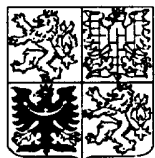


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3879-91**

(22) Přihlášeno: **18. 12. 91**

(30) Právo přednosti:
19. 12. 90 DE 90/4040574

(40) Zveřejněno: **15. 07. 92**
(Věstník č. 7/92)

(47) Uděleno: **05. 11. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 01. 99**
(Věstník č. 1/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 7/06

C 07 K 5/08

C 07 K 5/10

A 61 K 38/08

(73) Majitel patentu:

HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce vynálezu:

Müllner Stefan dr., Hochheim am Main, DE;
König Wolfgang dr., Hofheim am Taunus,
DE;
Müller Günter dr., Frankfurt am Main, DE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

Peptidy, způsob jejich výroby,
farmaceutické prostředky tyto látky
obsahující a jejich použití

(57) Anotace:

Peptidy, vybrané ze skupiny, zahrnující Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn, acetyl-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH, Asn-Tyr-Cys-Asn a X-Q-Cys-D (II), kde Q značí Tyr, His nebo Nal, D značí Asp, Asn, D-Asp, D-Asn, β-Ala nebo Azagly-NH₂ a X značí a) vodíkový atom nebo b) skupinu (C₁-C₁₈)-alkyl-C(=O)-, a stereoizomerní formy nebo fyziologicky přijatelné soli peptidu vzorce II. Způsob jejich výroby, jejich použití pro výrobu prostředků pro léčení cukrovky a farmaceutické prostředky s jejich obsahem.

Peptidy, způsob jejich výroby, farmaceutické prostředky tyto látky obsahující a jejich použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových peptidů s inzulínovým účinkem, které jsou vhodné pro léčení Diabetes mellitus (cukrovka), způsobu jejich výroby, farmaceutických prostředků tyto látky obsahujících a jejich použití.

10

Dosavadní stav techniky

Inzuliny jsou tvořeny dvěma polypeptidovými řetězci, a sice řetězcem A, který obsahuje 21 aminokyselinových zbytků, a řetězcem B, který obsahuje 30 aminokyselinových zbytků. Oba tyto řetězce A a B jsou vzájemně spojeny dvěma disulfidovými můstky, přičemž jsou spojeny cysteinové zbytky v polohách A7 a B7, jehož i cysteinové zbytky v polohách A20 a B19. Třetí disulfidový můstek se nachází mezi polohami A6 a A11. Zvířecí a lidský inzulín se tvoří ve slinivce břišní ve formě preproinzulinu. Lidský preproinzulin sestává například z prepeptidu s 24 aminokyselinovými zbytky, na které navazuje proinzulin s 86 aminokyselinovými zbytky, a uvedený preproinzulin má následující konfiguraci:

Prepeptid-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A,

25 přičemž obecný substituent C znamená aminokyselinový řetězec s 31 zbytky. V průběhu vylučování z Langerhansových ostrůvků se prepeptid odštěpí za vzniku proinzulinu. Potom se řetězec C proteolyticky štěpí a vzniká účinný lidský inzulín.

30 Inzulín vykazuje v inzulínsenzitivní tkáni široké spektrum účinků. Nejvýraznější z těchto účinků je rychlé snižování hladiny glukózy u savců v případě aplikace inzulínu. To je způsobeno rychlým převodem glukózy z krve do svalů a tukových buněk, kde je glukóza spotřebována. Inzulín dále aktivuje glykogen-syntetázu a inhibuje lipolýzu. Inzulín také podporuje syntézu proteinů z aminokyselin a zesiluje indukci glukokinázy a fosfofruktokinázy a inhibuje tvorbu určitých enzymů glukoneogeneze, jakými jsou pyruvátkarboxyláza a fruktosadifosfatáza.

35

Diabetes II. typu (na inzulínu nezávislý Diabetes) souvisí s rezistencí vůči inzulínu periferních tkání, jakými jsou svalové nebo tukové tkáně. Zmenšená míra využití glukózy, ke které přitom dochází, je způsobena chybějící inzulínovou stimulací transportu a následného metabolického zpracování glukózy. Tato násobná rezistence je pravděpodobně způsobena defektem v receptorové nebo postreceptorové rovině, tzn. před vznikem členu nazývaného "second messenger" (Garvey, Diabetes/Metabolism Reviews, 5 (1989) 727-742).

40

Nyní bylo s překvapením zjištěno, že krátké peptidy mohou mít inzulínový účinek a že se proto hodí k léčení cukrovky (diabetes mellitus).

45

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou peptidy, vybrané ze skupiny, zahrnující Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn, acetyl-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH, Asn-Tyr-Cys-Asn a

50

X-Q-Cys-D

(II),

kde

Q značí Tyr, His nebo Nal,
 D značí Asp, Asn, D-Asp, D-Asn, β -Ala nebo Azagly-NH₂, a
 X značí

- 5 a) vodíkový atom, nebo
 b) skupinu (C₁-C₁₈)-alkyl- C -

$$\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$$

10 a stereoizomerní formy nebo fyziologicky přijatelné soli peptidu obecného vzorce II.

Jako výhodné je možno uvést peptidy se sekvencí Asn Tyr Cys Asn nebo Tyr Cys Asn.

15 Pod pojmem "alkylová skupina" se rozumí alkylové skupiny s přímým nebo rozvětveným uhlovodíkovým řetězcem. To samé platí pro zbytky, odvozené od alkylové skupiny, jakými jsou například alkoxylový zbytek, aralkylový zbytek a alkanoylový zbytek.

Pod pojmem "fyziologicky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce II" se rozumí zejména farmaceuticky použitelné nebo netoxické soli. Takové soli budou například tvořeny reakcí
 20 sloučenin obecného vzorce I, které obsahují kyselé funkční skupiny, například karboxylové skupiny, s bázemi, odvozenými od alkalických kovů a kovů alkalických zemin, jakými jsou například sodík, draslík, hořčík a vápník, nebo s fyziologicky přijatelnými organickými aminy, jakými jsou například triethylamin a tris-/2-hydroxyethyl-/amin. Sloučeniny, které obsahují
 25 báze skupiny, jako například aminoskupiny nebo guanidiniové skupiny, tvoří soli s anorganickými kyselinami, jakými jsou například kyselina solná, kyselina sírová nebo kyselina fosforečná, a s organickými kyselinami, tj. s organickými karboxylovými nebo sulfonovými kyselinami, jakými jsou například kyselina octová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina maleinová, kyselina fumarová, kyselina vinná a kyselina p-toluen-sulfonová. Sloučeniny, které mají stejný počet kyselých a báze skupin, tvoří vnitřní soli a nejsou
 30 odkázány na třetí solnotvornou složku.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob výroby výše popsaných peptidů, jehož podstata spočívá v tom, že se

- 35 a) uvede v reakci segment s C- koncovou volnou karboxylovou skupinou nebo jeho aktivovaný derivát s odpovídajícím segmentem s N-koncovou volnou aminoskupinou, nebo se
 b) peptid postupně zkonstruuje,

40 a sloučenina, získaná ve stupni a) nebo b), se případně zbaví jedné nebo více dočasně zavedených ochranných skupin pro ochranu ostatních funkcí a takto získané sloučeniny se případně převedou na jejich fyziologicky přijatelné soli.

Peptidy podle vynálezu se připravují obecnými metodami, používanými v chemii peptidů, spočívajícími buď v postupné výstavbě peptidu od C-terminálního konce, nebo v kopulaci
 45 vhodných segmentů (Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, sv. 15/1,2). Kopulace peptidů mohou být například provedeny metodou směsných anhydridů, přes aktivní ester nebo karbodiimidovou metodou, a to zejména za přítomnosti látek, urychlujících reakci a bránících racemizaci, jakými jsou například 1-hydroxybenzotriazol, N-hydroxysukcimid, 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin, N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximid, a dále za
 50 použití aktivních derivátů 1-hydroxybenzotriazolu nebo anhydridů kyseliny fosforečné, fosfonové nebo fosfinové, při teplotě v rozmezí -10 °C až teplota varu použitého rozpouštědla, výhodně v rozmezí -5 °C až 40 °C.

Vhodnými rozpouštědly pro takové reakce jsou dimethylformamid, dimethylacetamid, N-methylpyrrolidon nebo dimethylsulfoxid.

- 5 Pokud se rozpustnost reakčních složek dovoluje, mohou být jako rozpouštědla použity methylenchlorid, chloroform nebo tetrahydrofuran. Uvedené metody přípravy peptidů jsou popsány: Meinehofer–Gross, "The Peptides"/, Academic Press, sv. I, /1979/.

- 10 V případě, že jsou funkční skupiny v bočním řetězci aminokyselin chráněny za účelem zabránění vedlejších reakcí nebo za účelem syntézy speciálních peptidů vhodnými ochrannými skupinami /viz například T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis"/, potom se především používají:

- 15 Arg/Tos/,
Arg/Mts/,
Arg/Mtr/,
Arg/PMC/,
Asp/OBzl/,
Asp/OBut/,
20 Cys-/4-MeBzl/,
Cys/Acm/,
Cys/SBut/,
Glu/OBzl/,
Glu/OBut/,
25 His/Tos/,
His/Fmoc/,
His/Dnp/,
His/Trt/,
Lys/Cl-Z/,
30 Lys/Boc/,
Met/O/,
Ser/Bzl/,
Ser/But/,
Thr/Bzl/,
35 Thr/But/,
Trp/Mts/,
Trp/CHO/,
Tyr/Br-Z/,
Tyr/Bzl/ nebo
40 Tyr/But/.

- Jakožto ochranné skupiny aminové skupiny se výhodně používají benzyloxykarbonylový zbytek (Z-), který je odštěpitelný katalytickou hydrogenací, 2-(3,5-dimethyloxyfenyl)-propyl(2)-oxykarbonylový zbytek (Ddz-), který je odštěpitelný slabými kyselinami, nebo tritylový zbytek (Trt-), který je rovněž odštěpitelný slabými kyselinami, a 9-fluorenylmethyloxykarbonylový zbytek (Fmoc-), který je odštěpitelný sekundárními aminy. Skupina SH cysteinu může být blokována celou řadou ochranných skupin. S výhodou se zde používají tritylový zbytek (Trt-) a S-terc.butylový zbytek (StBu-). Tritylový zbytek může být odštěpen buď oxidací jodem za vzniku cystinových sloučenin, nebo redukujícím kyselým štěpením za vzniku cysteinových sloučenin (Leibigs Ann. Chem. 1979, 227–247).
- 45
50

Naproti tomu S-terc.butylový zbytek bude nejlépe odštěpen redukčně působením tributylfosfinu (Aust. J. Chem. 19 /1966/, 2355–2360). Skupiny OH a COOH v bočních řetězcích se nejlépe

chrání kyselé odštěpitelným terc.butylovým zbytkem (tBu-) (viz také: Meienhofer-Gross: "The Peptides", sv. 3).

5 Sloučeniny podle vynálezu a jejich fyziologicky přijatelné soli slouží především jako účinné látky pro farmaceutické přípravky pro léčení cukrovky (Diabetes mellitus) nebo cukrovky, nezávislé na inzulínu.

Předmětem vynálezu je proto také farmaceutická kompozice, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje alespoň jednu sloučeninu podle vynálezu, a/nebo alespoň jednu z jejich fyziologicky
10 přijatelných solí v rozpuštěné, amorfní a/nebo krystalické formě, výhodně v amorfní a/nebo krystalické formě, přičemž nejsou vyloučeny ani sloučeniny H-Leu Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH nebo H-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH.

Pro tuto farmaceutickou kompozici jsou vhodnými peptidy:

15 Asn Tyr Cys Asn,
H-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH nebo
Tyr Cys Asn a/nebo

20 jejich fyziologicky přijatelné soli.

Farmaceutickou kompozicí je s výhodou roztok nebo suspenze pro injekční účely s hodnotou pH mezi asi 3,0 a 9,0, s výhodou mezi asi 5,0 a 8,5, který, popřípadě která, obsahuje vhodné izotonické činidlo, vhodné konzervační činidlo a případně vhodný pufr, jakož i případně depotní
25 účinnou složku, všechno přirozeně ve sterilním vodném roztoku nebo ve sterilní vodné suspenzi. Zbytek kompozice je tvořen nosičem.

Vhodnými izotonickými činidly jsou například glycerin, glukóza, mannit, chlorid sodný a vápenaté nebo hořečnaté sloučeniny, jako například chlorid vápenatý nebo chlorid hořečnatý.
30

Vhodnými konzervačními činidly jsou například fenol, m-krezol, benzylalkohol a/nebo ester kyseliny p-hydroxy benzoové.

Jako pufrы mohou být zejména k nastavení hodnoty pH mezi 5,0 a 8,5 použity například octan sodný, citran sodný a fosforečnan sodný. Jinak jsou k nastavení hodnoty pH kompozice vhodné i fyziologicky nezávadné zředěné kyseliny /typicky kyselina chlorovodíková/, popřípadě louhy /typicky hydroxid sodný/.
35

Za účelem modifikace účinkového profilu kompozice podle vynálezu mohou být do kompozice přimíseny i modifikované /viz EP-B 132 769 a EP-B 132 770/ a/nebo nemodifikované inzuliny, s výhodou hovězí, vepřový nebo lidský inzulín, zejména lidský inzulín.
40

Farmaceutická kompozice podle vynálezu se připraví tak, že se do vhodné aplikační formy upraví směs alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I nebo II a/nebo alespoň jedné z jejich fyziologicky přijatelných solí a případně modifikovaných a/nebo nemodifikovaných inzulínů
45 nebo jejich derivátů s fyziologicky přijatelným nosičem a případně s vhodnými přísadami a pomocnými látkami.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrativní charakter a vlastní rozsah vynálezu, definovaný formulací patentových nároků, nikterak neomezují.
50

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

H-Tyr-Cys-Asn-OH

Stupeň 1a

Fmoc-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu

K roztoku 3,4 g Fmoc-Tyr/tBu/-OH, 3,95 g /7,4 mol/ H-Cys/Trt/-Asn-OtBu /Liebigs Ann. Chem. 1979, 242/, a 1 g HOBt v 50 ml dimethylformamidu se při teplotě 0 °C a za míchání přidá 1,63 g DCC, načež se získaná směs míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 0 °C a potom se odstaví přes noc při pokojové teplotě. Druhý den se filtrací pod tlakem oddělí sraženina a filtrát se zahustí. Zbytek se rozetře s octanem ethylnatým, přičemž se získá 2,83 g produktu. Z matečného louhu se izoluje ještě 3,63 g produktu.

Celkový výtěžek: 6,46 g /89 %/;

 $C_{58}H_{62}N_4O_8$ /975,218/;

teplota tání: 121-114 °C;

 $[\alpha]_D^{21} = -15,3^\circ /c = 1$, v methanolu/.

Stupeň 1b

H-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu

6 g /6,15 mol/ Fmoc-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu se rozpustí ve 100 ml dimethylformamidu. K takto získanému roztoku se potom přidá 6,8 g diethylaminu a směs se nechá stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Potom se směs zahustí za vysokého vakua a zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené methylenchloridem, kterou se eluuje lipofilní nečistota, zatímco požadovaná látka se eluuje směsí methylenchloridu a methanolu v objemovém poměru 9,5:0,5.

Výtěžek: 4,4 olejovitého produktu /95 %/;

 $C_{43}H_{52}N_4O_6S$ /752,976/.

Stupeň 1c

H-Tyr-Cys-Asn-OH

2,2 g /2,9 mmol/ H-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu se rozpustí ve směsi 25 ml kyseliny trifluoroctové a 25 ml ethylmetkarbanu. Po 4 hodinách se roztok nalije do 250 ml vody. Vodný roztok se potom třikrát extrahuje etherem a nakonec vysuší mrazovou sublimací /lyofilizací/.

Výtěžek: 1,05 g /91 %/;

 $[\alpha]_D^{23} = -1,1^\circ /c = 1$ ve vodě/.

Příklad 2

H-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH

Stupeň 2a

Fmoc-Asn-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu

- 5 K roztoku 2,2 g /2,9 mmol/ H-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu, 1,04 g Fmoc-Asn-OH, 0,39 g HOBt ve 30 ml dimethylformamidu se za míchání a při teplotě 0 °C přidá 0,64 g DCC. Směs se potom míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 0 °C, načež se přes noc odstaví při pokojové teplotě. Druhého dne se sraženina oddělí podtlakovou filtrací a filtrát se zahustí. Zbytek se rozpustí v octanu ethylnatém a potom postupně extrahuje vodou, nasyceným roztokem
- 10 hydrogenuhlíčitanu sodného, roztokem hydrogensíranu draselného a vodou, načež se vysuší nad síranem sodným. Zbytek se rozetře s petroletherem.

Výtěžek: 1,98 g /63 %/;

 $C_{62}H_{68}N_6O_{10}S$ /1089, 323/;

- 15 $[\alpha]^{22}_D = -18,8^\circ /c = 1$ v methanolu/.

Stupeň 2b

F-Asn-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu

- 20 1,9 g /1,74 mmol/ Fmoc-Asn-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu se rozpustí v 50 ml dimethylformamidu. K takto získanému roztoku se potom přidá 1,8 ml diethylaminu a směs se odstaví na dobu 15 minut při pokojové teplotě. Reakční směs se potom zahustí za vysokého vakua a zbytek se rozetře v octanu ethylnatém a vysuší za vakua.

Výtěžek: 0,98 g /65 %/;

 $C_{47}H_{58}N_6O_8S$ /867,081/;

- 25 $[\alpha]^{21}_D = -7,2^\circ /c = 1$, v methanolu/.

- 30 Stupeň 2c

H-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH

- 35 0,9 g /1 mmol/ výše uvedeným způsobem získané sloučeniny se rozpustí ve směsi 10 ml ethylmerkaptanu a 10 ml kyseliny trifluoroctové. Po 4 hodinách se reakční směs nalije do 100 ml vody. Vodný roztok se potom třikrát extrahuje etherem a vysuší mrazovou sublimací /lyofilizací/.

Výtěžek: 455 mg /89 %/;

- 40 $C_{20}H_{28}N_6O_8S$ /512,547/;

 $[\alpha]^{23}_D = -26,0^\circ /c = 1$, ve vodě/.

Příklad 3

- 45

Acetyl-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH

- 50 K roztoku 2,0 g /1,56 mmol/ H-Leu-Glu/OtBu/-Asn-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu-trifluoracetátu /Liebigs Ann. Chem. 1979, 243/ ve 30 ml dimethylformamidu se přidá 0,4 ml N-ethylmorpholinu a 0,53 g acetyl-N-hydroxysukcinimidu. Po čtyřech hodinách při teplotě okolí se reakční směs zahustí za vysokého vakua. Zbytek se rozpustí v octanu ethylnatém a získaný roztok se postupně vytřepe do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhlíčitanu sodného, vodného roztoku hydrogensíranu draselného a do vody. Přitom vypadne sraženina, která se

oddělí podtlakovou filtrací, přičemž se získá 1,3 g produktu. Ethylacetátová fáze se vysuší nad síranem sodným a zahustí, zbytek se rozetře s diethyletherem a odsaje. Získá se 0,8 g produktu. Celkový výtěžek: 2,1 g /vyšší než 100 %/.

- 5 1,3 g /asi 1,07 mmol/ výše uvedeným způsobem získané čisté šarže Ac-Leu-Glu/OtBu/-Asn-Tyr/tBu/-Cys/Trt/-Asn-OtBu se rozpustí ve směsi 30 ml kyseliny trifluoroctové a 30 ml ethylmerkaptanu. Po čtyřech hodinách se reakční směs nalije do 300 ml vody a vodný roztok se třikrát extrahuje diethyletherem. Vodná fáze se potom vysuší mrazovou sublimací /lyofilizací/.

- 10 Výtěžek: 740 mg /87 %/
 $C_{33}H_{48}N_8O_{13}S$ /796,86/
 $[\alpha]^{23}_D = -25,1^\circ /c = 1$, ve vodě/.

- 15 Příklad 4

Syntéza H-Tyr/Bu¹/-Gln-Leu-Glu/OBu¹/-Asn-Tyr/Bu¹/-Cys/Trt/-Asn-Obu¹.HBr /7 HBr/

Stupeň 4a

- 20 Ddz-Tyr/Bu¹/-Gln-ONb /16/

- K roztoku 25,24 g /55 mmol/ Ddz-Tyr/Bu¹/-OH, 15,88 g /50 mmol/ H-Gln-ONb.HCl a 6,75 g 1-hydroxybenzotriazolhydrátu ve 100 ml N,N-dimethylformamidu se při teplotě -3 °C přidá
 25 6,4 ml /50 mmol/ N-ethylmorpholinu a 10,5 g dicyklohexylkarbodiimidu. Tato směs se míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 0 °C a potom ještě po dobu jedné hodiny při teplotě okolí, načež se odstaví přes noc při teplotě okolí. Vyloučená sraženina se oddělí podtlakovou filtrací a filtrát se zahustí. Rezultující olej se rozpustí v octanu ethylnatém a získaný roztok se potom postupně promyje vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, citrátovým pufrem /pH 3/ a vodou,
 30 načež se vysuší nad síranem sodným a zahustí. Olejovitý produkt se rozetře s petroletherem na prášek a oddělí podtlakovou filtrací. Potom se třikrát povaří vždy ve 100 ml diizopropyletheru a dekantuje. Nakonec se rozetře se studeným diizopropyletherem, oddělí podtlakovou filtrací a promyje petroletherem.

- 35 Výtěžek: 32,8 g /92 %/
 teplota tání: 80 až 90 °C;
 $[\alpha]^{22}_D = +15,1^\circ /c = 1$, v methanolu/
 elementární analýza:

- | | | | | |
|--------------|-------------------------|-------|------|------|
| | $C_{37}H_{46}N_4O_{11}$ | C %/ | H %/ | N %/ |
| 40 vypočteno | | 61,48 | 6,41 | 7,75 |
| nalezeno | | 61,3 | 6,7 | 7,9. |

Stupeň 4b

- 45 Ddz-Tyr/Bu¹/-Gln-OH.dicyklohexylamin

- K roztoku 32,5 g /45 mmol/ produktu 16 až 500 ml methanolu se přidá 5 ml vody a Pb/BaSO₄ a směs se hydrogenuje po dobu 7 hodin. Potom se katalyzátor odstraní podtlakovou filtrací a filtrát se zahustí. Rezultující olej se potom rozpustí ve 250 ml octanu ethylnatého. K získanému
 50 roztoku se přidá 11,3 ml /55 mmol/ dicyklohexylaminu a směs se nechá stát po dobu několika hodin při teplotě 3 °C, načež se vyloučená sraženina oddělí podtlakovou filtrací. Tato sraženina se potom rozetře v třecí misce s octanem ethylnatým, oddělí podtlakovou filtrací a vysuší za vakua.

Výtěžek: 27 g /78 %/
 teplota tání: 170–171 °C;
 $[\alpha]_D^{23} = +10,2^\circ /c = 1$, v methanolu/.

5 Elementární analýza:

$C_{42}H_{64}N_4O_9$	C/%/	H/%/	N/%/
vypočteno	65,6	8,39	7,28
nalezeno	65,4	8,5	7,3.

10 Stupeň 4c

Ddz–Tyr/Bu^t–Gln–OH /17/

15 2,9 g /3,7 mmol/ Ddz–Tyr/Bu^t–Gln–OH.dicyklohexylaminu se rozdělí mezi octan ethylnatý a citrátový pufr /pH 3/. Ethylacetátová fáze se promyje vodou až do neutrální reakce, vysuší nad síranem sodným a zahustí. Jako zbytek se získá amorfni produkt 17.

20 Výtěžek: 2 g /90 %/
 teplota tání: 110–115 °C;
 $[\alpha]_D^{22} = +19,8^\circ /c = 1$, v methanolu/.

Elementární analýza:

$C_{30}H_{41}N_3O_9$ /587,68/

	C/%/	H/%/	N/%/
25 vypočteno	61,31	7,03	7,15
nalezeno	60,6	7,2	7,0

Stupeň 4d

30 Ddz–Tyr/Bu^t–Gln–Leu–Glu/Obu^t–Asn–Tyr/Bu^t–Cys/Trt–Asn–Obu^t/18/

9,7 g /16,5 mmol/ produktu 17, 19,2 g /15 mmol/ sloučeniny z příkladu 3 a 2,025 g /15 mmol/ HOBt se při pokojové teplotě a za míchání rozpustí ve 30 ml N,N–dimethylformamidu. Směs se potom ochladí na teplotu 0 °C, přidá se k ní 1,95 ml /15 mmol/ N–ethylmorpholinu, jakož i roztok 3,3 g /16 mmol/ dicyklohexylkarbodiimidu a 9 ml N,N–dimethylformamidu a směs se nejdříve 35 míchá při teplotě 0 °C po dobu jedné hodiny a potom ještě čtyři hodiny při pokojové teplotě, načež se přes noc nechá stát při pokojové teplotě a dicyklohexylmočovina se odsaje. Po dvojnásobném promytí vždy 4,5 ml N,N–dimethylformamidu se filtrát přilije do 159 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a směs se míchá tak dlouho, až se vyloučí 40 prášková sraženina. Tato sraženina se odsaje, rozetře s citrátovým pufrem, znovu odsaje, promyje vodou až do neutrální reakce a vysuší při tlaku asi 13,3 Pa /výtěžek: 23,1 g/. Tento surový produkt se zahřeje na parní lázni až téměř k teplotě varu, řídka suspenze se přechovává přes noc při teplotě 3 °C, sraženina se odsaje a promyje octanem ethylnatým a etherem.

45 Výtěžek: 20 g /76,8 %/
 $[\alpha]_D^{22} = -10,2^\circ /c = 1$, v methanolu/.

Získaný produkt se rozkládá při teplotě od 205 °C a zuhelnatí zhruba při teplotě 250 °C;

50 aminokyselinová analýza:

Asp 2,00; Glu 2,01; Cys 0,75; Leu 0,99; Tyr 1,95.

Elementární analýza:

C₉₂H₁₂₃N₁₁O₂₀S /1735,15/

	C/%/	H/%/	N/%/	S/%/
vypočteno	63,68	7,15	8,88	1,85
5 nalezeno	62,0	7,2	8,6	2,1.

Stupeň 4e

H-Tyr/Bu^t–Gln–Leu–Glu/OBu^t–Asn–Tyr/Bu^t–Cys/Trt–Asn/OBu^t. HBr /7.HBr/

10

3,5 g /2 mmol/ produktu 18 se za míchání rozpustí ve směsi 1,75 ml kyseliny trifluoroctové /20 mmol/, 0,35 ml vody a 33 ml methyldichloridu /asi 35 ml 5% roztoku v kyselině trifluoroctové s 1 % vody/ a 3,5 ml anisolu. Získaný roztok se potom míchá po dobu 3 hodin při pokojové teplotě, načež se k němu přidá pyridin v množství 2 ml /24,8 mmol/ a směs se zahustí při tlaku asi 13,3 Pa. Zbytek se rozetře s etherem, podtlakově odfiltruje, promyje etherem, 15 vysuší, promyje vodou a vysuší nad oxidem fosforečným /výtěžek: 3,35 g/. Za účelem dalšího čištění se produkt dvakrát krátce povaří vždy s 20 ml octanu ethylnatého, načež se za tepla podtlakově odfiltruje. Potom se produkt ještě promyje etherem.

20 Výtěžek: 3,0 g /92 %/
teplota tání: 255–265 °C /za rozkladu/
[α]_D²² = -20,2° /c = 1, v methanolu/.

Aminokyselinová analýza:

25 Asp 1,97; Glu 2,00; Cys 0,61; Leu 1,00; Tyr 2,01.

Elementární analýza:

C₈₀H₁₁₀BrN₁₁O₁₆S /1593,8/

	C/%/	H/%/	N/%/	S/%/
30 vypočteno	60,23	6,96	9,67	2,01
nalezeno	60,6	7,0	9,5	2,2.

Příklad 5

35

Biologická aktivita peptidů podle vynálezu obecného vzorce I nebo II byla stanovena pomocí vypreparovaných tukových buněk a výseků bránice /diafragma/ krys. Výraz tripeptid se vztahuje na Tyr Cys Asn–OH a výraz hexapeptid se vztahuje na acetyl–Leu Glu Asn Tyr Cys Asn–OH. Výraz "bazální" se vztahuje na aktivitu bez stimulace, výraz inzulin se vztahuje na lidský inzulin 40 a dpm znamená radioaktivní rozpady za minutu.

Preparace tukových buněk z krys probíhá následujícím způsobem:

45 tuková tkáň nadvarlat /krysy Wistar s tělesnou hmotností 160 až 180 g a s žádným omezením v potravě/ se zpracuje kolagenázou a získané osamostatnělé tukové buňky se vícekrát promyjí flotací.

Příprava výseků krysí diafragmy: z vícekrát promyté hemidiafragmy /krysy Wistar s tělesnou hmotností 60 až 70 g a s žádným omezením v potravě/ byly vyseknuty malé kousky /průměr 50 5 mm/ tkáně.

Oba následující testy zahrnují insulinem stimulovatelné pohlcení glukózy, které vyžaduje inzulinem indukovanou kaskádu přenosu signálů a transport glukózy, a to nezávisle na tom, zda

je glukóza metabolizována oxidačně (glykolýza, přes pentosofosfát) nebo neoxidačně. Je sledována transformace na lipidy, glykogen nebo membránou neprostupné vedlejší produkty /glukózo-6-fosfát/, avšak nikoliv vznik laktátu.

- 5 a) Krycí tukové buňky se inkubují v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulínu a peptidu s D-[U-¹⁴C]glukózou /koncová koncentrace D-glukózy 22 µM/. Tukové buňky se potom oddělí odstředěním přes vrstvu silikonového oleje od ostatního média, izolují se a potom se stanoví radioaktivita, přidružená k těmto buňkám.
- 10 b) Výseky krycí diafragmy se inkubují v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulínu a peptidu s D-[U-¹⁴C]glukózou /koncová koncentrace D-glukózy 75 µM/. Médium se odsaje. Výseky tkáně se několikrát promyjí a potom se solubilizují zpracováním alkálií za účelem stanovení radioaktivity, přidružené k této tkáni.
- 15 Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 1.

Tabulka 1

20 Pohlacení glukózy

		b/ diafragma		a/ tukové buňky			
25		Inzulin	Tripeptid	Hexapeptid	Inzulin	Tripeptid	Hexapeptid
		[dpm]					
30	0,1 mM		7591	7429		1838	1488
	0,5 mM		8540	7752		2947	1917
	1 mM		11588	8597		6533	4218
	0,5 ng	10055			4379		
	5 ng	20841			26312		
35	bazální	7348			1235		

40 Příklad 6

Transport glukózy

- 45 Tukové buňky a výseky diafragmy byly získány stejným postupem jako v příkladu 5. Následující testy zahrnují výlučně insulinem stimulovatelný specifický transport glukózy /ulehčená difuze/ přes plazmatickou membránu prostřednictvím nosiče glukózy včetně insulinem indukované kaskády přenosu signálů. Vliv glukózového metabolismu na transport glukózy byl vyloučen použitím nemetabolizovatelného glukózového analogu.

- 50 a) Krycí tukové buňky byly inkubovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulínu a peptidu s 2-deoxy-D-[1-³H]glukózou /koncová koncentrace D-glukózy 0,2 mM/ a L-[1-¹⁴C]- glukózou /netransportovatelná/. Za účelem stanovení radioaktivity / [³H] a [¹⁴C] se buňky oddělí od média odstředěním přes vrstvu silikonového oleje. Specifický stereoselektivní glukózový transport se vypočte jako rozdíl mezi celkovou radioaktivitou, přidruženou k tukovým buňkám / [³H]-
- 55 glukóza/, a radioaktivitou, přidruženou k těmto buňkám difuzí a nespecifickým vlivem / [¹⁴C]glukóza/.

b) Výseky kryší diafragmy se inkubují v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulinu a peptidu s 2-desoxy-D-[1-³H]glukózou /koncová koncentrace D-glukózy 0,1 mM/ a L-[1-¹⁴C]glukózou. Výseky tkáně byly potom odděleny od média rychlou filtrací přes skleněnou fritu a intenzivně promyty. Radioaktivita se měří v alkalickém extraktu.

Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Transport glukózy

	a/ tukové buňky			b/ diafragma		
	Inzulin	Tripeptid	Hexapeptid	Inzulin	Tripeptid	Hexapeptid
	[dpm]					
0,1 mM		2289	2218		8836	8450
0,5 mM		3055	2842		9822	8928
1 mM		5781	3922		11252	9676
0,5 ng	4851			10828		
5 ng	20342			17750		
bazální	2311			8522		

Příklad 7

Esterifikace in vitro

Při tomto testu se míra inzulinem stimulovatelné esterifikace měří na transformaci glycerin-3-fosfátu na lipidové produkty /triglyceridy, fosfolipidy/. Této esterifikace se zúčastňují enzymy lipidové syntézy /např. Acyl-CoA: L-glycerin-3-fosfát acyltransferáza/ včetně inzulinem indikované kaskády přenosů signálů. Transport glukózy přitom nehraje žádnou roli, jak to dokazuje chybějící inhibice esterifikace cytochalasinem B.

Kryší tukové buňky, získané postupem, popsáním v příkladu 5, se inkubují s D-glukózou /koncová koncentrace 33 μ M/ v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulinu a peptidu, načež se za účelem permeabilizace plazmatickou membránou /bez porušení vnitřních membrán/ zpracují nízkými koncentracemi saponinu. Po přidání L-[U-¹⁴C]glycerin-3-fosfátu se v inkubaci pokračuje. Potom se přidá v toluenu rozpustné scintilační činidlo a lipid se od vodné fáze oddělí odstředěním. Toluenní fáze obsahující lipid se odstraní a stanoví se její radioaktivita. Získané výsledky jsou uvedené v následující tabulce 3.

Tabulka 3

Esterifikace tukovými buňkami

	Inzulin [dpm]	pTripetid [dpm]
5		
	0,1 mM	3710
10	0,5 mM	4422
	1 mM	5398
	0,5 ng	-
	5 ng	3640
	bazální	3842
15		

Příklad 8

20 Lipogeneze

Krysí tukové buňky, získané postupem podle příkladu 5, se zpracují nízkými koncentracemi trypsinu za účelem proteolytické inaktivace inzulinových receptorů. Po přidavku proteáze-inhibitorů se tukové buňky dvakrát promyjí flotací a v inkubaci se pokračuje po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Tyto buňky se potom použijí pro test na stimulaci lipogeneze peptidy. Kontrolní inkubace s inzulinem ukazuje, že trypsinem ošetřené buňky vykazují jen velmi malou inzulinem stimulovanou lipogenezi a tím i jen ohraničený počet funkčních inzulinových receptorů (s ohledem na vázání insulínu). Tento test takto měří stimulaci lipogeneze zásahy do inzulinem indikované kaskády přenosu signálů po vázání insulínu jeho receptory. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tabulka 4

35 Lipogeneze

	Inzulin [dpm]	Tripeptid [dpm]
40		
	0,1 mM	3250
	0,5 mM	4145
	1 mM	5072
	5 ng	3087
45	0,5 ng	-
	bazální	2355

50 Příklad 9

Profil krevní glukózy u myši

Myši samičky Charles River Wiga Balb-C s tělesnou hmotností 17 až 21 g /stáří asi 30 dnů/ dostávaly standardní potravu. 16 hodin před započítáním testu již myši nedostaly žádnou potravu. Skupinám po 5 pokusných zvířatech byl intravenózně podán vodný roztok (pH 6) sloučeniny z příkladu 4 (oktapeptid). Aplikační objem činil 0,3 ml/zvíře.

Tabulka 5 ukazuje hodnoty krevní glukózy v procentech jako rozdíl mezi kontrolní skupinou /5 pokusných zvířat; aplikován pouze roztok pufru pH 6 v aplikačním objemu 0,3 ml/zvíře) a skupinou zvířat, kterým byl aplikován oktapeptid. V tabulce je uvedena vždy pro každou skupinu průměrná hodnota.

Tabulka 5

Profil krevní glukózy

Čas [minuty]	Oktapeptid [%]	
	500 µg/zvíře	1000 µg/zvíře
20	-2	-31
40	-5	-19
60	-13	-23
75	-21	-24
90	-21	-19

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptidy, vybrané ze skupiny, zahrnující Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn, acetyl-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH, Asn-Tyr-Cys-Asn a peptid obecného vzorce II

X-Q-Cys-D (II),

kde

Q značí Tyr, His nebo Nal,
 D značí Asp, Asn, D-Asp, D-Asn, β-Ala nebo Azagly-NH₂, a
 X značí
 a) vodíkový atom nebo
 b) skupiny (C₁-C₁₈)-alkyl-C

$$\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$$

a stereoizomerní formy nebo fyziologicky přijatelné soli peptidu obecného vzorce II.

2. Peptid podle nároku 1 se sekvencí Asn Tyr Cys Asn nebo Tyr Cys Asn.

3. Farmaceutický prostředek pro ošetření diabetes mellitus, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství alespoň jednoho peptidu podle nároku 1 nebo 2 v rozpuštěné, amorfní nebo krystalické formě.

4. Způsob výroby peptidů podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se

a) uvede v reakci segment s C–koncovou volnou karboxylovou skupinou nebo jeho
5 aktivovaný derivát s odpovídajícím segmentem s N–koncovou volnou aminoskupinou,
nebo se

b) peptid postupně zkonstruuje,

a sloučenina získaná ve stupni a) nebo b) se případně zbaví jedné nebo více dočasně zavedených
10 ochranných skupin pro ochranu ostatních funkcí a takto získané sloučeniny se případně převedou
na jejich fyziologicky přijatelné soli.

5. Použití alespoň jednoho peptidu podle nároku 1 nebo 2 pro výrobu léčiv pro léčení diabetes
15 mellitus nebo na inzulinu nezávislé cukrovky.

20

Konec dokumentu
