

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

290 347

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 369

(22) Přihlášeno: 07.02.1997

(40) Zveřejněno: 16.09.1998

(Věstník č. 9/1998)

(47) Uděleno: 15.05.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.07.2002

(Věstník č. 7/2002)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 K 7/06

C 07 K 7/64

(73) Majitel patentu:

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE
AV ČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Hlaváček Jan RNDr. CSc., Praha, CZ;
Žertová Miroslava Ing., Praha, CZ;
Ježek Rudolf Ing., Praha, CZ;

(74) Zástupce:

KAV ČR Patentové a licenční služby, Třída
Politických vězňů 7, Praha 1, 11121;

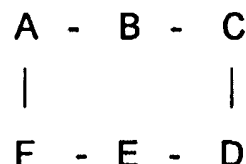
(54) Název vynálezu:

**Cyklopeptidy stimulující uvolňování růstového
hormonu a způsob jejich přípravy**

(57) Anotace:

Řešení se týká nových cyklických peptidů stimulujících uvolňování růstového hormonu obecného vzorce I, kde A znamená zbytky histidinu nebo cysteinu v L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny, B a D znamenají zbytky tryptofanu, terc.leucinu nebo neopentylglycinu v L nebo D konfiguraci, C znamená zbytek alaninu v L nebo D konfiguraci, E znamená zbytky lysinu, fenylalaninu nebo tetrahydroizochinolinkarboxylové kyseliny v L nebo D konfiguraci, F znamená zbytky lysinu nebo cysteinu v L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny; nebo je cyklus tvořen disulfidovou případně thiomethylenovou vazbou mezi postranními řetězci zbytků cysteinu v L nebo D konfiguraci, případně v kombinaci se zbytkem 3-merkaptopropionové kyseliny; způsob přípravy těchto cyklopeptidů spočívá v tom, že se N^α-Fmoc-N^ε-Boc-lysin nebo N^α-Fmoc-S-Trt-cystein, případně S-Trt-3-merkaptopropionová kyselina připojené na polymerní nosič postupně kondenzují s aktivními hydroxybenzotriazolovými estery N^α-Fmoc-aminokyselin v přítomnosti diizopropylethylaminu, přičemž kondenzační

reakce se nechá proběhnout v syntetickém cyklu za přidavku dimethylsulfoxidu, N^α-Fmoc chránicí skupina se v každém kroku syntézy odštěpí působením piperidinu v dimethylformamidu a v závěrečném stupni se hexapeptid po odštěpení z pryskyřice působením slabě alkalického činidla s následným okyselením nebo 1% TFA kyselinou cyklizuje působením difenylfosforylazidu, zatímco hexapeptidy se zbytky aminokyseliny cysteinu v její L nebo D konfiguraci, případně 3-merkaptopropionové kyseliny se odštěpí z pryskyřice za současného uzavření disulfidové vazby působením jodu ve směsi rozpouštědel AcOH, TFE a DCM.



CZ 290347 B6

Cyklopeptidy stimulující uvolňování růstového hormonu a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

5

Vynález se týká cyklopeptidů stimulujících uvolňování růstového hormonu a způsobu jejich přípravy

Dosavadní stav techniky

Cyklické peptidy jsou silné a specifické stimulatory sekrece růstového hormonu (dále jen GH) u rozmanitých živočišných druhů, které mají určité aminokyselinové pořadí.

- 15 Mechanismus biologické úlohy GH spočívá v regulaci funkce různých růstových faktorů (GFs, Rothe M., Falanda V., Arch. Dermatol. 125, 1390 (1989); Cohen S., Carpenter G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 1317 (1975); Lynch S. E., Nixon J. C., Colvin R. B., Anthonianes H. N.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7696 (1987); Baxter R. C.: Adv. Clin. Chem. 25, 49 (1986); Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L.: Mol. Cell. Endocrinol. 16, 187 (1986)), které
20 mají komplexní význam pro růst a syntézu buněk. Jsou považovány za důležité mediátory při hojení ran, při fibróze a obměně tkání. Nedostatečná sekrece GH má za následek poruchu funkce GFs a následně omezuje růst a regulaci tkáňového systému v různých organismech. Na druhé straně, zvýšený přísun GH vede ke stimulaci funkce GFs v metabolismu a zlepšuje růst, stav či hojení tkání a orgánů člověka a živočichů (Rothe M., Falanga V., Arch. Dermatol. 125, 1390
25 (1989)).

- Neuroendokrinní systém, kde GH a GFs hrají tak důležitou funkci se uplatňuje rovněž v procesu stárnutí organismu (Meites J., Goya R., Takahasni S.: Exp. Gerontol. 22, 1 (1987); Fabris N.: Intern. J. Neuroscience, 51, 373 (1990), Ďoubal S.: Mech. Ageing Dev. in press). Teprve
30 nedávno byly popsány účinky nízkých dávek GH na imunitní systém a stárnutí myši (Khansari D. N., Gustad T.: Mech. Ageing Dev. 56, 87 (1991)).

- Endogenní sekrece GH může být kromě tzv. releasing faktoru (GRF) z hypothalamu, obsahujícího 44 aminokyselinových zbytků, stimulována i tzv. releasing peptidem : His-D-Trp-
35 Ala-Trp-D-Phe-Lys-HN₂ (GHRP), složeným pouze ze 6 aminokyselinových zbytků a působícím sekrecí GH in vitro i in vivo (Momany F. A., Bowers C. Y., Reynolds G. A., Chang D., Hong A., Newlander K.: Endocrinology 108, 31 (1981); Bowers C. Y., Momany F. A., Reynolds G. A., Hong A.: Endocrinology, 114, 1537 (1984)).

- 40 Tento hexapeptid amid neinteraguje se stejným receptorovým místem v hypofýze jako GRF a je patrně zapojen do jiného mechanismu sekrece GH (Sartor O., Bowers C. Y., Chang D.: Endocrinology, 116, 952 (1985); Cheng K., Chan W. W. S., Barrets, Jr. A., Convey D. M., Smith R. G.: Endocrinology 124, 2791 (1989)). U člověka je jeho potence dokonce vyšší než účinek zmíněného GRF (Yellin T. O., Huffman W. F. in „Peptides“; Chemistry, Structure and
45 Biology. Proc. 11th A.P.S. (Rivier. J. E., Marshall G. R., Eds.), p. 214. ESCOM, Leiden, 1990). Pro svou krátkou aminokyselinovou sekvenci je z praktického hlediska GHRP, případně jeho analogy, zajímavější než GRF obsahující desítky aminokyselinových zbytků a mohl by být proto využíván v humánní i veterinární medicíně.

- 50 Před časem jsme objevily, že GHRP také výrazně zpomaloval proces stárnutí myši v experimentu trvajícím 10 měsíců (Hlaváček J., Směkal O., Barth T., Ďoubal S., Robinson I.: Peptides 1992 (Schneider C. H. and Eberle A. N., Eds.), p. 741, ESCOM, 1993).

- Na základě výpočtů (Momany F. A., Bowers C. Y., Reynolds G. A., Hong A., Newlander K.: Endocrinology, 114, 1531 (1984)) byla pro GHRP navržena pseudocyklická konformace
55

umožněná flexibilním zbytkem alaninu v centrální části molekuly a stabilizovaná interakcí mezi aromatickými zbytky aminokyselin opačné chiralidy v amino- (His, D-Trp) a karboxy- (Trp, D-Phe) terminální části. Navržená konformace je spojována s účinkem GHRP na stimulaci uvolňování GH.

5

Výše uvedené poznatky nás vedly k myšlence kovalentně fixovat výše uvedenou pseudo-cyklickou konformaci. Proto jsme syntetizovali řadu cyklopeptidů (I) podle schématu hlava k ocasu a sledovali jejich účinek na uvolňování GH do plazmy. Některé z analogů vykazují agonistický účinek lineárního hexapeptidu amidu, což potvrzuje naši představu, že cyklické uspořádání je relevantní pro interakci cyklopeptidu s odpovídajícím receptorem a nebrání následujícím procesům, které vedou k sekreci GH. Navíc, při dlouhodobém experimentu na myších (10 měsíců), byl jeden z cyklických analogů dokonce účinnější než GHRP při zpomalení procesu stárnutí u experimentálních zvířat.

10

15 Tyto peptidy a jejich kombinace působí přímo na přední lalok hypofýzy za specifického spouštění GH a jsou potenciálními analogy GHRP s protrahovaným účinkem. Některé z nich rovněž v dlouhodobém testu zpomalují pochody vedoucí ke stárnutí experimentálních zvířat.

20 Podstata vynálezu

Cyklické peptidy stimulující uvolňování růstového hormonu obecného vzorce I



25 kde A znamená zbytky aminokyselin histidinu nebo cysteinu v jejich L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny,

B a D znamenají zbytky aminokyselin tryptofanu, terc.leucinu nebo neopentylglycinu v jejich L nebo D konfiguraci,

30 C znamená zbytek aminokyseliny alaninu v jeho L nebo D konfiguraci,

E znamená zbytky aminokyselin lysinu, fenylalaninu nebo tetrahydroizochinolinkarboxylové kyseliny v jejich L nebo D konfiguraci,

35 F znamená zbytky aminokyselin lysinu nebo cysteinu v jejich L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny;

40 nebo je cyklus tvořen disulfidovou případně thiomethylenovou vazbou mezi postranními řetězci zbytků aminokyseliny cysteinu v jeho L nebo D konfiguraci, případně v kombinaci se zbytkem 3-merkaptopropionové kyseliny.

45 Způsob přípravy cyklopeptidů podle vynálezu spočívá v tom, že se N^α-Fmoc-N^ε-Boc-lysin nebo N^α-Fmoc-S-Trt-cystein, případně S-Trt-3-merkaptopropionová kyselina připojené na polymerní nosič postupně kondenzují s aktivními hydroxybenzotriazolovými estery N^α-Fmoc-aminokyselin v přítomnosti diizopropylethylaminu, přičemž kondenzační reakce se nechá proběhnout v syntetickém cyklu za přítomnosti dimethylsulfoxidu, N^α-Fmoc chránicí skupina se v každém kroku syntézy odštěpí působením piperidinu v dimethylformamidu a v závěrečném stupni se hexapeptid po odštěpení z pryskyřice působením slabě alkalického činidla s následným okyselením nebo 1% TFA kyselinou cyklizuje působením difenylfosforylazidu, zatímco

hexapeptidy se zbytky aminokyseliny cysteinu v její L nebo D konfiguraci, případně 3-merkaptopropionové kyseliny, jsou odštěpeny z pryskyřice za současného uzavření disulfidové vazby působením jodu ve směsi rozpouštědel AcOH, TFE a DCM.

- 5 Peptidy jsou syntetizovány podle obecného postupu modifikacemi standardních metodik na polymerním nosiči nebo v roztoku. V prvním případě se ke karboxyterminální aminokyselině připojené na polymerní nosič s výhodou chlormethylovou Merrifieldovu pryskyřici nebo její kysele labilnější hydroxymethylové, případně chlortritylové modifikace postupně připojují N^{α} -Fmoc-aminokyseliny v trojnásobném přebytku. Jejich karboxylová skupina je aktivovaná pomocí diizopropylkarbodiimidu (dále jen DIC) a N-hydroxybenztriazolu (dále jen HOBt) jako HOBt ester a kondenzace prováděna v přítomnosti dimethylformamidu (dále jen DMF) resp. N-methylpyrrolidonu (dále jen NMP). Syntetický cyklus pro požadované připojení amino-
- 10 kyseliny zahrnuje odštěpení N^{α} -Fmoc chránicí skupiny působením 20% piperidinu v DMF (5+20 min), pětinasobné promytí peptidyl-pryskyřice DMF, 2-propanolem, DMF resp. NMP. Acylační reakce zpravidla vyžaduje cyklus 2 hod, přičemž po 40 min se přidá dimethylsulfoxid (15% v reakční směsi). Dokončení reakce je kontrolováno ninhydrinovým testem (Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I.: Anal. Biochem. 34, 595 (1970)) a změnou zbarvení bromfenolové modři (Krchňák V., Vágner J., Šafář P., Lebl M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 53, 2542 (1988)). V případě nekompletní kondenzace (pod 99 %) je přidáno BOP činidlo ve
- 15 třímolárním přebytku s DIEA a reakce prodloužena o 1 h. Nekompletní kondenzace i po této operaci je eliminována acylační reakcí s 25% acetanhydridem v DMF po dobu 5 až 10 min.

- Peptid se odštěpí z pryskyřice mírně alkalickým vodným roztokem 0,1 M NaOH ve směsi rozpouštědel MeOH a dioxan, během 3 min, přičemž štěpení se provede celkem třikrát. Poté se
- 25 roztok okyslí octovou kyselinou k regeneraci karboxylové funkce. V případě kysele labilní pryskyřice se peptid odštěpí působením 1% TFA. Surový produkt analogu GHRP se odsolí na koloně s náplní biogelu Sephadex G-10 za použití 0,2M octové kyseliny. Po lyofilizaci se peptid dále čistí gelovou filtrací na Sephadexu G-25 v 0,2M octové kyselině, preparativní kontinuální průtokovou elektroforézou (Prusík Z., Kašíčka V., Mudra P., Štěpánek J., Smékal O., Hlaváček J.: Electrophoresis 11, 932 (1990)) v 0,5M octové kyselině a nakonec preparativní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (dále jen HPLC). Preparativní HPLC byla prováděna na zařízení fy Spectra Physics s kolonou Vydac C18 při gradientu: 0 až 30 % MeOH, 10 min a 30 až 80 % MeOH, 40 min v 0,05% trifluoroctové kyselině, průtoková rychlost 3 ml/min s detekcí při 222 resp. 254 nm. Analytická kontrola čistoty produktů byla prováděna pomocí TLC v systémech S1(2-butanol-98% HCOOH-voda, 75:13,5:11,5), S2(2-butanol-25% vodný amoniak-voda, 85:7,5:7,5), S3(1-butanol-octová kyselina-voda, 4:1:1) a S4(1-butanol-pyridin-octová kyselina-voda, 15:10:3:6) dále elektroforézou na papíře Whatman 3MM při potenciálovém spádu 20V/cm, 1 h v 1M octové kyselině (pH 2,4) a v pufru pyridin-acetát (pH 5,7) a pomocí analytické HPLC (kolona Vydac C18, 20 až 80 % MeCN/0,5% trifluoroctová
- 35 kyselina, 60 min, průtok 1 ml/min, detekce 222 a 280 nm), aminokyselinové analýzy na přístroji Durrum Instrum. Corp. USA, po hydrolýze peptidu v 6M-HCl, 20 h při 110 °C a hmotové spektrometrie na přístroji VG Analytical, England.

- V dalším je vynález a obecný experimentální postup blíže objasněn v příkladech provedení aniž se tím jakkoli omezuje.
- 45

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -Boc-lysyl-4-oxomethylenfenyl-pryskyřice

Merrifieldova pryskyřice (substituce 0,7 mmol/g, 2% kopolymer s divinylbenzenem, Fluka, 2,8 g) byla promyta DMF, vodou, vysušena ve vakuu a promyta benzenem. K pryskyřici byl
 10 přidán roztok cezné soli připravené z N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -Boc-Lys-OH (3,42 g) a Cs_2CO_3 (3,1 g) mícháním obou komponent ve směsi DMF-voda, 3 hod a celá směs byla míchána 48 hod při 40 °C. Po odstranění rozpouštědla byl polymerní materiál s navázanou aminokyselinou promyt na fritě EtOH a DCM a po vysušení bylo 1,67 g použito pro postupnou výstavbu peptidového
 15 řetězce.

Příklad 2

cyklo(D-His-Trp-Ala-D-Trp-Pre-Lys)

N^{α} -Fmoc chránicí skupina z navázaného Lys(Boc) podle příkladu 1 byla odštěpena 20% piperidinem v DMF (5 + 20 min) a po promytí polymerního materiálu DMF, 2-propanolem a opět DMF byl produkt acylován postupně N^{α} -Fmoc deriváty Phe (0,75 g, 2 h), D-Trp (0,46 g, 3 h), Ala (0,57 g, 2 h), Trp (0,38 g, 3 h) a D-His(Boc) (0,42 g, 2 h). Fmoc skupina byla odštěpena
 25 20% piperidinem v DMF a všechny kondenzace probíhaly působením DIC v přítomnosti HOBt v DMF. Částečně chráněný hexapeptid byl posléze odštěpen z pryskyřice v prostředí vodného 0,1M NaOH v MeOH-dioxan (3x50 ml) při teplotě místnosti a od polymerního materiálu oddělen filtrací a promytím 50 ml DMF, DCM a MeOH. Získáno 0,52 g surového produktu, který byl cyklizován působením difenylfosforylazidu v přítomnosti 1M roztoku K_2HPO_4 . Po
 30 cyklizaci byl produkt čištěn gelovou filtrací na Sephadexu G-10 a G-25 v 0,2M octové kyselině a pomocí HPLC. Aminokyselinová analýza: His 0,93, Ala 0,98, Trp 1,72, Phe 1,05, Lys 1,0. Pro $\text{C}_{56}\text{H}_{69}\text{N}_{11}\text{O}_{10}$ (1056,2) byl zjištěn $M+H^+$ 1057,1. V posledním stupni byl cyklopeptid rozpuštěn ve směsi TFA(90)-anisol(5)-ethandithiol(5) s přidavkem 100 mg indolu a roztok po 1 h odpařen do sucha za vakua, zbytek extrahován etherem, rozpuštěn ve 3M octové kyselině a roztok promyt
 35 3x etherem a po zředění vodou lyofilizován. Surový produkt byl čištěn semipreparativní HPLC v gradientu mobilní fáze 50-90% MeOH v 0,05% TFA, 30 min (retenční čas 5,21 min).

Pro $\text{C}_{46}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_6$ (856,02) byl stanoven $M+H^+ = 857$. Aminokyselinová analýza: Lys 1, Phe 1,03, Trp 1,84, Ala 1,04, His 0,96; $E_{\text{Gly}}^{2,4} 1,18$, $E_{\text{His}}^{5,7} 0,82$.

Příklad 3

cyklo(His-D-Trp-Ala-Trp-D-Tic-Lys)

Fmoc-Lys(Boc)-oxymethylenfenyl-resin (0,62 g) byla po odštěpení Fmoc-chránicí skupiny 20% piperidinem v DMF postupně acylována HOBt estery Fmoc derivátů D-Tic (0,6 g, 3 h), Trp (0,7 g, 4 h), Ala (0,3 g, 2 h), D-Trp (0,7 g, 3 h) a His(Boc) (0,73 g, 2 h). Částečně chráněný hexapeptid byl odštěpen z pryskyřice jako v příkladu 2 a cyklizován rovněž pomocí difenyl-
 50 fosforylazidu v přítomnosti K_2HPO_4 . Po odštěpení Boc chránicích skupin jako v příkladu 2 byl cyklohexapeptid čištěn preparativní HPLC za použití gradientu mobilní fáze 50 až 90% MeOH v 0,05% TFA, 30 min, s retenčním časem 5,64. Aminokyselinová analýza: His 0,94, Trp 1,56, Ala 1,08, Tic 0,93, Lys 1,0. $E_{\text{Gly}}^{2,4} 1,16$, $E_{\text{His}}^{5,7} 0,82$. Pro $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_6$ (868,0) stanoven $M+H^+ = 868,4$.

Příklad 4

cyklo(His-D-Neo-Ala-Trp-D-Phe-Lys)

5

N^α -Fmoc chránicí skupina z navázaného Lys(Boc) byla odštěpena 20% piperidinem v DMF (5 + 20 min) a po promytí polymerního materiálu DMF, 2-propanolem a opět DMF byl produkt acylován postupně N^α -Fmoc deriváty D-Phe (0,75 g, 2 h), Trp (0,46 g, 3 h), Ala (0,57 g, 2 h), D-Neo (0,31 g, 2 h) a His(Boc) (0,42 g, 3 h). Fmoc skupina byla odštěpena jako v předchozích případech. Všechny kondenzace probíhaly působením DIC v přítomnosti HOBt v DMF. Částečně chráněný hexapeptid byl uvolněn z pryskyřice jako v příkladu 2 a cyklizován rovněž pomocí difenylfosforylazidu v přítomnosti K_2HPO_4 . Po odštěpení Boc chránicích skupin jako v příkladu 2 měl cyklohexapeptid aminokyselinové složení: His 0,94, Neo 0,97, Trp 0,82, Ala 1,08, Phe 0,93, Lys 1,0. $E_{Gly}^{2,4}$ 1,12, $E_{His}^{5,7}$ 0,79.

15

Pro $C_{42}H_{56}N_{10}O_6$ (796,97) byl zjištěn $M+H^+ = 797$. Preparativní HPLC poskytla při použití gradientu mobilní fáze 50 až 90% MeOH v 0,05% TFA, 30 min čistý produkt III s retenčním časem 6,68.

20

Příklad 5

 N^α -Fmoc- N^ϵ -Boc-Lys-2-methoxy-4-alkoxybenzylalkohol-pryskyřice

25

K Sasrin pryskyřici (substituce 0,9 mmol/g, Bachem, 1 g) v DMF byl za míchání přidán aktivní ester vytvořený reakcí Fmoc-Lys(Boc)-OH (1,15 g) s HOBt (0,76 g) a „komplexu“ pentafluorfenol/DCC (3,74 g) při 0 °C, 30 min a dimethylaminopyridin (30 mg). pH směsi bylo upraveno na 7 přidávkem DIEA (1,2 ml) a po 4 dnech míchání při teplotě místnosti byla pryskyřice s navázanou aminokyselinou odsáta na fritě a promyta 5x 10 ml DMF, EtOH, iPrOH a MeOH a sušena v exsikátoru do konstantní váhy. Vážením (1,24 g) a stanovením Fmoc skupiny byla zjištěna substituce 0,57 mmol aminokyseliny na 1 g pryskyřice. Nezareagované OH-CH₂ skupiny linkeru byly acetylovány směsí acetanhydrid (1,3 ml)-DIEA(2 ml)-DCM(8 ml) a po 1 hod pryskyřice odsáta na fritě a promyta 3x 10 ml DCM, iPrOH a DMF. Po odštěpení Fmoc skupiny 20% piperidinem v DMF a promytí 5x10 ml DMF byl materiál připraven pro postupnou výstavbu peptidového řetězce jako v příkladu 1.

35

Příklad 6

40



H-Cys-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Cys-OH

Do roztoku Fmoc-Cys(Trt)-OH (0,96 g) v DCM (20 ml) a DMF (1 ml) byla za míchání při teplotě místnosti přidána chlortritylová pryskyřice (2 g, subst. 1,3 mmol Cl/g, NovaBiochem, Švýcarsko) a po 5 min 0,26 ml a po dalších 5 min 0,52 ml DIEA. Po 60 min míchání byla reakce stopnuta přidávkem MeOH (2 ml) a po 10 min rozpouštědlo odfiltrováno a na fritě pryskyřice s navázanou aminokyselinou promyta 3x20 ml DCM, DMF, iPrOH, DMF, iPrOH, MeOH, etheru a sušena nad KOH v exsikátoru. Vážením a stanovením Fmoc skupiny byla zjištěna substituce 0,54 mmol/g pryskyřice. Poté byla odštěpena Fmoc chránicí skupina 5%, resp. 20% piperidinem ve směsi DCM/DMF 1:1 (10+15 min) a po 4x promytí DMF byl produkt acylován postupně N-Fmoc deriváty D-Phe (0,75 g, 2 h), Trp (0,46 g, 3 h), Ala (0,57 g, 2 h), D-Trp (0,38 g, 3 h) a Cys(Trt) (0,72 g, 2 h). Fmoc skupina byla odštěpena 20% piperidinem v DMF a všechny kondenzace probíhaly působením DIC v přítomnosti HOBt v DMF. Částečně chráněný hexapeptid byl posléze uvolněn z pryskyřice a současně uzavřena disulfidová vazba mezi oběma Cys zbytky působením jodu (0,76 g) ve směsi rozpouštědel: AcOH (1,2 ml), TFE (2,4 ml),

55

- DCM (8,4 ml), 10 min při teplotě místnosti. Roztok byl extrahován 10 ml 0,1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do odbarvení roztoku, který byl posléze odpařen a zbytek rozpuštěn ve 3M AcOH a lyofilizován. Surový produkt byl čištěn semipreparativní HPLC v gradientu mobilní fáze 5% až 90% ACN v 0,05% TFA, 30 min (retenční čas 24,3 min) a pro $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_2$ (813,0) zjištěn m/z = 813,3. Aminokyselinová analýza: Ala 1, Trp 1,64, Phe 1,03, Cys 2,02.

Zkratky

- Zkratky aminokyselin odpovídají nomenklatuře navržené IUPAC-IUB (Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Recommendations 1983: Eur. J. Biochem. 138, 9 (1984)). Dále jsou pro chránící skupiny aminokyselin použity tyto zkratky: AcOH, octová kyselina; Boc, terc.butyloxykarbonyl; DCC, N,N-dicyklohexylkarbodiimid; DCM, dichlor-methan; DIC, N,N-diizopropylkarbodiimid; DIEA, diizopropylethylamin; DMF, dimethyl-formamid; EtOH, ethanol; Fmoc, fluorenylmethoxykarbonyl; HOBt, 1-hydroxybenztriazol, MeOH, methanol; iPrOH, 2-propanol; TFA, trifluoroctová kyselina; Trt, trifenylmethyl.

Průmyslová využitelnost

- Látky podle vynálezu mohou být využity v humánní a veterinární medicíně při ovlivnění imunitního systému v souvislosti s regulací funkce některých růstových faktorů za účelem zpomalování pochodů uplatňovaných v procesu stárnutí.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Cyklické peptidy stimulující uvolňování růstového hormonu obecného vzorce I



kde A znamená zbytky aminokyselin histidinu nebo cysteinu v jejich L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny,

- B a D znamenají zbytky aminokyselin tryptofanu, terc.leucinu nebo neopentylglycinu v jejich L nebo D konfiguraci,

C znamená zbytek aminokyseliny alaninu v jeho L nebo D konfiguraci,

- E znamená zbytky aminokyselin lysinu, fenylalaninu nebo tetrahydroizochinolinkarboxylové kyseliny v jejich L nebo D konfiguraci,

F znamená zbytky aminokyselin lysinu nebo cysteinu v jejich L nebo D konfiguraci nebo zbytek 3-merkaptopropionové kyseliny;

- nebo je cyklus tvořen disulfidovou případně thiomethylenovou vazbou mezi postranními řetězci zbytků aminokyseliny cysteinu v jeho L nebo D konfiguraci, případně v kombinaci se zbytkem 3-merkaptopropionové kyseliny.

2. Způsob přípravy cyklopeptidů podle nároku 1 obecného vzorce I, **v y z n a č u j í c í s e**
t í m, že se N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -Boc-lysin nebo N^{α} -Fmoc-S-Trt-cystein, případně S-Trt-3-
merkaptopropionová kyselina připojené na polymerní nosič postupně kondenzují s aktivními
5 hydroxybenztriazolovými estery N^{α} -Fmoc-aminokyselin v přítomnosti diizopropylethylaminu,
příčemž kondenzační reakce se nechá proběhnout v syntetickém cyklu za přídavku dimethyl-
sulfoxidu, N^{α} -Fmoc chránicí skupina se v každém kroku syntézy odštěpí působením piperidinu
v dimethylformamidu a v závěrečném stupni se hexapeptid po odštěpení z pryskyřice
polymerního nosiče působením slabě alkalického činidla s následným okyselením nebo 1% TFA
10 kyselinou cyklizuje působením difenylfosforylazidu, zatímco hexapeptidy se zbytky amino-
kyselin cysteinu v její L nebo D konfiguraci, případně 3-merkaptopropionové kyseliny se
odštěpí z pryskyřice za současného uzavřené disulfidové vazby působením jodu ve směsi
rozpouštědel AcOH, TFE a DCM.

15

Konec dokumentu
