jsou polypeptidy obecného vzorce :



(ve kterých mají  $A_1$ ,  $A_3$ ,  $A_5$  a  $A_6$  stejný význam jako bylo uvedeno shora a R představuje polymerní pryskyřici, přičemž funkční skupiny základních aminokyselin jsou popřípadě chráněny vhodnými chránicími skupinami). Jako příklad specifických sekvencí (ve vhodných chráněných formách), které byly takto podle uvedeného vynálezu připraveny, je možno uvést následující sekvence :



His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys- R  
Ala-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys- R  
Try-DArg-Phe-Gly- R  
Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys- R  
Ala-His-DHis-Ala-Trp-DPhe-Lys- R a  
Ala-His-DPro-Ala-Trp-DPhe-Lys- R

## P ř í k l a d 2

Uvolňování růstového hormonu in vivo u krys.

K tomuto testu byly použity nedospělé samičky krys Sprague-Dawley, které byly získány od firmy Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Po získání byly tyto krysy umístěny do klecí o teplotě 25 °C, ve kterých poměr cyklů světlo : tma byl 14 : 10 hodin. Těmto krysám byla k dispozici voda a potrava Purina podle libosti. Mláďata byla umístěna společně s jejich matkami po dobu 21 dní.

Potom byly krysy o stáří 26 dnů, ve skupinách po šesti, anestetizovány intraperitoneálně podáním 50 mg/kg pentobarbitalu, což bylo provedeno 20 minut před intravenózním podáním peptidu. Pro tyto intravenózní injekce (i.v.) obsahující peptidy bylo použito jako vehikula normálního slané roztoku obsahujícího 0,1 % želatiny. Těmto anestetizovaným krysám o hmotnosti v rozmezí od 55 do 65 gramů byly potom pomocí i.v. injekcí podány sloučeniny uvolňující růstový hormon v množství podle dále uvedených tabulek č. 3, 4 a 5. Injekce byly provedeny do jugulární žíly, přičemž množství injekčního roztoku odpovídalo 0,2 mililitru.

Všechna zvířata byla potom usmrcena na tonzilotomu 10 minut po podání poslední injekce (viz tabulky č. 3 a 4). Po dekapitaci byla odebrána krev z trupu pro stanovení hladiny růstového hormonu v krvi. Potom byla ponechána krev zkoagulovat, dále byla odstředěna a sérum bylo odděleno od sraženiny. Toto sérum bylo potom uchováváno ve zmraženém stavu až do provedení radioimunologického stanovení (RIA) hladiny růstového hormonu, což bylo provedeno podle dále popsané metody, která byla vyvinuta National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK).

Reakční činidla byla obvyklým způsobem přidána do trubic pro RIA stanovení najednou o teplotě, při které byly uchovávány v mrazničce (asi 4 °C), přičemž postup provádění byl následující :

- (a) pufr
- (b) "studený" (to znamená neradioaktivní) standard nebo neznámý vzorek séra, který má být analyzován,
- (c) radiooznačený jódovaný antigen růstového hormonu, a
- (d) antisérum růstového hormonu.

Přidání reakčních činidel se obvykle provede tak, aby bylo dosaženo zředění asi 1 : 30 000 (t. zn. poměr antiséra k celkovému objemu kapaliny, v jednotkách objem/objem).

Tato smíchaná reakční činidla byla potom obvyklým způsobem inkubována při teplotě místnosti (asi 25 °C) po dobu asi 24 hodin, přičemž potom byla přidána druhá protilátka (t. zn. kozí nebo králičí anti-opičí gama globulinové sérum), která se váže na antisérum růstového hormonu a způsobuje vysrážení takto vzniklého komplexu. Vysrážený podíl v trubicích pro RIA-stanovení byl potom analyzován na počet pulzů ve specifických časových

periodách, což bylo provedeno v gama-scintilačním čítači. Potom byla vytvořena standardní křivka vynesemím počtu radioaktivních pulzů proti úrovni růstového hormonu (GH). Hladina růstového hormonu u neznámých vzorků byla potom stanovena podle této standardní křivky.

Hladina růstového hormonu v séru byla zjišťována metodou RIA za pomoci reakčních činidel dodaných National Hormone and Pituitary Program.

Hladiny séra v tabulkách 3, 4, 5 a 6 jsou uváděny v ng/ml při GH-standardu 0,61 mezinárodních jednotek/mg (t. zn. IU/mg). Hodnoty jsou uváděny se střední +/- standardní odchylkou od průměrné hodnoty (SEM). Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu. Označení NS znamená to, že odchylka nebyla statisticky významná. Výsledky uvedené v tabulkách 3, 4, 5 a 6 představují průměr testů se šesti krysami.

TABULKA č. 3

Uvolňování růstového hormonu in vivo (ng/ml) promované sloučeninami uvolňujícími růstový hormon u kryš anestezizovaných pentobarbitalem.  
(Zvířata usmrcená 10 minut po poslední injekci)

Sloupec A: Sloučeniny uvolňující růstový hormon	Celková dávka ( $\mu$ g)	GH u kon- trolního vzorku (ng/ml)	GH uvol- něný slou- čeninou ve sloupci A (ng/ml) $\pm$ SEM	p- hodnota
His-DTrp-Ala-	0,1	151 $\pm$ 16	246 $\pm$ 39	-
Trp-DPhe-Lys-	0,3	151 $\pm$ 16	670 $\pm$ 75	-
NH <sub>2</sub>	1,0	151 $\pm$ 16	1000 $\pm$ 276	-
	3,0	151 $\pm$ 16	2106 $\pm$ 216	-
His-D <sup><math>\beta</math></sup> Nal-Ala-	0,1	151 $\pm$ 16	938 $\pm$ 255	<0,02
Trp-DPhe-Lys-	0,3	151 $\pm$ 16	1716 $\pm$ 258	<0,02
NH <sub>2</sub>	1,0	151 $\pm$ 16	3728 $\pm$ 691	<0,01
	3,0	151 $\pm$ 16	3238 $\pm$ 273	<0,01
His-DTrp-Ala-	0,1	138 $\pm$ 12	226 $\pm$ 31	-
Trp-DPhe-Lys-	0,3	138 $\pm$ 12	613 $\pm$ 73	-
NH <sub>2</sub>	1,0	138 $\pm$ 12	1581 $\pm$ 228	-
	3,0	138 $\pm$ 12	2875 $\pm$ 393	-
Ala-His-DTrp-	0,1	138 $\pm$ 12	254 $\pm$ 78	NS -
Ala-Trp-DPhe-	0,3	138 $\pm$ 12	809 $\pm$ 59	NS -
Lys-NH <sub>2</sub>	1,0	138 $\pm$ 12	1516 $\pm$ 215	NS -
	3,0	138 $\pm$ 12	3095 $\pm$ 473	NS -

TABULKA č. 3 (pokračování)

Sloupec A: Sloučeniny uvolňující růstový hormon	Celková dávka ( $\mu\text{g}$ )	GH u kon- trolního vzorku (ng/ml)	GH uvol- něný slou- čeninou ve sloupci A (ng/ml) $\pm$ SEM	p- hodnota	
Ala-His-	0,1	138 $\pm$ 12	1128 $\pm$ 309	<0,02	<0,02
D <sup><math>\beta</math></sup> Nal-Ala-	0,3	138 $\pm$ 12	2479 $\pm$ 389	<0,001	<0,001
Trp-DPhe-	1,0	138 $\pm$ 12	3899 $\pm$ 514	0,001	0,001
Lys-NH <sub>2</sub>	3,0	138 $\pm$ 12	4202 $\pm$ 369	<0,05	NS
Ala-His-	0,1	111 $\pm$ 25	360 $\pm$ 35	-	-
DTrp-Ala-	0,3	111 $\pm$ 25	903 $\pm$ 217	-	-
Trp-DPhe-	1,0	111 $\pm$ 25	2957 $\pm$ 427	-	-
Lys-NH <sub>2</sub>	3,0	111 $\pm$ 25	3956 $\pm$ 485	-	-
Ala-His-	0,1	111 $\pm$ 25	970 $\pm$ 169	<0,01	
D <sup><math>\beta</math></sup> Nal-Ala-	0,3	111 $\pm$ 25	2898 $\pm$ 247	<0,001	
Trp-DPhe-	1,0	111 $\pm$ 25	3908 $\pm$ 327	NS	
Lys-NH <sub>2</sub>					

TABULKA č. 4

Uvolňování růstového hormonu in vivo (ng/ml) promotované sloučeninou uvolňující růstový hormon u krys anestetizovaných pentobarbitalem.  
(Zvířata usmrcená 10 minut po poslední injekci)

Sloupec A: Sloučeniny uvolňující růstový hormon	GH u kon- trolního vzorku (ng/ml)	Celková dávka ( $\mu$ g)	GH uvol- něný slou- čeninou ve sloupci A (ng/ml) $\pm$ SEM
Ala-His-DTrp-Ala-Trp- DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	111 $\pm$ 25	0,3	901 $\pm$ 21
Ala-His-DPhe-Ala-Trp- DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	181 $\pm$ 69	0,3	616 $\pm$ 74
Ala-His-DHis-Ala-Trp- DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	117 $\pm$ 19	0,3	268 $\pm$ 54
Ala-His-DPro-Ala-Trp- DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	117 $\pm$ 19	0,3	262 $\pm$ 51

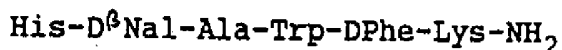
TABULKA č. 5

Peptid	Celková dávka ( $\mu\text{g}$ )	GH u kon- trolního vzorku (ng/ml)	Uvolněný GH (ng/ml)
His-DAsp-Ala-Trp-	1,0	150 $\pm$ 20	154 $\pm$ 63
DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	3,0	150 $\pm$ 20	155 $\pm$ 34
	10,0	150 $\pm$ 20	163 $\pm$ 44
	30,0	150 $\pm$ 20	224 $\pm$ 62
	100,0	150 $\pm$ 20	178 $\pm$ 83
His-DCys-(SMe)-Ala	0,3	181 $\pm$ 69	178 $\pm$ 28
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,0	181 $\pm$ 69	193 $\pm$ 28
	3,0	181 $\pm$ 69	180 $\pm$ 34
His-D <sup>α</sup> Nal-Ala-	0,1	151 $\pm$ 16	280 $\pm$ 70
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	151 $\pm$ 16	439 $\pm$ 122
	1,0	151 $\pm$ 16	1130 $\pm$ 179
	3,0	151 $\pm$ 16	2319 $\pm$ 139
His-Trp-Ala-Trp-	0,1	181 $\pm$ 69	512 $\pm$ 43
DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	181 $\pm$ 69	566 $\pm$ 114
	1,0	181 $\pm$ 69	1531 $\pm$ 303
	3,0	181 $\pm$ 69	2349 $\pm$ 267
His-DTrp-Ala-Trp-	0,1	220 $\pm$ 29	420 $\pm$ 105
DPhe-Ala-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	220 $\pm$ 29	900 $\pm$ 163
	1,0	220 $\pm$ 29	1965 $\pm$ 366
	3,0	220 $\pm$ 29	4553 $\pm$ 670

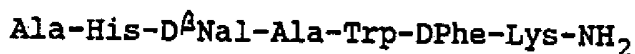
TABULKA č. 5 (pokračování)

Peptid	Celková dávka ( $\mu$ g)	GH u kon- trolního vzorku (ng/ml)	Uvolněný GH (ng/ml)
His-D <sup>6</sup> Nal-Ala-Trp-	0,1	111 $\pm$ 25	484 $\pm$ 89
DPhe-Ala-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	107 $\pm$ 16	971 $\pm$ 241
	1,0	107 $\pm$ 16	1593 $\pm$ 359
	3,0	107 $\pm$ 16	3337 $\pm$ 583
His-Ala-DTrp-Ala-	0,1	111 $\pm$ 25	-
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	151 $\pm$ 16	261 $\pm$ 32
	1,0	151 $\pm$ 16	830 $\pm$ 103
	3,0	151 $\pm$ 16	2588 $\pm$ 341

Z výsledků uvedených v tabulkách č. 3, 4, 5 a 6 je patrné, že sloučeniny podle uvedeného vynálezu promotují uvolňování růstového hormonu a zvyšování hladiny tohoto růstového hormonu v krvi krysy, kterým byly tyto sloučeniny podány. Peptidy podle uvedeného vynálezu vykazují tuto aktivitu, přičemž ekvivalentní sloučeniny se substitucí na A<sub>2</sub>-poloze [to znamená například s DAsp, DCys(SMe), DHis a DPro] neprojevují tuto aktivitu. Z výše uvedených tabulek je rovněž patrné, že



je aktivnější než sloučeniny, které mají DTrp, D<sup>α</sup>Nal, DAsp a DCys(SMe) na A<sub>2</sub>-poloze. Podobně je možno uvést, že



je aktivnější než ekvivalentní DTrp-sloučenina.

### P ř í k l a d 3.

Podávání kombinace obsahující sloučeniny uvolňující růstový hormon (GH).

Postup podle příkladu 2 byl opakován s tou výjimkou, že krysy nebyly anestetizovány ani nebyly předem ošetřeny pentobarbitalem, přičemž těmto krysám byla podána kombinace obsahující peptidy podle vynálezu. Podané sloučeniny, dávkované množství a získané výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

TABULKA č. 6

Uvolňování růstového hormonu in vivo iniciované sloučeninami uvolňujícími růstový hormon u kryš anestetizovaných pentobarbitalem.

(zvířata usmrcená 10 minut po aplikaci poslední injekce)

Sloupec A: Peptid uvolňující růstový hormon	Celková dávka (μg)	GH v kontrolním séru (ng/ml) ±SEM (N=6)	Uvolněný GH, GH v séru (ng/ml) ±SEM (N=6)
Ala-His-D <sup>β</sup> Nal-	0,1	337±51	610±90
DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	337±51	1140±187
	1,0	337±51	2909±257
	3,0	337±51	3686±436
Ala-D <sup>β</sup> Nal-Ala-	0,3	167±46	363±73
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,0	167±46	1450±294
	3,0	167±46	2072±208
	10,0	167±46	2698±369
Ala-His-D <sup>β</sup> Nal-Ala-	0,3	160±51	1418±302
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,0	160±51	2201±269
Ala-His-D <sup>β</sup> Nal-Ala-	0,3	228±23	1746±318
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,0	228±23	2610±176
Ala-His-D <sup>β</sup> Nal-Ala-	0,1	160±36	822±243
Trp-DPhe-Lys-NH <sub>2</sub>	0,3	160±36	1549±292
	1,0	160±36	2180±284

TABULKA č. 7

Synergický účinek sloučenin podle vynálezu v kombinaci se sloučeninami ze skupiny 1 a/nebo ze skupiny 3 in vivo u neanestetizovaných krys.

Podaná sloučenina			Dávka (μg)	Uvolněný GH (ng/ml) ±SEM
Kontrolní	-	-	-	12±3
175-1 <sup>a</sup>	-	-	1	58±13
175-1	-	-	3	240±32
C <sup>b</sup>	-	-	10	204±50
GHRH <sup>c</sup>	-	-	3	131±50
TP <sup>d</sup>	-	-	10	79±29
175-1	GHRH	-	1 + 3	2014±224
175-1	TP	-	1 + 10	987±204
175-1	GHRH	TP	1 + 3 + 10	4150±555
175-1	GHRH	-	3 + 3	1994±249
175-1	TP	-	3 + 10	2149±451
175-1	GHRH	TP	3 + 3 + 10	2922±384
C	GHRH	-	10 + 3	2525±453
C	TP	-	10 + 10	1597±387
C	GHRH	TP	10 + 3 + 10	4344±374

\* Sloučeniny ze skupin 1 a 3 jsou popsány detailně v patentu Spojených států amerických č. 4 880 778

a : 175-1 = His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> (sloučenina podle uvedeného vynálezu),

b : C = His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> (porovnávací sloučenina),

c : GHRH = Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-  
Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-  
Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-  
Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-  
Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>  
(sloučenina ze skupiny 1)

d : TP = Tyr-DArg-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (sloučenina ze skupiny 3)

Z výsledků uvedených v tabulce 7 je patrné, že sloučeniny podle uvedeného vynálezu projevují synergický účinek při podání společně s příkladnými sloučeninami vybranými ze skupiny 1 a/nebo 3. Z těchto uvedených výsledků v tabulce č. 7 je rovněž patrné, že sloučeniny podle vynálezu projevují silnější synergický účinek než je účinek dosažený s porovnávací sloučeninou (C), která je uváděna podle dosavadního stavu techniky jako sloučenina se synergickým účinkem.

#### P ř í k l a d 4

Kondenzační reakce peptidových fragmentů pro přípravu peptidu.

Obecný postup :

Teplotu tání je možno stanovit na přístroji Thomas Hoover pro stanovení teploty tání kapilární metodou. Infračervená spektra (IR) je možno zaznamenat na spektrofotometru Perkin-Elmer Model 137 nebo Nicolet Model 5DX, přičemž hodnoty se uvádí v počtu vln ( $\text{cm}^{-1}$ ). Hmotové spektrum (MS) se stanoví na přístroji VG Analytical Ltd. Model ZAB-1F Mass Spektrometer metodou EI (elektronového nárazu), FD (desorpce pole) nebo FAB (bombardování rychlými atomy). GCMS je možno změřit na přístroji Finnigan 4023 GCMS vybaveném 30-ti metrovou DB5 kapilární kolonou (J & W Scientific) za použití helia jako nosného plynu. Optickou rotaci je možno změřit na polarimetru Autopol III, vyráběném firmou Rudolph Research.

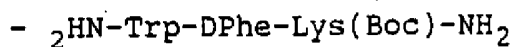
$^1\text{H}$  NMR spektra je možno naměřit na přístroji JEOL GX-400 NMR pracujícím při 400 MHz nebo na přístroji JEOL GX-270 NMR pracujícím při 270 MHz. Tyto přístroje jsou schopny pracovat s běžným digitálním rozlišením menším než 0,7 Hz. Chemický posun je vyjádřen v dílech na milion dílů vzhledem ke vnitřnímu standardu, kterým je 3-(trimethylsilyl)tetradeuteropropionát sodný (TSP).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla provedena za použití systému Hitachi, sestávajícího z gradientového regulátoru L-500 a čerpadla 655A, připojeného na semipreparativní kolonu 218TP1010. Jako elučního rozpouštědla je možno použít kombinací vody

obsahující 0,2 % kyseliny trifluoroctové a methanolu. V obvyklém provedení jsou požadované sloučeniny eluovány průtokovou rychlostí šest mililitrů za minutu se stoupajícím gradientem organické složky rychlostí přibližně 1-2 % za minutu. Sloučeniny se potom stanoví při vhodných vlnových délkách za použití U.V. detektoru LKB 2140 s diodovým uspořádáním. Integraci je potom možno provést pomocí programu Nelson Analytical Software (verze 3.6).

Reakce byly provedeny pod inertní atmosférou dusíku nebo argonu, pokud nebude uvedeno jinak. Bezvodý tetrahydrofuran (THF, jakost U.V.) a dimethylformamid (DMF) byly dodány firmou Burdick and Jackson, přičemž tyto látky byly přímo odebírány z nádoby.

#### A. Postup přípravy tripeptidového fragmentu



$N^\alpha$ -benzyloxykarbonyl-( $N^\epsilon$ -t-butoxykarbonyl)lysin-amid, 4.

Podle tohoto provedení byl k roztoku obsahujícímu karbonyldiimidazol (CDI, 2, 88,24 gramů, 0,544 molu) a suchý tetrahydrofuran (THF, 1500 mililitrů) o teplotě 10 °C pomalu přidáván  $N^\alpha$ -benzyloxykarbonyl-( $N^\epsilon$ -t-butoxykarbonyl)lysin (1, v množství 180 gramů, 0,474 molu). Během tohoto přidavku bylo pozorováno uvolňování plynu. Zatímco se tvořil meziprodukt 3, kterým je  $N^\epsilon$ -benzyloxykarbonyl-( $N^\epsilon$ -t-butoxykarbonyl)lysinimidazolin, byl připraven nasycený roztok amoniaku a THF (2000 mililitrů), což bylo prováděno tak, že plynný amoniak byl veden tetrahydrofuranem při teplotě v rozmezí od 5 do 10 °C. Poté, co bylo odhadnuto, že vznik meziproduktu 3 proběhl úplně (to znamená, že vývoj plynu ustal, což trvalo přibližně 2 hodiny), byla jedna

polovina THF-roztoku obsahující meziprodukt 3 přidána k roztoku amoniaku. Zbytek roztoku obsahující meziprodukt 3 byl přidán po 30 minutách. Během tohoto přidavku byl udržován kontinuální proud plynného amoniaku, přičemž tento proud byl udržován po dobu dalších 45 minut po tomto přidavku. Během přidávání těchto dvou podílů roztoku obsahujícího meziprodukt 3 se vytvořila bílá sraženina. Takto získaná reakční směs byla potom ponechána ohřát na teplotu místnosti a potom byla promíchávána po dobu 15 hodin. Použité rozpouštědlo bylo odstraněno od suspenze aplikací vakuua. Získaný zbytek byl suspendován ve vodě, přičemž výsledná pevná látka byla oddělena vákuovou filtrací.

N<sup>5</sup>-t-Butoxykarbonyl-lysin-amid, 5.

Podle tohoto provedení byl roztok obsahující lysinamid 4 (v množství 181,48 gramu, což je 0,479 molu) v methanolu (MeOH, v množství 1000 mililitrů) přidáván ke katalytické suspenzi obsahující 5 % Pd/C (v množství 5 gramů) v methanolu (250 mililitrů) pod atmosférou argonu. Touto reakční směsí byl potom probubláván vodík (po dobu asi 15 minut), přičemž tato reakční směs byla potom promíchávána pod atmosférou vodíku tak dlouho, dokud nebylo HPLC-metodou zjištěno, že reakce proběhla úplně (36 hodin). Vodíková atmosféra byla potom vyměněna argonem. Reakční roztok byl potom přečištěn průchodem přes vrstvu Celitu a rozpouštědlo bylo odstraněno za použití vakuua, čímž byla získána pevná látka.

$N^{\alpha}$ -Benzyloxykarbonyl-D-fenylalanyl-( $N^{\epsilon}$ -t-butoxykarbonyl)-  
lysin-amid, 8.

Podle tohoto provedení byl  $N^{\alpha}$ -benzyloxykarbonyl-D-fenylalanin (6, v množství 126,39 gramu, což odpovídá 0,423 molu) pomalu přidáván k roztoku CDI (2, v množství 66,03 gramu, což je 0,409 molu) v THF (500 mililitrů) o teplotě 10 °C. Během tohoto přidávání byl pozorován vývoj plynu. Poté co vývoj plynu ustal, byl přidán lysinamid 5 (v množství 110,75 gramu, což odpovídá 0,452 molu) ve formě roztoku v THF (500 mililitrů). Po asi 48 hodinách byla takto získaná směs zfiltrována za účelem odstranění pevných látek. Oddělený filtrát byl zkoncentrován za použití vákua.

Takto získaný zbytek byl potom vložen do ethylesteru kyseliny octové (EtOAc, v množství 500 mililitrů) a tento podíl byl potom promyt v děliči následujícím způsobem :

1. vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (1N, 3 x 500 mililitrů), pH promytého podílu 1 bylo asi 8, přičemž následující promývací podíly měly pH 1;
2. voda (500 mililitrů);
3. vodný roztok uhličitanu sodného  $Na_2CO_3$  (polovičně nasycený roztok, podíly 2 x 500 mililitrů) byl zfiltrován za účelem oddělení vzniklého krystalického pevného podílu (8);
4. voda (3 x 500 mililitrů).

Organická vrstva byla potom usušena za pomoci síranu hořečnatého  $MgSO_4$ . Po vyčištění bylo rozpouštědlo odstraněno za použití vákua. Získaný zbytek byl potom rekrystalován z horkého EtOAc, čímž byl získán druhý podíl vzorku 8.

D-Fenylalanyl-(N<sup>t</sup>-t-butoxykarbonyl)-lysin-amid, 9.

Podle tohoto provedení byl methanolický roztok (v množství 1500 mililitrů) amidu 8 (v množství 120,53 gramu, což je 0,229 molu) přidán ke katalytické suspenzi obsahující 5 % Pd/C (50 gramů) v methanolu MeOH (200 mililitrů). Argonová atmosféra byla potom nahrazena vodíkem. Poté, co bylo HPLC analýzou zjištěno, že reakce proběhla úplně (reakce probíhala po dobu asi 4 hodin), byla vodíková atmosféra vyměněna argonem. Získaný reakční roztok byl potom vyčištěn průchodem přes vrstvu Celitu, přičemž filtrát byl potom zkoncentrován za použití vákua, čímž byl získán zbytek. Tento dipeptidový produkt byl potom použit přímo pro přípravu tripeptidu 12.

N<sup>α</sup>-Benzyloxykarbonyl-tryptofyl-D-fenylalanyl-(N<sup>t</sup>-t-butoxykarbonyl)lysin-amid, 12.

Podle tohoto provedení byl roztok obsahující N<sup>α</sup>-benzyloxykarbonyl-tryptofan (10, v množství 67,60 gramu, což je 0,200 molu), THF (v množství 500 mililitrů) a CDI (2, v množství 33,05 gramu, což je 0,104 molu) o teplotě 10 °C promícháván tak dlouho, dokud neustal vývoj plynu. K této reakční směsi byl potom přidán roztok obsahující sloučeninu 9 (v množství 40,8 gramu, což je 0,103 molu) v THF (asi 200 mililitrů). Takto vzniklý roztok byl potom ponechán reagovat po dobu 15 hodin, přičemž se tento roztok ohřál na teplotu místnosti. Tímto způsobem se vytvořila pevná látka, která byla oddělena vakuovou filtrací. Získaný filtrát byl potom zkoncentrován za použití vákua, čímž byl získán zbytek. Takto získaný zbytek a pevný podíl byly potom opět spojeny a vloženy do ethylesteru kyseliny octové EtOAc (v množství 4000 mililitrů) za mírného ohřívání. Po ochlazení tohoto

roztoku na teplotu místnosti vznikla pevný podíl. Tento pevný podíl byl potom oddělen vákuovou filtrací. Získaná pevná látka byla potom rekrystalována z horkého methanolu MeOH, čímž byl získán čistý tripeptidový produkt 12. Ethylacetátový filtrát (z první krystalizace) byl potom promyt v děličce následujícím způsobem :

1. vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (1N, 2 x 500 mililitrů),
2. voda (1 x 500 mililitrů),
3. vodný roztok uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (polovičně nasycený roztok, 2 x 500 mililitrů),
4. vodný roztok chloridu sodného (1 x 500 mililitrů).

Organická vrstva byla potom usušena pomocí síranu hořečnatého MgSO<sub>4</sub> a potom byl tento podíl přečištěn vákuovou filtrací. Rozpouštědlo z tohoto filtrátu bylo potom odstraněno za použití vakuua. Takto získaný výsledný zbytek byl potom opět přidán do ethylesteru kyseliny octové, čímž vznikl suchý pevný podíl. Tento pevný materiál byl potom podroben rekrystalování z horkého methanolu MeOH, čímž byl získán druhý výtěžek sloučeniny 12 ve formě bílé pevné látky.

Tryptofyl-D-fenylalanyl-(N<sup>t</sup>-t-butoxykarbonyl)lysin-amid, 13.

---

Podle tohoto provedení byl methanolický roztok (v množství 1500 mililitrů) tripeptidové sloučeniny 12 (v množství 64,59 gramu, což je 0,091 molu) přidán ke katalytické suspenzi obsahující 5 % Pd/C (5 gramů) a methanol MeOH (250 mililitrů) pod atmosférou argonu. Potom byl přidán další podíl methanolu MeOH (2250 mililitrů). Argonová atmosféra byla potom nahrazena vodíkem a reakční směs byla ponechána zreagovat (reakce probíhala po dobu asi

24 hodin). Po dokončení reakce byla vodíková atmosféra nahražena argonem. Takto získaný roztok byl potom vyčištěn přes vrstvu Celitu a získaný filtrát byl zkoncentrován za použití vákua, čímž byl získán tripeptid 13 ve formě bílé pevné látky.

B. Příprava tripeptidového fragmentu -K-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-OMe.

Methylester N<sup>α</sup>-benzyloxykarbonyl-histidyl-D-beta-naftylalaninu.

Podle tohoto provedení byl roztok obsahující ethylester kyseliny octové EtOAc (v množství 400 mililitrů) a hydrochlorid methylesteru D-beta-naftylalaninu (22, v množství 0,62 molu) promyt nasyceným roztokem uhličitanu sodného (400 mililitrů) a 0,8 N vodným roztokem hydroxidu sodného (asi 500 mililitrů). Získaná vodná fáze byla odstraněna (pH 8,5) a organická fáze byla postupně promyta polovičně nasyceným vodným roztokem uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150 mililitrů) a potom vodou (50 mililitrů). Volná bazická forma sloučeniny 22 byla potom oddělena při zkoncentrování ethylacetátové vrstvy ve vákuu.

Dicyklohexylkarbodiimid (DCC, v množství asi 95 gramů, což je 0,46 molu) byl přidán k roztoku obsahujícímu N<sup>α</sup>-benzyloxykarbonyl-histidin (19, v množství 143,5 gramu, což je 0,50 molu), N-hydroxysukcinimid (HONSu, 23, v množství 0,62 molu) a čerstvě připravenou volnou bazickou formu sloučeniny 22 (v množství asi 0,52 molu) v DMF (asi 3 litry) o teplotě -5 °C (roztok chlazen na lázni ledu a ethanolu). Takto získaný výsledný reakční roztok byl potom ponechán promíchávat po dobu 24 hodin, přičemž se tento roztok ohřál na teplotu místnosti. Ke zjištění, zda reakce

proběhla úplně, je možno použít HPLC-analýzu (vysokoučinná kapalinová chromatografie) reakčního produktu. V případě, že reakce neproběhla úplně, byl reakční roztok ochlazen na asi  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a k reakční směsi byl přidán další podíl dicyklohexylkarbodiimidu (asi 0,17 molu). Tato reakční směs byla potom opět ponechána promíchávat po dobu dalších 24 hodin při současném ohřátí na teplotu místnosti. Takto získaná směs byla potom zfiltrována za účelem odstranění dicyklohexylmočoviny (DCU). K takto získanému filtrátu byla potom přidána voda (1 litr) a tento roztok byl potom zkoncentrován ve vakuu. Zbytek byl potom zpracováván vodným roztoku 1N kyseliny chlorovodíkové (asi 1 litr dokud hodnota pH vodné fáze nedosáhla 1). Vodná fáze byla potom extrahována dvěma podíly ethylesteru kyseliny octové (každý podíl o objemu 1 litr). Takto získané ethylacetátové vrstvy byly potom odděleny. Hodnota pH vodné fáze byla potom upravena přidávkem chladného 2N roztoku hydroxidu sodného (500 mililitrů) a peletami hydroxidu sodného. Během provádění neutralizace byl roztok udržován v chladném stavu přidávkem ethylesteru kyseliny octové (1 litr). Po úpravě hodnoty pH této vodné fáze na přibližně 7 nastane obvykle velice intenzivní vysrážení bílé pevné látky nebo oleje. Získaná sraženina byla oddělena vakuovou filtrací nebo dekantováním a potom promyta půlovičně nasyceným roztokem uhličitanu sodného (2 x 1500 mililitrů), vodou (6 x 1500 mililitrů) a ethylesterem kyseliny octové (3 x 1500 mililitrů). Získaný podíl byl potom usušen za vysokého vákua na konstantní hmotnost. Tento produkt byl potom hydrolyzován přímo bez dalšího přečišťování.

DPhe-peptid je možno připravit použitím hydrochloridu methylesteru D-fenylalaninu jako sloučeniny 22 místo hydrochloridu methylesteru D-beta-naftylalaninu.

$N^{\alpha}$ -Benzyloxykarbonyl-histidyl- $\beta$ -naftyl-D-alanin, 26.

Podle tohoto provedení byl vodný roztok hydroxidu sodného (v množství 192 mililitrů, 0,08 g/ml roztoku, 0,38 molu) přidán k roztok obsahujícímu dipeptid 25 (asi 0,38 molu), vodu (360 mililitrů) a methanol MeOH (asi 6 litrů). Takto získaný roztok byl potom promícháván při teplotě místnosti tak dlouho, dokud hydrolyza neproběhla úplně (asi 24 hodin). Spotřeba výchozího peptidu bylo potvrzeno HPLC analýzou. Potom byl tento roztok zkoncentrován za použití vakua, čímž vznikl zbytek, který byl rozpuštěn ve vodě (asi 1 litr). Vodná vrstva byla potom extrahována ethylesterem kyseliny octové EtOAc (2 x 500 mililitrů) v děličce. Ethylacetátová vrstva byla potom oddělena. Získaná vodná fáze byla potom upravena na pH přibližně 5 přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové,, přičemž v tomto okamžiku nastalo vysrážení bílé pevné látky nebo oleje. Produkt byl oddělen a usušen za použití vakua.

Methylester  $N^{\alpha}$ -Benzyloxykarbonyl-histidyl-D-beta-naftyl-alanyl-alaninu, 20.

Podle tohoto provedení byl shora uvedený dipeptid  $N^{\alpha}$ -benzyloxykarbonyl-histidyl-D-beta-naftylalanin (26, v množství 0,253 molu) přidán k roztoku HONSu (23, v množství 0,505 molu) v DMF (800 mililitrů) pod atmosférou argonu. K tomuto roztoku byla potom přidána směs obsahující hydrochlorid methylesteru alaninu (15, v množství 0,303 molu), N-methylmorfolin (16, v množství 0,303 molu) a dimethylformamid DMF (200 mililitrů). Takto získaný konečný roztok byl potom ochlazen na teplotu 10 °C, přičemž současně byl přidán dicyklohexylkarbodiimid (24, v množství 0,265 molu) v methylenchloridu (273 mililitrů). Reakční

průběh byl monitorován metodou HPLC, přičemž reakční teplota byla udržována na 10 °C až do dokončení reakce. Jestliže po několika dnech (asi 4 dny) neproběhne reakce úplně, přidá se k reakční směsi další podíl sloučeniny 24 (v množství 0,080 molu) a tato reakční směs se potom ponechá promíchávat po dobu dalšího dne, což se provede při teplotě 10 °C. Reakce se znovu monitoruje metodou HPLC dokud není zaznamenán úplný průběh reakce (obvykle asi 5 dní). Pevný podíl, který během této reakce vznikl, byl oddělen vakuovou filtrací. Získaný filtrát byl potom zkoncentrován za použití vákua, čímž vznikl zbytek. Tento zbytek byl potom přidán do ethylesteru kyseliny octové a extrahován polovičně nasyceným roztokem uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 x 500 mililitrů). Potom byla ethylacetátová fáze usušena síranem hořečnatým MgSO<sub>4</sub>. Získaný roztok byl přečištěn a zkoncentrován za použití vákua za vzniku zbytku.

C. Příprava tetrapeptidového fragmentu Ala-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-OH

Methylester histidyl-D-beta-naftyl-alanyl-alaninu, 30.

Podle tohoto provedení bylo 5 % paládia na uhlíku (v množství 3 gramy) opatrně přidáno k roztoku methylesteru N<sup>α</sup>-benzyloxykarbonyl-histidyl-D-beta-naftylalanyl-alaninu 20 (v množství 71 mmolu) v methanolu (500 mililitrů) pod atmosférou argonu. Potom byl argon probubláván reakční směsí po dobu 15 minut a v další fázi byla přidána kyselina octová (v množství 15 mililitrů, 0,26 molu). Takto získanou reakční směsí byl potom podpovrchově probubláván vodík po dobu 15 minut a potom byla tato reakční směs ponechána promíchávat při teplotě místnosti a pod ochrannou vrstvou vodíku (0,1 MPa). Ke zjištění případně přítomné výchozí látky bylo k monitorování této reakční směsi použito metody

HPLC-analýzy (vysokoučinná kapalinová chromatografie). V případě, kdy byla zjištěna přítomnost určitého podílu výchozí látky, byl reakční směsí opatrně probubláván argon (podpovrchovým přiváděním po dobu 30 minut) a v další fázi byl přidán další podíl 5 % paládia na uhlíku (v množství 2,5 gramu). Potom byl znovu zaveden vodík. Touto reakční směsí byl znovu probubláván argon, přičemž výsledný reakční roztok byl vyčištěn filtrací přes vrstvu křemeliny. Takto získaný výsledný roztok byl potom zkoncentrován za použití vakua, čímž byl získán požadovaný produkt. Část tohoto produktu byla rozpuštěna nebo suspendována ve vodě (500 mililitrů). K získanému výslednému materiálu byl potom přidán ethylester kyseliny octové a nasycený vodný roztok uhličitanu sodného. Oddělením ethylacetátové vrstvy nebo vzniklých pevných látek byla získána požadovaná sloučenina (30) ve formě volného acetátu.

N-hydroxysukcinimidester Boc-alanin, 31.

Podle tohoto provedení byl dicyklohexylkarbodiimid (v množství 43 mmolů) přidán při teplotě místnosti k roztoku obsahujícímu Boc-alanin (v množství 43 mmolů) a N-hydroxysukcinimid (v množství 48 mmolů) v methylenchloridu (250 mililitrů). Takto získaný roztok byl potom ponechán promíchávat po dobu přes noc. Získaná reakční směs byla potom zfiltrována za účelem odstranění dicyklohexylmočoviny a vyčištěný filtrát byl zkoncentrován za použití vakua, čímž byl získán požadovaný produkt, který byl před použitím skladován při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod atmosférou argonu.

Boc-Ala-His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-OMe, 32.

Výše uvedený ester alaninu (v množství 23,9 gramu), získaný shora uvedeným postupem, byl podle tohoto provedení přidán do roztoku obsahujícímu His-D<sup>β</sup>Nal-Ala-OMe (30) (v množství 20,1 mmolu) v bezvodém dimethylformamidu (DMF, 200 mililitrů). Takto získaný homogenní roztok byl potom ponechán promíchávat po dobu přes víkend při teplotě místnosti a potom byl analyzován. V případě, že se při HPLC-analýze ukázalo, že v reakční směsi nebyl přítomen téměř žádný tripeptid (to znamená po intervalu asi 3 dní), byla přidána k reakční směsi voda (v množství 50 mililitrů). Takto získaná reakční směs byla potom ponechána promíchávat po dobu dalšího jednoho dne. Získaný roztok byl potom zkoncentrován za použití vakua. Vznikl zbytek, který byl rozpuštěn v ethylesteru kyseliny octové a potom byl extrahován polovičně nasyceným vodným roztokem uhličitanu sodného (v množství 2 x 300 mililitrů). Získaná organická fáze byla potom sušena za pomoci síranu hořečnatého MgSO<sub>4</sub> a síranu sodného Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a potom byla zkoncentrována za použití vakua, čímž byl získán požadovaný tetrapeptid. Tato látka byla potom použita bez dalšího čištění pro přípravu Boc-Ala-His-D-<sup>β</sup>Nal-Ala-OH.

Boc-Ala-His-D-<sup>β</sup>Nal-Ala-OH, 33.

Podle tohoto provedení byl vodný roztok 2N hydroxidu sodného (v množství 7,5 mililitru, což je 15 milimolů) přidán k roztoku methanolu (v množství 500 mililitrů) a vody (200 mililitrů) obsahujícímu Boc-Ala-His-D-<sup>β</sup>Nal-Ala-OMe (v množství 13,7 mmolu). Po proběhnutí reakce byla získaná reakční směs ponechána promíchávat po dobu přes noc při teplotě místnosti, přičemž potom bylo HPLC-analýzou

(vysokoučinná kapalinová chromatografie) zjištěno, že v této reakční směsi zbývá ještě určitý podíl výchozí látky. Po téměř úplném dokončení reakce (což trvalo asi po dobu přes noc) byl získaný výsledný roztok zkoncentrován ve vakuu na objem přibližně 200 mililitrů. K tomuto roztoku byla přidána voda (100 mililitrů) a hodnota pH byla upravena na přibližně 12 přidávkem 2N hydroxidu sodného (1 mililitr). Tento výsledný roztok byl extrahován ethylesterem kyseliny octové (2 x 500 mililitrů). Vzniklá ethylacetátová vrstva byla potom odstraněna. Hodnota pH vodné fáze byla potom upravena na přibližně 5 přidávkem vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, což obvykle způsobí vysrážení produktu. V této fázi je důležité minimalizovat objem vodné fáze za účelem urychlení vysrážení produktu. Vodná fáze byla potom dekantováním oddělena od získaného produktu a tento produkt byl opláchnut vodou (2 x 50 mililitrů). Oddělený produkt byl potom usušen na konstantní hmotnost ve vakuu.

D. Kondenzace peptidových fragmentů za účelem přípravy heptapeptidu Boc-Ala-His-D- $\beta$ Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>, 34.

Podle tohoto provedení byly dva peptidy, to znamená Boc-Ala-His-D- $\beta$ Nal-Ala-OH (33, v množství 2,6 mmolu) a Trp-D-Phe-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (13, v množství 2,8 mmolu) rozpuštěny v bezvodém DMF, přičemž získaný výsledný roztok byl zkoncentrován za použití vakuu. Toto předběžné zkoncentrování bylo provedeno z toho důvodu, aby bylo odstraněno jakékoliv stopové množství methanolu, které by mohlo být přítomno. Takto získaná peptidová směs byla potom opět rozpuštěna v DMF a dále byl přidán N-hydroxysukcinimid (v množství 5,1 mmolu). Takto získaný výsledný roztok byl potom ochlazen na teplotu -2 °C a potom byl přidán

dicyklohexylkarbodiimid (v množství 3,4 mmolu) ve formě roztoku v methylenchloridu (3,5 mililitru). Takto získaná reakční směs byla potom ponechána promíchávat při teplotě roztoku -2 °C po dobu tří dní. K analyzování roztoku, zda proběhla reakce úplně, bylo použito metody HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie). Po tomto uvedeném časovém intervalu a v případě, že bylo zaznamenáno, že reakce neproběhla úplně, byl přidán další podíl dicyklohexylkarbodiimidu a takto získaná reakční směs byla ponechána promíchávat po dobu dalšího jednoho dne při teplotě -2 °C. V případě, že v následujícím dni (to znamená celkově po čtyřech dnech) bylo metodou HPLC-analýzy (vysokoučinná kapalinová chromatografie) znovu zjištěno, že reakce neproběhla úplně, bylo ochlazením reakční směsi dosaženo ukončení reakce. Teplota reakčního roztoku byla potom ponechána mírně vzrůst na teplotu místnosti (25 °C), což bylo prováděno po dobu několika hodin (asi 8 hodin). Takto získaná reakční směs byla potom ponechána promíchávat po dobu přes noc při teplotě místnosti. Tento postup byl potom opakován dokud reakce neproběhla úplně. K výsledné reakční směsi byla potom přidána voda (50 mililitrů) a výsledná reakční směs byla potom ponechána promíchávat po dobu dalšího jednoho dne. Potom byl reakční roztok zfiltrován za účelem odstranění dicyklohexylmočoviny a získaný filtrát byl zkoncentrován ve vakuu na viskózní olej. K takto získanému výslednému zbytku byl potom přidán ethylester kyseliny octové a polovičně nasycený vodný roztok uhličitanu sodného (200 mililitrů). Tímto způsobem vznikla dvoufázová reakční směs, která byla intenzivně promíchávána na rotačním odpařováku po dobu přibližně jedné hodiny. Veškerý podíl pevných látek byl potom oddělen filtrací na fritě za účelem získání produktu. Organická fáze byla promyta vodou a potom byla sušena na konstantní hmotnost za

použití vákua, čímž byl získán další podíl produktu.

Ala-His-D- $\beta$ Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>, 35.

Podle tohoto provedení byl heptapeptid získaný shora uvedeným postupem, t. zn.

Boc-Ala-His-D- $\beta$ Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (34, v množství 1,02 mmolu) přidán při teplotě místnosti k roztoku obsahujícímu trifluoroctovou kyselinu (v množství 30 mililitrů), dimethylsulfid (v množství 14 mililitrů), 1,2-ethandithiol (7 mililitrů) a anisol (2,2 mililitru) v methylenchloridu (15 mililitrů). Takto získaná homogenní reakční směs byla potom ponechána promíchávat po dobu 15 minut. Po tomto časovém intervalu byl přidán bezvodý éter (v množství 450 mililitrů) za účelem dosažení vysrážení surového biologicky aktivního peptidového produktu 35. Tento produkt byl potom izolován filtrací na fritě nebo dekantováním. Takto získaný výsledný produkt byl potom rozpuštěn ve vodě a potom byl lyofilizován. Takto získaný lyofilizovaný produkt byl potom dále přečištěn chromatografickou metodou za středního tlaku ve skleněné koloně 26 x 460 milimetrů naplněné materiálem Lichroprep RP-18 (C-18, 25-40 nm, nepravidelná hodnota mesh, neboli rozdělení velikostí zrn). Po přivedení peptidu ve formě roztoku ve vodě byla tato kolona eluována průtokovou rychlostí 9 mililitrů za minutu při malém gradientu v rozmezí 0 až 25 % methanolu po dobu 5 až 20 hodin a potom při gradientu 25 až 55 % methanolu po dobu 48 hodin. Koncentrace methanolu při použití tohoto gradientu vzrůstala rychlostí 2 % za hodinu. Během provádění tohoto eluování byl zbytek rozpouštědlové směsi upraven vodou obsahující 0,2 % kyseliny chlorovodíkové. Produkt získaný tímto postupem (35) byl potom analyzován metodou HPLC (vysokoučinná

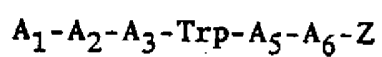
kapalinová chromatografie), přičemž byl oddělen  
zkonzcentrováním vhodných podílů získaných eluováním.

Uvedený vynález byl detailně popsán pomocí jednoho z  
výhodných provedení náležitých do rozsahu obecného řešení  
podle vynálezu. Je ovšem třeba poznamenat, že odborníkům  
pracujícím v daném oboru budou na základě výše uvedeného  
popisu zřejmá i další provedení, alternativy a modifikace  
tohoto postupu, které všechny náleží do rozsahu uvedeného  
vynálezu.

Pril.
PRŮMYŠLOVÉ VLAŠTIVOSTI
GRAD
1 2 X 7 1
01500
0 2 8 8 9 0
2.

# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid obecného vzorce



ve kterém znamená :

$A_1$  His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr,  $A_0$ -His nebo  $A_0$ -3(NMe)His

kde  $A_0$  představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce



kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar,

$A_2$  znamená  $D^\beta$ Nal nebo DPhe,

$A_3$  znamená Ala, Gly nebo Ser,

$A_5$  znamená DPhe, D/L $^\beta$ (Me)Phe nebo (NMe)DPhe,

$A_6$  znamená B-G nebo G,

kde B představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, dipeptidy libovolných v přírodě se vyskytujících aminokyselin nebo  $H_2N-(CH_2)_n-CO_2H$ , kde  $n = 2-12$  a

G znamená Arg, iLys, Lys nebo Orn,

Z znamená koncovou skupinu na koncovém uhlíku polypeptidu nebo C-koncovou aminokyselinu nebo kyseliny plus koncovou skupinu, přičemž Z je  $-CONR^1R^2$ ,  $-COOR^1$  nebo  $-CH_2OR^1$ ,  $-Gly-Z'$ ,  $-Met-Z'$ ,  $-Lys-Z'$ ,  $-Cys-Z'$ ,  $-Gly-Tyr-Z'$

nebo -Ala-Tyr-Z',

kde Z' představuje skupiny  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ ,  $-\text{COOR}^1$  nebo  $-\text{CH}_2\text{OR}^1$ , a

$\text{R}^1$  znamená vodík, alkylovou skupinu obsahující 1 až asi 6 atomů uhlíku, cykloalkylovou skupinu obsahující 3 až asi 8 atomů uhlíku, alkenylovou skupinu obsahující 2 až asi 8 atomů uhlíku nebo arylovou skupinu obsahující 6 až asi 12 atomů uhlíku, a  $\text{R}^2$  je definován jako  $\text{R}^1$ , přičemž tyto substituenty mohou být stejné nebo rozdílné,

a organické nebo anorganické farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin.

2. Peptid podle nároku 1, ve kterém  $\text{A}_2$  je  $\text{D}^{\beta}\text{Nal}$ .

3. Peptid podle nároku 2, ve kterém  $\text{A}_1$  znamená His, Ala, His-Ala nebo  $\text{A}_0$ -His.

4. Peptid podle nároku 2, ve kterém  $\text{A}_3$  znamená Ala.

5. Peptid podle nároku 3, ve kterém  $\text{A}_0$  je Ala, Lys nebo Glu;  $\text{A}_3$  je Ala;  $\text{A}_6$  je Lys, iLys, Ala-Lys, Ala-Ala-Lys nebo  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CO-Lys}$ , kde  $n$  je 4 až 8.

6. Peptid podle nároku 1, který má obecný vzorec :

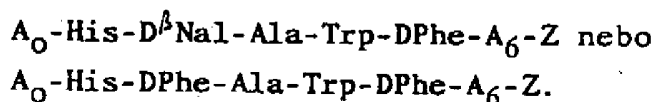


7. Peptid podle nároku 1, ve kterém  $\text{A}_2$  je DPhe.

8. Peptid podle nároku 6, který má obecný vzorec :



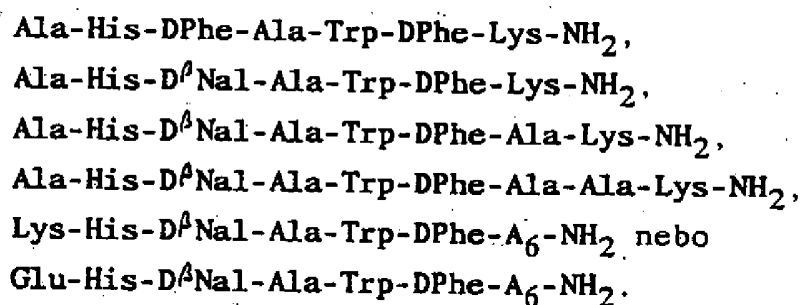
9. Peptid podle nároku 1, který má obecný vzorec :



10. Peptid podle nároku 9, ve kterém  $\text{A}_0$  je Ala.

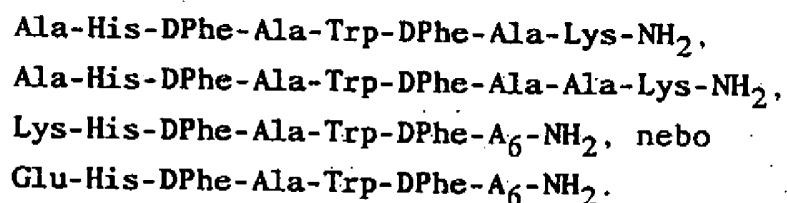
11. Peptid podle nároků 6, 9, 18 nebo 20, ve kterém Z znamená  $-\text{CONH}_2$ .

12. Peptid podle nároku 12, který má obecný vzorec :

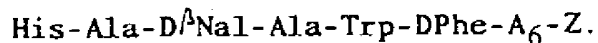


13. Peptid podle nároků 3, 6, 9, 18 nebo 20, ve kterém  $\text{A}_6$  znamená G.

14. Peptid podle nároku 8, který má obecný vzorec :

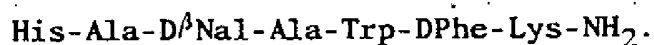


15. Peptid podle nároku 1, který má obecný vzorec :

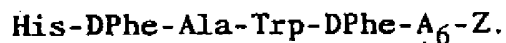


16. Peptid podle nároku 15, ve kterém Z znamená  
-CONH<sub>2</sub>.

17. Peptid podle nároku 16, který má obecný vzorec :



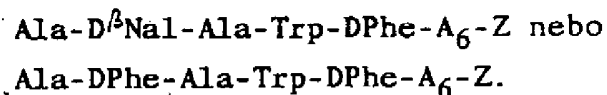
18. Peptid podle nároku 1, který má obecný vzorec :



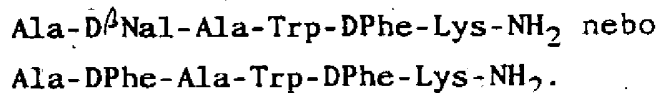
19. Peptid podle nároku 18, který má obecný vzorec :



20. Peptid podle nároku 1, který má obecný vzorec :



21. Peptid podle nároku 20, který má obecný vzorec :



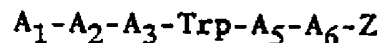
22. Peptid podle nároku 3, ve kterém A<sub>0</sub> představuje  
libovolnou v přírodě se vyskytující aminokyselinu.

23. Farmaceutický prostředek k promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu u zvířat, vyznačující se tím, že obsahuje přinejmenším jeden z peptidů podle nároku 1, 4, 5, 7, 9, 12, 14 nebo 15 a farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo.

24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, vyznačující se tím, že dále obsahuje druhou sloučeninu, která působí jako agonista receptoru hormonu uvolňujícího růstový hormon nebo která inhibuje účinek somatostatínu.

25. Použití peptidu podle nároku 1 v synergicky účinném množství v kombinaci se sloučeninou, která působí jako agonista receptoru hormonu uvolňujícího růstový hormon nebo která inhibuje účinek somatostatínu, pro přípravu léčiva k promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu v krvi.

26. Použití sloučeniny obecného vzorce :



ve kterém znamená :

$A_1$  His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr,  $A_0$ -His nebo  $A_0$ -3(NMe)His

kde  $A_0$  představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce



kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe,

Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar,

A<sub>2</sub> znamená D<sup>β</sup>Nal nebo DPhe,

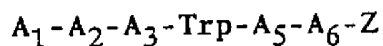
A<sub>3</sub> znamená Ala, Gly nebo Ser,

A<sub>5</sub> znamená DPhe, D/L<sup>α</sup>(Me)Phe nebo (NMe)DPhe,

A<sub>6</sub> znamená B-G nebo G,

pro přípravu léčiva k promotování uvolňování a zvyšování hladiny růstového hormonu v krvi.

27. Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce :



ve kterém znamená :

A<sub>1</sub> His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A<sub>0</sub>-His nebo A<sub>0</sub>-3(NMe)His

kde A<sub>0</sub> představuje libovolnou v přírodě se vyskytující L-aminokyselinu, Met(O), DOPA, Abu nebo peptidy obecného vzorce



kde L znamená H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr nebo Tyr-DAla-Phe-Sar,

A<sub>2</sub> znamená D<sup>β</sup>Nal nebo DPhe,

A<sub>3</sub> znamená Ala, Gly nebo Ser,

A<sub>5</sub> znamená DPhe, D/L<sup>α</sup>(Me)Phe nebo (NMe)DPhe,

A<sub>6</sub> znamená B-G nebo G,

vyznačující se tím, že se kondenzují aminokyseliny nebo deriváty aminokyselin za vzniku uvedené sloučeniny.

28. Způsob přípravy peptidu podle nároku 1,  
vyznačující se tím, že se kondenzují peptidové fragmenty za  
vzniku uvedeného peptidu.

Zastupuje :

Dr. Pavel Zelený