

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

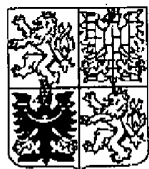
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2516-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 01. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.02.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/011425**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 11. 98**
(Věstník č. 11/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/00380**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/29126**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/575

(71) Přihlášovatel:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Bolin David Robert, Montclair, NJ, US;

Danho Waleed, Wayne, NJ, US;

Felix Arthur M., West Caldwell, NJ, US;

(74) Zástupce:

**Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy analogu VIP
a meziprodukty pro tuto přípravu**

(57) Anotace:

Způsob jednoduché, účinné a ekonomické
přípravy peptidového analogu Ac/1-31/-NH₂,
vasoaktivního intestinálního peptidu /VIP/,
který je relaxant/bronchodilator hladkého
svalstva, reguluje sekreci hlenu v dýchacích
cestách a má antialergické a antizánětlivé
charakteristiky, ze čtyř chráněných peptido-
vých fragmentů.

CZ 2516-98 A3

01-1497-98-Ho

Způsob přípravy analogu VIP a meziprodukty pro tento způsob

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy vasoaktivního intestinálního peptidového analogu $\text{Ac}(1-31)\text{-NH}_2$ ze čtyř chráněných peptidových segmentů.

Dosavadní stav techniky

Vasoaktivní intestinální peptid (VIP) je relaxant/bronchodilator hladkého svalstva, který reguluje sekreci hlenu v dýchacích cestách a má antialergické a antizánětlivé charakteristiky. Nejnovější studie vedly k objevu analogu VIP, který má zvýšenou metabolickou stabilitu a zvýšené receptorové vazné charakteristiky. Tento analog VIP je předmětem vynálezu, popsaného v evropské zveřejněné přihlášce vynálezu číslo 92/117,185.

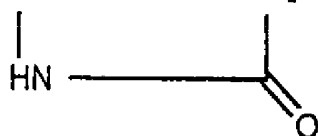
Až dosud se tento analog VIP připravuje použitím pevné fáze. Tento způsob přípravy s pevnou fází zahrnuje vázání alfa-aminokyseliny, chráněné například terc.-butyloxykarbonylovou skupinou (BOC), esterovou vazbou na chlormethylovanou pryskyřici nebo na hydroxymethylovou pryskyřici. Na pryskyřici se postupně váže několik aminokyselin. BOC chránicí skupina se z alfa aminokyseliny odstraňuje za kyselých podmínek a následně se chráněné aminokyseliny kopulují postupně k získání meziproduktu, kterým je chráněná peptidová pryskyřice. Chránicí skupiny se odstraní a peptid se oddělí od pryskyřice opakovanými fluorovodíkovými odštěpujícími reakcemi. Čištění peptidu je dvoustupňové a) gelovou chromatografií k exkluzi velikosti a b) preparativní vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tento několikastupňový proces je časově náročný a vede

Úkolem vynálezu je vyvinout poměrně jednoduchý, účinnější a ekonomičtější způsob syntézy analogu VIP.

Způsob přípravy analogu VIP Ac(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO:1)
spočívá podle vynálezu v tom, že se kopulují Fmoc chráněné
peptidové fragmenty.

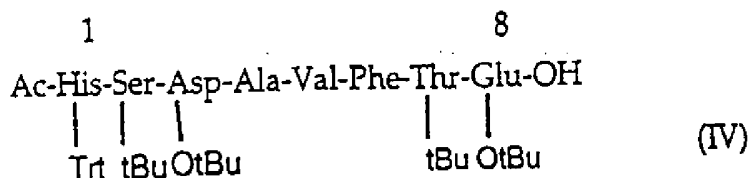
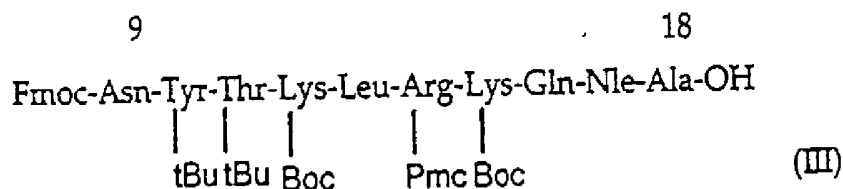
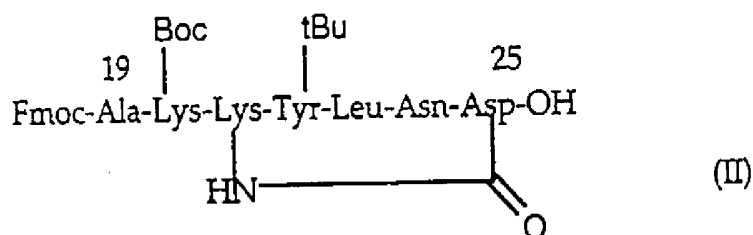
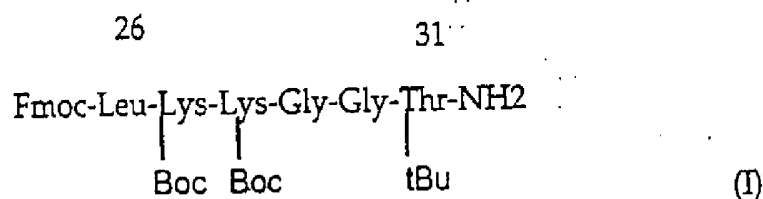
1 8 12 17
Ac-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Glu-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Arg-Lys-Gln-Nle-Ala

19 25 26 27 28 29 30 31
Ala-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Asp-Leu-Lys-Lys-Gly-Gly-Thr-NH₂



z chráněných peptidových fragmentů. S výhodou se při způsobu podle vynálezu kopulují Fmoc chráněné fragmenty, především se kopulují následující čtyři fragmenty: peptidový fragment I (SEQ ID NO:2), fragment II (SEQ ID NO:3), fragment III (SEQ ID NO:4) a peptidový fragment IV (SEQ ID NO:5). Nový způsob nevyžaduje dosud nutné čištění peptidových fragmentů preparativní chromatografií HPLC, které bylo nutné, když se analog připravoval způsobem pevné fáze, ani nevyžaduje čištění meziproduktů, vytvořených v průběhu syntézy cílového cyklického VIP analogu. Výsledný produkt se čistí v konečné fázi po ukončení jednoho kroku preparativní chromatografií.

Způsob podle vynálezu pro přípravu cyklického VIP analo-
gu AC(1-31)-NH₂ zahrnuje kopulaci dvou nebo několika chráně-
ných peptidových fragmentů. Výhodnými peptidovými fragmenty
jsou čtyři Fmoc chráněné fragmenty: peptidový fragment I (SEQ
ID NO:2), fragment II (SEQ ID NO:3), fragment III (SEQ ID
NO:4) a peptidový fragment IV (SEQ ID NO:5):



Způsob podle vynálezu přípravy sloučeniny Ac(1-31)-NH₂
(SEQ ID NO:1) kopulací čtyř chráněných peptidových fragmen-
tů, kterými jsou peptidový fragment I (SEQ ID NO:2), fragment
II (SEQ ID NO:3), fragment III (SEQ ID NO:4) a peptidový frag-
ment IV (SEQ ID NO:5) zahrnující (a) odstraňování chránicí
skupiny Fmoc z peptidového fragmentu I a kopulaci chráněné

skupiny zbaveného peptidového fragmentu I s chráněným peptidovým fragmentem II; b) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z peptidu získaného ve stupni (a) a kopulaci s chráněným peptidovým fragmentem III; c) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z peptidu získaného ve stupni (b) a kopulaci s chráněným peptidovým fragmentem IV; d) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z peptidu získaného ve stupni (c) k získání sloučeniny $Ac(1-31)-NH_2$, prosté chránicích skupin.

Chráněné peptidové fragmenty vzorce I až IV se volí se zřetelem na maximální kopulační účinnost a minimální racemizaci produktu v každé kopulační reakci. Používá se ekvivalentní množství každého fragmentu v každé kopulační reakci za vytvoření ekonomického způsobu získání cílového peptidu. Mezi produkty, vytvořené po každé kopulační reakci, se používají přímo pro následující kopulační reakci bez dalšího čištění.

Čistota každého fragmentu, produkovaného způsobem s pevnou fází, jak se uvádí, je 82 až 97 % po jednotlivém čistícím stupni podle analytické chromatografie HPLC a každého fragmentu se používá pro přípravu cyklického analogu VIP bez dalšího čištění.

Způsob podle vynálezu přípravy vyčištěné sloučeniny $Ac(1-31)-NH_2$ (SEQ ID NO:1) tedy zahrnuje: (a) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z peptidového fragmentu I (SEQ ID NO:2) a kopulaci chráněné skupiny zbaveného peptidového fragmentu I s chráněným peptidovým fragmentem II (SEQ ID NO:3) za získání chráněného peptidu $Fmoc(19-31)-NH_2$ (SEQ ID NO:6) jakožto meziprojektu; (b) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z meziprojektu $Fmoc(19-31)-NH_2$ a kopulaci meziprojektu $Fmoc(19-31)-NH_2$, zbaveného chránicích skupin, s chráněným fragmentem III (SEQ ID NO:4) za získání jako meziprojektu chráněného peptidu $Fmoc(9-31)-NH_2$ (SEQ ID NO:7), (c) odstraňování chránicí skupiny Fmoc z meziprojektu $Fmoc(9-31)-NH_2$ a kopulaci meziprojektu $Fmoc(9-$

31)-NH₂, zbaveného chránicích skupin s chráněným fragmentem IV (SEQ ID NO:5) za získání jako meziprojektu chráněného peptidu Ac(1-31)-NH₂; odstraňování chránicích skupiny z chráněného peptidu Ac(1-31)-NH₂; a čištění peptidu Ac(1-31)-NH₂, zbaveného chránicích skupin, například preparativní chromatografií HPLC.

Používaná nomenklatura k definování peptidů je v oboru běžně používanou nomenklaturou, přičemž aminoskupina na N-zakončení je vlevo a karboxylová skupina na C-zakončení je vpravo. Přírodními aminokyselinami se míní přírodně se vyskytující aminokyseliny v proteinech, například Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp a His. Pokud má aminokyselina izomerní formy, míní se aminokyselinou její L-forma, pokud není uvedeno jinak.

Pro prezentaci aminokyselin se používají například následující zkratky, kromě shora uvedených, chránicích skupiny, rozpouštědla a reakční činidla. Význam jednotlivých zkratk je následující:

Symbol	Význam
Ac	acetyl
Nle	norleucin
Fm	9-fluorenylmethyl
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid

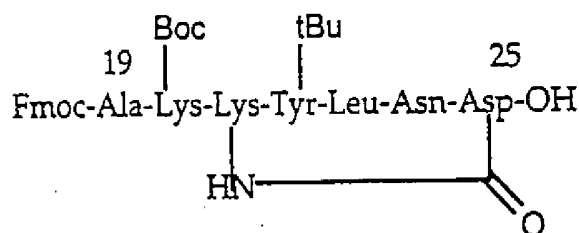
Připojené označení "-OH" a "-NH₂" za "VIP" se týká forem volné kyseliny a amidu polypeptidu. Pokud toto označení není uvedeno, zahrnuje výraz obě formy.

Zde definovaným cyklickým peptidem je peptid, přičemž karboxyzakončení vedlejšího řetězce aminokyseliny v peptidu je vázáno kovalentně na vedlejší řetězec aminozakončení jiné

aminokyseliny peptidového řetězce za vytvoření amidové vazby. Pro cyklické peptidy se používají různé nomenklatury a symboly. Příkladně se uvádějí:

- a. cyklo(Lys²¹-Asp²⁵)-Fmoc-Ala¹⁹-Lys(Boc)²⁰-Lys²¹-Tyr(tBu)²²-Leu²³-Asn²⁴-Asp²⁵-OH;
- b. Fmoc-(19-25)-OH;
- c. Fmoc-[Ala¹⁹-Asp²⁵]-VIP cyklo(21 → 25);
- d. [Fmoc-(SEQ ID NO:3)-OH];
- e. Fmoc-[Ala¹⁹-Asp²⁵]-VIP cyklo (Lys²¹→Asp²⁵);
- f. [Fmoc-(SEQ ID NO:3)-OH];

g.



Shora uvedené struktury (a-g) a presentace za použití "(SEQ ID NO:)" reprezentují vždy stejný peptid mající aminokyselinovou sekvenci odpovídající VIP peptidovému fragmentu, ve kterém je Fmoc skupina nahrazena vodíkem v N-zakončení. Přídavně se vytváří amidová vazba mezi vedlejším řetězcem karboxylového lysinu v poloze 21 a vedlejším řetězcem aminu asparagové kyseliny v poloze 25 za vytvoření cyklického peptidového fragmentu. Shora uvedené presentace pro peptidovou strukturu se považují za rovnocenné a zaměnitelné,

V cyklických peptidech podle vynálezu se používají následující konfigurace, pokud není uvedeno jinak.

Aminokyselina	Zakončení aminokyseliny
v řetězci	vázané k vytvoření cyklického peptidu
Lys	epsilon amino epsilon
Asp	beta karboxyl
Glu	gamma karboxyl

Peptidové fragmenty, které obsahuje VIP analog podle

vynálezu se mohou snadno připravovat o sobě známými běžnými způsoby pro vytváření peptidových vazeb mezi aminokyselinami. Takové běžné způsoby zahrnují například všechny způsoby v roztokové fázi umožňující kondenzaci mezi volnou alfa aminoskupinou aminokyseliny nebo jejího zbytku majícího své karboxylové nebo jiné reaktivní aminoskupiny chráněné a volnou primární karboxylovou skupinou jiné aminoskupiny nebo jejího zbytku mající své aminoskupiny nebo jiné reaktivní skupiny chráněné.

Způsob přípravy peptidových fragmentů, obsahujících VIP analog, se může provádět tak, že se přidávají aminokyseliny v žádoucím pořadí jedna, aminokyselina ke druhé aminokyselině nebo k jejímu zbytku způsobem, při kterém se peptidové fragmenty s žádanou aminokyselinovou sekvencí nejdříve obvyklým způsobem syntetizují a pak se kondenzují za získání žádaného peptidu.

Takový obvyklý způsob přípravy peptidových fragmentů zahrnuje například přípravu na jakékoliv pevné fázi. Při takovém způsobu se příprava peptidového fragmentu může provádět postupným vnášením žádaných aminokyselinových zbytků do rostoucího peptidového řetězce o sobě známými principy přípravy s pevnou fází (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, str. 2149 až 2154, 1963; Barany a kol., The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology, svazek 2, E. Gross a J. Meienhofer, vyd. Academic Press 1-284, 1980).

Při chemické přípravě peptidů je běžné chránění reaktivních skupin vedlejšího řetězce různých aminokyselinových podílů vhodnými chránicími skupinami, které brání průběhu chemických reakcí v místě až do chvíle odstranění takové chránicí skupiny. Je také dobře známo chránit alfa aminoskupinu aminokyseliny nebo jejího fragmentu, když molekula reaguje na karboxylové skupině, načež se selektivně odstraní skupina chránící alfa aminoskupinu a tím se na tomto místě umožní reakce.

Jakkoliv byly vyvinuty specifické chránicí skupiny pro způsob přípravy peptidů s pevnou fází, připomíná se, že je možno chránit každou aminokyselinu chránicími skupinami používanými pro přípravu v tekuté fázi.

Alfa aminoskupiny se mohou chránit vhodnými chránicími skupinami ze souboru zahrnujícího aromatické chránicí skupiny urethanového typu, jako je skupina benzyloxykarbonylová (Z) a substituovaná skupina benzyloxykarbonylová, jako jsou například skupina p-chlorbenzyloxykarbonylová, p-nitrobenzyloxykarbonylová, p-brombenzyloxykarbonylová, p-bifenylisopropoxykarbonylová, p-fluorenylmethyloxykarbonylová (Fmoc) a p-methoxybenzyloxykarbonylová (Moz) skupina; alifatické chránicí skupiny urethanového typu, jako jsou například skupina terc.-butyloxykarbonylová (Boc), diisopropylmethyloxykarbonylová, isopropoxykarbonylová a allyloxykarbonylová skupina. Jakožto nejvýhodnější skupina pro chránění alfa aminoskupiny se uvádí skupina Boc.

Karboxylové skupiny se mohou chránit vhodnými skupinami ze souboru zahrnujícího aromatické estery, například skupinu benzylovou (OBzl) nebo skupinu benzylovou substituovanou nižší alkylovou skupinou, atomem halogenu, nitroskupinou, thioskupinou nebo substituovanou thioskupinou například nižší alkylovou skupinou (s 1 až 7 atomy uhlíku), thioskupina, alifatický ester jako nižší alkyl, t-butyl (Ot-Bu), cyklopentyl, cyklohexyl (OcHx), cykloheptyl a 9-fluorenylmethyl (OFm). Obzvláště výhodnými chránicími skupinami pro glutamovou kyselinu (Glu) jsou skupina OBzl a OFm. Obzvláště výhodnými chránicími skupinami pro asparagovou kyselinu (Asp) jsou skupina OcHx, OBzl a OFm.

Hydroxylové skupiny se mohou chránit vhodnými skupinami ze souboru zahrnujícího ethery, jako jsou například skupina benzylová (Bzl) nebo skupina benzylová substituovaná nižší al-

kylovou skupinou, atomem halogenu, například 2,6-dichlorbenzylová skupina (DCB), nitroskupinou nebo methoxyskupinou, dále skupina terc.-butylová (t-Bu), tetrahydropyranylová a trifenylmethylová (tritylová) skupina. Obzvláště výhodnou chránicí skupinou pro serin (Ser) a threonin (Thr) je skupina Bzl. Obzvláště výhodnou chránicí skupinou pro tyrosin (Tyr) je skupina DCB.

Aminoskupiny vedlejšího řetězce se mohou chránit vhodnými chránicími skupinami ze souboru zahrnujícího aromatické chránicí skupiny urethanového typu, jako je skupina benzyloxykarbonylová (Z) a substituovaná skupina benzyloxykarbonylová, jako jsou například skupina p-chlorbenzyloxykarbonylová, 2-chlorbenzyloxykarbonylová (2-Cl-Z), p-nitrobenzyloxykarbonylová, p-brombenzyloxykarbonylová, p-bifenylisopropoxykarbonylová, 9-fluorenylmethoxykarbonylová (Fmoc) a p-methoxybenzyloxykarbonylová (Moz) skupina; alifatické chránicí skupiny urethanového typu, jako jsou například skupina terc.-butyloxykarbonylová (Boc), diisopropylmethoxykarbonylová, isopropoxykarbonylová a allyloxykarbonylová skupina. Jakožto nejvýhodnější skupina pro chránění ornithinu (Orn) se uvádí skupina Z. Jakožto nejvýhodnější skupina pro chránění lysinu (Lys) se uvádí skupina 2-Cl-Z a Fmoc.

Guanidinoskupiny se mohou chránit vhodnou chránicí skupinou ze souboru zahrnujícího nitroskupinu, p-toluensulfonylovou skupinu (Tos), skupinu Z, adamantyloxykarbonylovou skupinu a skupinu Boc. Nejvýhodnější skupinou pro chránění argininu (Arg) je Tos.

Amidoskupiny vedlejšího řetězce se mohou chránit xanthyllovou skupinou (Xan). Pro asparagin (Asn) a pro glutamin (Gln) neexistuje žádná výhodná chránicí skupina.

Imidazolové skupiny se mohou chránit vhodnými chránicími

skupinami ze souboru zahrnujícího skupinu p-toluensulfonylovou (Tos), 9-fluorenylmethyloxykarbonylovou (Fmoc) trifenylmethylovou (tritylovou), 2,4-dinitrofenylovou (Dnp), Boc a benzyloxymethylovou (Bom). Skupina Tos a Bom jsou nejvýhodnějšími chránícími skupinami pro histidin (His).

Jakožto chráněné aminokyseliny pro účely vynálezu se uvádějí příkladně Lys(Boc), Glu(OtBu) a Tyr(tBu).

Všechna rozpouštědla pro účely vynálezu včetně methanolu, methylenchloridu, acetonitrilu (CH_3CN), etheru, hexanu a dimethylformamidu jsou obchodní produkty společnosti Fischer nebo Burdick a Jackson. Trifluoroctová kyselina (TFA) je ochodním produktem společnosti Halocarbon a používá se přímo bez dalšího čištění. Diisopropylethylamin (DIPEA), 1,2-ethandithiol (EDT), dicyklohexylkarbodiimid (DCC), N-hydroxysukcinimid (HOSu) a thioanisol jsou obchodní produkty společnosti Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, WI). 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) je ochodním produktem společnosti Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI), 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorofosfát (HBTU) a benzotriazol-1-yloxy-tri(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfát (BOP) jsou obchodní produkty společnosti Richelieu Biotechnologies (St. Hyacinthe, Quebec, Kanada). 2-Methoxy-4-alkoxybenzylalkoholkopolystyren 1 % divinylbenzenu (pryskyřice Sasrin) je obchodní produkt společnosti Bachem Bioscience. Fmoc/tBu chráněné aminokyseliny jsou všechny v konfiguraci L a jsou obchodními produkty společnosti Bachem Inc. (Torrance, Ca).

Analytická vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) se provádí na jednotce LDC Constrametric IIG, vybavené jednotkami Gradient Master a spektromonitorem III UV-detektorem variabilních vlnových délek a na jednotce Lichrosorb RP-8 (5 μm) sloupec (4,6 mm x 25 cm), za použití jako elučního činidla: (A) 0,1M NaClO_4 (hodnota pH 2,5) - (B) CH_3CN , lineární gra-

dient 20 minut, průtok 1 ml/minuta, detekce 214 nm. HPLC chráněných meziproduktů, Fmoc-(19-31)-NH₂ a Fmoc(9-31)-NH₂ se provádí na jednotce Lichrosorb RP-8 (5 μm) sloupec (4,6 mm x 25 cm), za použití jako elučního činidla: (A) 0,1M NaClO₄ (hodnota pH 2,5)-(B) CH₃CN, lineární gradient 40 až 90% (B) 20 minut, průtok 1 ml/minuta, detekce 214 nm. HPLC chráněného Ac-(1-31)-NH₂ se provádí na též sloupci, za použití (B) CH₃CN: IPrOH (1:1); lineární gradient 60 až 95 % (B), 20 minut. HPLC cyklického VIP analogu se provádí na (i) Vydac C-18 sloupci, eluční činidlo: (A) H₂O (0,1 % TFA) - (B) CH₃CN (0,1 % TFA); lineární gradient 15 až 30 % (B), 20 minut; průtok 1 ml/minuta; detekce 214 nm (ii) Zorbax Protein Plus sloupec; eluční činidlo (A) H₂O (0,1 % TFA)-(B) CH₃CN (0,1 % TFA); lineární gradient 20 až 35 % (B) 20 minut; průtok 2 ml/minuta; detekce 210 nm (iii) Lichrosorb RP-8 (5 μm) sloupec; eluční činidlo (A) NaClO₄ (hodnota pH 2,5)-(B) CH₃CN, lineární gradient 30 až 50 % (B), 20 minut, průtok 1 ml/minuta, detekce 206 nm. Preparativní HPLC se provádí na sloupci Delta Prep 3000 system YMC ODS-A (1,2 μm, 15 μm) (4,7 x 50 cm); eluční činidlo H₂O (0,1 % TFA)-(B) acetonitril:methanol (1:1) (0,1 % TFA); lineární gradient 20 až 50 % (B) 3 hodiny; průtok 80 ml/minuta; detekce 2154 nm.

Hmotová spektra z bombardování rychlými atomy (FAB-MS) se zapisují na Beckmanově VG2AB-1F nebo VG70E-HF hmotovém spektrometru. Analýza aminokyselin se provádí na Beckmanově analyzátoru aminokyselin Model 121M. Chráněný peptidový fragment a volné peptidy se hydrolyzují v 6N kyselině chlorovodíkové (Pierce Chemical Co.) v utěsněné evakuované zkumavce při teplotě 110 °C po dobu 24 hodin.

Podle vynálezu se čtyři peptidové fragmenty vzorce I až IV připravují opakovanou syntézou na pevné fázi. Kopulační reakce se vždy monitorují Kaisrovým ninhydrinovým testem ke stanovení postupu reakce a ukončení reakce (Kaiser a kol.,

Anal. Biochem. 34, str. 595 až 598, 1970). Příprava pryskyřic se monitoruje UV analýzou tímto způsobem:

Substituce chráněné aminokyseliny (AA) pryskyřice (Fmoc-AA-pryskyřice) v každém bodě syntézní přípravy využívá absorbance N-(9-fluorenylmethyl)piperidinu při 301 nm (epsilon = 7800). Přesně se váží 4 až 8 mg pryskyřice ve zkušební zkumavce a zpracuje se 0,5 ml 20% roztoku piperidinu v dimethylformamidu. Například do zkušební zkumavky, obsahující 5,05 mg Fmoc-Gly-pryskyřice se přidá 0,5 ml 20% roztoku piperidinu v dimethylformamidu. Jako slepého pokusu se použije 0,5 ml 20% roztoku piperidinu v dimethylformamidu. V průběhu následujících 15 minut se zkumavka s Fmoc-Gly-pryskyřicí rozvíří dvakrát nebo třikrát k zajištění dokonalého styku pryskyřice s piperidinovým roztokem. Do obou zkumavek se vnese dimethylformamid k úpravě objemu na 50 ml. Spektrofotometr se vynuluje při 301 nm se slepou zkouškou. Absorbance Fmoc-Gly-pryskyřice se vypočte tímto způsobem:

$$\frac{A_{301} \times \text{obj}(\text{ml})}{7800 \times \text{hmot. (g)}} = \frac{526 \times (50)}{7800 \times 0,00505 \text{ (g)}} = 0,67 \text{ mmol/g}$$

Obecně se chránicí Fmoc skupina odstraňuje z peptidové pryskyřice způsobem uvedeným v tabulce:

Protokol 1: Odstraňování chránicí skupiny Fmoc

Stupeň	Reakční činidlo	Doba
1	methylenchlorid	2 x 3
2	dimethylformamid	3 minuty
3	25% piperidin	5 minut
4	25% piperidin	15 minut
5	dimethylformamid	3 minuty
6	methanol	3 minuty
7	methylenchlorid	3 minuty

8	methanol	3 minuty
9	methylenchlorid	3 x 3 minuty
10	dimethylformamid	3 minuty
11	kopulace	90 minut
12	dimethylformamid	3 minuty
13	methanol	3 minuty
14	methylenchlorid	3 minuty
15	methanol	2 x 3 minuty

Příprava fragmentu I, Fmoc-(26-31)-NH₂, popsaná v příkladu 1 až 8, zahrnuje přípravu C koncového amidového fragmentu za použití XAL-spojovníkové pryskyřice a za použití benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfátu (BOP) jako kopulačního činidla. Obecně se provádí podvojná kopulace pro každou aminokyselinu k zajištění konečné čistoty. Zpravidla se používají čtyři ekvivalenty reakčního činidla pro první kopulaci a dva ekvivalenty reakčního činidla pro druhou kopulaci.

Synthesa fragmentu II, Fmoc-(19-25)-OH, popsaná v příkladu 9 až 15, zahrnuje postupné vytváření v pevné fázi chráněného heptapeptidu, ve kterém koncová skupina COOH, Asp je vázán na pryskyřici Sasrin na beta-COOH přes Fmoc-Asp(O-Sasrin)-OBzl. Výchozí pryskyřice se kopuluje s dipeptidem, Fmoc-Leu-Asn-OH, který byl připraven z Fmoc-Leu-OH a H-Asn-OH (preaktivací Fmoc-Leu-OH na Fmoc-Leu-OSu) ve 71,3% výtěžku (stanovená čistota větší než 95% analytickou HPLC). Tripeptidová pryskyřice se podrobuje dvěma cyklům synthesy v pevné fázi s Fmoc-Tyr(tBu)-OH a s Fmoc-Lys(Alloc)-OH. Část výsledné pentapeptidové pryskyřice se podrobí dvěma dalším cyklům synthesy v pevné fázi Fmoc-Lys(Boc)-OH a s Fmoc-Ala-OH. Podíl plně chráněné heptapeptidové pryskyřice se odštěpí systémem 0,5 % trifluoroctová kyselina/methylenchlorid a vykazuje jeden hlavní pík (stanovená čistota větší než 82%) podle HPLC. Selektivní odstraňování chránicí skupiny Lys(Alloc)²¹ se provádí Pd[(C₆H₅)₃P]₂ a

Bu₃SnH a výsledná částečně chráněná pryskyřice se štěpí 0,5 % systémem 0,5 % trifluoroctová kyselina/methylenchlorid. K úplnému štěpení pryskyřice je potřeba 10 minut. Čistota produktu Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(OBzl) je podle stanovení větší než 80% podle analytické HPLC a celkový výtěžek je 75,7% (ve srovnání s výchozí pryskyřicí, Fmoc-Asp(O-Sasrin)-OBzl).

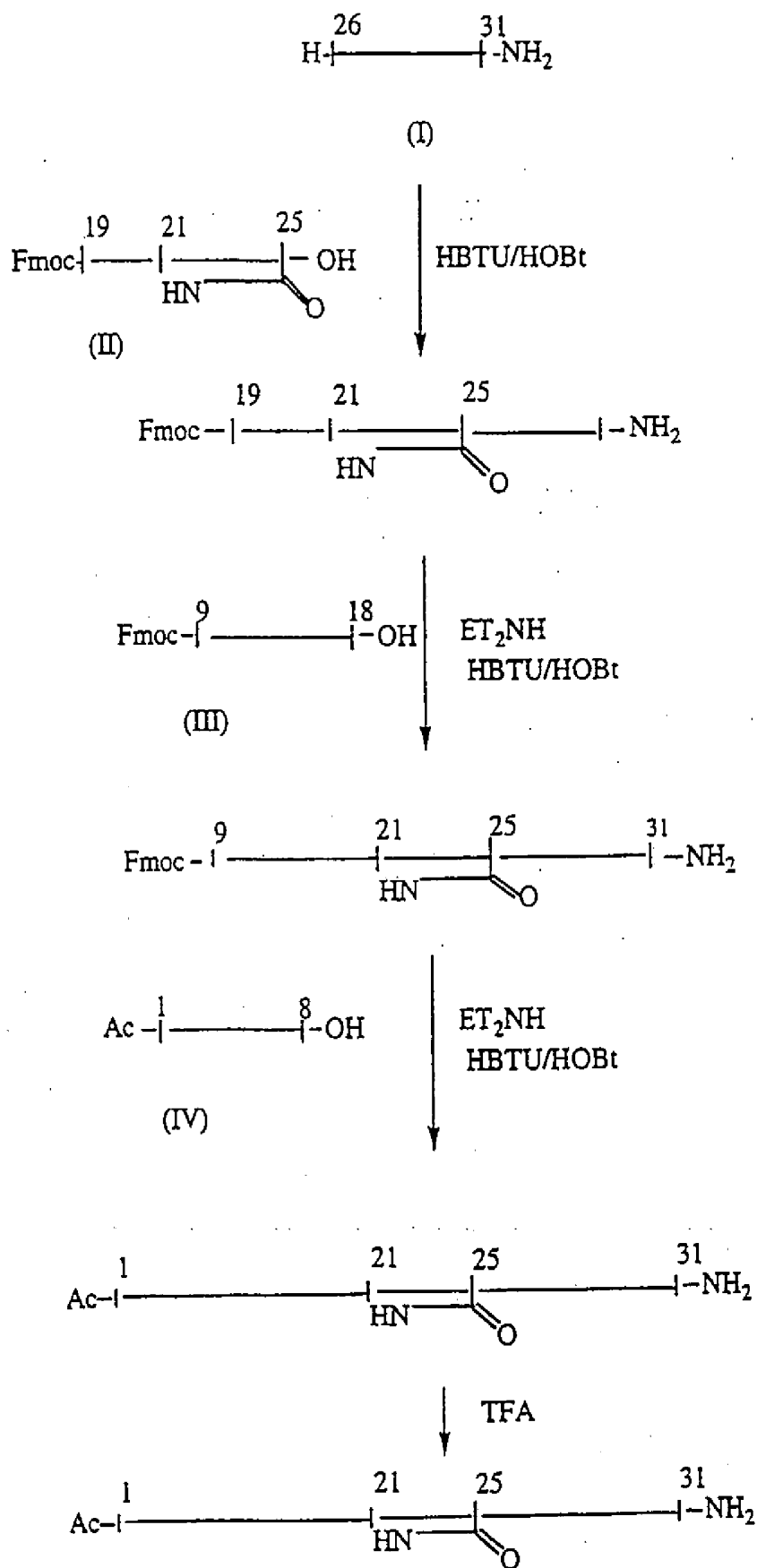
Cyklizace vedlejšího řetězce k vedlejšímu řetězci (Lys²¹ k Asp²⁵) lineárního heptapeptidu se provádí v roztoku obsahujícím dimethylformamid za použití BOP a DIPEA a je ukončena za 1,25 hodin. Analytická HPLC tohoto surového produktu dokládá téměř kompletní konverzi lineárního heptapeptidu. Provádí se jediný čistící stupeň získaného cyklického heptapeptidu na silikagelu. Při tomto čištění se odstraňují jakékoliv oligomery, vytvořené při laktamizaci. Analytická HPLC čištěného heptapeptidu dokládá čistotu cyklického heptapeptidu větší než 98%. Celkový výtěžek čištěného cyklického heptapeptidu, ve srovnání s výchozí pryskyřicí je 37%. Konečné odstraňování C-koncové benzylesterové skupiny se provádí hydrogenolýzou ve vibromixované aparatuře za použití 10% palladia na uhlí po dobu přibližně šesti hodin. Po reakci se provádí analytická HPLC a konečný produkt, cyklo(Lys²¹-Asp²⁵)-Fmoc-Ala¹⁹-Lys(Boc)²⁰-Lys²¹-Tyr(tBu²²)-Leu²³-Asn²⁴-Asp²⁵-OH se získá v celkovém výtěžku 33,7% (ve srovnání s výchozí pryskyřicí) při čistotě větší než 97%. Struktura a identita konečného produktu se potvrzuje ¹H-NMR spektroskopií a plně se charakterizuje aminokyselinovou analýzou a hmotovou spektroskopií.

Opakovaná syntéza na pevné fázi fragmentu III, Fmoc-(9-18)-OH, popsaná v příkladu 16 až 26 a fragmentu IV, Ac(1-8)-OH, popsaná v příkladu 27 až 36, se provádí za použití BOP jakožto kopulačního činidla a piperidinu pro odstraňování chránící Fmoc skupiny. Vysoce kyselinově labilního linkeru Sasrin se používá k zadržování skupiny chránící vedlejší řetězec na

fragmentu. Obecně se provádějí dvě kopulační reakce pro každou aminokyselinu k zajištění čistoty. Používají se dva ekvivalenty reakčního činidla pro první kopulaci a jednoho ekvivalentu reakčního činidla pro druhou kopulaci.

Střední čistota, získaná po štěpení je 91% v případě peptidového fragmentu III a 95% v případě peptidového fragmentu IV. Tyto peptidové čistoty, získané po štěpení jsou dostatečné pro přímé použití peptidového fragmentu pro syntézu VIP analogu bez dalšího čištění.

Příprava mocého cyklického VIP analogu podle vynálezu se provádí kopulací čtyř fragmentů I až IV podle následujícího schéma.



zbavený chránicí skupiny

Každý cyklus fragmentové kopulace se provádí stejným následujícím způsobem: (i) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z peptidového fragmentu 10% Et_2NH v dimethylformamidu (dvě hodiny); (ii) odstraňuje se fluoren promytím systémem hexan/ether; (iii) kopuluje se peptidový fragment, zbavený chránicí skupiny s 1,0 ekvivalentu jiného chráněného fragmentu za použití HBTU (1,2 ekvivalenty), HOBt (3,6 ekvivalentů v systému dimethylformaid/ethylenchlorid při teplotě 0°C po dobu 30 minut až jedné hodiny a při teplotě 25°C po dobu tří hodin za použití DIPEA (4,8 ekvivalentů); a (iv) provádí se odpaření a rozpuštění v methylenchloridu a extrakce nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 10% kyselinou citronovou.

Podle výhodného provedení se každý cyklus kopulace fragmentů provádí následujícím způsobem: (i) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z peptidového fragmentu 10% Et_2NH v dimethylformamidu (dvě hodiny); (ii) odstraňuje se fluoren promytím systémem hexan/ether; (iii) kopuluje se peptidový fragment I, zbavený chránicí skupiny, s 1,0 ekvivalentu chráněného fragmentu II za použití HBTU (1,2 ekvivalenty), HOBt (3,6 ekvivalentů) v systému dimethylformaid/ethylenchlorid při teplotě 0°C po dobu 30 minut až jedné hodiny a při teplotě 25°C po dobu tří hodin za použití DIPEA (4,8 ekvivalentů); a (iv) provádí se odpaření a rozpuštění v methylenchloridu a extrakce nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 10% kyselinou citronovou za získání chráněného meziprojektu Fmoc(19-31)- NH_2 ; (v) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z meziprojektu Fmoc(19-31)- NH_2 za použití 10% Et_2NH v dimethylformamidu (dvě hodiny); (vi) odstraňuje se fluoren promytím systémem hexan/ether; (vii) kopuluje se chránicí skupiny zbavený meziprojekt Fmoc(19-31)- NH_2 s 1,0 ekvivalentu chráněného fragmentu III za použití HBTU (1,2 ekvivalenty), HOBt (3,6 ekvivalentů v systému dimethylformaid/ethylenchlorid při teplotě 0°C po dobu 30 minut až jedné hodiny a při teplotě 25°C po dobu tří hodin za použití DIPEA (4,8 ekvivalentů); a (xii) provádí se odpaření

a rozpuštění v methylenchloridu a extrakce nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 10% kyselinou citronovou za získání chráněného meziprojektu $\text{Fmoc}(9\text{-}31)\text{-NH}_2$; (ix) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z meziprojektu $\text{Fmoc}(9\text{-}31)\text{-NH}_2$ 10% Et_2NH v dimethylformamidu (dvě hodiny); (x) odstraňuje se fluoren promytím systémem hexan/ether; (xi) kopuluje se peptidový fragment, zbavený chránicí skupiny, s 1,0 ekvivalentu chráněného fragmentu IV za použití HBTU (1,2 ekvivalenty), HOBT (3,6 ekvivalentů) v systému dimethylformamid/ethylenchlorid při teplotě 0°C po dobu 30 minut až jedné hodiny a při teplotě 25°C po dobu tří hodin za použití DIPEA (4,8 ekvivalentů); a (xii) provádí se odpaření a rozpuštění v methylenchloridu a extrakce nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 10% kyselinou citronovou za získání chráněného meziprojektu $\text{Fmoc}(1\text{-}31)\text{-NH}_2$.

Příprava cyklického VIP analogu z fragmentů je podrobně objasněna v příkladu 37 až 41. Chráněné meziprojekty, $\text{Fmoc}(19\text{-}31)\text{-NH}_2$, $\text{Fmoc}(9\text{-}31)\text{-NH}_2$ a $\text{Ac}(1\text{-}31)\text{-NH}_2$ se získají jako hlavní produkty z každého reakčního cyklu. Tyto surové, chráněné meziprojekty se dále nečistí a používají se v této surové formě pro každý následný kopulační cyklus. Analytická HPLC potvrzuje, že jsou výchozí materiály plně spotřebovány za použitých podmínek.

Konečné odstranění chránicí skupiny z plně chráněného peptidu $\text{Ac}(1\text{-}31)\text{-NH}_2$ se provádí reakcí s TFA (90 %); s EDT (3 %); s thioanisoem (5 %); a s anisoem (2 %) při teplotě 25°C po dobu dvou hodin. Analytická HPLC potvrzuje, že hlavním produktem syntézy (72 až 75 %) je cyklický VIP analog.

Čištění surového produktu se provádí jediným průchodem za použití preparativní HPLC za použití AMC ODS-A reverzního fázového sloupce (4,7 x 50 cm). Další čištění až do 4,0 g surového produktu se snadno dosahuje za použití sloupce a

izoluje se celkem 8,48 g čištěného cyklického VIP analogu nebo 85,2 % z celkem stanovených 9,95 g (podle analýzy HPLC) cyklického VIP analogu, obsaženého v surovém produktu. To odpovídá celkovému výtěžku syntézy 23,9 %, která zahrnuje kopulační reakce, odstranění ochranných skupin a čištění. Cyklický VIP analog, připravený tímto způsobem, je homogenní (více než z 99 %) podle analytické HPLC a kapilární zonové elektroforézy. Identita cyklického VIP analogu se potvrzuje hmotovou spektroskopií FAB a aminokyselinovou analýzou.

Vynález blíže objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

Příklad 1 až 8 popisuje způsob přípravy v pevné fázi chráněného fragmentu I, Fmoc-(26-31)-NH₂, Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-NH₂. Příklad 9 až 15 popisuje způsob přípravy fragmentu II, cyklo(Lys²¹-Asp²⁵)-Fmoc-Ala¹⁹-Lys-(Boc)²⁰-Lys²¹-Tyr(t-Bu)²²-Leu²³-Asn²⁴-Asp²⁵-OH. Příklad 16 až 26 popisuje způsob přípravy v pevné fázi fragmentu III, Fmoc-(9-18)-OH, Fmoc-Asn-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-OH. Příklad 27 až 36 popisuje způsob v pevné fázi přípravy fragmentu IV, Ac(1-8)-OH, Ac-His(Trt)-Ser(t-Bu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-OH. Příprava cyklického VIP analogu, Ac(1-31)-NH₂, je popsána v příkladu 37 až 41 Ac(1-31)-NH₂.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava (3)-XAL-pryskyřice

Neutralizuje se 150 g benzhydrylamínové (BHA) pryskyřice (plnění: 0,54 mekv./g, podíl číslo 13933) dvakrát 1500 ml NMP obsahujícího 10 % triethylaminu, promývá se 1000 ml dimethylformamidu, 1000 ml methanolu, 1000 ml methylenchloridu, 1000

ml methanolu a 3 x 1000 ml methylenchloridu. Rozpustí se 96,3 g (3)-XAL-linkeru (0,18 mol), 2,2 ekv.), 79,6 g BOP (0,18 mol) a 24,3 g HOBt (0,18 mmol) ve 200 ml NMP. Přidá se 47,03 ml DIPEA a roztok se přidá najednou do reaktoru obsahujícího neutralizovanou pryskyřici. Směs se míchá po dobu 90 minut.

Podíl se odstraní a promývá se dimethylformamidem a methanolem. Plnění XOL-spojovníku určené UV analysou je 0,365 mmol/g. Pryskyřice XAL se promývá 1000 ml dimethylformamidu, 1000 ml methanolu, 1000 ml methylenchloridu a dvakrát 1000 ml methanolu. Nekopulovaná pryskyřice BHA se blokuje po dobu 30 minut 1000 ml 10% acetaldehydu a 10% DIPEA v methylenchloridu. Pryskyřice se odfiltruje promývá se 1000 ml methylenchloridu, 1000 ml methanolu, dvakrát 1000 ml methylenchloridu a dvakrát 1000 methanolu.

Příklad 2

Připrava Fmoc-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

K první kopulaci se rozpustí směs 119,2 g Fmoc-Thr(t-Bu)-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se v jedné dávce přidá do XAL-pryskyřice připravené podle příkladu 1. Směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 59,6 g Fmoc-Thr(t-Bu)-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se

39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Thr(t-Bu)-XAL-BHA promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 3

Příprava Fmoc-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z Fmoc-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede způsobem popsaným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Gly-OH na Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede takto:

K první kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 89,2 g Fmoc-Gly-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Thr(t-Bu)-XAL-BHA a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 44,6 g Fmoc-Gly-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 4

Příprava Fmoc-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z Fmoc-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede způsobem popsaným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Gly-OH na Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede následujícím způsobem:

K první kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 89,2 g Fmoc-Gly-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 44,6 g Fmoc-Gly-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Příklad 5

Příprava Fmoc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z Fmoc-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede způsobem popsaným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Lys(Boc)-OH na Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede následujícím způsobem

K první kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 140,5 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 70,3 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 6

Příprava Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z Fmoc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede způsobem popsáným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Lys(Boc)-OH na Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede následujícím způsobem:

K první kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 140,5 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledek reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 70,3 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledek reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x 1000 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 7

Příprava Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede způsobem popsáným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Leu-OH na Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-

Thr(t-Bu)-XAL-BHA se provede následujícím způsobem:

K první kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 106 g Fmoc-Leu-OH (300 mmol), 132 g BOP (300 mmol) a 40,5 g HOBt (300 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 78,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a dvakrát 1000 ml methanol (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se za míchání při teplotě místnosti rozpustí směs 53 g Fmoc-Leu-OH (150 mmol), 66,3 g BOP (150 mmol) a 20,2 g HOBt (150 mmol) v 1000 ml NMP. Přidá se 39,2 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po zfiltrování se pryskyřice Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA promývá 1000 ml dimethylformamidu (3 minuty), 1000 ml methanolu (3 minuty), 1000 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x 1000 ml methanolu (3 minuty).

Konečná hmotnost fragmentu Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(t-Bu)-XAL-BHA peptidové pryskyřice, známého též jako Fmoc-(26-31)-XAL-BHA, je 267 g.

Příklad 8

Odštěpení chránicí skupiny z Fmoc-(26-31)-XAL-BHA

Do 500 ml baňky s plochým dnem se vnese 10 g chráněného Fmoc-(26-31)-XAL-BHA spolu se 200 ml 0,5% trifluoroctové kyseliny v methylenchlorid. Suspense se míchá po dobu 0,5 minut při teplotě místnosti a zfiltruje se. Filtrát se okamžitě na-

staví na hodnotu pH 7 přidáním pyridinu. Filtrát se odpaří za teploty místnosti na rotační odparce. Zbytek se trituruje 200 ml destilované vody, načež se promývá 2x 200 ml etheru. Výsledný pevný materiál se vysuší ve vakuu, čímž se získá chráněný Fmoc-(26-31)-NH₂.

Zfiltrovaná peptidová pryskyřice se pak zpracuje 5x 200 ml 0,5% roztokem THF po 15 minutách, načež se nastaví hodnota pH 7 pyridinem. Po odpaření, trituraci a vysušení se vzorek každého odštěpení analyzuje HPLC. Podmínky HPLC: Lichrosorb RP-18, 5 mm, 25 cm: eluční činidla (A) 0,1 M HClO₄/H₂O (pH 2,5), (B) MeCN; gradient: 34 % až 39 % MeCN/20 minut; průtočná rychlost: 1 ml/min a detektor 210 nm Knau.

Všechny peptidové fragmenty s čistotou nad 90 % se spojí na celkových 3,01 g. Čistota spojeného materiálu je 94,5%.

Příklad 9

Příprava Fmoc-Asp(O-Sasrin)-OBzl

V dimethylformamidu (2 x 500 ml) a v methylenchloridu (3 x 500 ml) se promývá 2-methoxy-4-alkoxybenzylalkoholkopolystyren 1% divinylbenzenové zesíťené pryskyřice (pryskyřice Sasrin, 25 g, 0,96 ekv/g, 24 mekv.). Přidá se ester Fmoc-Asp(O-benzylu) (35 g, 78,56 mmol, 3,27 ekv.) v methylenchloridu (400 ml) a v mechanickém šejkru se protřepe. Přidá se roztok DCC (16,2 g, 78,5 mmol, 3,27 ekv.) v methylenchloridu (100 ml), následně N-methylmorfolin (3,36 ml, 30 mmol, 3,27 ekv.) a 4-dimethylaminopyridinu (0,293 g, 2,4 mmol, 0,1 ekv.) a proptřepává se pět hodin. Podíl se vyjme, promývá se methanolem a vysuší se. UV-analysou se stanoví plnění 0,60 mmol/g pryskyřice. Pryskyřice se promývá dimethylformamidem (2x500 ml) a methanolem (5x 500 ml) a vysuší se ve vakuu za získání 32,8 g Fmoc-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl. 10 g této pryskyřice se suspenduje v di-

methyformamidu (180 ml) a přidá se roztok anhydridu benzoové kyseliny (6,78 g, 30 mmol, 5 ekv.) v dimethylformamidu (40 ml), následně DIPEA (5,22 ml, 30 mmol, 5 ekv.) a suspenze se protřepává 30 minut. Pryskyřice se promývá dimethylformamidem (5x 200 ml) a podle stanovení je substituce 0,60 mmol/g.

Příklad 10

Synthesa N α -Fmoc-L-leucyl-L-asparagin(Fmoc-Leu-Asn-OH)

V systému dimethylformamid (10 ml)/methylenchlorid (70 ml) se rozpustí L-Leu-OH (10 g, 28,32 mmol) a ochladí se na ledové lázni. Přidá se N-hydroxysuccinimid (3,58 g, 31,14 mmol, 1,1 ekv.) a dicyklohexylkarbodiimid (6,06 g, 31,14 mmol, 1,1 ekv.) a směs se míchá při teplotě 0 °C 1 hodinu a při teplotě 25 °C 14 hodin. Reakční směs se ochladí na ledové lázni, zfiltruje se a sraženina se promývá methylenchloridem (40 ml). Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se rozpustí ve směsi dioxanu (80 ml), vody (10 ml) za získání roztoku Fmoc-Leu-OSu. Přidá se roztok bezvodého L-asparaginu (5,606 g, 42,48 mmol, 1,5 ekv.) v 60 ml uhličitanu sodného (2,50 g, 42,28 mmol, 1,5 ekv.). Přidá se dalších 10 ml dioxanu a reakční směs se míchá 2 hodiny při teplotě 25 °C. Do reakční směsi se přidá ethylacetát (200 ml) a hodnota pH se nastaví na přibližně 2 přísadou 5% vodné kyseliny chlorovodíkové za míchání. Ethylacetátová vrstva se oddělí a vodná vrstva se extrahuje 4x vždy 100 ml ethylacetátu. Spojený ethylacetátový extrakt se promývá nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vodou (3x 100 ml), vysuší se bezvodým síranem sodným, zfiltruje se a odpaří se k suchu. Zbytek se rozpustí v dimethylformamidu (60 ml) za ohřevu na teplotu (40 až 45 °C) a voda se přidá až do zakalení. Produkt vykřystaluje při stání přes noc. Zfiltruje se, promývá se etherem a překřystaluje se ze systému dimethylformamid/voda. Výsledkem lyofilizace z dioxanu je 9,45 g (71,3 % teorie) produktu. Spektroskopie NMR a FAB potvrzuje molekulární vzorec

$C_{25}H_{29}N_3O_6$ s pozorovanou hmotou pro $(M + H)^+$, 468,3. Analytická HPLC potvrzuje čistotu produktu vyšší než 95% (obr.4). Podmínky HPLC: sloupec: Lichrosorb RP-8 (5 μ m); eluční činidlo: (A) 0,1M $NaClO_4$ (pH 2,5)-(B) CH_3CN ; gradient: 40%-80% (B) ve 20 minutách; průtok 1 ml/min a detekce: 210 nm.

Příklad 11

Příprava Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)-OBzl

Provede se následující syntéza peptidu (za použití 20 ml systému roztok/g pryskyřice): 1) 20% piperidin/dimethylformamid, 1 minuta, 2) 20% piperidin/dimethylformamid, 10 minut, 3) dimethylformamid, 4x2 minuty, 4) NMP, 1x2 minuty, 5) kopulace chráněných aminokyselin, jak dále popsáno a 6) dimethylformamid, 3x2 minuty.

Synthesa v pevné fázi se provede jak shora popsáno s 10 g (0,60 mmol/g, 6,0 mmol) Fmoc-Asp(O-Sasrin)-OBzl. Fmoc-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl se připraví kopulací dipeptidu Fmoc-Leu-Asn-OH na H-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl následujícím způsobem:

Do Fmoc-Asn-Leu-OH, (4,2 g, 9 mmol, 1,5 ekv.) se přidá HBTU, (3,41 g, 9 mmol, 1,5 ekv.), HOBt, (4,13 g, 27 mmol, 4,5 ekv.), DIPEA, (3,135 ml, 18 mmol, 3 ekv.) a systém NMP/methylenchlorid (1:1) 220 ml. Směs se kolupuje 1,25 hodiny. K této zvláštní kopulaci se rozpustí Fmoc-Leu-Asn-OH ve 160 ml NMP-methylenchlorid (1:1). Jelikož smísení NMP a methylenchloridu je exothermické, rozpouštědlo se před přidáním do peptidu chladí a přidá se do H-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl a následně se přidá DIPEA a HOBt a reakční nádoba se protřepává dvě minuty. Pak se přidá 30 ml studeného methylenchloridu a nakonec se přidá roztok HBTU ve 20 ml systému NMP/methylenchlorid

(1:1) a 10 ml NMP. Poměr NMP: methylen-chlorid se udržuje (1:1). Hodnota pH kopulační reakce se udržuje na 5 až 6.

Fmoc-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl se připraví kopulací Fmoc-Tyr(tBu)-OH k pryskyřici následujícím způsobem: Do Fmoc-Tyr(tBu)-OH, (5,4 g, 12 mmol, 2 ekv.) se přidá HBTU, (3,4 g, 12 mmol, 2 ekv.), HOBt, (1,8 g, 12 mmol, 2 ekv.), DIPEA, (5,75 ml, 33 mmol, 5,5 ekv.) a NMP (220 ml). Směs se přidá do pryskyřice a kopuluje se jednu hodinu.

Fmoc-Lys(Alloc)-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl se připraví kopulací Fmoc-Lys(Alloc)-OH k pryskyřici. Do Fmoc-Lys(Alloc)-OH, (5,4 g, 12 mmol, 2 ekv.) se přidá HBTU, (3,4 g, 12 mmol, 2 ekv.), HOBt, (1,8 g, 12 mmol, 2 ekv.), DIPEA, (5,75 ml, 33 mmol, 5,5 ekv.) a NMP (220 ml). Směs se přidá do pryskyřice a kopuluje se jednu hodinu.

Po přidání Fmoc-Lys(Alloc)²¹-OH se pryskyřice promývá methanolem a vysuší se za získání 13,3 g (0,45 mmol/g, 5,98 mmol) chráněného Fmoc-(21-25)-(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl. Polovina této peptidové pryskyřice (6,65 g, 2,99 mmol) se podrobí dvěma přídatným cyklům syntézy v pevné fázi, jak shora popsáno, a kopuluje se s Fmoc-Lys(Boc)-OH následujícím způsobem: k Fmoc-Lys(Boc)-OH, (2,8 g, 6 mmol, 2 ekv.) se přidá BOP, (2,65 g, 6 mmol, 2 ekv.), HOBt, (0,918 g, 6 mmol, 2 ekv.); DIPEA, (3,25 ml, 18,65 mmol, 6,2 ekv.) a NMP (120 ml). Po přidání do pryskyřice se kopuluje jednu hodinu. K Fmoc-Ala-OH, (1,86 g, 6 mmol, 2 ekv.) se přidá HBTU (2,27 g, 6 mmol, 2 ekv.), HOBt, (0,90 g, 6 mmol, 2 ekv.) a NMP (120 ml) a směs se přidá do pryskyřice a kopuluje se jednu hodinu.

Pryskyřice se promývá dimethylformamidem (3x120 ml) a methanolem (4x120 ml) a vysuší se ve vakuu za získání 7,3 g (0,39 mmol/g, 2,84 mmol) chráněného Fmoc-(19-25)-(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl. Část Fmoc-(19-25)-(O-Sasrin-pryskyřice)-OBzl se štěpí systémem 0,5% TFA/methylenchlorid a podle analytické

HPLC má čistotu větší než 82%.

Příklad 12

Příprava Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)-OBzl odstraněním chránicí skupiny z Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-(Alloc)-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)-OBzl

Chráněná hexapeptidová pryskyřice Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)-OBzl (7,2 g, 0,39 mmol/g, 2,8 mmol) se suspenduje ve 130 ml methylenchloridu a nechá se probublávat heliem. Přidá se kyselina octová (0,330 ml, 5,75 mmol), bis(trifenylfosfin)palladiumdichlorid (0,138 g, 0,196 mmol) a tributylcínhydrid (3,165 ml, 11,9 mmol) a peptidovou pryskyřici se nechá probublávat heliem 1,5 hodin a reakční nádoba se vypustí. Uvedená reakce se opakuje celkem pětkrát k zajištění úplného odstranění chránicí skupiny Alloc. Podíl peptidové pryskyřice se štěpí systémem 0,5 % TFA/methylenchlorid a analytická HPLC vykazuje úplné odstranění chránicí skupiny Alloc. Pryskyřice se promyje methylenchloridem (2x120 ml) a methanolem (4x120 ml) a vysuší se ve vakuu, čímž se získá 7,1 g (0,40 mmol/g, 2,84 mmol) částečně chráněných skupin zbavené peptidové pryskyřice Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)OBzl.

Příklad 13

Štěpení Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(O-Sasrin)-OBzl: Příprava Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp(OBzl

Při teplotě místnosti se 10 minut zpracovává 7,1 g (2,84 mmol) částečně chráněné Fmoc-(19-25)-Sasrin-pryskyřice-OBzl systémem 0,5% TFA/ methylenchlorid (140 ml), zfiltruje se a filtrát se okamžitě nastaví na hodnotu pH 6 až 7 přísadou pyridinu. Peptidová pryskyřice se podrobí dalším 4 zpracováním 0,5 TFA v methylenchloridu, jak shora popsáno, a filtráty se spojí

a odpaří. Peptid se trituruje vodou, zfiltruje se, promývá se libovolně vodou a vysuší se ve vakuu. Surový peptid se promývá bezvodým etherem a vysuší se ve vakuu za získání 3,26 g (celkový výtěžek 75,7 % teorie) částečně chráněného Fmoc-Ala-Lys-(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-OBzl, který podle analytické HPLC vykazuje čistotu větší než 80%.

Příklad 14

Cyklizace lineárního heptapeptidu: příprava Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-OBzl cyklo(Lys 21 → Asp25)

Roztok částečně chráněného heptapeptidu Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-OBzl (3,26 g, 2,271 mmol) ve 100 ml dimethylformamidu se přidá pomalu během 20 minut do magneticky míchaného roztoku reakčního činidla BOP (2,0 g, 4,53 mmol, 2 ekv.) a DIPEA (3,16 ml, 18,14 mmol, 8 ekv.) v 500 ml dimethylformamidu. Po míchání při teplotě místnosti po dobu 1,25 hodin se podíl odstraní a analytická HPLC indikuje, že lineární peptid byl úplně cyklizován. Reakční směs se míchá další hodinu, okyselí se octovou kyselinou a odpaří se na přibližně 20 ml a přidá se destilovaná voda (200 ml). Sraženina se odfiltruje, promývá se důkladně destilovanou vodou a vysuší se ve vakuu. Produkt se promývá bezvodým etherem a vysuší se za získání 3,0 g chráněného cyklického heptapeptidu. Analytická HPLC indikuje téměř úplnou přeměnu lineárního peptidu na cyklický heptapeptid. Tento materiál se rozpustí ve 100 ml 10% methanolu v methylenchloridu. Nerozpustné části (oligomery) se odstraní filtrací roztoku celitem a filtrát se odpaří za získání 2,85 surového chráněného cyklického peptidu. Tento materiál se rozpustí ve 100 ml methylenchloridu a vpraví se na silikagelový sloupec Waters Prep Pack (4,7 x 30 cm, 15 až 20 μm); průtočná rychlost: 50 ml/min; detekce: 280 nm. Sloupec se eluuje methylenchloridem (500 ml), 5% methanolem v methylenchloridu (2000 ml) a nakonec se eluuje 8% methanolem v methylenchlori-

du. Frakce, obsahující čistý peptid (podle analytické HPLC), se smísí, odpaří se k suchu a lyofilizací se odstraňuje dioxan za získání 1,445 g vyčištěného heptapeptidu (celkový výtěžek, 37 % teorie), který podle analytické HPLC vykazuje čistotu větší než 98%.

Příklad 15

Příprava Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-OH
cyklo(Lys 21 → Asp25)

Plně chráněný cyklický heptapeptid podle příkladu 14 (1,445 g, 1,111 mmol) se rozpustí v 60 ml methanolu ve vibromisičové baňce v proudu helia. Přidá se 0,314 g 10% Pd na uhlí a reakční směs se hydrogenuje 3,5 hodiny ve vibromixeru. Analytická HPLC indikuje, že zbylo přibližně 30 % cyklického heptapeptidu chráněného benzylesterem. Přidá se dalších 0,2 g 10% Pd na uhlí a v hydrogenaci se pokračuje po dobu 2,75 hodin. Analytická HPLC indikuje, že došlo k úplnému zbavení ochrany benzylovou skupinou. Reakční směs se zfiltruje celitem a promývá se methanolem. Filtrát a promývací voda se odpaří a lyofilizací se odstraňuje dioxan za získání 1,225 g (91,1% výtěžek, celkový výtěžek 33,7%) cyklické heptapeptidové kyseliny. Podle analytické HPLC je čistota produktu vyšší než 97 %. Identita produktu se charakterizuje a potvrzuje analýsou aminokyseliny, FAB-MS, optickým stáčením a spektroskopií $^1\text{H-NMR}$.

Příklad 16

Příprava pryskyřice Fmoc-Ala-Sasrin

Promyje se 50 g 2-methoxy-4-alkoxybenzylalkoholové kopolystyrenové, 1 % divinylbenzenu zesílené pryskyřice (Sasrinové pryskyřice) 500 ml methylenchloridu a 2x500 ml dimethylformamidu.

V 650 ml systému methylenchlorid/dimethylformamid (obj. 2:1) se rozpustí 74,6 g Fmoc-Ala-OH (240 mmol). Roztok se ochladí na ledové lázni a přidá se 49,5 g DCC (240 mmol), následně 1,46 g 4-dimethylaminopyridinu (12 mmol) a 6,27 ml N-methylmorpholinu (60 mmol). Směs se míchá 9 hodin v oběhovém rotačním šejkru.

Pryskyřice se zfiltruje a promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 500 ml methanolu (3 minuty).

Podíl se odstraní, vysuší se a náplň se určí UV kvalitativní analysou 0,54 mmol/g.

Pryskyřice se pak promývá 2x 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 500 ml dimethylformamidu (3 minuty). Pryskyřice se suspenduje ve 400 ml dimethylformamidu a přidá se 54,3 g anhydridu benzoové kyseliny (240 mmol), následně 100 ml dimethylformamidu a 41,7 ml diisopropylethylaminu (240 mmol). Suspense se protřepává 30 minut. Pryskyřice se odfiltruje a promyje 500 ml methylenchloridu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 2x500 ml methylenchloridu (3 minuty), 500 ml dimethylformamidu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 17

Příprava pryskyřice Fmoc-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným v protokolu 1. Kopulace Fmoc-Nle-OH na Ala-Sasrin se provede následujícím způsobem:

K první kopulaci se rozpustí směs 19,08 g Fmoc-Nle-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml

NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou k pryskyřici Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

K druhé kopulaci se rozpustí směs 9,54 g Fmoc-Nle-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 18

Příprava pryskyřice Fmoc-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsáním protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 19,9 g Fmoc-Gln-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou k pryskyřici Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylen -

chloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

K druhé kopulaci se rozpustí směs 9,9 g Fmoc-Gln-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 19

Příprava pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstraňování chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsáním protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 25,3 g Fmoc-Lys(Boc)-Gln-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 12,7 g Fmoc-Lys(Boc)-Gln-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá

dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 20

Příprava pryskyřice Fmoc-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 40,1 g Fmoc-Arg(Pmc)-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 20,1 g Fmoc-Arg(Pmc)-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 21

Příprava pryskyřice Fmoc-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstraňování chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným v protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 19,1 g Fmoc-Leu-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 9,6 g Fmoc-Leu-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 22

Příprava pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 25,4 g Fmoc-Lys(Boc)-Leu-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformami-
du (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylen-
chloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 12,7 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 23

Příprava pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-
Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstraňování chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 28,7 g Fmoc-Thr(tBu)-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou k pryskyřici Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys-(Boc)Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 14,4 g Fmoc-Thr(tBu)-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 24

Příprava pryskyřice Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 24,8 g Fmoc-Tyr(tBu)-OH (54 mmol), 23,9 g BOP (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 14,1 ml

DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 12,4 g Fmoc-Tyr(tBu)-OH (27 mmol), 11,9 g BOP (27 mmol) a 3,65 g HOBt (27 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,05 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá dvě hodiny.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 25

Příprava pryskyřice Fmoc-Asn-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1 před kopulací Fmoc-Asn-OH způsobem symetrického anhydridu.

Rozpustí se 19,4 g Fmoc-Asn-OH (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve směsi 135 ml methylenchloridu a 270 ml dimethylformamidu. Směs se míchá v ledové lázni před přidáním 11,2 g DCC (54 mmol). Směs se míchá 30 minut, zfiltruje se a filtrát se přidá najednou k pryskyřici Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-

Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrin (pryskyřice (10-18) Sasrinové pryskyřice). Kopulace se ukončí v 90 minutách.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 19,4 g Fmoc-Asn-OH (54 mmol) a 7,3 g HOBt (54 mmol) ve 135 ml methylenchloridu a 270 ml dimethylformamidu. Směs se míchá v ledové lázni před přidáním 11,2 g DCC (54 mmol). Směs se míchá 30 minut, zfiltruje se a filtrát se přidá v jedné dávce do Sasrinové pryskyřice (10-18). Kopulace se ukončí v 90 minutách.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Po ukončené kopulaci se pryskyřice nezbavuje chránicích skupin. Konečný výtěžek Fmoc-Asn-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Gln-Nle-Ala-Sasrinu (Fmoc(9-18)Sasrin-pryskyřice jakožto produktu je 112 g.

Příklad 26

Štěpení Fmoc(9-18) z pryskyřice Fmoc(9-18)-Sasrin

Při teplotě místnosti se zpracovává 1 minutu 20 g pryskyřice Fmoc(9-18)-Sasrin se 400 ml 0,2% TFA v methylenchloridu a zfiltruje se. Hodnota pH filtrátu se okamžitě nastaví na pH 7 přidáním pyridinu. Filtrát se odpaří a zbytek se trituruje 50 ml destilované vody a promývá se pak 50 ml etheru. Výsledný pevný materiál se vysuší ve vakuu.

Odfiltrovaná peptidová pryskyřice se zpracovává 6x 400 ml

0,2% roztoku TFA po dobu 10 minut s následným nastavením hodnoty pH na 7 pyridinem. Po odpaření, trituraci a sušení se provede analýza HPLC. Podmínky HPLC: sloupec Lichrosorb RP-18, 5m, 25 cm, eluční činidla (a) 0,1 M HClO₄/H₂O (pH 2,5), (b) MeCN, gradient 34% až 39% MeCN/20 minut, průtočná rychlost 1/ml/min a detektor 210 nm Knau. Všechny peptidové fragmenty o čistotě větší než 90% se spojí na celkem 9,9 g. 52 g produktu získaného štěpením 112 g peptidové pryskyřice má průměrnou čistotu 91%.

Příklad 27

Příprava pryskyřice Fmoc-Glu(OtBu)-Sasrin

Promývá se 50 g 2-methoxy-4-alkoxybenzylalkoholkopolystyrenové, 1 % divinylbenzenu zesíťné pryskyřice (pryskyřice Sasrin) 500 ml methylenchloridu a 2x500 ml dimethylformamidu.

V 500 ml systému methylenchlorid/dimethylformamid (objemový poměr 9:1) se rozpustí 102 g Fmoc-Glu(OtBu)-OH (240 mmol). Roztok se ochladí v ledové lázni a přidá se roztok DCC, připravený rozpuštěním 49,5 g DCC (240 mmol) v 100 ml systému methylenchlorid/dimethylformamid (9:1). Směs se míchá 30 minut, pak se zfiltruje k odstranění DCU. Filtrát se přidá do promyté pryskyřice Sasrin, načež se přidá 1,46 g 4-dimethylaminopyridinu (12 mmol) a 6,27 ml N-methylmorpholinu (60 mmol). Směs se míchá 9 hodin na oběhovém rotačním mísiči.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty). Podíl se vyjme, vysuší se a násada stanovená UV analýsou je 0,59 mmol/g.

Pryskyřice se promývá 2x500 ml methylenchloridu (3 minuty)

a 500 ml dimethylformamidu (3 minuty). Pryskyřice se pak suspenduje ve 400 ml dimethylformamidu a přidá se 54,3 g anhydridu kyseliny benzoové (240 mmol), následně 100 ml dimethylformamidu a 41,7 ml diisopropylethylaminu (240 mmol). Suspense se protřepe 30 minut. Pryskyřice Fmoc-Glu(OtBu)-Sasrin se odfiltruje a promývá se 500 ml methylenchloridu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 2x500 ml methylenchloridu (3 minuty), 500 ml dimethylformamidu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 28

Příprava pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 23,4 g Fmoc-Thr(tBu)-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 11,7 g Fmoc-Thr(tBu)-OH (29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 29

Příprava pryskyřice Fmoc-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 22,8 g Fmoc-Phe-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanol (3 minuty).

Ninhydrinový test ukazuje, že kopulační reakce je úplná, takže druhá kopulace není nutná.

Příklad 30

Příprava pryskyřice Fmoc-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsaným protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 20 g Fmoc-Val-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 10 g Fmoc-Val-OH (29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 31

Příprava pryskyřice Fmoc-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsáním v protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 18,4 g Fmoc-Ala-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a

směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 9,2 g Fmoc-Ala-OH (29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 32

Příprava pryskyřice Fmoc-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsaným v protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 24,3 g Fmoc-Asp(OtBu)-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformami-

du (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylen - chloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 12,1 g Fmoc-Asp(OtBu)-OH (29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá najednou do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 33

Příprava pryskyřice Fmoc-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsaným v protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 22,6 g Fmoc-Ser(tBu)-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylen - chloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 11,3 g Fmoc-Ser(tBu)-OH

(29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Příklad 34

Příprava pryskyřice Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Odstranění chránicí skupiny Fmoc z pryskyřice Fmoc-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se provede postupem popsáním v protokolu 1.

K první kopulaci se rozpustí směs 36,6 g Fmoc-His(Trt)-OH (59 mmol), 26,1 g BOP (59 mmol) a 8,0 g HOBt (59 mmol) ve 400 ml NMP za míchání při teplotě místnosti. Přidá se 15,4 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reakční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice promývá 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty).

Ke druhé kopulaci se rozpustí směs 18,3 g Fmoc-His(Trt)-OH (29,5 mmol), 13,1 g BOP (29,5 mmol) a 4,0 g HOBt (29,5 mmol) ve 400 ml NMP a míchá se při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá 7,7 ml DIPEA a směs se intenzivně míchá. Výsledné reak-

ční činidlo se přidá v jedné dávce do pryskyřice a směs se míchá 90 minut.

Po filtraci se pryskyřice Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin promývá 500 ml dimethylformamid (3 minuty), 500 ml methanol (3 minuty), 500 ml methylenchlorid (3 minuty) a 2x500 ml methanol (3 minuty).

Příklad 35

Acetylace pryskyřice His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Chráněná peptidová pryskyřice Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin se zpracuje 2x 25% piperidinem a promývá se jak popsáno při odstraňování chránicí skupiny v protokolu 1. Po odstranění chránicí skupiny Fmoc se provede acetylace N-koncového aminu následujícím způsobem:

Roztok 100 ml Ac₂O a 100 ml DIPEA v 800 ml methylenchloridu se přidá do peptidové pryskyřice a reakce se nechá probíhat 90 minut.

Pryskyřice se odfiltruje a promývá se postupně 500 ml dimethylformamidu (3 minuty), 500 ml methanolu (3 minuty), 500 ml methylenchloridu (3 minuty) a 2x500 ml methanolu (3 minuty) a vysuší se ve vakuu, čímž se získá 110 g chráněné pryskyřice Ac(1-8)-Sasrin, Ac-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin.

Příklad 36

Štěpení pryskyřice Ac-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Sasrin

Při teplotě místnosti se zpracovává jednu minutu 20 g pryskyřice Ac(1-8)-Sasrin se 400 ml 0,5% TFA v methylenchloridu a odfiltruje se. Hodnota pH filtrátu se okamžitě nastaví na 7 přidáním pyridinu. Filtrát se odpaří a zbytek se trituruje 50 ml destilované vody a promývá se pak 50 ml etheru. Výsledný pevný materiál se vysuší ve vakuu. Zfiltrovaná peptidová pryskyřice se zpracovává 3x 400 ml 0,5% roztoku TFA po dobu 10 minut s následným nastavením hodnoty pH na 7 pyridinem. Po odpaření, trituraci a sušení se provede analýza HPLC.

Zfiltrovaná peptidová pryskyřice se zpracovává 3x 400 ml 0,3% roztoku TFA po dobu 10 minut s následným nastavením hodnoty pH na 7 pyridinem. Po odpaření, trituraci a sušení se provede analýza HPLC. Podmínky HPLC: sloupec Lichrosorb RP-18,5 m, 25 cm, eluční činidla (a) 0,1 M $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (pH 2,5), (b) MeCN, gradient 34 % až 39 % MeCN/20 minut, průtočná rychlost 1 ml/min a detektor 210 nm Knau.

Všechny peptidové fragmenty o čistotě větší než 90% se spojí a tak se získá celkem 10,8 g. Celkový výtěžek získaný štěpením VIP g peptidové pryskyřice je 46 g s průměrnou čistotou 95%.

Příklad 37

Synthesa Fmoc-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(tBu)-NH₂:
(chráněný Fmoc(19-31)-NH₂)

V 90 ml 10% diethylaminu v dimethylformamidu se rozpustí fragment I, Fmoc(26-31)-NH₂ (SEQ ID No:2) (8,91 g, 8,24 mmol) a míchá se dvě hodiny při teplotě místnosti. Amin a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a zbytek se trituruje se směsí hexanu a etheru (4:1), pevný produkt se oddělí a promývá se směsí hexanu a etheru (4:1), čímž se získá 7,0 g H-(26-31)-NH₂ v po-

době bezbarvého prášku (výtěžek 98,9 % teorie).

Fragment II, Fmoc(19-25)-OH (SEQ ID NO:3) (9,89 g , 8,15 mmol), H-(26-31-NH₂) (7,0 g, 8,15 mmol), HOBt (4,49 g, 29,3 mmol) a DIPEA (6,81 ml, 39,1 mmol) se rozpustí ve 120 ml systému dimethylformamid/methylenchlorid (1:1) a míchá se na ledové lázni. Během 10 minut se do uvedeného roztoku přidá po částech pevný HBTU (3,71 g, 9,78 mmol). V míchání se pokračuje 30 minut při teplotě 0 °C a pak 3 hodiny při teplotě místnosti. Roztok se odpaří ve vakuu k odstranění rozpouštědel a zbytek se rozpustí v methylenchloridu. Tento roztok se promývá nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3x), 10% citrónovou kyselinou (2x), vodou a solankou a vysuší se bezvodým síranem hořečnatým. Roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří, čímž se získá surový chráněný meziprodukt Fmoc(19-31)-NH₂ v podobě bezbarvé pevné látky 17,4 g (výtěžek 100 %). Analytickou HPLC je určena čistota přibližně 70%.

Příklad 38

Synthesa Fmoc-Asn-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg-(Pmc)-Lys(Boc)-(Gln-Nle-Ala-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(tBu)-NH₂: (chráněný Fmoc-(9-31)-NH₂)

V 90 ml 10% diethylaminu v dimethylformamidu se rozpustí Fmoc(19-31)-NH₂ (17,4 g) a míchá se dvě hodiny při teplotě místnosti. Amin a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a zbytek se trituruje se směsí hexanu a etheru (3:1), pevný produkt se oddělí a promývá se směsí hexanu a etheru (3:1), čímž se získá 16,67 g H-(19-31)-NH₂ v podobě bezbarvého pevné látky (výtěžek 100 % teorie).

Fmoc(9-18)-OH (SEQ ID NO:4) (16,59 g , 8,15 mmol), H-(19-31)-NH₂ (16,67 g), HOBt (4,49 g, 29,3 mmol) a DIPEA (6,81 ml,

39,1 mmol) se rozpustí ve 150 ml systému dimethylformamid/methylenchlorid (2:1) (roztok je velmi kalný) a míchá se na ledové lázni. Během 10 minut se do uvedeného roztoku přidá po částech pevný HBTU (3,70 g, 9,78 mmol). Roztok se vyčeří a v míchání se pokračuje 30 minut při teplotě 0 °C a pak tři hodiny při teplotě místnosti. Roztok se odpaří ve vakuu k odstranění rozpouštědel a zbytek se rozpustí v methylenchloridu. Tento roztok se promývá nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3x), 10% citronovou kyselinou (2x), vodou a solankou a vysuší se bezvodým síranem hořečnatým. Roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří, čímž se získá 24,77 g surového chráněného meziprojektu Fmoc (9-31)-NH₂ v podobě bezbarvé pevné látky (výtěžek přibližně 79 %), který podle analytické HPLC vykazuje čistotu 69%.

Příklad 39

Synthesa Ac-His(Trt)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Val-Phe-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-(Gln-Nle-Ala-Ala-Lys(Boc)-Lys-Tyr(tBu)-Leu-Asn-Asp-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Gly-Thr(tBu)-NH₂:
(chráněný Ac(1-31)-NH₂)

Ve 100 ml 10% diethylaminu v dimethylformamidu se rozpustí Fmoc(9-31)-NH₂ (24,77 g) a míchá se dvě hodiny při teplotě místnosti. Amin a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a zbytek se trituruje se směsí hexanu a etheru (3:1), pevný produkt se odfiltruje a promývá se směsí hexanu a etheru (3:1), čímž se získá 22,56 g H-(9-31)-NH₂ v podobě bezbarvé pevné látky (výtěžek 96,7 % teorie).

Roztok H-(9-31)-NH₂ (22,56 g, 6,22 mmol), Ac(1-8)-OH (SEQ ID NO:5) (8,79 g, 6,22 mmol), HOBt (3,43 g, 22,38 mmol) a DIPEA (5,19 ml, 29,84 mmol) ve 200 ml systému dimethylformamid/methylenchlorid (1:1) se míchá na ledové lázni. Během 10

minut se do uvedeného roztoku přidá po částech pevný HBTU (2,83 g, 7,46 mmol). Roztok se míchá 30 minut při teplotě 0 °C a pak tři hodiny při teplotě místnosti. Roztok se odpaří ve vakuu k odstranění rozpouštědel a zbytek se rozpustí v methylenchloridu. Tento roztok se promývá nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (3x), 10% vodnou citronovou kyselinou (2x), vodou a solankou a vysuší se bezvodým síranem hořečnatým. Roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří, čímž se získá 29,54 g surového chráněného meziproduktu Ac(1-31)-NH₂ v podobě bezbarvé pevné látky (výtěžek 72,2 % teorie), která podle analytické HPLC vykazuje čistotu přibližně 78%.

Příklad 40

Odstranění chránicí skupiny z chráněného Ac(1-31)-NH₂:

Syntesa cyklického analogu VIP

Chráněný Ac(1-31)-NH₂ (29,54 g) se rozpustí ve 150 ml směsi TFA (135 ml), EDT (4,5 ml), thioanisolu (7,5 ml), anisolu (3 ml) a míchá se dvě hodiny při teplotě místnosti. Tento roztok se odpaří k odstranění TFA a vlije se do 500 ml předchlazeného etheru, čímž vznikne sraženina, která se odfiltruje a promývá se opatrně etherem. Produkt se vysuší ve vakuu a získá se 25,5 g Ac(1-31)-NH₂ v podobě bezbarvého prášku s čistotou přibližně 72 až 75% podle zjištění HPLC.

Příklad 41

Čištění cyklického VIP analogu

Surový peptid Ac(1-31)-NH₂ se čistí několikanásobnou preparativní HPLC na systému Delta Prep 3000. Kvantitativní analýsy HPLC podílu surového produktu na sloupci Zorbac Protection Plus (standard cyklického VIP analogu) vykazuje obsah 9,95 g analogu v surovém produktu o hmotnosti 25,5 g. Při typické operaci se peptid (4 g) rozpustí ve 200 ml systému 1 %

TFA/H₂O a aplikuje se na sloupec YMC ODS-A (12,0 nm, 15 µm) (4,7 x 50 cm). Mobilní fáze je (A) 0,1 % TFA/H₂O, (B) 0,1 % TFA/50 % methanol/acetonitril. Gradient od 20 % (B) (10 minut) a pak 20 % až 50 % (B) ve 180 minutách při průtočné rychlosti 80 ml/min. Detekce UV při 215 nm. Frakce obsahující hlavní vrchol se spojí a vyhodnotí se analytickou HPLC. Frakce posouzené jako vysoce čisté se spojí, zkoncentrují se na rotační odparce a lyofilizují se k získání 1,2 g cyklického analogu VIP Ac(2-3)-NH₂. Zbytek surového produktu se zpracuje stejným způsobem a poskytne celkem 8,48 g (výtěžek 85,2 % teorie) vyčištěného cyklického analogu VIP, celkový výtěžek 23,9 %. Analytická HPLC a kapilární elektroforéza potvrzují, že čistota produktu je větší než 99%. Produkt se charakterizuje a identita se potvrdí analýsou aminokyselin, FAB-MS, optickým stáčením, ultrafialovou absorpcí a cirkulárním dichroismem.

Průmyslová využitelnost

Způsob poměrně jednoduché, účinné a ekonomické přípravy peptidového analogu Ac(1-31)-NH₂, vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP), který je relaxant/bronchodilator hladkého svalstva, reguluje sekreci hlenu v dýchacích cestách a má antialergické a antizánětlivé charakteristiky.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel

- (A) Jméno: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
- (B) Ulice: Grenzacherstrasse 124
- (C) Město: Basle
- (D) Stát: BS
- (E) Země: Švýcarsko
- (F) Poštovní kod ZIP: CH-4010
- (G) Telefon: 061-6885108
- (H) Telefax: 061-6881395
- (I) Telex: 962292/965542 hlr ch

(ii) Název vynálezu: Způsob přípravy analogu VIP a mezi-
produkty pro tento způsob

(iii) Počet sekvencí: 7

(iv) Forma pro počítač

- (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: Apple Macintosh
- (C) Operační systém: Apple Macintosh
- (D) Software: Word 5.1

(vi) Platné přihlašovací údaje

Číslo přihlášky: EP

(2) Informace pro SEQ ID NO:1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 31 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselina
- (C) řetězovitost: jeden řetězec
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(ix) Charakteristiky

- (A) jméno/klíč: modifikované místo
- (B) lokace: 21..25

(C) jiné informace: (poznámka = cyklizace vedlejšího řetězce v Lys21 na ASP25)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:1:

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr
			20					25					30	

(2) Informace pro SEQ ID NO:2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden řetězec

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:2:

Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

(2) Informace pro SEQ ID NO:3:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 7 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden řetězec

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(ix) Charakteristiky

(A) jméno/klíč: modifikované místo

(B) lokace: 3..7

(C) jiné informace: (poznámka = vedlejší řetězec Lys3 a Asp 7 jsou cyklizovány)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:3:

Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp

1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO:4:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 10 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden řetězec

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:4:

Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln Xaa Ala

1 5 10

(2) Informace pro SEQ ID NO:5:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 8 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden řetězec

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:5:

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu

1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO:6:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 13 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden řetězec

(D) topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ne
- (ix) Charakteristiky
 - (A) jméno/klíč: modifikované místo
 - (B) lokace: 3..7
 - (C) jiné informace: (poznámka = vedlejší řetězce
Lys3 a Asp7 jsou cyklizovány)
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:6:

Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr
 1 5 10

(2) Informace pro SEQ ID NO:7:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 23 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselina
 - (C) řetězcovitost: jeden řetězec
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ne
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:7:

Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln Xaa Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr
 20

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy analogu VIP Ac(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO:1) v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kopulují Fmoc chráněné peptidové fragmenty.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako chráněné peptidové fragmenty kopulují peptidový fragment I (Seq ID NO:2), peptidový fragment II (Seq ID NO:3), peptidový fragment III (Seq ID NO:4) a peptidový fragment IV (Seq ID NO:5).
3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
 - a) odstraňuje chránicí skupina Fmoc z peptidového fragmentu I a kopuluje se chráněné skupiny zbavený peptidový fragment I s chráněným peptidovým fragmentem II;
 - b) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z peptidu získaného ve stupni (a) a kopuluje se chráněné skupiny zbavený peptidový fragment s chráněným peptidovým fragmentem III;
 - c) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z peptidu získaného ve stupni (b) a kopuluje se chráněné skupiny zbavený peptidový fragment s chráněným peptidovým fragmentem IV;
 - d) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z peptidu získaného ve stupni (c) za získání sloučeniny AC(1-31)-NH₂.
4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se chráněné skupiny zbavený peptid Ac(1-31)-NH₂ čistí.
5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se peptid Ac(1-31)-NH₂ čistí preparativní chromatografií HPLC.
6. Způsob přípravy čištěného Ac(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO:1) kopulací čtyř skupinou Fmoc chráněných peptidových fragmentů, peptidového fragmentu I (Seq ID NO:2), peptidového fragmentu

II (Seq ID NO:3), peptidového fragmentu III (Seq ID NO:4) a peptidového fragmentu IV (Seq ID NO:5), v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

- a) odstraňuje chránicí skupina Fmoc z peptidového fragmentu I
- b) kopuluje se chráněné skupiny zbavený peptidový fragment I s chráněným peptidovým fragmentem II za získání chráněného meziproduktu Fmoc(19-31)-NH₂,
- c) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z meziproduktu Fmoc(19-31)-NH₂,
- d) kopuluje se chráněné skupiny zbavený meziprodukt Fmoc(19-31)-NH₂ s chráněným peptidovým fragmentem III za získání chráněného meziproduktu Fmoc(9-31)-NH₂,
- e) odstraňuje se chránicí skupina Fmoc z meziproduktu Fmoc(9-31)-NH₂,
- f) kopuluje se chráněné skupiny zbavený meziprodukt Fmoc(9-31)-NH₂ s chráněným peptidovým fragmentem IV za získání chráněného meziproduktu Ac(1-31)-NH₂,
- g) odstraňuje se chránicí skupina z chráněného peptidu Ac(1-31)-NH₂ a
- h) chránicí skupiny zbavený peptid Ac(1-31)-NH₂ se čistí.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se čištění podle stupně h) provádí preparativní chromatografií HPLC.

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se chránicí skupina z peptidových fragmentů a meziproduktů odstraňuje 10% Et₂NH v dimethylformamidu.

9. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se po odstranění chránicí skupiny odstraňuje fluoren promýváním peptidových fragmentů a meziproduktů systémem hexan/ether.

10. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e

t í m , že se chránicí skupiny zbavené peptidové fragmenty a meziprodukty

- a) kopulují s 1,0 ekvivalentem chráněných peptidových fragmentů za použití 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorfosfátu, 1-hydroxybenzotriazolu v systému dimethylformamid/methylenchlorid za použití diisopropylethylaminu,
- b) reakční směs se odpaří a zbytek se rozpustí v methylenchloridu a
- c) reakční směs se extrahuje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 10% kyselinou citronovou.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kopulace provádí za teploty 0 °C po dobu 30 minut až jedné hodiny a 25 °C po dobu tří hodin s 1,2 ekv. 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorfosfátu, 3,6 ekv. 1-hydroxybenzotriazolu a 4,8 ekv. diisopropylethylaminu.

12. Peptidy ze souboru zahrnujícího Fmoc(19-31)-NH₂ (SEQ ID NO:6) a Fmoc(9-31)-NH₂ (SEQ ID NO:7) jakožto meziprodukty pro provádění způsobu podle nároku 1.

13. Chráněné peptidové fragmenty ze souboru zahrnujícího Fmoc(26-31)-NH₂ (SEQ ID NO:2), Fmoc(19-25)-OH (SEQ ID NO:3), Fmoc(9-18)-OH (SEQ ID NO:4) a Ac(1-8)-OH (SEQ ID NO:5) jakožto meziprodukty pro provádění způsobu podle nároku 1.

14. Peptidové fragmenty podle nároku 13 ze souboru zahrnujícího (SEQ ID NO:2), (SEQ ID NO:3) a (SEQ ID NO:4) zbavené chránicích skupin jakožto meziprodukty pro provádění způsobu podle nároku 1.

15. Použití peptidových fragmentů podle nároku 12 až 13 pro přípravu Ac-(1-31)-NH₂ (Seq ID NO:1).