



ORAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

199674  
(11) (B2)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 C 103/52

(22) Přihlášeno 05 05 77  
(21) (PV 207-79)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 11 05 76  
(19327/76) Velká Británie

(40) Zveřejněno 31 10 79

(45) Vydáno 15 07 83

(72)  
Autor vynálezu

DUTTA ANAND SWAROOP, FURR BARRINGTON JOHN ALBERT  
a GILES MICHAEL BRIAN, MACCLESFIELD (Velká Británie)

(73)  
Majitel patentu

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, LONDÝN (Velká Británie)

## (54) Způsob výroby polypeptidů

1

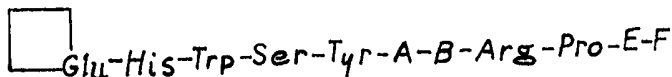
Vynález se týká způsobu výroby polypeptidů vykazujících vlastnosti agonistů luliberinu. Luliberin je mezinárodně přijatý triviální název pro faktor uvolňující luteinizační hormon (LH-RF) (viz J. Biol. Chem., 1975, 250, 3215).

Je již známo (viz Dutta, Furr, Giles a Morley, Clinical Endocrinology, 1976, 5 Supplement, str. 291s—298s), že substitučním zavedením  $\alpha$ -aza-aminokyselin do poloh 6 nebo 10 luliberinu se získají sloučeniny, které jsou méně účinné než základní molekula co do schopnosti uvolňovat luteinizační hormon

2

(LH) z hypofýzy. Nyní bylo zjištěno, že substituční zavedení azaglycinu do polohy 10 spojené se substitučním zavedením různých D- $\alpha$ -aminokyselin do polohy 6-luliberinu nebo substituční zavedení azaglycinu nebo azalaninu do polohy 6 luliberinu spojené s náhradou terminálního glycinamidu v luliberinu ethylaminoskupinou vede ke sloučeninám, které jsou účinnější než luliberin z hlediska jejich schopnosti uvolňovat luteinizační hormon.

V souhlase s tím popisuje vynález způsob výroby polypeptidů obecného vzorce I



(I)

ve kterém

A znamená D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala nebo D-Trp,  
B představuje Leu nebo MeLeu,  
E znamená Azgly a  
F představuje aminoskupinu, nebo  
A znamená Azgly nebo Azala,  
B představuje Leu,  
E je přímá vazba a  
F znamená ethylaminoskupinu

a jejich farmaceuticky nebo veterinárně upotřebitelných adičních solí s kyselinami.

Ve shora uvedeném obecném vzorci I a v celém textu jsou zbytky aminokyselin označovány svými standardními zkratkami (viz Pure and Applied Chemistry, 1974, 40, 317 až 331). Zbytkem  $\alpha$ -aza-aminokyseliny je takový zbytek, v němž  $\alpha$ -CH-skupina aminokyseliny je nahrazena dusíkem. Zkratka  $\alpha$ -aza-aminokyseliny se odvozuje od zkratky odpovídající aminokyseliny zařazením prefixu

„Az“. Tak tedy Azgly představuje azaglycin a Azala znamená azalanin. V případech, kde není uvedena konfigurace příslušné aminokyseliny, má tato aminokyselina (s výjimkou  $\alpha$ -aza-aminokyselin, které v sousedství karboxylové skupiny neobsahují žádné centrum asymetrie) přírodní  $\alpha$ -konfiguraci. Rovněž zkratky Me a Bu<sup>t</sup> jsou v daném oboru běžné a standardně používané a představují methylovou resp. terc.butylovou skupinu.

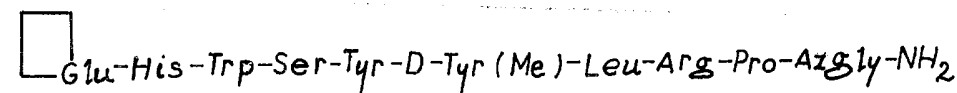
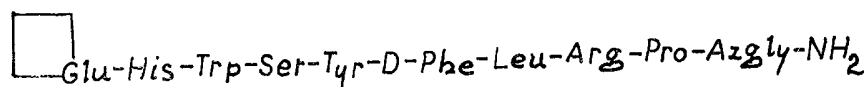
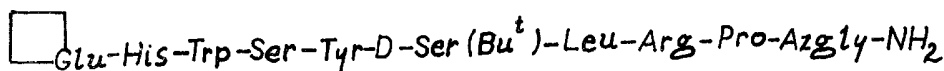
Zvlášť vhodnými skupinami sloučenin vyráběných způsobem podle vynálezu jsou:

látky shora uvedeného obecného vzorce I, ve kterém

A znamená D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala nebo D-Trp,  
B představuje Leu nebo MeLeu,  
E znamená Azgly a  
F představuje aminoskupinu;

látky shora uvedeného obecného vzorce I, ve kterém

A znamená Azgly nebo Azala,



Vhodnými farmaceuticky nebo veterinárně upotřebitelnými adičními solemi sloučenin vyráběných způsobem podle vynálezu s kyselinami jsou například hydrochloridy, fosfáty, citráty nebo acetáty.

Způsob podle vynálezu spočívá v odštěpení jedné nebo několika běžných chránicích skupin peptidů z příslušného chráněného polypeptidu, za vzniku sloučeniny obecného vzorce I.

Při práci způsobem podle vynálezu může výchozí materiál obsahovat tolik chránicích skupin, kolik nese zbytků potřebujících chránění, jako například některé nebo všechny zbytky vyskytující se v produktu jako volné hydroxylové skupiny nebo bazické iminoskupiny.

Chránicemi skupinami používanými při práci způsobem podle vynálezu mohou být příslušné skupiny popsané ve standardních učebnicích chemie peptidů, jako jsou například M. Bodansky a M. A. Ondetti, „Peptide Synthesis“, Interscience, New York, 1966, kapitola IV; F. M. Finn a K. Hofmann, „The Proteins“, sv. II, redaktoři H. Neurath a R. L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1976,

B představuje Leu,  
E znamená přímou vazbu a  
F představuje ethylaminoskupinu;

látky shora uvedeného obecného vzorce I, ve kterém

A znamená D-Tyr(Me), D-Ser, D-ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala nebo D-Trp,  
B představuje Leu nebo MeLeu,  
E znamená Azgly a  
F představuje aminoskupinu.

Výhodnou skupinu sloučenin vyráběných způsobem podle vynálezu tvoří látky shora uvedeného obecného vzorce I, ve kterém

A znamená D-Tyr(Me), D-Ser(Bu<sup>t</sup>) nebo D-Phe,  
B představuje Leu nebo MeLeu,  
E znamená Azgly a  
F představuje aminoskupinu.

Tři výhodné sloučeniny vyráběné způsobem podle vynálezu mají následující struktury:

str. 106, „Amino-acids, Peptides and Proteins“ (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, London, sv. 1 až 8. Ve shora uvedených publikacích jsou rovněž popsány různé metody odštěpování chránicích skupin.

Zvlášť vhodnou chránicí skupinou iminoskupiny je benzyloxykarbonylová skupina a zvlášť vhodnou chránicí skupinou hydroxylové skupiny je skupina benzylová. Obě tyto chránicí skupiny je možno snadno odštěpit hydrogenolýzou, například v přítomnosti paládia na uhlí jako katalyzátoru.

Další zvlášť vhodnou chránicí skupinou iminoskupiny je terc.butoxykarbonylová skupina a další zvlášť vhodnou chránicí skupinou hydroxylové skupiny je skupina terc.butylová. Obě tyto skupiny je možno snadno odštěpit působením kyseliny, jako chlorovodíku nebo trifluoroctové kyseliny.

Další zvlášť vhodnou chránicí skupinou iminoskupiny je benzyloxykarbonylová nebo terc.butoxykarbonylová skupina a zvlášť vhodnou chránicí skupinou hydroxylové skupiny skupina terc.butylová. Tyto chránicí

skupiny lze snadno odštěpit působením bromovodíku v kyselině octové.

Výchozí materiály pro práci způsobem podle vynálezu je možno připravit ze známých sloučenin standardními kondenzačními reakcemi z chemie peptidů, standardním zaváděním chránicích skupin, známých z chemie peptidů a standardním odštěpováním chránicích skupin, známých z chemie peptidů. Tyto reakce jsou popsány například v níže uvedených příkladech 1 a 2.

Jak již bylo uvedeno výše, vykazují sloučeniny, které je možno vyrobit způsobem podle vynálezu vlastnosti agonistů luliberinu, tj. napodobují působení luliberinu. Luliberin je přírodní hormon vylučovaný hypothalamem, který působí na hypofýzu tak, že hypofýza uvolňuje luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH). Tyto dva hormony hypofýzy řídí reprodukční procesy, přičemž posledně jmenovaný, folikulostimulační hormon, působí na vaječníky v tom smyslu, že napomáhá zrání folikulů, a prvně zmíněný, luteinizační hormon, vyvolává ovulaci. Sloučeniny obecného vzorce I jsou neočekávatelně účinnější než luliberin pokud jde o schopnost uvolňovat luteinizační hormon, a jsou proto užitečné pro řízení a/nebo zlepšování reprodukce u živočichů. Zmíněné sloučeniny jsou zejména užitečné pro množení velkých domácích zvířat během anestro a při všech typech umělé inseminace k přesnějšímu řízení doby ovulace. Sloučeniny podle vynálezu mohou být rovněž používány k zlepšení infertility u mužů a žen.

Agonistické vlastnosti popisovaných sloučenin vůči luliberinu je možno prokázat například jejich schopností vyvolat ovulaci u krysa s konstantním esterem, sterilizovaných androgenem, nebo jejich schopností uvolňovat luteinizační hormon a folikulostimulační hormon, měřeno dvojitou radioimunologickou zkouškou na protilátky v krevní plasmě nedospělých krysích samců nebo v krevní plasmě anestrálních nebo diestrálních ovcí.

Shora zmíněný test na kryších sterilizovaných androgenem se provádí následovně:

Androgenem sterilizované krysy samice, připravené podáním 100  $\mu$ g testosteron-propionátu krysám ve třetím, čtvrtém a pátém dnu věku, mají trvalý estrus, jak je možno prokázat vaginálními výtěry a přítomností četných preovulačních folikulů ve vaječnicích. Aplikace luliberinu a jeho aktivních analogů způsobí uvolnění ovulační dávky luteinizačního hormonu a folikulostimulačního hormonu, což je možno prokázat přítomností vajíček ve vejcovodech a čerstvých žlutých tělískách ve vaječnicích.

Všechny sloučeniny jmenované v tomto textu jsou účinnější než luliberin co do jejich schopnosti vyvolávat ovulaci u krysa s konstantním esterem a mimoto nevykazují žádné známky toxicity při podání v dávce nejméně čtyřnásobně vyšší než je jejich mi-

nimální účinná dávka. Zejména pak výhodné sloučeniny podle vynálezu, což jsou látky uvedené v příkladech 6, 8 a 9, jsou zhruba stokrát účinnější než luliberin a nemají žádné toxické účinky při podání v dávce stonásobně vyšší než je jejich minimální účinná dávka. Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu je možno používat ve formě farmaceutických nebo veterinárních prostředků obsahujících jako účinnou látku sloučeninu vyrobenou způsobem podle vynálezu, v kombinaci s farmaceuticky nebo veterinárně upotřebitelným ředidlem nebo nosičem.

Tento prostředek může být například ve formě vhodné k orální nebo perlinguální aplikaci, například ve formě tablety, kapsle, roztoku či suspenze, k nasální aplikaci, například ve formě šňupacího prášku, nosního spreje nebo nosních kapek, k vaginální nebo rektální aplikaci, například ve formě čípků, nebo k parenterální aplikaci, například ve formě sterilního injekčního roztoku nebo suspenze.

Obecně je možno shora uvedené prostředky připravovat obvyklým způsobem za použití běžných pomocných látek, v případě prostředků k orální aplikaci však může být výhodné opatřit prostředek povlakem chránícím polypeptidickou účinnou komponentu před účinkem enzymů v žaludku.

Popisované prostředky mohou kromě polypeptidu vyrobeného způsobem podle vynálezu obsahovat ještě jedno nebo několik známých léčiv vybraných ze skupiny zahrnující prostaglandinové deriváty, například prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , cloprostenol nebo fluprostenol, a další léčiva, jako clomiphene nebo tamoxifen.

Výhodným prostředkem je preparát k orálnímu podání v jednotkové dávkovací formě, například tableta, kapsle, kapky nebo bolus, obsahující v každé jednotkové dávce od 2,5 do 500 mg, s výhodou od 10 do 100 mg, polypeptidu, nebo preparát vhodný k parenterálnímu podání, obsahující od 5  $\mu$ g do 1 mg polypeptidu na 1 ml roztoku, s výhodou od 10  $\mu$ g do 100  $\mu$ g polypeptidu na 1 ml roztoku.

Prostředkem k parenterálnímu podání je s výhodou roztok v isotonickém solném nebo isotonickém dextrózovém roztoku, popřípadě pufovaný na pH 5 až 9. Prostředek k parenterálnímu podání může být alternativně ve formě, z níž se účinná látka postupně pomalu uvolňuje, v kterémžto případě je množství polypeptidu na jednotkovou dávku obecně vyšší než při použití běžných injekčních preparátů. Výhodný prostředek k parenterálnímu podání s pomalým uvolňováním účinné látky obsahuje v jednotkové dávce od 100  $\mu$ g do 1,00 mg polypeptidu.

Popisované prostředky se normálně aplikují tak, aby při orálním podání činila denní dávka od 50  $\mu$ g/kg do 20 mg/kg a denní dávka při parenterálním podání, například

intravenózní, subkutánní či intramuskulární injekcí nebo infusí, se pohybovala od 0,2  $\mu\text{g/kg}$  do 100  $\mu\text{g/kg}$ . U lidí odpovídá toto dávkování celkové denní dávce od 3,5 mg do 1,4 g při orálním podání a celkové denní dávce od 14  $\mu\text{g}$  do 7 mg při podání parenterálním. Při aplikaci prostřednictvím sliznic se dávky pohybují mezi výše zmíněnými dávkami pro orální a parenterální podání.

Vynález ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

V příkladech uváděné hodnoty  $R_f$  se týkají vzestupné chromatografie na tenké vrstvě silikagelu. Rozpouštědlovými systémy používanými při této chromatografii jsou systémy

1-butanol - kyselina octová - voda (4:1:5 objem/objem) ( $R_fA$ ),

1-butanol - kyselina octová - voda - pyridin (15:3:12:10 objem/objem) ( $R_fB$ ),

2-butanol-3% [hmotnost/objem] vodný roztok hydroxidu amonného (3:1 objem/objem) ( $R_fC$ ),

acetonitril - voda (3:1 objem/objem) ( $R_fD$ ),

aceton - chloroform (1:1 objem/objem) ( $R_fE$ ),

chloroform - ethanol (1:4 objem/objem) ( $R_fF$ ),

cyklohexan - ethylacetát (1:1 objem/objem) ( $R_fG$ ),

cyklohexan - ethylacetát - methanol (1:1:1 objem/objem) ( $R_fH$ ),

chloroform - methanol - voda (11:8:2 objem/objem) ( $R_fK$ ),

chloroform - methanol (19:1 objem/objem) ( $R_fP$ ),

a chloroform - methanol (9:1 objem/objem) ( $R_fQ$ ).

Ve všech případech se chromatografické desky zkoumají v ultrafialovém světle a detekují se fluorescaminem, ninhydrinem a chlor-škrob-jodovým činidlem. Pokud není uvedeno jinak, znamená uvedení symbolu  $R_f$ , že při těchto postupech byla detekována pouze jediná skvrna.

Kyselé hydrolyzáty všech produktů v příkladech se získávají záhřevem peptidu nebo chráněného peptidu s 6 N kyselinou chlorovodíkovou obsahující 1 % hmotnost/objem) fenolu v zatavené evakuované ampuli na teplotu 100 °C po dobu 16 hodin. Složení aminokyselin v každém hydrolyzátu se stanovuje ze pomoci analyzátoru aminokyselin (LoCarte) a ve všech případech je v souladu s očekávaným složením.

Výraz „zpracuje se obvyklým způsobem“, používaný v příkladech, znamená, že po reakci se všechny pevné podíly odfiltrují, filtrát se odpaří k suchu při teplotě pod 40 °C, zbytek se rozpustí v ethylacetátu, roztok se promyje 20% roztokem kyseliny citrónové, vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a znovu vodou, vysuší se bezvodým síranem sodným a ethylacetát se odpaří ve vakuu, čímž se získá žádaná sloučenina.

#### Příklad 1 a 2

Syntéza L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptofyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-B-L-arginyl-L-prolyl-azaglycinamidu

Obecný postup (o) schémata 1 a 2)

50 mg chráněného decapeptidického derivátu [obsahujícího Ser( $\text{Bu}^t$ ) v poloze 6 nebo Tyr( $\text{Bu}^t$ ) v poloze 5] se rozpustí v 5 ml 90% (objem/objem) vodné kyseliny trifluoroctové, přidají se 3 kapky  $\beta$ -merkptoethanolu a roztok se nechá 45 minut stát při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a zbytek se lyofilizuje jednou z vody a dvakrát z terc.butanolu. Výtěžek činí 90 až 100 %.

Sloučeniny podle vynálezu, připravené tímto způsobem, jsou uvedeny v příkladech 1 a 2, shrnutých do následující tabulky:

Tabulka

| Příklad A<br>číslo | B     | E     | F     | Postup          | Výtě-<br>žek<br>(%) | Papírová elektroforéza R <sub>f</sub> A<br>R <sub>f</sub> (vztaženo na luliberin) |        |              |
|--------------------|-------|-------|-------|-----------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------|
|                    |       |       |       |                 |                     | pH 2,1                                                                            | pH 6,5 |              |
| 1                  | D-Ser | Leu   | argly | NH <sub>2</sub> | o                   | 95                                                                                | 0,94   | 0,96         |
| 2                  | D-Phe | MeLeu | argly | NH <sub>2</sub> | o                   | 46                                                                                | 0,84   | 0,87         |
|                    |       |       |       |                 |                     |                                                                                   |        | 0,25<br>0,35 |

Výchozí látky pro použití ve shora uvede-  
ném postupu je možno připravit podle násle-  
dujících schémat 1 a 2 [postup (o)].

V těchto schématech se používají následu-  
jící zkratky:

OC<sub>p</sub> = 2,4,5-trichlorfenylester

Bzl = benzyl  
Z = benzyloxykarbonyl  
Boc = terc.butoxykarbonyl  
DMF = dimethylformamid

Čísla v kroužcích označují příslušné re-  
akční stupně popsané dále.



## S c h e m a 2

[illegible]

Stupeň (4)

N-terc.butoxykarbonylderivát se rozpustí v ethylacetátu a nechá se 1 hodinu reagovat při teplotě místnosti s 3 N chlorovodíkem v ethylacetátu (4 ekvivalenty).

Stupeň (39)

Pracuje stejně jako u postupu

(4)

Stupeň (49)

5,4 mmol methylesteru L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptofyl-L-serinu se rozpustí v 70 mililitrech dimethylformamidu a roztok se nechá 4 hodiny reagovat se 100 mmol hydrazinhydrátu. Dimethylformamid se odpaří ve vakuu, zbytek se trituruje s ethanolem, produkt se shromáždí, promyje se ethanolem a etherem, a vysuší se. Získá se produkt o teplotě tání 184 až 189 °C. Výtěžek činí 88,2 procenta;

$R_fA=0,18,$   
 $R_fB=0,55,$   
 $R_fC=0,39,$   
 $R_fD=0,27,$   
 $R_fK=0,58.$

Stupeň (56) [A=D-Tyr(Me)]

Roztok 3,17 g (9,64 mmol) Z-D-Tyr(Me)-OH, 1,92 g (10,6 mmol) H-Leu-OH.HCl, 2,6 gramu (19,2 mmol) 1-hydroxybenzotriazolu a 1,6 ml (11 mmol) triethylaminu ve 30 ml dimethylformamidu se ochladí na 0 °C a přidá se k němu 2,29 g (11,1 N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě 4 °C, načež se obvyklým způsobem zpracuje. Po překrystalování z horkého cyklohexanu se získá chráněný dipeptidický derivát ve výtěžku 1,41 g (95,2 %);

$R_fD=0,83,$   
 $R_fE=0,69,$   
 $R_fP=0,72,$   
 $R_fQ=0,76.$

Stupeň (59) [A=D-Tyr(Me)]

K roztoku 4,59 g (6,4 mmol) Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-Leu-OMe ve 25 ml dimethylformamidu a 50 ml methanolu se přidá 12,9 mmol hydrazinhydrátu a směs se nechá přes noc stát při teplotě místnosti. Methanol se odpaří ve vakuu, produkt se vysráží vodou, shromáždí se, promyje se vodou a vysuší se. Teplota tání činí 212 až 213 °C,

$R_fE=0,49,$   
 $R_fF=0,66,$   
 $R_fH=0,69,$   
 $R_fQ=0,70.$

Stupně (60) a (61) [A=D-Tyr(Me)]

3,54 g (5,0 mmol) hydrazidu ze stupně

(59)

se rozpustí v 10 ml dimethylformamidu, roztok se za míchání ochladí na -20 stupňů Celsia a přidá se k němu nejprve 3,38 mililitrů (20 mmol) 5,9 M chlorovodíku v dioxanu a pak 0,6 ml (5,25 mmol) terc.butyl-nitritu. Po 2 minutách se přidá předem ochlazený roztok 2,04 g (5 mmol) H-Arg-(NO<sub>2</sub>)-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub>.HCl a 3,55 ml triethylaminu (25 mmol) v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračuje přes noc při teplotě 4 °C. Reakční směs se obvyklým způsobem zpracuje a surový produkt se vyčistí chromatografií na sloupci silikagelu za použití chloroformu, 5% (objem/objem) methanolu v chloroformu a 10% (objem/objem) methanolu v chloroformu jako elučních činidel. Výtěžek produktu činí 3,72 g (70,9 procenta);

$R_fA=0,64,$   
 $R_fB=0,72,$   
 $R_fC=0,55,$   
 $R_fD=0,66,$   
 $R_fF=0,40,$   
 $R_fH=0,52.$

Stupeň (62) [A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>)]

Pracuje se stejně jako ve stupni

(56)

Produkt se krystaluje z vodného methanolu. Výtěžek činí 90,4 %; teplota tání 107 až 108 stupňů Celsia,

$R_fD=0,80,$   
 $R_fE=0,68,$   
 $R_fF=0,73,$   
 $R_fH=0,72,$   
 $R_fP=0,72,$   
 $R_fQ=0,74.$

Stupeň (63) [A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>)]

Pětihodinová katalytická redukce v přítomnosti 5% (hmotnost/hmotnost) paládia na uhlí, ve směsi dimethylformamidu a vody (8:2).



Stupeň (64)  $[A = D-Ser (Bu^t)]$ 

Roztok 19,17 g (32,7 mmol) Z-Tyr(Bzl)-OCp a 32,7 mmol H-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Leu-OMe ve 100 ml dimethylformamidu se nechá 72 hodiny stát při teplotě místnosti. Obvyklým zpracováním se získá pevný produkt, který se shromáždí, promyje se etherem a vysuší se. Výtěžek činí 17,6 g (79 %); teplota tání 135 až 137 °C,

$R_D = 0,80$ ,  
 $R_H = 0,77$ ,  
 $R_Q = 0,81$ .

Stupeň (65)  $[A = D-Ser (Bu^t)]$ 

Pracuje se stejně jako ve stupni (59)

Produkt se překrystaluje z vodného methanolu. Výtěžek činí 56,2 %; teplota tání 134 až 136 °C,

$R_D = 0,66$ ,  
 $R_H = 0,64$ ,  
 $R_Q = 0,64$ .

Stupně (66) a (67)  $[A = D-Ser (Bu^t)]$ 

Pracuje se stejně jako ve stupních

(60) a (61)

Produkt se vyčistí chromatografií na sloupci silikagelu za použití chloroformu a 5% (objem/objem) methanolu v chloroformu jako elučních činidel. Výtěžek produktu činí 38,5 %; teplota tání 142 až 145 °C,

$R_A = 0,64$ ,  
 $R_B = 0,71$ ,  
 $R_O = 0,55$ ,  
 $R_D = 0,65$ ,  
 $R_F = 0,46$ ,  
 $R_H = 0,43$ ,  
 $R_Q = 0,16$ .

Stupeň (74)

K roztoku 5,99 g (20 mmol) Z-Phe-OH a 2,2 ml (20 mmol) N-methylmorpholinu v 60 ml dimethylformamidu, ochlazenému na -15 °C, se přidá 1,8 ml (18 mmol) chlormravenčanu ethylnatého. Po 2 minutách se přidá roztok 4,8 g (20 mmol) H-MeLeu-OMe.HBr a 2,8 ml (20 mmol) triethylaminu ve 20 ml dimethylformamidu, předem ochlazený na -15 °C a reakční směs se míchá nejprve 30 minut při teplotě 0 °C a pak přes noc při teplotě místnosti, načež se zpracuje obvyklým

způsobem. Výtěžek olejovitého produktu činí 7,54 g (90 %).

Stupeň (75)

Tříhodinová katalytická redukce v methanolu obsahující ekvivalent chlorovodíku, v přítomnosti 5% (hmotnost/hmotnost) paládia na uhlí.

Stupeň (76)

Stejným postupem jako ve stupni (74)

se kondenzuje 16,02 g (43,2 mmol) Z-Tyr-(Bu<sup>t</sup>)-OH a 13,15 g (40,0 mmol) H-D-Phe-MeLeu-OMe.HCl. Produkt se vyčistí chromatografií na sloupci silikagelu za použití chloroformu a 5% (objem/objem) methanolu v chloroformu jako elučních činidel. Výtěžek olejovitého produktu činí 60 %;

$R_G = 0,48$ ,  
 $R_P = 0,71$ ,  
 $R_Q = 0,73$ .

Stupeň (77)

Roztok 6,52 g (0,76 mmol) Z-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-D-Phe-MeLeu-OMe a 97,6 mmol hydrazinhydrátu v 50 ml methanolu se nechá přes noc stát při teplotě místnosti, načež se methanol odpaří ve vakuu. Hydrazid se krystaluje ze směsi methanolu a etheru, promyje se směsí methanolu a vody (1:1 objem/objem) a etherem, a vysuší se. Výtěžek produktu činí 5,2 g (80 %); teplota tání 135 °C,

$R_D = 0,75$ ,  
 $R_E = 0,69$ ,  
 $R_F = 0,66$ ,  
 $R_H = 0,79$ ,  
 $R_Q = 0,73$ .

Stupně (78) a (79)

Pracuje se stejně jako ve stupních

(60) a (61)

Při zpracování se produkt vysráží ethylacetátem, odfiltruje se, promyje se ethylacetátem a etherem, a vysuší se. Výtěžek činí 58,5 %; teplota tání 145 až 148 °C,

$R_D = 0,72$ ,  
 $R_F = 0,40$ ,  
 $R_H = 0,53$ ,  
 $R_Q = 0,18$ .

## Příklady 3 až 12

Za použití obecného postupu popsaného v příkladech 1 a 2 je možno připravit následující sloučeniny:



Glu-His-Trp-Ser-A-B-Arg-Pro-E-F

| Příklad<br>číslo | A                       | B     | E     | F                               | Papírová<br>elektroforéza<br>R <sub>f</sub> (vztaženo na<br>luliberin) |        | R <sub>f</sub> A |
|------------------|-------------------------|-------|-------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------|------------------|
|                  |                         |       |       |                                 | pH 2,1                                                                 | pH 6,5 |                  |
| 3                | Azgly                   | Leu   | —     | NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | 0,98                                                                   | 1,03   | 0,28             |
| 4                | Azala                   | Leu   | —     | NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | 0,97                                                                   | 1,0    | 0,30             |
| 5                | D-Ala                   | Leu   | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 0,97                                                                   | 1,0    | 0,30             |
| 6                | D-Phe                   | Leu   | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 1,0                                                                    | 0,71   | 0,27             |
| 7                | D-Trp                   | Leu   | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 0,53                                                                   | 0,37   | 0,37             |
| 8                | D-Tyr(Me)               | Leu   | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 0,92                                                                   | 0,87   | 0,25             |
| 9                | D-Ser(Bu <sup>t</sup> ) | Leu   | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 0,94                                                                   | 0,96   | 0,25             |
| 10               | D-Tyr(Me)               | MeLeu | Azgly | NH <sub>2</sub>                 | 0,87                                                                   | 0,90   | 0,34             |

### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby polypeptidů obecného vzorce I



Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F

(I)

ve kterém

A znamená D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala nebo D-Trp,  
B představuje Leu nebo MeLeu,  
E znamená Azgly a  
F představuje aminoskupinu, nebo  
A znamená Azgly nebo Azala,  
B představuje Leu,  
E je přímá vazba a  
F znamená ethylaminoskupinu,

a jejich farmaceuticky a veterinárně upotřebitelných adičních solí s kyselinami, vyznačující se tím, že se odštěpí jedna nebo několik chránících skupin běžných v chemii peptidů z příslušného chráněného polypeptidu, za vzniku sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I, načež se popřípadě výsledný produkt v neprotonované formě reakcí s kyselinou poskytující farmaceuticky nebo veterinárně upotřebitelný anion převede na svoji sůl.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látka použije chráněný polypeptid, v němž chránící skupinou iminoskupiny je benzyloxykarbonylová sku-

pina a/nebo chránící skupinou hydroxylové funkce benzylová skupina.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látka použije chráněný polypeptid, v němž chránící skupinou iminoskupiny je terc.butoxykarbonylová skupina a/nebo chránící skupinou hydroxylové funkce terc.butyllová skupina.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látka použije chráněný polypeptid, v němž chránící skupinou iminoskupiny je benzyloxykarbonylová nebo terc.butoxykarbonylová skupina a/nebo chránící skupinou hydroxylové funkce terc.butyllová skupina.

5. Způsob podle bodů 1, 2 nebo 3, vyznačující se tím, že se použije výchozí polypeptid, v němž

A znamená D-Ser(Bu<sup>t</sup>),  
B představuje Leu,  
E znamená Azgly a

F představuje aminoskupinu, přičemž tento výchozí materiál rovněž obsahuje jednu nebo několik chránících skupin odštěpitelných hydrogenolýzou nebo působením chlo-  
rovodíku nebo kyseliny trifluoroctové.