

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.07.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.07.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19933173**
(33) Země priority: **DE**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/EP00/06188**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/05810**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 26

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 7/00

(71) Přihlašovatel:
MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE;

(72) Původce:
Jonczyk Alfred, Darmstadt, DE;
Diefenbach Beate, München, DE;
Goodman Simon, Griesheim, DE;
Groth Ulrich, Konstanz, DE;
Zischinsky Gunther, Konstanz, DE;

(74) Zástupce:
Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Deriváty cyklického peptidu jako inhibitory
integrinu $\alpha_v\beta_6$**

(57) Anotace:

Deriváty cyklického peptidu obecného vzorce I, kde znamená X^1 Ser, Gly nebo Thr; X^2 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe; X^3 Asp, Glu, Lys nebo Phe; X^4 Gly, Ala nebo Ser; X^5 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe; X^6 Arg, Har nebo Lys; R^1 chybí nebo znamená jeden nebo několik zbytků aminokarboxylové kyseliny, přičemž zbytek aminokarboaminokarboxylové kyseliny má délku 500 až 2500 pm, přičemž uvedené aminokyseliny mohou být derivatizovány, včetně D a L forem a opticky aktivních aminokyselinových zbytků a jejich fyziologicky přijatelné soli a solváty, jsou jakožto ligandy $\alpha_v\beta_6$ biologicky účinné a proto vhodné pro výrobu léčiva k ošetřování nemocí, které jsou založeny na expresi a patologické funkci $\alpha_v\beta_6$ integrinových receptorů.

Cyklo (Arg- X^1 -Asp- X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - R^1)

(1)

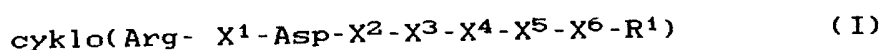
09.01.02
PV 2002-26
~~1463~~

01-3729-01-Ma

Deriváty cyklického peptidu jako inhibitory integrinu $\alpha v\beta 6$

Oblast techniky

Vynález se týká nových peptidů obecného vzorce I



kde znamená

X^1 Ser, Gly nebo Thr,

X^2 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X^3 Asp, Glu, Lys nebo Phe,

X^4 Gly, Ala nebo Ser,

X^5 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X^6 Arg, Har nebo Lys,

R^1 chybí nebo znamená jeden nebo několik zbytků ω -aminokarboxylové kyseliny, přičemž zbytek ω -aminokarboxylové kyseliny má délku 500 až 2500 pm,

přičemž uvedené aminokyseliny mohou být také derivatizovány, včetně D a L forem a opticky aktivních aminokyselinových zbytků

a jejich fyziologicky přijatelných solí a solvátů.

Vynález je založen na objevu nových sloučenin, které mají hodnotné vlastnosti a mohou být použity pro výrobu léčiv.

Zjistilo se, že sloučeniny podle vynálezu a jejich soli

mají velmi hodnotné farmakologické vlastnosti spolu s dobrou snášenlivostí.

Peptidy podle vynálezu se mohou používat jako účinné inhibitory $\alpha_v\beta_6$ integrinového receptoru a tím k ošetřování různých nemocí a patologických nálezů.

Dosavadní stav techniky

Jiné inhibitory integrinu $\alpha_v\beta_6$ jsou popsány v německém patentovém spise číslo DE 19858857 a jiné takové typy také popsal S. Kraft a kol. (J. Biol. Chem. 274, str. 1979 až 1985, 1999). Sloučeniny podle vynálezu lze považovat za výběrový vynález se zřetelem na shora uvedenou literaturu.

Integriny patří do rodiny heterodimerní třídy I - trans-membránových receptorů, které mají významnou úlohu v četných adhezních procesech buňka-matrice popřípadě buňka-buňka (Tuckwell a kol., 1996, Symp. Soc. Ex. Biol. 47). Zhruba se mohou dělit do tří tříd: β_1 -integriny, které představují receptory pro extracelulární matrici, β_2 -integriny, které jsou aktivovatelné na leukocytech, a jsou spouštěny při zánětlivých procesech, jakož také α_v -integriny, které ovlivňují buněčnou odezvu při hojení ran a při jiných patologických procesech (Marshall a Hart, Semin. Cancer Biol. 7, str. 191, 1996).

Integriny $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ a $\alpha_v\beta_6$ se všechny váží na Arg-Gly-Asp (RGD) peptidovou sekvenci v přírodních ligandech, jako jsou například fibronektin nebo vitronektin. Rozpustné RGD-obsahující peptidy jsou schopny inhibovat interakci každého tohoto integrinu s odpovídajícími přírodními ligandy. Integrin $\alpha_v\beta_6$ je poměrně vzácný integrin (Busk a kol., J. Biol. Chem. 267(9), str. 5790, 1992), který se při procesech opravy epitelových tkání ve větším množství vytváří a přednostně váže přirozené matricové molekuly fibro-

nektin a tenascin (Want a kol., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15(5), str. 664, 1996). Fyziologické a patologické funkce $\alpha v \beta 6$ nejsou dosud dokonale známy, je však domněnka, že tento integrin má důležitou úlohu při fyziologických pochodech a nemocech (například záněty, hojení ran, nádory), na kterých se podílí epitelové buňky. Tak se $\alpha v \beta 6$ expresuje na keratinocytech v ranách (Haapasalmi a kol., J. Invest. Dermatol. 106(1), str. 42, 1996), z čehož lze usuzovat, že agonisty a antagonisty tohoto integrinu jsou ovlivňovány vedle procesů hojení ran a zánětů i jiné patologické jevy kůže, jako například lupénka. Kromě toho má $\alpha v \beta 6$ význam v epitelu dýchacích cest (Weinacker a kol., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12(5), str. 547, 1995), takže by se mohly úspěšně nasazovat odpovídající agonisty/antagonisty tohoto integrinu při onemocnění dýchacích cest, jako jsou bronchitida, astma, plicní fibróza a nádory dýchacích cest. Je také známo, že $\alpha v \beta 6$ mají význam pro střevní epitel, takže by bylo možno používat odpovídající integrinové agonisty/antagonisty při ošetřování zánětů, nádorů a poranění žaludečního a střevního traktu.

Závislost vytváření angiogeneze na vzájemném 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).

Úkolem vynálezu je proto přidavně k již známým přírodním vysokomolekulárním ligandům a protilátkám, se kterými se terapeuticky a diagnosticky obtížně pracuje, nalézt mocné, specifické a selektivní nízkomolekulární ligandy pro $\alpha v \beta 6$, s výhodou peptidy, které by se mohly používat pro uvedené terapeutické oblasti avšak také jako diagnostická nebo reakční činidla.

Podstata vynálezu

Zjistilo se, že shora charakterizované peptidové sloučeniny podle vynálezu a jejich soli jakožto rozpustné molekuly

ly působí na buňky, které mají uvedený receptor nebo když se váží na povrchy, představují umělé ligandy pro $\alpha\beta$ zprostředkovávané ulpívání buněk. Především působí jako inhibitory $\alpha\beta$ integrinu, přičemž především brzdí vzájemné působení receptoru s jinými ligandy, například vazbu fibronektinu. Toto působení lze doložit například způsobem, který popsal J. W. Smith a kol. (J. Biol. Chem. 265, str. 12267 až 12271, 1990).

Kromě toho se zjistilo, že nové sloučeniny mají velmi hodnotné farmakologické vlastnosti spolu s dobrou snášenlivostí a mohou se používat jakožto léčiva. Tato skutečnost bude ještě přesněji popsána.

Peptidické sloučeniny podle vynálezu se kromě toho mohou používat jakožto diagnostika pro detekci a lokalizaci patologických stavů v epitelovém systému *in vivo* a *in vitro*, pokud jsou vybaveny vhodnými markery (například biotinylovým zbytkem) podle stavu techniky.

Vynález zahrnuje také kombinace s alespoň jednou jinou účinnou sloučeninou a/nebo konjugáty s jinými účinnými látkami, jako jsou cytotoxicky účinné látky, jakož také konjugáty s radioznačením pro rentgenovou terapii nebo pro PET diagnózu nebo také fúzní proteiny s proteinovými markery, jako jsou GFP nebo protilátky, nebo terapeutické proteiny, jako je IL-2.

Obzvláště účinné jsou sloučeniny obecného vzorce I, ve kterých je oktapeptidová sekvence cyklo(Arg- X¹-Asp-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶) a kde X², X³, X⁴, X⁵ a X⁶ mají shora uvedený význam, rozšířena skupinou R¹. Vliv expanze kruhu je ukázán na obr. 1 na příkladu cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg) [EMD 271588]. Jakožto srovnávací sloučenina se uvádí Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH₂ [EMD 271293]. Některé cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-R¹)peptidy mají vzdálenost od R¹ (vypočtenou) a hodnotu Q (IC₅₀[sloučeniny]/IC₅₀ [EMD 271293] a -log Q uvedenou v tabulce.

09.01.02

R^1	Distance [pm]	Q	$-\log Q$
0	0	47	-1,672
Gly	370	2,1	-0,322
Abu	617	0,028	1,553
Gly-Gly	740	0,05	1,301
Aha	870	0,036	1,444
Aee	1078	0,038	1,420
Gly-Gly-Gly	1110	0,03	1,523
Abu-Abu	1235	0,03	1,523
Gly-Gly-Gly-Gly	1480	0,033	1,481
Aha-Aha	1740	0,036	1,444
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	1850	0,046	1,337
Gly-(Gly) ₄ -Gly	2220	0,05	1,301

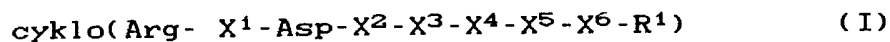
Grafické znázornění je zřejmé z obr. 1. Obzvláště aktivní sloučeniny se získají právě když délka mezerníku R^1 dosáhne přibližně 500 pm.

Obzvláště výhodnými jsou sloučeniny obecného vzorce I, kde R^1 znamená jeden nebo několik zbytků ω -aminokarboxylové kyseliny, přičemž zbytek ω -aminokarboxylové kyseliny má délku 600 až 2000 pm

Zbytky ω -aminokarboxylové kyseliny se míní zbytky jakékoliv ω -aminokarboxylové kyseliny, přičemž obzvláště výhodné aminokyseliny se volí ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a $H_2N-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_n-COOH$, kde znamená m, n vždy na sobě nezávisle 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, nebo 12, za podmínky, že $m+n$ je větší než 0.

09.01.02

Vynález se tedy týká zvláště derivátů peptidů obecného vzorce I



kde znamená

X^1 Ser, Gly nebo Thr,

X^2 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X^3 Asp, Glu, Lys nebo Phe,

X^4 Gly, Ala nebo Ser,

X^5 Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X^6 Arg, Har nebo Lys,

R^1 chybí nebo znamená 1 až 10 aminokyselin volených ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, kde znamená m, n vždy na sobě nezávisle 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, nebo 12, za podmínky, že $m+n$ je větší než 0,

přičemž uvedené aminokyseliny mohou být také derivatizovány, včetně D a L forem a opticky aktivních aminokyselinových zbytků a jejich fyziologicky přijatelných solí.

Některými výhodnými skupinami sloučenin obecného vzorce I jsou následující sloučeniny podvzorců Ia až Ih, kde zvláště neuvedené symboly mají význam uvedený u obecného vzorce I, přičemž znamená v obecném vzorci

09.01.02

- a) X¹ Gly nebo Thr,
- b) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
- c) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
X³ Asp nebo D-Asp,
- d) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
X³ Asp nebo D-Asp,
X⁴ Gly nebo Ala,
- e) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
X³ Asp nebo D-Asp,
X⁴ Gly nebo Ala,
X⁵ Leu,
- f) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
X³ Asp nebo D-Asp,
X⁴ Gly, Ala nebo Ser,
X⁵ Leu,
X⁶ Arg,
- g) X¹ Gly nebo Thr,
X² Leu,
X³ Asp nebo D-Asp,
X⁴ Gly, Ala nebo Ser,
X⁵ Leu,
X⁶ Arg,
R¹ 1 až 10 aminokyselin volených ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His,

09.01.02

Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, kde znamená

m, n vždy na sobě nezávisle 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 nebo 12, za podmínky, že $m+n$ je větší než 0,

- h) X^1 Gly nebo Thr,
 X^2 Leu,
 X^3 Asp nebo D-Asp,
 X^4 Gly, Ala nebo Ser,
 X^5 Leu,
 X^6 Arg,
 R^1 1 až 6 aminokyselin volených ze souboru zahrnujícího Gly, β -Ala, Abu nebo Aha,

a jejich soli.

Vynález se zvláště týká peptidových sloučenin vybraných ze souboru zahrnujícího

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Gly-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha-Aha),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aee),
 cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),
 cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),
 cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Uváděné zkratky zbytků aminokyselin znamenají zbytky ná-

09.01.02

sledujících aminokyselin:

Abu	4-aminomáselná kyselina
Aee	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Aha	6-aminohexanová kyselina, 6-aminokapronová kyselina
Aib	α -aminoisomáselná kyselina
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Arg	arginin
Bgl	C-alfa-terc-butylglycin
Cys	cystein
Dab	2,4-diaminomáselná kyselina
Dap	2,3-diaminopropionová kyselina
Gln	glutamin
Glp	pyroglutamová kyselina
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
Har	homoarginin
Hcy	homocystein
His	histidin
homo-Phe	homo-fenylalanin
Hse	homo-serin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Nal	naft-2-ylalanin
Nle	norleucin
Orn	ornitin
Pen	penicilamin
Phe	fenylalanin
Phg	fenylglycin
4-Hal-Phe	4-halogenfenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin

09.01.02

Thr	threonin
TIS	triisopropylsilan [sic]
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

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

Ac	acetyl
BOC	terc-butoxykarbonyl
BSA	albumin hovězího séra
CBZ nebo Z	benzyloxykarbonyl
DCCl	dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIEA	diethylamin
DMF	dimethylformamid
EDCl	N-ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)karbodiimid,
Et	ethyl
FCA	fluoresceinkarboxylová kyselina
FITC	fluoresceinisothiokyanát
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl
FTH	fluoresceinthiomochovina
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
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
POA	fenoxyacetyl
Sal	salicyloyl

TBS++	tris pufrovaná solanka s dvoumocným kationtem
TBSA	TBS + BSA
TBTU	2-((1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3-tetramethyl-uroniumtetrafluorborát
TFA	trifluoroctová kyselina
Trt	trityl (trifenylmethyl).

Pokud shora uvedené aminokyseliny mohou být v několika enantiomerních formách, všechny tyto formy a také jejich směsi (například DL formy) vynález zahrnuje. Kromě toho mohou být aminokyseliny chráněny o sobě známými chránícími skupinami.

Vynález se také týká hydrátů a solvátů, například alkoholátů sloučenin obecného vzorce I.

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

Uvedené aminokyseliny nebo aminokyselinové zbytky, například skupiny NH nebo koncové amidové skupiny, 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.

Vynález zahrnuje také sloučeniny podle vynálezu, které

jsou navzájem vázány peptidovým způsobem prostřednictvím α -aminoskupin a α -karboxylových skupin (vazba hlava-ocas) a jsou cyklickými sloučeninami, které mají funkční postranní řetězec například skupinu SH a jsou vázány následujícím způsobem

postranní-postranní například S-S (disulfidická)

hlava-postranní

postranní-ocas.

Vynález zahrnuje také deriváty obsahující známé markery, které detekci peptidů usnadňují. Jakožto příklady takových derivátů se uvádějí radioaktivně značené, biotinylované nebo fluorescenčně značené peptidy.

Fluorescenčními barvivovými skupinami jsou s výhodou skupina 7-acetoxykumarin-3-ylová, fluorescein-5- (a/nebo 6-)ylová, 2',7'-dichlorfluorescein-5- (a 6-)ylová, dihydrotetramethylrosamin-4-ylová, tetramethylrhodamin-5- (a 6-)ylová, 4,4-difluor-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-ethylová nebo 4,4-difluor-5,7-difenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-ethylová skupina.

Vhodné skupiny funkcionalizovaných fluorescenčních barviv, které se mohou používat jako reakční činidla při přípravě sloučenin obecného vzorce I podle vynálezu, jsou popsány například v publikaci "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", 5. vydání, 1992 až 1994, R.P. Haugland Molecular Probes Inc.

Vynález zahrnuje nejen shora charakterizované peptidy, nýbrž také směsi a prostředky, které vedle sloučenin podle vynálezu obsahují také jiné farmakologicky aktivní sloučeniny nebo pomocné přísady, které mohou příznivě ovlivňovat primární farmakologické působení peptidů podle vynálezu.

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.

S výhodou se peptidy podle vynálezu připravují způsobem používajícím pevnou fázi s následným oddělením a čišťením, jak popsal například Jonczyk a Meienhofer (Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Symp. Eds. V. Hruby a D.H. Rich, Pierce Comp. III, str. 73 až 77, 1983; nebo Angew. Chem. 104, str. 375, 1992) nebo Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 94, str. 3102, 1972).

Peptidy podle vynálezu se mohou připravovat na pevné fázi (ručně nebo použitím automatizovaných syntetizérů) strategií Fmoc využívající v kyselém prostředí labilních postranních chránicích skupin a čištěním chromatografií RP-HPLC. Píková homogenita se může měřit chromatografií RP-HPLC a identita sloučenin využitím FAB-MS.

Peptidy se také mohou připravovat o sobě známými způsoby přípravy aminokyselin a peptidů, které jsou známy z literatury (například Novabiochem -1999 Catalog & Peptide Synthesis Handbook of Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) a z četné standardní literatury a ze zveřejněných patentových spisů.

Mohou se používat postupné kopulace a kondenzace fragmentů. Mohou se používat různé N-koncové a C-koncové a postranní chránicí skupiny, které se s výhodou volí tak, aby byly ortogonálně odštěpitelné. Kopulační stupně se mohou provádět za použití různých kondenzačních činidel, jako jsou karbodiimidy, karbodiimidazoly, činidla uroniového typu jako TBTU, použitím způsobů směsných anhydridů a halogenidů kyselin nebo

aktivních esterů. Aktivované estery se výhodně vytvářejí in situ, například adicí HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu.

Cyklizace lineární prekurzorové molekuly, mající postranní chránicí skupiny, se podobně může provádět za použití kondenzačních reakcí, které jsou popsány v literatuře (například německý patentový spis číslo DE 43 10 643; nebo Houben-Weyl, 1.c., svazek 15/II, str. 1 až 806, 1974).

Při přípravě za použití pevné fáze se může používat různých pryskyřic a kotvicích funkcí. Pryskyřice mohou být například na bázi polystyrenu nebo polakrylamidu; jakožto kotvicí funkce přicházejí v úvahu Wang, o-chlortrityl pro přípravu peptidových kyselin, aminoxanthenoxykotvy například pro přípravu peptidových amidů.

Biotynylované nebo fluorescenčně značené peptidy/proteiny se podobně mohou připravovat o sobě známými způsoby (například E.A. Bayer a M. Wilchek, Methods of Biochemical Analysis, svazek 26, The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology; a "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", 6. vydání, 1996, R.P. Haugland Molecular Probes Inc.; nebo světový patentový spis číslo WO 97/14716).

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 chránicí aminoskupinu, nebo které místo atomu vodíku v hydroxylové skupině mají skupinu chránicí hydroxylovou skupinu. Totéž platí pro karboxylové kyseliny, které mohou být chráněny tak, že se nahradí jejich -CO-OH hydroxylová skupina chránicí skupinou na-

příklad esterovou skupinou.

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 chemická reakce na jiném místě molekuly provedena. Výraz "skupina chránící hydroxylovou skupinu" je podobně obecně znám a jde o skupiny, které jsou vhodné k ochraně (k blokování) hydroxylové skupiny před chemickými reakcemi, které jsou však snadno odstranitelné, když je žádoucí chemická reakce na jiném místě molekuly provedena. 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 benzensulfonová nebo p-toluensulfonová. Hydrogenolyticky odstranitelné chránící skupiny (například skupiny CBZ nebo skupina benzylová) se mohou odštěpovat například zpracováním vodíkem v přítomnosti katalyzátoru (například katalyzátoru na bázi ušlechtilého kovu, jako palladium, účelně na nosiči, jako na uhlí).

Typické chránící skupiny pro N-koncové skupiny a pro postranní aminoskupiny jsou skupina Z, BOC, Fmoc, pro koncové C-skupiny nebo pro Asp nebo Glu postranní řetězce jsou O-prim-alkylové skupiny (například methoxyskupina nebo ethoxyskupina), skupiny O-terc-alkylové (například OBut) nebo Obenzylová skupina. Pro chránění guanidinopodílu skupiny Arg jsou vhodné například skupina Z, BOC, NO₂, Mtr, Pmc nebo Pbf. Alkoholové skupiny se mohou chránit terc-alkylovými nebo tritylovými skupinami.

Skupina BOC, OBut a Mtr se může například s výhodou od-

štěpovat kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu nebo přibližně 3 až 5 N kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu při teplotě 15 až 30 °C, zatímco skupina Fmoc [sic] 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.

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 palladium, 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.

Jak shora uvedeno, zahrnují peptidy podle vynálezu také své fyziologicky přijatelné soli, které se mohou připravovat o sobě známými způsoby. Zásada obecného vzorce I se může kyselinou převádět na příslušnou adiční sůl s kyselinou, například reakcí ekvivalentního množství zásady a kyseliny v inertním

rozpouštědla, 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 organické 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 kyseliny sloučenin obecného vzorce I reakcí se zásadou mohou převádět na své fyziologicky přijatelné soli kovové 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.

Peptidové sloučeniny podle vynálezu se mohou používat, jak shora uvedeno, jako farmaceuticky účinné sloučeniny v humánní a ve veterinární medicíně zvláště pro profylaxi a/nebo terapii poruch, na kterých se podílejí epitelové buňky. Obzvláště pro ošetřování zánětů, pro hojení ran pokožky, pro ošetřování orgánů respiračního traktu a pro ošetřování žaludku a střev, například pro ošetřování apoplexie, anginy pectoris,

nádorů, osteolytických nemocí jako osteoporózy, patologických angiogenních nemocí, jako například zánětů, pulmonární fibrózy, oftalmologických nemocí, diabetické retinopatie, degenerativních skvrn, myopie, oční histoplasmózy, reumatoidní artritidy, osteoartritidy, rubeotického glaukomu, vředovité kolitidy, Krohnovy nemoci, atherosklerózy, lupénky, restenózy po angioplastii, akutního selhání ledvin, nefritidy, mikrobiální infekce a rozptýlené sklerózy.

Vynález se týká peptidových sloučenin shora uvedeného obecného vzorce I a jejich fyziologicky přijatelných solí jakožto léčiv, diagnostických a reakčních činidel.

Vynálezem jsou zvláště odpovídající léčiva jakožto inhibitory k ošetřování nemocí, které jsou bezprostředně nebo nebezprostředně způsobeny expresí $\alpha v \beta 6$ integrinových receptorů, zvláště patogenních angiogenních nemocí, trombóz, srdečního infarktu, koronárních onemocnění srdce, arteriosklerózy, nádorů, osteoporózy, zánětů, infekcí jakož také k ovlivňování procesů hojení ran.

Vynález se také týká vhodných farmaceutických prostředků, které obsahují alespoň jedno léčivo obecného vzorce I a popřípadě nosič a/nebo excipienty.

Vynález se dále také týká použití peptidových sloučenin a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí podle vynálezu a návodu pro výrobu léčiv pro léčení poruch, které jsou nepřímo nebo přímo založeny na expresi $\alpha v \beta 6$ integrinového receptoru, což platí zvláště pro patologické angiogenní poruchy, trombózy, srdeční infarkt, koronární poruchy srdce, arteriosklerózu, nádory, osteoporózu, zánět, infekce a pro ovlivňování léčení ran.

Léčiva podle vynálezu popřípadě farmaceutické prostředky,

které je obsahují se mohou používat v humánní a ve veterinární medicíně. Jakožto nosiče přicházejí v úvahu anorganické nebo organické látky, které jsou vhodné pro enterální (například orální) nebo pro parenterální nebo topické podávání nebo pro podávání ve formě inhalačních sprejů a které nereagují se sloučeninami obecného vzorce I, jako jsou například voda, rostlinné oleje, benzylalkoholy, alkylenglykoly, polyethylen-glykoly, glycerintriacetát, želatina, uhlohydráty, jako laktóza nebo škroby, stearát hořečnatý, mastek a vaselina. Pro orální použití se hodí zvláště tablety, pilulky, povlečené tablety, kapsle, prášky, granule, sirupy, šťávy nebo kapky, pro rektální použití čípky, pro parenterální použití roztoky, zvláště olejové nebo vodné roztoky, dále suspenze, emulze nebo implantáty, pro topické použití masti, krémy nebo pudry. Sloučeniny podle vynálezu se také mohou lyofilizovat a získaných lyofilizátů se může například používat pro přípravu vstřikovatelných prostředků. Prostředky se mohou sterilovat a/ nebo mohou obsahovat pomocné látky, jako jsou kluzná činidla, konzervační, stabilizační činidla a/nebo smáčedla, emulgátory, soli k ovlivnění osmotického tlaku, pufry, barviva, chuťové přísady a/nebo ještě jednu další nebo ještě několik dalších účinných látek, jako jsou například vitaminy.

Pro podávání ve formě inhalačních sprejů se účinná látka rozpouští nebo suspenduje ve hnacím plynu nebo ve směsi hnacích plynů (jako jsou například oxid uhličitý nebo fluorochlorované uhlovodíky). V takovém případě se přitom používá účinné látky v mikronizované formě, přičemž se může přidávat alespoň jedno fyziologické kompatibilní rozpouštědlo, například ethanol. Inhalační roztoky se mohou podávat za použití o sobě známých zařízení k tomuto účelu.

Sloučenin obecného vzorce I podle vynálezu se zpravidla používá v dávkách podobných jako obchodně známé peptidy, zvláště obdobně jako sloučeniny podle amerického patentového

spisu číslo 4 472305, s výhodou v dávce přibližně 0,05 až 500 mg, zvláště 0,5 až 100 mg na dávkovací jednotku. Denní dávka je s výhodou přibližně 0,01 až 20 mg/kg tělesné hmotnosti. Určitá dávka pro každého jednotlivého jedince závisí na nej-různějších faktorech, například na účinnosti určité použité sloučeniny, na stáří, tělesné hmotnosti, všeobecném zdravotním stavu, pohlaví, stravě, na okamžiku a cestě podání, na rychlosti vylučování, na kombinaci léčiv a na závažnosti určitého onemocnění. Výhodné je parenterální podávání.

Vynález se také týká sloučenin obecného vzorce I, které se mohou používat v analytické biologii a v molekulární biologii. Nové sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená X skupinu fluorescenčního barviva, vázanou prostřednictvím -CONH, -COO, -NH-C(=S)-NH, -NH-C(=O)-NH, -SO₂NH nebo -NHCO vazbou, se mohou používat jako diagnostické markery v technice FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) a ve fluorescenční mikroskopii.

Použití značených sloučenin ve fluorescenční mikroskopii je popsáno v literatuře (například Y.-L.Wang a D.L. Taylor, "Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, část A+B, Academic Press, Inc. 1989").

Nových sloučenin podle vynálezu se také může používat jakožto integrinových ligandů k výrobě sloupců pro afinitní chromatografii k výrobě čistých integrinů. Komplex Avidinem derivatizovaného nosiče, například Sepharose, a nových sloučenin obecného vzorce I se vytváří o sobě známým způsobem (jako popisuje například E.A. Bayer a M. Wilchek, Methods of Biochemical Analysis, svazek 26, The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology). Jakožto polymerní nosičové materiály jsou pro tento účel vhodné polymerní pevné fáze známé z chemie peptidů s výhodou s hydrofilními vlastnostmi, například sesíťené polycukry, jako jsou celulóza, Sepharose nebo Sephadex^R, akrylamidy, polymer na polyethylenglykolové bázi nebo Tentakelpolymery^R.

Vnález zahrnuje také rekombinantní DNA-sekvence, které obsahují úseky, které kódují oblasti peptidů majících peptidové strukturální motivy podle vynálezu.

Takové DNA se mohou přenášet částicemi na buňky, jak popisuje Ch. Andree a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. 91, str. 12188 až 12192, 1994) nebo mohou zvyšovat transfer na buňky jinými pomocnými činiteli, jako jsou liposomy (A.I. Aronsohn a J.A. Hughes, J. Drug Targeting 5, str. 163 až 169, 1997).

Transferu takové DNA by se proto mohlo použít v kvasnicích prostřednictvím Bacculovirů nebo v buňkách savců pro produkci peptidických látek.

Pokud se infikuje živočišný nebo lidský organizmus takovou rekombinantní DNA, mohou se vázat infikovanými buňkami nakonec vytvořené peptidy podle vynálezu bezprostředně na $\alpha\beta_6$ -integrinový receptor, například na nádorové buňky a mohou je blokovat.

Odpovídající rekombinantní DNA, která se může připravit o sobě známými a běžnými způsoby, může být však také například ve formě virové DNA, která obsahuje úseky, které kódují virový obalový protein. Infekcí hostitelského organismu takovými rekombinantními, zvláště nepatogenními viry, se mohou hostitelské buňky, které expresují integrin $\alpha\beta_6$ s výhodou napadat (cílování).

Vhodnými viry jsou například adenoviry, kterých se často používá jakožto vektorů pro cizí geny v buňkách savců. Pro své četné vlastnosti se hodí pro genovou terapii, jak uvádí S.J. Watkins a kol. (Gene Therapy 4, str. 1004 až 1012, 1997) a také J. Engelhard a kol. (Hum. Gene Ther. 4, str. 759 až 769, 1993). Jak uvádí A. Fasbender a kol. (J. Clin. Invest. 102, str. 184 až 193, 1998), je společným problémem genové terapie

virovými a nevirovými vektory omezená účinnost transferu genu. Shora popsanou přídatnou ligandovou sekvencí pro integrin $\alpha v\beta 6$ v obalovém proteinu adonovirů se může dosáhnout zlepšení transferu například cystický fibrózní transmembránový vodivostní regulátor (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) cDNA.

Podobně jako popisuje T. Tanaka a kol. (Cancer Research 58, str. 3362 až 3369, 1998) se mohou využít místo DNA pro angiostatin také DNA pro sekvenční podle vynálezu pro transfekci buněk prostřednictvím retrovirových nebo adenovirových vektorů.

Peptidy podle vynálezu se mohou používat také v komplexu liposomů ze systému lipid/peptid/DNA vyrobeném pro transfekci buněčných kultur z liposomového komplexu sestávajícího ze systému lipid/DNA (bez peptidu) pro použití v genové terapii lidí. Přípravu komplexu liposomů ze systému lipid/DNA/peptid popsal například S.L. Hart a kol. (Lipid-Mediated Enhancement of Transfection by a Non-Viral Integrin-Targeting Vector, Human Gene Therapy 9, str. 575 až 585, 1998).

Může se připravovat liposomový komplex lipid/peptid/DNA například z následujících zásobních roztoků: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lipofektinu (ekvimolární směs DOTMA (=N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamoniumchlorid) a DOPE (dioleylfosfatidylethanolamin), 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plasmidu DNA a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptidu. Za tímto účelem se jak DNA tak peptid rozpouští v buněčném kultivačním prostředí.

Komplex liposomů se připraví smíšením těchto tří složek v určitém hmotnostním poměru (lipid:DNA:peptid například 0,75:1:4). Komplex liposomů a DNA je již popsán pro genovou terapii lidí (Caplen N.J. a kol., Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, Nature Medicine 1, str. 39 až 46, 1995).

09.01.00

Vynález se proto také týká použití odpovídajícím způsobem modifikované rekombinantní DNA z gen uvolňujících systémů, zvláště ze systému vir-DNA, k ošetřování nemocí, které jsou bezprostředně nebo nebezprostředně způsobeny expresí $\alpha v\beta 6$ integrinových receptorů, zvláště patogenních angiogenních nemocí, trombóz, srdečního infarktu, koronárních onemocnění srdce, arteriosklerózy, nádorů, osteoporózy, zánětů, infekcí jakož také k ovlivňování procesů hojení ran.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení. Teploty se uvádějí vždy ve stupních Celsia

Chromatografická HPLC analýza (retenční doba R_t) se provádí za použití následujících systémů:

Sloupec 5 μ m LichroSpher 60 RP-Select B (250-4) s 50 minutovým gradientem od 0 do 80 % 2-propanolu ve vodě/0,3 % trifluorocetové kyseliny za toku 1 ml/min a za detekce při 215 nm.

Hmotová spektrometrie (MS): EI (elektronová rázová ionizace)
 M^+ ;
FAB (bombardování rychlými atomy)
 $(M+H)^+$

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava a čištění peptidů podle vynálezu.

Peptidy podle vynálezu se v podstatě připravují a čistí použitím Fmoc-strategie za chránění ke kyselině labilních postranních řetězců na pryskyřicích labilních ke kyselině za využití obchodně dostupných kontinuálních ("continuous flow") syntetizérů peptidů podle popisu Haubnera a kol. (J. Am. Chem. Soc. 118, str. 17703, 1996).

09.01.00

Cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) [EMD 272914]

Suspenduje se [sic] 2,7 g Fmoc-Abu-OH (Bachem B-1910) ve [sic] 150 ml dichlormethanu a rozpustí se do čirosti za použití 10 ml dimethylformamidu. Přidá se 5,6 ml diisopropylethylaminu. Roztok se nalije na 12,0 g o-chlortritylchloridpolystyrenové pryskyřice (1,14 mmol/g, Bachem D-196512) a dávka se protřepe při teplotě místnosti.

Po pěti hodinách se pryskyřice odfiltruje za odsávání a promyje se vždy 300 ml DMC/MeOH/DIEA v poměru 17/2/1, DCM, DMF, DCM a MeOH. Po odstranění rozpouštědel se získá 14,55 g Fmoc-aminokyseliny na pryskyřici. Trojí Fmoc stanovení dokládá střední zatížení 541 $\mu\text{mol/g}$ Fmoc-Abu-O-oClTrt-pryskyřici.

Postupně se podrobuje 0,7 g Fmoc-Abu-O-oClTrt-polystyrenové pryskyřice kopulačnímu stupni podvojnou kopulační technikou 2 x vždy se 0,30 g TBTU, 0,315 ml ethyldiisopropylaminu a Fmoc-aminokyseliny v 4,1 ml dimethylformamidu za použití obchodně dostupné syntezní aparatury a o sobě známým způsobem (aparatura a příručka Milligen 9050 PepSynthetizerTM, 1987) v každém případě po dobu 30 minut. Promytí se provádí v dimethylformamidu po dobu 10 minut, štěpení v systému piperidin/dimethylformamid (objemově 1:4) po dobu 5 minut a N-koncová acetylace (uzavření) se provádí za použití systému acetanhydrid/pyridin/dimethylformamid (objemově 2:3:15) po dobu 15 minut.

Používají se aminokyseliny Fmoc-Arg(Pmc), pak Fmoc-Leu, pak Fmoc-Ala, pak Fmoc-D-Asp(OBut), pak Fmoc-Leu, pak Fmoc-Asp(OBut), pak Fmoc-Thr(But), pak Fmoc-Arg(Pmc) nakonec pak Fmoc-ABu. Po odstranění chránicí skupiny Fmoc ze Fmoc-Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-O-oClTrt-polystyrenové pryskyřice se po promytí dimethylformamidem a isopropanolem a následném vysušení ve vakuu při teplotě místnosti získá 0,9 g Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-

09.01.00

-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-O-oClTrt-polystyrenové
pryskyřice

Zpracováním této peptidylové pryskyřice 20 ml systému trifluorethanol/dichlormethan/kyselina octová (objemově 2:6:2) po dobu dvou hodin při teplotě místnosti, filtrací, zkoncentrováním ve vakuu a triturací s diethyletherem se získá 0,19 g na postranním řetězci chráněného Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-OH.

Přidáváním po kapkách roztoku tohoto produktu v dimethylformamidu (100 mg peptidu/15 ml DMF) do míchaného roztoku TBTU/HOBT/DIPEA (10:10:11 ekvivalentů) v 50 ml dimethylformamidu/100 mg peptidu v průběhu 30 minut a dalším mícháním po dobu jedné hodiny se dosáhne cyklizace. Po zkoncentrování a vysrážení vodou se získá 0,15 g surového cyklo(Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-Abu). Zpracováváním systémem trifluorooctová kyselina/voda/TIS (objemově 94:3:3) po dobu dvou hodin při teplotě místnosti, zkoncentrováním ve vakuu a triturováním s diethyletherem se získá sraženina 85 mg cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu).

Produkt se čistí chromatografií RP-HPLC na Lichrosorbu RP 18 (250 - 25, 7 µm, Merck KGaA) ve 0,3% trifluorooctové kyselině za použití gradientu 4 % až 24 % 2-propanolu v průběhu jedné hodiny při průtoku 10 ml/min a eluát se hodnotí UV průtokem fotometrem při 215 a 254 nm. Získá se 51 mg produktu; FAB 1067; Rt [sic] 19,0.

Podobně se připraví následující sloučeniny:

Kód (EMD)	Sekvence	Mol. hmotn. (g/mol)	FAB	Rt [sic]
271312	cyklo(RTDLDSLRL)	957,1	958	15,10
271578	cyklo(RTDLdSLRL)	957,1	957	17,51

09.01.00

Kód (EMD)	Sekvence	Mol. hmotn. (g/mol)	FAB	Rt [sic]
271579	cyklo(RTDLdALR)	941,1	941	16,64
271586	cyklo(RGDLDSLRL)	913,0	913	17,95
271587	cyklo(RGDLdSLRL)	913,0	913	17,24
271588	cyklo(RGDLdALRL)	897,0	897	19,60
271589	cyklo(RGDLdGLRL)	882,9	883	16,68
271590	cyklo(RGDLd-β-Ala-LR)	897,0	897	15,47
271591	cyklo(RGDLdALRG)	954,1	954	16,79
271592	cyklo(RGDLdALRGG)	1011,1	1011	17,83
271593	cyklo(RGDLdALRGGG)	1068,2	1068	17,79
271594	cyklo(RGDLdALRGGGGGG)	1239,3	1239	17,30
272914	cyklo(RGDLdALR-Abu-Abu)	1067,2	1067	19,00
272966	cyklo(RTDLdALRGGG)	1112,2	1113	17,14
272967	cyklo(RTDLdGLRGGG)	1098,2	1099	19,00
272968	cyklo(RTDLDALRGGG)	1112,2	1113	17,39
272969	cyklo(RTDLDGLRGGG)	1098,2	1099	16,88
272970	cyklo(RGDLdALRG)	954,1	955	17,32
272971	cyklo(RaDLdALRGGG)	1082,2	1083	18,26
272972	cyklo(RGDLdALRGGG)	1082,2	1083	18,23
272958	cyklo(RGDLdALR-Aha-Aha)	1123,3	1123	19,38
272959	cyklo(RGDLdALR-Aha)	1010,2	1010	20,63
272960	cyklo(RGDLdALR-Aee)	1042,2	1042	18,92
272961	cyklo(RGDLdALRGGGG)	1125,2	1125	17,56
272962	cyklo(RGDLdALRGGGGG)	1182,3	1182	17,52
272963	cyklo(RGDLdGLRGGG)	1054,1	1054	15,59
272964	cyklo(RGDLdALRGGG)	1068,2	1069	16,84
272965	cyklo(RGDLdGLRGGG)	1054,1	1055	16,03
273028	cyklo(RTDLdALR-Aha)	1072,2	n.d.	19,30
273033	cyklo(RTDLdALR-Abu)	1044,2	n.d.	16,72
273035	cyklo(RGDLdALR-Abu)	1000,1	n.d.	16,96
273038	cyklo(RTDLdALR-Aha-Aha)	1185,4	n.d.	20,46
273040	cyklo(RTDLdALR-Abu-Abu) × 2 TFA	1111,3	n.d.	18,75
304219	cyklo(RTDLdALR-βAla)	1012,1	1012	19,4
304218	cyklo(RGDLdALR-βAla)	968,1	968	18,7
329400	cyklo(RGDLdALR)	811,9	812	21,15

09.01.00

Kód (EMD)	Sekvence	Mol. hmotn. (g/mol)	FAB	Rt [sic]
329412	cyklo(RTDLdALR-Abu-Abu)	1111,3	1112	20,31
329402	cyklo(RGDLdALAGGG)	983,1	984	20,48
329399	cyklo(NMeArg- GDLaALRGGG)	1038,2	1039	19,66
329398	cyklo(R-NMeGly- DLaALRGGG)	1038,2	1039	19,76
326397	cyklo(RGD-NMeLeu- aALRGGG)	1038,2	1039	20,22
329396	cyklo(RGDL-[D-NMeAla]- ALRGGG)	1038,2	1039	20,55
329395	cyklo(RGDLa-NMeAla- LRGGG)	1038,2	1039	21,35
329394	cyklo(RGDLaA-NMeLeu- RGGG)	1038,2	1039	18,87
329393	cyklo(RGDLaAL-NMeArg- GGG)	1038,2	1039	20,64
	cyklo(RGDLdAAR)			
	cyklo(RGDLdAARGGG)			

Nomenklatura aminokyselin se řídí směrnicí Eur. J. Biochem.
138, str. 9 až 37, 1984.

index = D-aminokyselina

n.d. = nestanoveno

Příklad 2

Test receptorového vázání systému $\alpha\text{v}\beta_6$ /fibronektin

Vyrobené peptidy podle vynálezu se váží v roztoku spolu s konkurenčně působícím fibronektinem na imobilizovaný $\alpha\text{v}\beta_6$ receptor a zjišťuje se hodnota Q jakožto míra selektivity vázání testovaného peptidu na $\alpha\text{v}\beta_6$. Hodnota Q se vypočítává ze kvocientu hodnoty IC_{50} testovaného peptidu a standardu. Jakožto standardu se použilo lineárního Ac-RTDLDSLRL-NH₂ (kód EMD

271293) (lit./patent srovnej Pytela a kol., Science 231, str. 1559, 1986).

Zkouška vázání se provádí následujícím způsobem:

Imobilizace rozpustného $\alpha\text{v}\beta_6$ receptoru na mikrotitračních destičkách probíhá po zředění proteinového roztoku v TBS++ a následné inkubaci přes noc při teplotě 4 °C (100 μl /důlek). Nespecifická místa vázání se blokují inkubací (dvě hodiny při teplotě 37 °C) s 3 % (hmotnost/objem) BSA v TBS++ (200 μl /důlek). Nadbytek BSA se odstraní trojím promytím TBSA++. Peptidy se sterilně (1:10) v TBSA++ zředí a inkubují se s imobilizovaným integrinem (50 μl peptidu + 50 μl ligandu na důlek; dvě hodiny při teplotě 37 °C) spolu s biotinylovaným fibronectinem 2 $\mu\text{g/ml}$. Nevázaný fibronectin a peptidy se odstraní trojím promytím TBSA++. Detekce vázaného fibronektinu se provádí inkubací (jednu hodinu při teplotě 37 °C) s alkalickou fosfatázou kopulovanou s antibiotinovou protilátkou (Biorad) (1:20000 v TBSA++; 100 μl /důlek). Po trojím promytí TBSA++ se provádí kolorimetrické zjištění inkubací (10 až 15 minut při teplotě 25 °C ve tmě) s roztokem substrátu (5 mg nitrofenylfosfátu, 1 ml ethanolaminu, 4 ml vody; 100 μl /důlek). Enzymová reakce se ukončí přidáním 0,4 M roztoku hydroxidu sodného (100 μl /důlek). Barevná intenzita se stanovuje při 405 nm v měřicím zařízení ELISA a porovnává se s nulovou hodnotou. Jakožto nulové hodnoty se používá důlků nepovlečených receptorem. Jako standardu se používá Ac-RTDLSLR-NH₂. Hodnoty IC₅₀ pro testované peptidy se odečítají z grafu a z nich spolu s IC₅₀ hodnotou standardního peptidu se zjišťuje hodnota Q peptidu podle vynálezu. Hodnota Q = IC₅₀ testovaného peptidu/IC₅₀ standardu. Hodnota Q se vypočte jako střed opakovaných testů. Výsledky popsaného testu jsou v následující tabulce.

09.01.00

Tabulka II

Výsledky $\alpha v\beta 6$ /fibronektinového receptorového testu vázání

Kód (EMD)	Sekvence	Q hodnota = IC ₅₀ testovaný peptid/ IC ₅₀ EMD 271293
271293	Ac-RTDLDSLRL-NH ₂	1,00 (=75 nM)
271586	cyklo(RGDLDSLRL)	26
271587	cyklo(RGDLdSLRL)	88
271588	cyklo(RGDLdALRL)	47
271589	cyklo(RGDLdGLRL)	19
272970	cyklo(RGDLDALRG)	6,7
272964	cyklo(RGDLDALRGGG)	0,037
272965	cyklo(RGDLdGLRGGG)	0,16
272972	cyklo(RGDLdALRGGG)	0,05
271593	cyklo(RGDLdALRGGG)	0,03
272963	cyklo(RGDLdGLRGGG)	0,084
271590	cyklo(RGDLd-βAla-LR)	233
271591	cyklo(RGDLdALRG)	2,1
271592	cyklo(RGDLdALRGG)	0,05
271594	cyklo(RGDLdALRGGGGG)	0,05
272914	cyklo(RGDLdALR-Abu-Abu)	0,03
272958	cyklo(RGDLdALR-Aha-Aha)	0,036
272959	cyklo(RGDLdALR-Aha)	0,036
272960	cyklo(RGDLdALR-Aee)	0,038
272961	cyklo(RGDLdALRGGGG)	0,033
272962	cyklo(RGDLdALRGGGGG)	0,046
273035	cyklo(RGDLdALR-Abu)	0,028
271312	cyklo(RTDLDSLRL)	8
271578	cyklo(RTDLdSLRL)	104
271579	cyklo(RTDLdALRL)	12
272966	cyklo(RTDLdALR-GGG)	0,05
272967	cyklo(RTDLdGLR-GGG)	0,15
272968	cyklo(RTDLdALR-GGG)	0,14
272969	cyklo(RTDLdGLR-GGG)	0,18

09.01.00

Kód (EMD)	Sekvence	Q hodnota = IC ₅₀ testovaný peptid/ IC ₅₀ EMD 271293
273028	cyklo(RTDLdALR-Aha)	0,015
273033	cyklo(RTDLdALR-Abu)	0,043
273038	cyklo(RTDLdALR-Aha-Aha)	0,015
273040	cyklo(RTDLdALR-Abu-Abu)	0,014
272971	cyklo(RaDLdALR-GGG)	8,2

Následující příklady objasňují farmaceutické prostředky:

Příklad A. Injekční ampulky

Roztok 100 g cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) a 5 g dinatriumhydrogenfosfátu ve 3 l dvakrát destilované vody se nastaví 2n kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH 6,5, sterilně se zfiltruje a plní se do injekčních ampulek, lyofilizuje se za sterilních podmínek a sterilně se ampulky uzavřou. Každá injekční ampulka obsahuje 5 mg účinné látky.

Příklad B. Čípky

Roztaví se směs 20 g cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) se 100 g sojového lecitinu a 1400 g kakového másla, vlije se do formiček a nechá se vychladnout. Každý čípek obsahuje 20 mg účinné látky.

Příklad C. Roztok

Připraví se roztok 1 g cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu), 9,38 g dihydrátu natriumdihydrogenfosfátu, 28,48 g dinatriumhydrogenfosfátu se 12 molekulami vody a 0,1 g benzalkonium-chloridu v 940 ml dvakrát destilované vody. Hodnota pH roztoku se upraví na 6,8, doplní se na jeden litr a

steriluje se ozářením. Tohoto roztoku je možno používat jakožto očních kapek.

Příklad D. Mast

Smísí se 500 mg cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-
-Abu-Abu) s 99,5 g vazeliny za aseptických podmínek.

Příklad E. Tablety

Ze směsi 1 kg cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-
-Abu), 4 kg laktózy, 1,2 kg bramborového škrobu, 0,2 kg mastku
a 0,1 kg stearátu hořečnatého se obvyklým způsobem vylisují
tablety, tak, že každá tableta obsahuje 10 mg účinné látky.

Příklad F. Povlečené tablety

Obdobně jako podle příkladu E se vylisují tablety, které
se pak obvyklým způsobem povléknou povlakem ze sacharózy,
bramborového škrobu, mastku, tragantu a barviva.

Příklad G. Kapsle

O sobě známým způsobem se plní do kapslí z tvrdé žela-
tiny 2 kg cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu)
tak, že každá kapsle obsahuje 20 mg účinné látky.

Příklad H. Ampule

Roztok 1 kg cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-
-Abu) v 60 l dvakrát destilované vody se sterilně zfiltruje a
plní se do ampulí, lyofilizuje se za sterilních podmínek a
sterilně se ampule uzavřou. Každá ampule obsahuje 10 mg účinné
látky.

Příklad I. Inhalační sprej

Rozpustí se 14 g cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) v 10 l isotonického roztoku chloridu sodného a plní se do běžných obchodních nádob pro stříkání s pumpovým mechanismem. Roztok se může stříkat do úst nebo do nosu. Každý střík (přibližně 0,1 ml) odpovídá dávce přibližně 0,14 mg.

Průmyslová využitelnost

Peptidické sloučeniny, které jakožto ligand integrinu $\alpha v \beta 6$ jsou vhodné pro výrobu farmaceutických prostředků k ošetřování nemocí založených na expresi a na patologické funkci $\alpha v \beta 6$ integrinových receptorů.

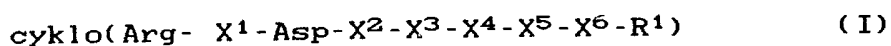
09.01.02

PV 2001-26

1983

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Deriváty cyklického peptidu obecného vzorce I



kde znamená

X¹ Ser, Gly nebo Thr,

X² Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X³ Asp, Glu, Lys nebo Phe,

X⁴ Gly, Ala nebo Ser,

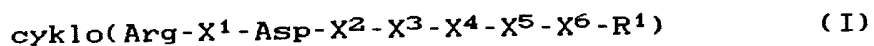
X⁵ Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X⁶ Arg, Har nebo Lys,

R¹ chybí nebo znamená jednu nebo několik zbytků ω-aminokarboxylové kyseliny, přičemž zbytek^ωaminokarboaminokarboxylové kyseliny má délku 500 až 2500 pm, přičemž uvedené aminokyseliny mohou být také derivatizovány, včetně D a L forem a opticky aktivních aminokyselinových zbytků

a jejich fyziologicky přijatelné soli a solváty.

2. Deriváty cyklického peptidu obecného vzorce I



kde znamená

X¹ Ser, Gly nebo Thr,

09.01.02

X² Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X³ Asp, Glu, Lys nebo Phe,

X⁴ Gly, Ala nebo Ser,

X⁵ Leu, Ile, Nle, Val nebo Phe,

X⁶ Arg, Har nebo Lys,

R¹ chybí nebo znamená 1 až 10 aminokyselin volených ze souboru zahrnujícího Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val a $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, kde znamená m, n vždy na sobě nezávisle 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, nebo 12, za podmínky, že m+n je větší než 0,

přičemž uvedené aminokyseliny mohou být také derivatizovány, včetně D a L forem a opticky aktivních aminokyselinových zbytků

a jejich fyziologicky přijatelné soli a solváty.

3. Deriváty cyklického peptidu podle nároku 1 nebo 2 ze souboru zahrnujícího

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Gly-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha-Aha),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aee),

cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),

cyklo(Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-β-Ala),

cyklo(Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-β-Ala),

09.01.00

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

4. Deriváty cyklického peptidu obecného vzorce I podle nároku 1 a 2 a sloučeniny podle nároku 3 a jejich fyziologicky přijatelné soli a solváty jakožto léčiva.

5. Léčiva podle nároku 4 jakožto inhibitory pro ošetřování nemocí, které jsou založeny na expresi a na patologické funkci $\alpha v \beta 6$ integrinových receptorů.

6. Léčiva podle nároku 5 k ošetřování trombóz, srdečního infarktu, koronárních nemocí srdce, arteriosklerózy, nádorů, osteoporózy, fibróz, zápalů, infekcí, lupénky jakož také k ovlivnění hojení ran.

7. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jedno léčivo podle nároku 5 a 6 a popřípadě nosič a/nebo pomocnou látku a popřípadě jiné účinné látky.

8. Použití derivátů cyklického peptidu podle nároku 1 až 3 a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí pro výrobu léčiva k ošetřování nemocí, které jsou založeny na expresi a patologické funkci $\alpha v \beta 6$ integrinových receptorů.

9. Použití derivátů cyklického peptidu podle nároku 8 pro výrobu léčiva k ošetřování trombóz, srdečního infarktu, koronárních nemocí srdce, arteriosklerózy, nádorů, osteoporózy, fibróz, zápalů, infekcí, lupénky jakož také k ovlivnění hojení ran.