

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

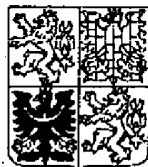
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3980-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.96, 02.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9611881, 96/9622890**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 02. 99**
(Věstník č. 2/99)

(86) PCT číslo: **PCT/GB97/01491**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/46578**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 7/02
A 61 K 38/08

(71) Přihlášovatel:

ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce:

Cotton Ronald, Macclesfield, GB;

Edwards Philip Neil, Macclesfield, GB;

Luke Richard William Arthur, Macclesfield,
GB;

Oldham Keith, Macclesfield, GB;

(74) Zástupce:

Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha
7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Deriváty peptidů, způsob jejich přípravy
a farmaceutický prostředek, který je
obsahuje

(57) Anotace:

Farmaceuticky využitelné deriváty peptidů
vzorce I, $P-AA^1-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6-AA.su$
 $p.7-AA^8-Q$, kde $p, AA^1, AA^2, AA^3, AA^4, AA^5,$
 AA^6, AA^7, AA^8 a Q mají významy definované v
popisu a jejich farmaceutické prostředky,
které je obsahují. Nové deriváty peptidů jsou
cenné při léčbě T-buňkami zprostředkova-
ných na MHC třídy II závislých autoimunních
nebo zánětlivých onemocnění, jako je revma-
toidní artritida. Způsob přípravy nových de-
rivátů peptidů.

CZ 3980-98 A3

DERIVÁTY PEPTIDŮ, ZPŮSOB JEJICH PŘÍPRAVY A FARMACEUTICKÝ
PROSTŘEDEK, KTERÝ JE OBSAHUJE

44774

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká určitých nových derivátů peptidů, které mají farmakologicky využitelné vlastnosti pro použití při léčbě autoimunních onemocnění nebo onemocnění, jako je revmatoidní artritida, a jiných onemocnění zprostředkovaných T-buňkami závislými na MHC třídy II. Vynález se také týká farmaceutických prostředků obsahujících nové peptidové deriváty, způsobu jejich přípravy a jejich použití při léčbě jednoho nebo více výše uvedených onemocnění nebo stavů a při výrobě nových léčiv pro použití při léčbě těchto onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Stimulace imunitní odpovědi člověka závisí na rozpoznání proteinových antigenů T buňkami. Avšak T buňky nemohou na antigen odpovědět samy o sobě, ale jsou aktivovány antigenem, pouze když se tento komplexuje s molekulami hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) na povrchu buněk obsahujících antigen, jako jsou B-buňky, makrofágy nebo dendritické buňky.

Molekuly MHC třídy I vyvolávají odpověď zabíječských T-buněk (T-killer cells), čímž dojde ke zničení buněk nesoucích antigen. Molekuly MHC třídy II vyvolávají odpověď pomocných T buněk (T-helper cells), která kontroluje expanzi a maturaci vybraných buněk B (t.j. vznik protilátek specifických k antigenu) a aktivaci makrofágů.

Kritickým požadavkem imunitního systému je schopnost rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizorodými“ antigeny. Toto rozlišování je nutné proto, aby mohl imunitní systém odpovědět na vniknutí cizích patogenů za zachování tolerance k vlastním proteinům a tím působit preventivně proti poškození normální tkáně.

- Autoimunní onemocnění vznikají, pokud se poruší vlastní tolerance a tak se umožní, aby imunitní systém reagoval proti vlastním tkáním, čímž vznikají spoje při revmatoidní arthritidě. Má se za to, že udržení tolerance, a tedy zabránění autoimunním onemocněním, je kriticky závislé na funkci MHC molekul.

Zjištění, že mnoho autoimunních onemocnění je spojeno s dědičností určitých MHC alel svědčí o klíčové roli molekul MHC při pathogenezi autoimunních onemocnění. Například mnohočetná skleróza je spojena s dědičností HLA-DR2, diabetes mellitus závislý na insulinu je spojen s dědičností HLA-DR3 a Hashimotova thyroditida je spojena s dědičností HLA-DR5. Zvláště silná vazba existuje mezi dispozicí a vývojem chronické zánětlivé revmatoidní arthritidy a dědičností HLA-DR4Dw4 a/nebo HLA-DR4Dw14 a/nebo HLA-DR1. Předpokládá se tedy, že autoimunní onemocnění zahrnující MHC molekuly se váží k určitým vlastním antigenům a přenášejí je do T buněk, čímž se stimuluje autoimunní odpověď. Jiné peptidy, které se mohou vázat k autoimunním molekulám spojeným s MHC a/nebo buď předcházejí vazbě nebo vytlačují již vázané vlastní antigeny a/nebo peptidy, které inhibují aktivaci T buněk (zejména aktivitu pathogenních T buněk (například Th 1 buněk)) a/nebo peptidy, které zvyšují aktivitu ochranných T buněk (například Th 2 buněk) nebo peptidy, které interagují s molekulami MHC pomocí alternativního mechanismu působení tak, že předcházejí nebo modifikují stimulaci autoimunní odpovědi přes tak zvané molekuly MHC, mohou specificky potlačit autoimunní odpověď.

Činidlo tohoto druhu by mohlo poskytnout léčbu autoimunních onemocnění a zároveň zamezit obecnému potlačení imunitního systému, čímž se omezí nežádoucí vedlejší účinky. Toto by mělo významné výhody před dosud používanou léčbou onemocnění, jako je revmatoidní arthritida. V současné době se revmatoidní arthritida léčí nejprve pomocí činidel zmírňujících symptomy,

jako je NSAID, která nemají jakýkoli užitečný vliv na zlepšení onemocnění a jsou často spojena s nežádoucími vedlejšími účinky. Léčba závažnějších onemocnění spoléhá na použití takzvaných činidel „druhé linie“. Tato činidla jsou často cytotoxické sloučeniny, které mají omezenou účinnost a mohou způsobovat některé komplikace vzhledem k jejich toxicitě. Činidla modifikující onemocnění bez přidružené nespecifické cytotoxicity by tedy byla velmi prospěšná při léčbě revmatoidní artritidy.

V mezinárodních patentových přihláškách číslo WO 92/02543, WO 93/05011 a WO 95/07707 jsou uvedeny peptidy, které se váží k molekulám MHC a inhibují aktivaci T buněk.

Ačkoli bylo objeveno mnoho peptidů, které inhibují aktivaci T buněk omezených HLA-DR pomocí vazby k molekulám HLA-DR, stále existuje potřeba alternativních sloučenin, které se váží k takovým molekulám a/nebo buď působí preventivně proti vazbě nebo vytlačují již vázané vlastní antigeny a/nebo inhibují aktivaci T buněk a/nebo zvyšují aktivitu ochranných T buněk nebo sloučenin, které interagují s molekulami MHC pomocí alternativního mechanismu působení tak, že předcházejí nebo modifikují stimulaci autoimunní odpovědi, která způsobuje onemocnění nebo stavy uvedené výše.

Podstata vynálezu

Zjistili jsme, že deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu (uvedené níže) mají překvapivě tyto farmakologicky využitelné vlastnosti a toto zjištění je základem předkládaného vynálezu.

Podle jednoho aspektu předkládaný vynález poskytuje derivát peptidu obecného vzorce I (uvedený níže) nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, kde

P je hydrofobní zbytek;

05.12.95

AA¹, AA², AA³, AA⁴, AA⁵, AA⁶, AA⁷ a AA⁸ jsou L-aminokyselinové zbytky, kde 1, 2 nebo 3 ze zbytků AA¹, AA⁴ a AA⁷ jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II (uvedeného níže)

kde n je celé číslo 1, 2, 3 nebo 4;

X je skupina -NH-CO-, skupina -CO- (karbonylová skupina) nebo skupina -O.CO- (oxykarbonylová skupina);

R¹ a R² jsou vybrány z (A), (B) a (C), kde

(A) je skupina obecného vzorce $-(CH_2)_a-CO-N(R^3)(R^4)$, kde a je celé číslo 1 nebo 2 a R³ a R⁴ jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupin $-[(CH_2)_bO]_m-R^a$, kde R^a je methylová skupina nebo ethylová skupina a m je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud m je 1, b je 2 nebo 3 a pokud m je 2, 3, 4 nebo 5, hodnota b v každé skupině $-(CH_2)_bO-$ je nezávisle vybrána z hodnot 2 a 3;

(B) je skupina obecného vzorce $-(CH_2)_cO(CH_2)_d-CO-N(R^5)(R^6)$, kde c je celé číslo 2 nebo 3, d je celé číslo 1, 2 nebo 3, a R⁵ a R⁶ jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupin $-[(CH_2)_eO]_p-R^b$, kde R^b je methylová skupina nebo ethylová skupina a p je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud p je 1, e je 2 nebo 3 a pokud p je 2, 3, 4 nebo 5, hodnota e pro každou skupinu $-(CH_2)_eO-$ je nezávisle vybraná z hodnot 2 a 3; a

(C) je skupina obecného vzorce $-[(CH_2)_fO]_g-R^7$, kde R⁷ je methylová skupina nebo ethylová skupina a g je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud g je 1, f je 2 nebo 3 a pokud g je 2, 3, 4 nebo 5, hodnota f v každé skupině $-(CH_2)_fO-$ je nezávisle vybraná z hodnot 2 a 3;

nebo AA¹, AA², AA³, AA⁶, AA⁷, a AA⁸ jsou zbytky L-aminokyselin, kde jedna nebo obě skupiny AA¹ a AA⁷ jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše a AA⁴ společně s AA⁵ tvoří skupinu obecného vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va (uvedeno níže) kde Ra, Rb a Rz jsou nezávisle na

sobě vybrány ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku a A je atom kyslíku nebo methylenová skupina;

nebo AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 a AA^6 jsou zbytky L-aminokyselin, kde jedna nebo obě skupiny AA^1 a AA^4 jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše, a AA^6 společně s AA^7 tvoří skupinu obecného vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va (uvedeno níže), kde Ra, Rb a Rz jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, a A je atom kyslíku nebo methylenová skupina;

a Q je hydroxylová skupina, aminoskupina, skupina $NRcRd$, kde Rc je vybrána ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, 2-karbamoylcyklopentylová skupina, 2-pyridylmethylová skupina, 4-karbamoylcyklohexylová skupina, 4-karbamoylcyklohexylmethylová skupina, 3-karbamoylfenylová skupina, 4-karbamoylfenylová skupina, 4-(karbamoylmethyl)fenylová skupina, 4-(karboxymethyl)fenylová skupina, 2-morfolinethylová skupina a skupina obecného vzorce $-A^1-G^1$, kde A^1 je alkylenová skupina obsahující 3 až 7 atomů uhlíku nebo

A^1 je vybrána ze

(1) skupiny obecného vzorce $-A^2-B^2-$, kde A^2 je p-fenylenová skupina nebo 1,4-cyklohexylenová skupina a B^2 je alkylenová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku nebo A^2 je methylenová skupina a B^2 je p-fenylenová skupina nebo 1,4-cyklohexylenová skupina; a

(2) skupiny obecného vzorce $-A^3-B^3-C^3-$, kde A^3 je methylenová skupina, B^3 je p-fenylenová skupina nebo 1,4-cyklohexylenová skupina a C^3 je alkylenová skupina obsahující 1 až 3 atomy uhlíku; a

00.12.98

G^1 je skupina je skupina obecného vzorce $-N=C[N(Rp)_2]_2$, kde každá skupina Rp je nezávisle vybraná ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku, methylová skupina, ethylová skupina a propylová skupina; a Rd je atom vodíku nebo alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku; nebo Q je 1-piperazinylová skupina, 4-methyl-1-piperazinylová skupina, 4-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1-piperazinylová skupina, 4-amidino-1-piperazinylová skupina, 1-piperidylová skupina nebo v poloze 4 substituovaná 1-piperidylová skupina, kde substituentem v poloze 4 je karboxylová skupina, karbamoylová skupina, N-(2-aminoethyl)karbamoylová skupina a N-(4-aminobutyl)karbamoylová skupina; nebo Q je sekvence 1 až 6 aminokyselinových zbytků nebo jejich amid.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje derivát peptidu obecného vzorce I (uvedeného níže), nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, kde AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, kde AA^1 , AA^4 a AA^7 jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II (uvedeného níže) kde n , X , R^1 a R^2 mají stejný význam, jako bylo uvedeno výše; nebo AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^6 , AA^7 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, kde jedna ze skupin AA^1 a AA^7 je vybrána ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II jak je definováno výše a AA^4 společně s AA^5 tvoří skupinu obecného vzorce IIIa, jak je definováno výše; nebo AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, kde jedna ze skupin AA^1 a AA^4 je vybrána ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše a AA^6 společně s AA^7 tvoří skupinu obecného vzorce IIIa, jak je definováno výše; a P a Q mají jakoukoli z hodnot definovaných výše.

Je třeba poznamenat, že aminokyselina Q může mít nezávisle stereochemii D i L. Dále, pokud Q je definováno jako hydroxylová skupina (OH), je třeba uvést, že je hydroxylovou skupinou C-konce aminokyseliny AA^8 . Podobně, pokud Q je

03.12.98

definováno jako aminoskupina, skupina NRcRd, piperazinylová skupina, piperidylová skupina, a tak dále, znamená to, že hydroxylová skupina C-koncové aminokyseliny AA^a je nahrazena touto skupinou. Také je potřeba poznamenat, že pokud se uvede termín aminokyselina, znamená alfaaminokyselinu. Také je třeba poznamenat, že pokud se uvede termín L-aminokyselina, zahrnuje také aminokyseliny jako je Gly, 2,2-diethylGly, azaalanin a azaglycin, které neobsahují chirální atomy uhlíku. Dále je třeba uvést, že obecné termíny, jako je „alkylová skupina“ zahrnují jak variantu s přímým řetězcem, tak variantu s rozvětveným řetězcem, pokud to počet atomů uhlíku umožňuje. Stejně pravidlo platí i u ostatních zbytků.

Dále je třeba si uvědomit, že pokud R¹ a R² jsou obě skupiny obecného vzorce (A), hodnoty a, R³ a R⁴ ve skupině R¹ mohou být stejné nebo různé od těchto skupin v R². Podobně pokud R¹ a R² jsou obě skupiny obecného vzorce (B), hodnoty c, d, R⁵ a R⁶ ve skupině R¹ mohou být stejné nebo různé než tyto skupiny ve skupině R², a pokud R¹ a R² jsou obě skupiny obecného vzorce (C), hodnoty f, g a R⁷ ve skupině R¹ mohou být stejné nebo různé než tyto hodnoty ve skupině R².

Pro odborníky v této oblasti je známé, že sloučeniny, které mají chirální centrum, mohou existovat ve formě racemátu (nebo, pokud je přítomno více než jedno chirální centrum, ve směsi diastereomerů) nebo jako opticky aktivní enantiomer nebo diastereoizomer. V této oblasti je také známo, že případná biologická aktivita spojená s racemickou nebo diastereomerní směsí může vnikat převážně nebo pouze z jednoho opticky aktivního izomeru. Proto je třeba poznamenat, že se vynález týká jakékoli formy derivátu peptidu obecného vzorce I, který má výše uvedené farmaceuticky využitelné vlastnosti. V této oblasti je známo, jakým způsobem získat jeden opticky aktivní izomer, například pomocí rozdělení racemické nebo diastereomerní směsi obsahující izomer za použití běžných

technik, jako je chromatografie, nebo pomocí chirální syntézy za použití vhodných opticky aktivních výchozích látek nebo meziproduktů, přičemž příklady jsou uvedeny níže. V této oblasti je také známo, jak určit farmakologické vlastnosti takových racemických nebo diastereomerních směsí a jednotlivých opticky aktivních izomerů, například za použití testů, které jsou popsány níže. Pro odborníka v této oblasti je proto snadné získat patřičné izomery derivátů peptidů obecného vzorce I, které mají výhodné farmakologické vlastnosti uvedené v předkládaném vynálezu. Je třeba uvést, že předkládaný vynález také zahrnuje všechny polymorfní formy, všechny tautomery nebo všechny solváty nebo jejich směsi, směsi derivátů peptidů obecného vzorce I, které mají výhodné farmakologické vlastnosti uvedené v souladu s předkládaným vynálezem.

Vhodné nazávislé významy zbytků α -aminokyselin AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 a AA^8 , pokud nejsou zbytky aminokyseliny obecného vzorce II nebo tvoří část skupiny obecného vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va, zahrnují například ty, které se skládají z 20 přírodních aminokyselin kódujících genetický kód, zejména alaninu (Ala), kyseliny glutamové (Glu), glycinu (Gly), histidinu (His), isoleucinu (Ile), lysinu (Lys), asparaginu (Asn), glutaminu (Gln), argininu (Arg), threoninu (Thr), valinu (Val) a prolinu (Pro). Také jsou vhodné zbytky aminokyselin, jako je sarkosin (Sar), 3,3,3-trifluoralanin, 2,2-diethylglycin, kyselina 2,3-diaminopropanová (Dap), kyselina 2,4-diaminobutanová (Dab), kyselina 2-aminobutanová (Abu), homarginin, homfenylalanin, trans-4-hydroxyprolin (Hyp), azaalanin [$H_2N-N(CH_3)-COOH$; Azala], aza-glycin [$H_2N-NH-COOH$; Azgly], kyselina 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylová (Tic), kyselina oktahydroindol-2-karboxylová (Oic), kyselina dekahydroisochinolin-3-karboxylová (Dic). (Pokud je uvedena zkratka Dic, znamená formy, kde spojení kruhů mají obě konfiguraci R nebo obě konfiguraci S). Mohou se také použít

zbytky odpovídající N^2 -methylovaným aminokyselinám, stejně jako zbytky odpovídající aminokyselinám, které mají esterifikovanou karboxylovou funkci ve vedlejším řetězci (například alkylesterová skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo benzylesterová skupina) a alkylovanou aminoskupinu ve vedlejším řetězci (například methylovanou), acetylovanou nebo na karbamát převedenou aminoskupinu ve vedlejším řetězci (například, alkylkarbamát (jako je methylkarbamát nebo ethylkarbamát), fenylkarbamát nebo benzylkarbamát). Mezi další vhodné významy patří glycin substituovaný v poloze 2, kde substituentem v poloze 2 je skupina vzorce $-(CH_2)_sNH_2$, kde s je 1 až 3, nebo skupina vzorce $-(CH_2)_pN(Re)_3 \cdot X^-$, kde wherein p je 2 až 4 a X^- je a protiion (jako je acetát, trifluoracetát, hydroxid nebo chlorid), nebo skupina vzorce $-(CH_2)_qN(Re)_2$, kde q je 0 až 4 nebo skupina vzorce $-(CH_2)_rN=C[N(Re)_2]_2$, kde r je 1 až 4 a kde každá skupina Re v posledních třech skupinách je nezávisle vybrána ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku (jako je methylová skupina nebo ethylová skupina).

Vhodné významy pro hydrofobní zbytek P (který je připojen k aminoskupině N-koncové aminokyseliny AA^1) zahrnují například organické hydrofobní skupiny jako jsou hydrofobní alifatické, aromatické, heteroaromatické nebo smíšené alifaticko/aromatické nebo alifaticko/heteroaromatické organické skupiny obsahující 5 až 20 atomů uhlíku (a 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané ze skupiny, kterou tvoří atom kyslíku, atom síry a atom dusíku pro skupiny obsahující heteroatom), například skupina vzorce R-, skupina R.CO-, skupina R.SO₂-, skupina R.O.CO-, skupina R.NHCO-, skupina R.O.CS-, skupina R.S.CO-, skupina R.NHCS-, skupina R.S.CS- a skupina R.CS-, kde R je například alkylová skupina obsahující 5 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heteroarylová skupina, arylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 10 atomů uhlíku, heteroarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 10 atomů uhlíku,

diarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 8 atomů uhlíku, arylalkenylová skupina obsahující v alkenylové části 2 až 10 atomů uhlíku, arylcyklopropylová skupina, cykloalkylová skupina obsahující 5 až 10 atomů uhlíku, cykloalkylalkylová skupina obsahující v cykloalkylové části 5 až 10 atomů uhlíku a v alkylové části 2 až 6 atomů uhlíku, 3-bifenylová skupina, 4-bifenylová skupina, 4-cyklohexylfenylová skupina, 2-naftyloxymethylová skupina, 3-naftyloxymethylová skupina, fenoxifyenylová skupina a tetrahydronaftylová skupina, arylová skupina nebo heteroarylová skupina, kde skupiny R mohou nést jednu nebo více substituentů, kterými jsou alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, atom halogenu, kyanoskupina nebo alkoxylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku. Jedno zvláštní provedení podle předkládaného vynálezu zahrnuje například sloučeniny obecného vzorce I, kde P je skupina R.CO-, jak je definováno výše. Další zvláštní provedení podle předkládaného vynálezu zahrnuje například deriváty peptidu obecného vzorce I, kde P je hydrofobní alifatická, aromatická nebo alifaticko/aromatická organická skupina obsahující 5 až 20 atomů uhlíku.

R může mít například následující konkrétní významy: pokud je to alkylová skupina obsahující 5 až 10 atomů uhlíku: pentylová skupina, isopentylová skupina, terc-pentylová skupina, 2-methylpentylová skupina, hexylová skupina, isohexylová skupina, 5-methylhexylová skupina a oktylová skupina; pokud je to arylová skupina: fenylová skupina, naftylová skupina a indenylová skupina; pokud je to heteroarylová skupina: 2-, 3-, 5- nebo 6-indolylová skupina, 2-, 3-, 5- nebo 6-indolinylová skupina, 2-, 3-, 5- nebo 6-benzo[b]thiofenylová skupina, thienylová skupina, 2-, 4- nebo 5-benzothiazolylová skupina, 2-, 4- nebo 5-benzoxazolylová skupina, 2-, 4- nebo 5-benzimidazolylová skupina, 1,4-benzodioxanylová skupina připojená v poloze 2-, 3-, 6- nebo 7- a 2-, 3-, 5- nebo 6-benzofuranylová skupina; pokud je to arylalkylová skupina

obsahující v alkylové části 2 až 10 atomů uhlíku: arylalkylová skupina obsahující 2 až 6 atomů uhlíku (kde arylovou část tvoří například jakákoli specifická arylová skupina uvedená výše a alkylovou část obsahující 2 až 6 atomů uhlíku tvoří například methylenová skupina, ethylenová skupina, trimethylenová skupina, tetramethylenová skupina a pentamethylenová skupina) jako je 2-fenylethylová skupina, 3-fenylpropylová skupina, 4-fenylbutylová skupina a 5-fenylpentylová skupina; pokud je to heteroarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 10 atomů uhlíku: heteroarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 6 atomů uhlíku (kde heteroarylovou část tvoří například jakákoli specifická heteroarylová skupina uvedená výše a alkylovou část obsahující 2 až 6 atomů uhlíku tvoří například methylenová skupina, ethylenová skupina, trimethylenová skupina, tetramethylenová skupina a pentamethylenová skupina) jako 2-(2-kyanobenzo[b]thiofen-5-yl)ethylová skupina; pokud je to diarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 8 atomů uhlíku: diarylalkylová skupina obsahující v alkylové části 2 až 6 atomů uhlíku, jako je 2,2-difenylethylová skupina, 3,3-difenylpropylová skupina a 4,4-difenylbutylová skupina; pokud je to arylalkenylová skupina obsahující v alkenylové části 2 až 10 atomů uhlíku: arylalkenylová skupina obsahující v alkenylové části 2 až 6 atomů uhlíku jako je styrylová skupina, 3-fenylpropen-2-yllová skupina a 4-fenylbuten-1-yllová skupina; pokud je to arylcyklopropylová skupina: fenylcyklopropylová skupina, 1-naftylcyklopropylová skupina a 2-naftylcyklopropylová skupina; pokud je to cykloalkylová skupina obsahující 5 až 10 atomů uhlíku: cyklopentylová skupina, cyklohexylová skupina a 1-adamantylová skupina; a pokud je to cykloalkylalkylová skupina obsahující v cykloalkylové části 5 až 10 atomů uhlíku a v alkylové části 2 až 6 atomů uhlíku: 2-(cyklohexyl)ethylová skupina, 3-(cyklohexyl)propylová skupina a 4-(cyklohexyl)-butylová skupina. Případnými substituenty na arylové skupině

skupiny R jsou například methylová skupina, ethylová skupina, atom chloru, atom bromu, atom jodu, methoxyskupina, ethoxy-skupina a kyanoskupina.

Mezi hydrofobní zbytky P také patří například hydrofobní L-aminokyseliny, jako je fenylalanin (Phe) a jeho hydrogenovaná analoga, jako je cyklohexylalanin (Cha), parachlorPhe, 3-(2-thienyl)alanin, tyrosin (Tyr), Tyr(OMethyl), tryptofan (Trp), bifenylalanin, 3-(1-naftyl)alanin, 3-(2-naftyl)alanin a jeho hydrogenovaná analoga, 3-(1-adamantyl)alanin (Ada), Glu(O-Benzyl), 3-(benzyloxy)Ala, 3-(benzylsulfanyl)Ala a 9-fluorenylGly, každá z těchto skupin může popřípadě nést na N-konci hydrofobní alifatický, aromatický, heteroaromatický nebo smíšený alifaticko/aromatický nebo alifaticko/heteroaromatický organický zbytek, jak je definováno výše. Alternativně může hydrofobní aminokyselina popřípadě nést například další sekvenci 1 až 3 aminokyselin, které jsou vybrány ze všech vhodným hodnot uvedených výše pro AA¹ až AA⁸. Například P zahrnuje sekvence Ala-Cha, Ala-Ala-Cha, Tyr-Ala-Ala-Cha, Tyr-Ala-Ala-Phe, Ala-Phe-Phe-Phe a Ala-Ala-Ala-Phe.

První aminokyselina takové další sekvence 1 až 3 aminokyselin (čteno zleva doprava) může být L- nebo D-aminokyselinou a také může popřípadě nést hydrofobní alifatickou, aromatickou, heteroaromatickou nebo smíšenou alifaticko/aromatickou nebo alifaticko/heteroaromatickou organickou skupinu, jak je definováno výše.

Popřípadě může být P například skupina 3-(benzyloxykarbonyl)-propionyl-Phe, skupina 3-(benzyloxykarbonyl)propionyl-Cha, skupina 4-(benzyloxykarbonyl)butyryl-Phe, skupina 4-(benzyloxykarbonyl)butyryl-Cha, skupina (5-oxo-pyrrolidin-2-yl)karbonyl-Phe-Tyr, skupina (5-oxopyrrolidin-2-yl)karbonyl-Glu(O-Benzyl)-Tyr, skupina acetyl-Glu(O-Benzyl)-Tyr, skupina difenylmethyl.CONH.CH₂CH₂.CO-Cha, skupina difenylmethyl.CONH.CH₂CH₂.CO-Tyr, skupina difenylmethyl.CONH.CH₂CH₂CH₂.CO-Cha, skupina

difenylmethyl.CONH.CH₂CH₂CH₂.CO-Tyr, skupina difenylmethyl.NH-CO.CH₂CH₂CH₂.CO-Cha, skupina difenylmethyl.NHCO.CH₂CH₂CH₂.CO-Tyr, skupina benzyl.NHCO.CH₂CH₂.CO-Cha, skupina benzyl.NHCO.CH₂-CH₂.CO-Tyr, skupina N-acetyl-4-chlorbetahydroxy-Phe, skupina 4-fenoxyfenyl.NHCO-, skupina benzyl.NHCO.CH₂CH₂.CO.(N-methyl-Phe), skupina benzyl.NHCO.CH₂CH₂.CONH.CH(CHPh₂).CO, skupina benzyl.NHCO.CH₂CH₂.CO-Tyr, 3,3-difenylpropionylová skupina, trans-cinnamoylová skupina, 5-fenylvalerylová skupina a 3-(2-kyanobenzo[b]thiofen-5-yl)propionylová skupina.

Výhodnou skupinou P je například skupina Ph.(CH₂)₄.CO-(5-fenylvaleryl (Phv)), skupina Ph.(CH₂)₄.CS- a 3-(2-kyanobenzo[b]thiofen-5-yl)propionylová skupina.

Mezi výhodné hydrofobní zbytky P patří, například, 3-(2-kyanobenzo[b]thiofen-5-yl)propionylová skupina a 5-fenylvalerylová skupina (Phv), zejména druhá z těchto skupin.

Pokud R_c je skupina obecného vzorce -A¹-G¹, A¹ je konkrétně, pokud je to alkylenová skupina, například methylenová skupina, ethylenová skupina, propylenová skupina a butylenová skupina; a B² je konkrétně, pokud je to alkylenová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, například methylenová skupina, ethylenová skupina a propylenová skupina; a C³ je, pokud je to alkylenová skupina obsahující 1 až 3 atomy uhlíku, například methylenová skupina, ethylenová skupina a propylenová skupina.

Mezi konkrétní skupiny -A¹-G¹ patří například 3-guanidino-propylová skupina, 4-(2-guanidinoethyl)fenylová skupina, 4-(2-morfolinoethyl.NH.CO.CH₂)fenylová skupina a 4-(4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-yl.CO.CH₂)fenylová skupina.

Konkrétní skupiny Q, pokud je to sekvence 1 až 6 aminokyselinových zbytků, patří například sekvence aminokyselinových zbytků nezávisle vybraných z jakýchkoli vhodných nezávislých skupin AA¹ až AA⁸ definovaných výše, (jako je Ala-Thr-Gly-OH),

nebo jejich D- analog, nebo sekvence obsahující jak D-, tak L-aminokyseliny, nebo jejich amidy, jako je amid odvozený od amoniaku, alkylamin obsahující 1 až 4 atomy uhlíku (jako je methylamin) nebo dialkylamin obsahující v každé alkylové skupině 1 až 4 atomy uhlíku (jako je dimethylamin).

Mezi výhodné skupiny Q patří například 4-karbamoyl-1-piperidylová skupina (zbytek od piperidin-4-karboxamidu (Pip-NH₂)), 4-karboxy-1-piperidylová skupina (zbytek od piperidin-4-karboxylové kyseliny (Pip-OH)), 4-(karbamoylmethyl)anilinoskupina (zbytek od 4-aminofenylacetamidu (Papa-NH₂)), 4-(karboxymethyl)anilinoskupina (zbytek od 4-aminofenylactové kyseliny (Papa-OH)), a 4-(2-guanidinoethyl)anilinoskupina (zbytek od 2-(4-aminofenyl)ethylguanidinu (Pape-NHC(=NH)NH₂)). Pip-NH₂ a Papa-NH₂ jsou zvláště výhodnými skupinami Q, a zejména Papa-NH₂.

Mezi konkrétní nové deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu patří například peptidové sloučeniny obecného vzorce I, definované výše, kde:

(1) ve vzorci II, $n = 1$ a $X = -CO-$;

(2) ve vzorci II, $n = 4$ a $X = -NHCO-$;

(3) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (A), kde $a = 1$;

(4) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (A), kde R^3 a R^4 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce $-[(CH_2)_bO]_m-R^a$, kde $b = 2$;

(5) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (A), kde R^3 a R^4 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce $-[(CH_2)_bO]_m-R^a$, kde $m = 1, 2$ nebo 3 ;

(6) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (B), kde $c = 2$;

(7) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (B), kde $d = 2$;

(8) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (B), kde R^5 a R^6 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce $-[(CH_2)_eO]_p R^e$, kde $e = 2$;

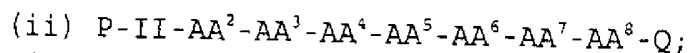
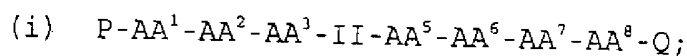
(9) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (B), kde R^5 a R^6 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce $-[(CH_2)_eO]_p R^e$, kde $p = 1$;

(10) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (C), kde $f = 2$; a

(11) ve vzorci II, R^1 a R^2 jsou skupiny (stejně nebo různé) vzorce (C), kde $g = 3$; a kde, pokud není uvedeno jinak, AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 , AA^8 , P a Q mají jakýkoli z významů uvedených výše.

Konkrétní významy pro R^3 , R^4 , R^5 a R^6 , a R^1 a R^2 , pokud jsou tyto skupiny vybrány ze skupin obecného vzorce $-[(CH_2)_fO]_g R^7$, zahrnují například skupinu $-CH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$, skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$, a skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_3$.

Mezi další konkrétní nové peptidové deriváty podle předkládaného vynálezu patří například následující peptidové deriváty obecného vzorce I:



(iii) $P-AA^1-AA^2-AA^3-IIIa-AA^6-II-AA^8-Q$;

(iv) $P-AA^1-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6-II-AA^8-Q$;

(v) $P-AA^1-AA^2-AA^3-II-AA^5-IIIa-AA^8-Q$; a

(vi) $P-II-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-IIIa-AA^8-Q$;

kde II je zbytek L-aminokyseliny obecného vzorce II, jak je definováno výše, a IIIa je skupina vzorce IIIa, jak je definováno níže, a kde, pokud není uvedeno jinak, AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 , AA^8 , P a Q mají jakýkoli význam, včetně konkrétních a výhodných významů, jak je definováno výše. (je třeba uvést, že ve skupinách (i) až (vi), kde se vyskytuje skupina AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 nebo AA^8 , jsou to L-aminokyselinové zbytky a přítomnost a poloha skupiny vzorce II nebo IIIa je specificky označena). Skupiny (i) až (vi) jsou dalším nezávislým aspektem předkládaného vynálezu.

Mezi peptidové deriváty zvláštního významu obsahující (i) až (vi) patří například deriváty, kde ve vzorci II, $n = 1$ nebo 2, X = karbonylová skupina a R^1 a R^2 jsou skupiny obecného vzorce (C) (zejména, kde $f = 2$, $g = 3$ a/nebo R^7 = methylová skupina, jako je skupina $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$) nebo jsou obě skupiny vzorce (A) (zejména, kde $a = 1$, $b = 2$, $m = 1$ nebo 3 a/nebo R^a = methylová skupina, jako je skupina $-CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$ nebo skupina $-CH_2CON[(CH_2CH_2O)_3CH_3]_2$. Ze skupin (i) až (vi), jsou peptidové deriváty skupin (i) a (v) zvláště důležité. Mezi výhodné peptidové deriváty patří například sloučeniny skupiny (v), ve kterých, ve vzorci II, $n = 1$, X = karbonylová skupina a R^1 a R^2 jsou obě skupiny obecného vzorce (A).

Výhodnými významy pro AA^1 až AA^8 (pokud AA^1 , AA^4 nebo AA^7 není zbytek aminokyseliny vzorce II a pokud AA^4 společně s AA^5 nebo AA^6 společně s AA^7 nejsou skupiny vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va) jsou například

AA¹ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Ala, Ile, Tyr, Val, Glu, Lys, Arg, Gly, Gap, GapMe₄ a 3,3,3-trifluoralanin, zejména Ala, Ile, Arg, Gap, GapMe₄, zvláště Ala, Arg a Ile, a výhodněji Ala a Arg;

AA² vybraná ze skupiny, kterou tvoří Ala, Lys, Glu, Sar, Val, Arg, Gly, Pro, Ile, Tic, 3,3,3-trifluoralanin a N⁶-diethylLys, zejména Ala, Arg, Ile, Lys a Tic, zvláště Ala, Arg, Ile a Tic a výhodněji Ala a Arg;

AA³ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Ala, His, Gln, Val, Thr, Glu, Gly, Asp, Asn a N³-diethylDap, zvláště Ala, His, Asp a Asn, zejména Ala a Asn a výhodněji Ala;

AA⁴ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Ala, Lys, Asn, Arg, Thr, Glu, Sar, Gly, Pro, His a N⁶-diethylLys, zvláště Ala, Arg, Lys a His, zejména Ala, Arg a His a výhodněji Ala;

AA⁵ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Thr, Val, Ala, Gly, Dap, Dab, Pro, Hyp, Asn, Ser a N³-diethylDap, zvláště Thr, Val a Dap, a zejména Thr a Val;

AA⁶ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Gly, Leu, Lys, Ala, Pro, Glu, Sar, His a Dap (zejména Ala a Pro);

AA⁷ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Pro, Ala, Lys, Arg, Glu, Sar, Gly, Oic a Dic (zejména Ala a Arg); a

AA⁸ vybraná ze skupiny, kterou tvoří Ala, Gly, Dap, azaalanin a azaglycin, zejména Ala, Gly a azaglycin a zvláště Ala a Gly. (kde Gap má význam uvedený pro zbytek vzorce -NH.CH[CH₂-NH.C(=NH).NH₂].CO-, a kde GapMe₄ má význam uvedený pro zbytek vzorce -NH.CH(CH₂N=C[N(CH₃)₂].CO-)).

Dalšími individuálními nezávislými skupinami derivátů peptidů podle předkládaného vynálezu jsou například peptidové deriváty obecného vzorce I, kde 1 nebo 2 skupiny AA¹, AA⁴ a AA⁷ jsou

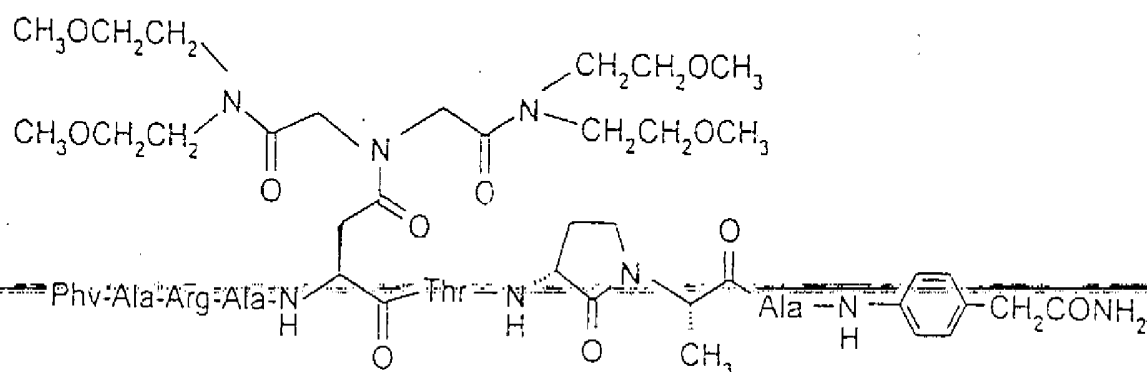
vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše a ostatní skupiny AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 , AA^5 , AA^6 , AA^7 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin (včetně vhodných, specifických a výhodných významů, které jsou uvedeny výše).

Pokud peptidový derivát obecného vzorce I obsahuje skupiny vzorce III, IV, IVa nebo V, specifické významy pro Ra ve vzorci III a Rb ve vzorci IV, a IVa a Rz ve vzorci V jsou, pokud to jsou alkylové skupiny, methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina a isopropylová skupina. Z derivátů peptidů obsahujících skupinu vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va, jsou výhodné deriváty obsahující skupinu IIIa.

Další výhodný aspekt podle předkládaného vynálezu zahrnuje peptidové deriváty obecného vzorce I, které obsahují zbytek argininu, zejména sloučeniny, kde AA^1 nebo AA^2 jsou arginin (jako jsou sloučeniny, ve kterých částí sekvence $AA^1-AA^2-AA^3$ je Ala-Arg-Ala nebo Arg-Ala-Ala).

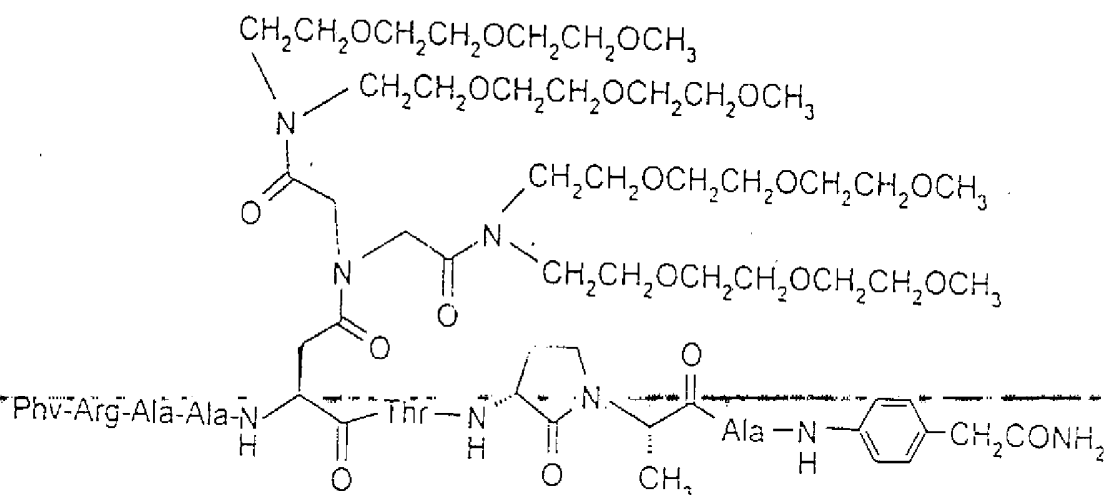
Deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu, které jsou zvláště důležité, zahrnují například specifická provedení uvedená níže v příkladech. Z těchto derivátů jsou zvláště důležité peptidové deriváty z příkladů 3 a 6 a tyto sloučeniny, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli tvoří další rysy předkládaného vynálezu.

(Sekvence identifikační číslo: 3)



Příklad 3

(Sekvence identifikační číslo: 6)



Příklad 6

Další aspekt podle předkládaného vynálezu tvoří chráněné (například skupinou Fmoc) nebo nechráněné aminokyseliny obecného vzorce II, kde n , X , R^1 a R^2 mají jakýkoli význam, včetně konkrétních a výhodných významů, uvedený výše.

Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují například soli peptidových derivátů, které jsou dostatečně bazické, například těch, které obsahují volnou aminoskupinu, s kyselinami tvořícími fyziologicky přijatelné anionty, jako jsou soli s minerálními kyselinami, například halogenovodíky (jako je

chlorovodík a bromovodík), sulfonovými kyselinami a fosfonovými kyselinami a s organickými kyselinami jako je kyselina octová, kyselina šťavelová, kyselina vinná, kyselina mandlová, kyselina p-toluensulfonová, kyselina methansulfonová, kyselina trifluor-octová a podobně, a soli peptidových derivátů, které jsou dostatečně kyselé, například derivátů, které mají volnou karboxylovou skupinu, s bázemi tvořícími fyziologicky přijatelné kationty, jako jsou soli s alkalickými kovy (jako je sodík nebo draslík), soli s kovy alkalických zemin (jako je hořčík nebo vápník), soli s hliníkem a amonné soli, stejně jako soli s vhodnými organickými bázemi, jako je ethanolamin, methylamin, diethylamin, isopropylamin, trimethylamin a podobně.

Jak je uvedeno výše, deriváty peptidů obecného vzorce I nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli, budou mít užitečný farmakologický vliv u teplokrevných živočichů (včetně člověka) při léčbě autoimunních onemocnění a nebo stavů, na léčbu symptomů nebo jako modifikační činidlo nebo profylaktické činidlo. Mezi taková onemocnění patří například revmatoidní arthritida, mnohočetná skleróza, Goodpasturov syndrom, idiopatická trombocytopenická purpura, mladická revmatoidní arthritida, celiakie, systémový lupus erythematosus, ankyloidní spondylitida, Sjorgenuv syndrom, myastenia gravis, diabetes typu 1 (závislý na insulinu), Hashimotovo onemocnění, Graveovo onemocnění, Addisonovo onemocnění, skleroderma, polymyositida, dermatomyositida, pemfigus vulgaris, pemfigoidní bulóza, autoimunní hemolytická anemie, zhoubná anemie, glomerulonefritida, odmítnutí transplantátu a podobně, zejména revmatoidní arthritida a mnohočetná skleróza.

Využitelnost peptidových derivátů obecného vzorce I nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, může být stanovena za použití mnoha standardních testů a klinických studií, včetně těch, které jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce číslo

WO92/02543, WO93/05011 a WO95/07707 (nebo jejich modifikací) a pomocí testů popsaných níže. Deriváty peptidů obecného vzorce I vykazují významnou aktivitu při jednom nebo více takových testech nebo studiích.

Test A

Test vazby čištěného HLA-DR peptidu *in vitro*. (Tento test je možné použít pro demonstraci vazby derivátů peptidů obecného vzorce I k molekulám MHC třídy II souvisejícím s onemocněním).

30 μ l biotin-FHA₃₀₇₋₃₂₀ (FHA (307-320)peptid, derivatizovaný na N-konci biotinem s dlouhým řetězcem, Biotin-Ahx-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-OH) při 800 nm ve fosfátem pufovaném solném roztoku (PBS)) se inkubuje s 30 μ l čištěného HLA-DR4Dw4 při koncentraci mezi 0,5 a 5 pg/ml v mikrotitrační desce s jamkami ve tvaru V (V-jamky) (Nunc) 48 hodin s nebo bez inhibitoru peptidů. Na konci inkubační periody se 100 μ l inkubátu převede na desky pro test s enzymem navázaným na imunosorbent (ELISA test) (Nunc), které se předtím povlékly anti-MHC protilátkou (L243 kolekce kultur amerického

typu (ATCC)-HBSS, popsáno v Lampson a Levy (1980)-J. Immunol. 125, 293-299) při koncentraci 10 pg/ml na 1 hodinu při teplotě místnosti a potom se 1 hodinu blokuje 1% telecím sérovým albuminem (BSA) v PBS a 0,05% Tween 20. Po další 1 hodině se nevázaný peptid vymyje a na 2 hodiny při teplotě místnosti se přidá 1/4000 zředěná streptavidinperoxidáza (Sigma) v PBS s 0,01 % vhodného detergentu, jako je NP-40 (Sigma). Po dalším promytí se do každé desky přidá tetramethylbenzidenový (TMB) substrátový roztok (1 TMB tableta (Sigma) v 10 ml 0,1M citrát/acetát pufru, pH 6,0 s 36 μ l hydroperoxidu močoviny (UHPO) (Fluka)). Reakce se ukončí přidáním 2M kyseliny sírové (10 μ l na jamku) a pomocí měření absorbance při 450 nm se určí množství vázaného peptidu. Inhibiční aktivita peptidů se získá pomocí vynesení absorbance proti koncentraci.

Čištěný HLA-DR4Dw4 se získá následujícím způsobem:

(i) Exprese HLA-DR v bakulovirovém systému

Expresa rekombinovaných proteinů v buňkách z bakulovirových vektorů je postupem používaným pro získání vysokého výtěžku rekombinovaného proteinu [Luckow, VA & Summers, MD (1988) Biotechnology, 6, 47-55]. Aby se umožnila exprese heterodimerního HLADR, například HLA-DR4Dw4, z jednoho rekombinovaného bakulovirového vektoru (což odporuje získání oddělených rekombinovaných virů pro α a β řetězce a potom koinfekci), připraví se dvojnásobný rekombinovaný bakulovirus, který obsahuje α a β řetězce.

cDNA kódující sekvence α polypeptidu se klonuje do transferového vektoru pACYM1 [Matsuura, Y; Possee, RD; Overton, HA & Bishop, DHL (1987) J. Gen. Virol., 68, 1233-1250], aby se uvedla exprese proteinu pod kontrolu polyhedrinového promotéru. Jednotka se zavede do genomu bakuloviru pomocí homologní rekombinace v buňkách Sf21 a vytvoří se jednoduchý rekombinant bakuloviru pro řetězec α . Techniky pro kultivaci a infekci buněk, pro homologní rekombinaci a detekci/izolaci rekombinovaného viru jsou podrobně popsány Summersem, MDD & Smith GE (1987) [A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures; Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 1555]. Molekulární genetické techniky používané pro přípravu rekombinovaných vektorů jsou také dostupné v literatuře a jsou podrobně popsány v Sambrook, J; Fritsch, EF & Maniatis T, (1989) [Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press].

Aby se připravil dvojnásobně rekombinovaný bakulovirus, cDNA kódující β řetězec se klonuje do transferového vektoru pAcUW1 [Weyer, U; Knight, S & Possee, RD (1990) J. Gen. Virol., 71,

1525-1534], a tak se uvede exprese proteinu pod kontrolu P10 promotéru. Jednotka se potom vloží do genomu jednoho rekombinovaného bakuloviru nesoucího řetězec α . Dvojnásobně rekombinované viry se detekují pomocí natečkování buněk infikovaných náhodně sebranými viry z transfekce, na membrány a jejich reakcí s monoklonální protilátkou, například L243, která specificky rozpozná HLA-DR heterodimer. Vázání protilátky k Sf21 buňkám se detekuje za použití standardních průtokových cytometrických technok, které jsou snadno dostupné z literatury. Stabilní, dvojnásobně rekombinované bakuloviry vylučující HLA-DR se čistí z plaku.

(ii) Čištění HLA-DR od buněk

Použitá metoda je modifikací metody popsané Gorgou a kol., 1987. (Gorga a kol., 1987. J. Biol. Chem. 262, 16087-16094). HLA-DR vylučující buňky bakuloviru/Sf21 (10 l, což je přibližně 2×10^{10} buněk) se rozpustí v 100 ml 5 mM EDTA (sodná sůl), 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 2% NP40, 150nM chloridu sodného, 1mM jodoacetamidu, 1mM PMSF pomocí homogenizace 10 tahy teflonového skleněného-homogenizéru. Homogenát se odstřeďoval při 100 000 g 1 hodinu a oddělil se supernatant. Anti-HLA-DR monoklonální protilátka LB3,1 (Gorga a kol., 1986, Cell. Immunol. 103, 160-172) kovalentně vázaná v poměru 50 mg L243 na 10 ml protein A-sefarózy (Pharmacia) a preinkubovaná s 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% NP-40 se inkubuje se supernatantem přes noc. Pryskyřice se potom umístí na kolonu a promyje se 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 % NP-40 (20 objemů kolony) potom 0,15 M chloridu sodného, 50 nM Na_2HPO_4 , pH 7,0 1 % oktylglukosidem (20 objemů kolony). HLA-DR se eluuje 50 mM diethylaminu pH 11,0, 0,15 M chloridem sodným, 1 % oktylglukosidem. Frakce z kolony se okamžitě neutralizují 1 M Tris-HCl pH 8,0 a zahustí se ultraodstředěním přes membránu centricon 10. Obsah proteinu se určí pomocí BCA proteinového testu (Pierce) a čistota pomocí SDA-PAGE elektroforézy.

Obecně, deriváty peptidů obecného vzorce I, které jsou definovány výše, které se testovaly v testu A vykazaly významnou inhibici při koncentraci asi $10\mu\text{M}$ nebo daleko nižší.

Další výhodný aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje derivát peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, která se neváže k HLA-DR3, ale váže se k HLA-DR 1 a/nebo HLA-DR4Dw4 a/nebo HLA-DR4Dw14. HLA-DR3 je obecná HLA-DR alela, která nesouvisí s revmatoidní arthritidou. Tedy, u pacientů s revmatoidní arthritidou, kteří mají HLA-DR3 jako jednu z jeho alel (což je přibližně jedna třetina z celkového počtu pacientů s revmatoidní arthritidou), nebudou takové deriváty peptidů obecného vzorce I zasahovat do normální role HLA-DR3 v obranné funkci hostitele. Použití takových derivátů peptidů je proto zvláště výhodné pro léčbu pacientů s revmatoidní arthritidou, protože dochází k menší imunosupresi, než při použití neselektivních látek vážících DR.

Pomocí varianty testu A se odhadla schopnost peptidu podle vynálezu vázat jednu nebo více molekul HLA-DR následujícím způsobem:

(i) Čištění typů HLA-DR z buněčných kmenů

Použitá metoda je modifikací metody popsané v Gorga a kol., 1987, J.Biol.Chem. 262, 16087-16094. Lidské HLA-DR antigeny se čistily z různých buněčných kmenů pomocí imunoafinitní chromatografie. Krátce tedy, 1×10^9 - 5×10^9 peletovaných buněk příslušného buněčného kmene z Hom 2 (zdroj DR1), BBF (zdroj DR2), AVL-B (zdroj DR3), JAH (zdroj DR4Dw4), JHAF (zdroj DR4Dw13) nebo Pe117 (zdroj DR4Dw14) se rozpustí přibližně při 4°C v 50 ml 5 mM EDTA (sodná sůl), 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 2% NP40, 150 mM chloridu sodného, 1 mM jodacetamidu, 1 mM PMSF, pomocí homogenizace 10 tahy teflonového skleněného homogenizéru. Homogenát se potom odstřeďoval při 100 000 g 1 hodinu a odebral se supernatant. Anti-HLA-DR monoklonální

protilátka LB3.1 (Gorga a kol., 1986, Cell. Immunol., 103, 160-173) kovalentně kondenzovaná k CNBr-Sefarose 4B (Pharmacia) se ekvilibruje se 150 mM chloridu sodného, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 % NP-40 a inkubuje se přes noc se supernatantem. Pryskyřice se potom umístí na kolonu a promyje se 0,15 M chloridu sodného, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 % oktylglukosidem (20 objemů kolony). HLA-DR se eluuje 50 mM diethylaminu pH 11,0, 0,15 M chloridem sodným, 1 % oktylglukosidem. Frakce z kolony se okamžitě neutralizují 0,5 M HEPES NaOH pH 7,4. Obsah proteinu se určí pomocí Biorad proteinového testu a čistota pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

(ii) Test selektivity vázání peptidu.

200nM biotin-FHA₃₀₇₋₃₂₀ v pufovaném solném roztoku (PBS) se inkubuje s čištěným HLA-DR1, DR2, DR4Dw4, DR4Dw13 nebo DR4Dw14 (2-20µg/ml) v mikrotitračních deskách s jamkami ve tvaru V (Nunc) s nebo bez inhibitoru peptidů v testovacím pufru (PBS, 0,01% NP40 (Sigma.)) Pro inhibici DR3 se 400nM Biotin-Ahx-(D)Ala-Ala-Ala-Che-Ile-Ala-Ala-Ala-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-(D)Ala-OH inkubuje s čištěným DR3 (20 µg/ml), a inkubuje se tak, jak je popsáno výše. Po 48 hodinách se inkubáty zpracovávají a určila se absorbance tak, jak je popsáno výše. Inhibiční aktivita peptidů, vyjádřená jako hodnota IC₅₀, se vypočte za použití software Microcal Origin na počítači.

Test B

Inhibice aktivace T buněk *in vitro* (Tento test je možné použít pro demonstraci schopnosti derivátů peptidů obecného vzorce I inhibovat imunitní odpověď T buněk zprostředkovanou molekulami MHC třídy II).

Peptidové inhibitory se testovaly na schopnost blokovat stimulaci B52.24 hybridomové linie T-buněk myší, které reagují na FHA₃₀₇₋₃₂₀ peptid " (H-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-

Leu-Ala-Gly-OH) přítomný v HLA-DR4Dw4 molekulách. Látka B52,24 se připraví fúzí T buněk lymfatických uzlin izolovaných z $FHA_{307-320}$ imunizovaných HLA-DR4Dw4 transgenních myší (mezinárodní patentová přihláška číslo WO95/03331) s kmenem BW5147 myších lymfatických T buněk (White a další (1989) J. Immunol. 143; 1822) jak je uvedeno v práci Woods a další (1994) J. Exp. Med. 180, 173-181 a obecnými metodami pro přípravu hybridomů T buněk popsány v Current Protocols in Immunology, oddíl 2.7.21.

Peptidové inhibitory se smíchaly při koncentraci od 100 do 0,1 μM (nebo nižší) s antigenním peptidem $FHA_{307-320}$ o buď různých koncentracích mezi 100 a 0,1 μM nebo o pevné koncentraci 10 μM zředěním v kultivačním médiu RPMI-1640 (Gibco) na 96 jamkové mikrotitrační desce (Nunc) na konečný objem 100 μl . Pomocí glutaraldehydu se na 30 sekund ustálily B buňky s expresí HLA-DR4Dw4 (například JAH EBV transformované kmeny lymfoblastoidních buněk - Evropská kolekce kultur ECACC 85102909) nebo B buňky izolované z HLA-DR4Dw4 homozygotních jedinců a transformované pomocí Epstein-Barr viru metodou popsanou v Current Protocols in Immunology 7.22.1 (suspendováním na 30 sekund v 1% glutaraldehydu (Sigma) při koncentraci 4×10^6 buněk/ml). Potom se na 3 minuty přidal ekvivalentní objem 200 mM lysinu (Sigma). Buňky se zpracovaly odstředěním při 300 g, promyly v roztoku RPMI-1640 a nanesly na mikrotitrační desky obsahující antigenní a inhibiční sloučeniny o koncentraci 2×10^5 buněk na jamku. Mikrotitrační desky se inkubovaly 2 hodiny při 37°C a v atmosféře s 5 % CO_2 .

Mikrotitrační desky se pak promyly v roztoku RPMI-1640 odstředěním při 300 g, dvakrát odplyněny, a pak byly přidány hybridní T buňky kmene B52,24 při koncentraci 10^5 buněk na jamku v kultivačním médiu (RPMI-1640, 10% fetální hovězí sérum (Gibco) a 2 mM glutaminu (Gibco)). Mikrotitrační desky pak byly

inkubovány další 2 dny při 37 °C a 5 % CO₂; Desky se pak 10 minut odstředily při 300 g a z každé jamky se před biologickým testem na obsah IL-2 odebralo 150 µl roztoku ke zmrazení při -20 °C.

Kultivační desky obsahující roztoky k testování se ponechaly při teplotě místnosti roztát a 100 ml roztoku se převedlo do

~~čerstvé desky s 96 jamkami s kulatým dnem. Za použití~~
kultivačního media (RPMI-1640 (Gibco), 10% hovězího fetálního séra (Advanced Protein Products), 100 µg/ml streptomycinu a 100 U/ml penicilinu (Gibco), 2 mM L-glutaminu (Gibco) a 50 µM 2-merkapt ethanolu (Sigma)) se provedlo 1:1 sériové zředění IL-2 za získání standardní křivky 250 jednotek/ml až 0,04 jednotky/ml IL-2. Na IL-2 závislý kmen buněk jako CTLL-2 buňky (Nature (1977) 268 154-156) nebo HT-2 buňky (J. Immunol. Methods (1987) 94104) se zpracovaly a dvakrát promyly kultivačním médiem, a pak se opět suspendovaly při koncentraci 5x10⁴ buněk/ml. Potom bylo do každé jamky standardní křivky a testovaných vzorků přidáno 100 µl suspenze na IL-2 závislých buněk...Kultivační desky se inkubovaly 72 hodin při 37 °C a 5 %

CO₂. Potom se do každé jamky přidalo 20 µl (1mCi) 3H-thymidinu (Amersham International) a desky se vrátily do inkubátoru na dalších 16 hodin. Obsah každé desky se převedl na filtrační podložku ze skelného vlákna a změřila se radioaktivita, a to pomocí beta scintilačního počítadla.

Obecně platí, že peptidové deriváty vzorce I uvedeného výše, které se testovaly testem B, vykazují silnou inhibici při koncentraci kolem 10 µM nebo značně nižší.

Test C

Peptidem stimulovaná DTH (zpožděný typ hypersensitivity) u myši BALB/C. (Test lze použít pro důkaz in vivo aktivity peptidových derivátů vzorce I na zvířecím modelu). Balb/c samice myši

(18-20 g) ve skupinách po 5 byly podkožně očkovány do slabin 0,1 ml emulze ovalbuminu (Sigma) (2 mg/ml v salinu) smíchané v poměru 1:1 (objemově) s kompletním Freundovým činidlem (Sigma). Po sedmi dnech byla stanovena tloušťka chodidla za použití duálního odpichovacího mikrometru, a pak byla do chodidla zadní končetiny vstříknuta 30 μ l podkožní injekce 1% teplem sraženého ovalbuminového proteinu v salinu. Dvacetčtyři hodin po vstříknutí antigenu byla chodidla opět změřena a byla vypočtena DTH odezva jako procento zvýšení tloušťky chodidla po injekci v porovnání s kontralaterální (druhou) stranou. Inhibitory byly podávány tří denními osmotickými minipumpičkami (Alzet) implantovanými 24 hodin před podáním antigenu v dávce od 10 mg/kg/den až do 0,1 μ g/kg/den. Stupeň inhibice byl vypočten z hodnoty otoku inhibitorem ošetřeného chodidla a hodnoty otoku chodidla ošetřeného kontrolní dávkou nosiče, a to vydělením hodnotou kontrolního vzorku a vynásobením 100 %.

Peptidové deriváty vzorce I uvedené výše, které byly testovány v testu C obecně vykazaly silnou inhibici při dávkách 1 mg/kg/den nebo značně menších bez vyvolání jakéhokoliv zjevného toxikologického nebo jiného než farmakologického účinku.

Test D

(Test lze použít pro důkaz *in vivo* aktivity peptidových derivátů vzorce I na zvířecím modelu arthritidy).

Samice myši balb/c (19-21 g, skupiny po 5-10) se očkují v den 0 a toto se stupňuje až do dne 7, a to podkožní injekcí 0,1 ml emulze obsahující stejné objemy 2 mg/ml methylovaného albuminu hovězího séra (met-BSA, Sigma) v salinu a kompletního Freundova činidla (Sigma) doplněným 2,5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (MTB, kmen C, DT a PN, MAFF, Weybridge, Surrey) za získání konečné MTB koncentrace 3,5 mg/ml. Současně se navíc podá 0,1 ml injekce 10^9 organismů *Bordetella pertussis* (Wellcome

Pertussis vakcína) v salinu. Po čtrnácti dnech se zvířatům do jednoho kolenního kloubu podá 10 μ l nitrokloubní injekce obsahující 100 μ g met-BSA v salinu a to za použití 30 G jehly a a hamilton stříkačky. Do druhého kolena se injektuje stejný objem salinu, což poslouží jako kontrolní vzorek. Po 13 dnech se stanoví velikost zánětu/otoku obou kolen měřením duálním odpichovacím mikrometrem. To se provede řezem nůžkami s tupými konci a lékařskými kleštěmi do kůže asi 5 mm nad a pod kolenem a pokračuje se po straně kolena za vytvoření kypsy, která se pak opatrně odstříhne, čímž se obnaží vespod ležící kloub. Měření se provede přes nejširší část kolena v horizontální rovině na ohnuté končetině držené v zafixované poloze. Procento zvětšení následkem zánětu v koleně se vstříknutým antigenem v porovnání s kontrolním vzorkem se vypočítá podle vzorce: [tloušťka kolena injektovaného antigenem - tloušťka kolena injektovaného salinem / tloušťka kolena injektovaného salinem] x 100. Inhibitory byly podávány tří denními osmotickými minipumpičkami (Alzet) implantovanými 24 hodin před podáním antigen v dávce od 10 mg/kg/den až do 0,1 μ g/kg/den. Procento inhibice zánětu/otoku bylo vypočteno z měření tloušťky resp. hodnoty otoku ve skupině ošetřené inhibitorem a hodnoty v kontrolní skupině ošetřené pouze dávkou nosiče, a to vydělením kontrolní hodnotou a vynásobením 100. Další vyhodnocení choroby zahrnuje 1) histologické vyšetření zánětu, synovitidy a eroze chrupavky/kosti provedené na zafixované části kolena obarvené hemotoxylinem a eosinem a 2) stanovení hladiny akutního reaktantu v séru, sérového amyloidu P a/nebo haptoglobinu.

Peptidový derivát vzorce I uvedený výše může v testu D vykazat silnou inhibici při dávce 10 mg/kg/den nebo značně nižší.

Jako ilustraci farmakologické aktivity konkrétních peptidových derivátů vzorce I vykazaly sloučeniny z příkladů 3 a 6 silnou vazbu k HLA-DR4Dw4 v testu A (nebo variantě testu A popsané zde

výše) při koncentraci 0,1 mikromolu nebo nižší a v testu C byly aktivní při koncentraci menší než 0,1 mg/kg/den. Sloučenina z příkladu 3 také vykazala silnou vazbu k HLA-DR4Dw14, ale sloučeniny z příkladu 3 a příkladu 6 nevykazaly silnou vazbu ($IC_{50} > 100$ mikromolů) k HLA-DR1, HLA-DR2 nebo HLA-DR3. Obě sloučeniny vykazaly dobrou stabilitu ve vodě při pH 3 a pH 7,6 a ve formě polymerního extrahovaného depotního prostředku vykazaly minimální úbytek v důsledku rozkladu při protlačování a minimální rozklad při uvolnění z tohoto depotního prostředku.

Deriváty peptidů obecného vzorce I je možné připravit pomocí jakýchkoli známých postupů používaných v chemii peptidů, které je možné aplikovat na syntézu analogických peptidů.

Deriváty peptidů obecného vzorce I je možné připravit například pomocí postupů, které jsou analogické postupům popsaným v "Solid Fase Peptid Synthesis: A practical approach"; Atherton a Sheppard (vydal IRL press v Oxford University Press, 1989). "Solid Fase Peptid Synthesis" od Stewart a Young (vydal Pierce Chemical Company, Illinois, 1984), "Principles of Peptid Synthesis" (vydal Springer-Verlag, Berlin, 1984), a v sérii knih "Amino Acids, Peptides a Proteins" (díl 1 - 25; vydáno 1994) (vydala Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK).

S výhodou se deriváty peptidů obecného vzorce I připraví pomocí postupné syntézy na pevné fázi. Za použití této techniky se aminokyselina, která se má připojit na C-konec aminokyseliny peptidu chrání na alfa-aminoskupině, a, pokud je to nutné, na vedlejším řetězci, a kondenzuje se s pevným nosičem, například s pryskyřicí, jako je 2-chlortritylchloridová pryskyřice nebo Merrifieldova pryskyřice (chlormethylpolystyrendivinylbenzen) pokud se po štěpení požaduje volná karboxylová kyselina, nebo Rink Amid pryskyřice (4-(2',4'-dimethoxyfenyl-Fmoc-aminomethyl)fenoxy pryskyřice) nebo Rink Amid MBHA pryskyřice (N-(4-[2',4'-dimethoxyfenyl-Fmoc-aminomethyl)-fenoxyacetamido-norleu-

cyl)-4-methylbenzhydrylaminová pryskyřice (všechny dostupné od Calbiochem-Novabiochem), pokud se po štěpení požaduje karboxamid, potom se odstraní chránicí skupina z alfa-aminoskupiny. Aminokyselina, která se má připojit na C-konec aminokyseliny, se chrání na alfa-aminoskupině a, pokud je to nutné, ve vedleším řetězci a připojí se na C-konec aminokyseliny, která zůstala připojena k pevnému nosiči. Postupný způsob odstranění skupiny chránicí alfa-aminoskupinu a kondenzace s další aminokyselinou se opakuje za získání chráněného nebo nechráněného polypeptidu připojeného k pevnému nosiči. Chráněná aminokyselina obecného vzorce II se může připravit například tak, jak je popsáno v příkladech nebo jak je ilustrováno ve schématu 1 níže, nebo pomocí analogických postupů za použití symetrického nebo nesymetrického aminu vzorce R^1R^2NH . Amíny obecného vzorce R^1R^2NH je možné připravit pomocí způsobů, které jsou v této oblasti známe, například tak, jak je popsáno v příkladech nebo ilustrováno ve schématu 2 níže, nebo analogickými způsoby. Činidla a podmínky použité pro provedení reakčních kroků ve schématech 1 a 2, jako je alkylace alkoholů a aminů, kondenzace aminů a karboxylových kyselin za vzniku amidů, vznik močoviny a karbamátů a chránění a odstranění chránicích skupin, jsou v této oblasti dobře známe a jsou popsány ve standardních učebnicích. Skupina vzorce III nebo IV se do sekvence zavede pomocí vhodně chráněné (3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)alkanové kyseliny (pro peptidovou sloučeninu obsahující III, kde A = methylenová skupina) nebo odpovídajícího oxa analoga získaného tak, jak je popsáno v J. Med. Chem., 1993, 36, 256-263 nebo pomocí analoga (pro peptidovou sloučeninu obsahující III, kde A je atom kyslíku) nebo (6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)alkanové kyseliny (pro peptidovou sloučeninu obsahující IV) na místo chráněné aminokyseliny. Skupina vzorce V může být do sekvence zařazena použitím vhodně chráněné 3-amino-2-oxoperhydroazepin-1-alkanové kyseliny získané podle J. Med. Chem., 1993, 36, 256-263 (nebo

analogickým způsobem) nebo tak, jak je popsáno v příkladech níže (nebo analogickým způsobem). Chráněný nebo nechráněný polypeptid se uvolní z pevného nosiče pomocí standardních postupů, například za použití směsi kyseliny trifluoroctové, triethylsilanu a vody.

Je třeba si uvědomit, že vedlejší řetězec chránicí skupiny může být ~~štěpen za podmínek používaných pro uvolnění peptidu~~ z pevného nosiče nebo může být štěpen v odděleném kroku za následného uvolnění peptidu z pevného nosiče. Dále je třeba si uvědomit, že způsob výstavby polypeptidu může být upraven za použití sekvence dvou nebo více vhodně chráněných aminokyselin ve vhodném kondenzačním kroku. Při syntéze je možné použít ruční techniku nebo může být prováděna automaticky, za využití například „Applied Biosystems 431 A nebo 430A“ syntetizéru peptidů, „Advanced Chemtech ACT357“ syntetizéru peptidů nebo podobných automatických syntetizérů peptidů nebo může být použita kombinace obou technik.

V průběhu syntézy peptidů se aminokyselinové funkční skupiny ~~neúčastnící se reakce chrání různými funkčními skupinami~~. Například N-koncové aminoskupiny ve vedlejším řetězci mohou být chráněny za použití 9-fluorenylmethoxykarbonylové skupiny (Fmoc), t-butoxykarbonylové skupiny (Boc), bifenyliisopropoxykarbonylové skupiny (Bpoc), 2-[3,5-dimethoxyfenyl]propyl-2-oxykarbonylové skupiny (Ddz), adamantyloxykarbonylové skupiny (Adoc), allyloxykarbonylové skupiny (Aloc), 2,2,2-trichlorethoxykarbonylové skupiny (Troc), benzyloxykarbonylové skupiny a různých substituovaných benzyloxykarbonylových skupin. Tyto chránicí skupiny je možné štěpit, pokud je to nutné, pomocí standardních technik (například pomocí kyselého nebo bazického zpracování, katalytické hydrogenolýzy a reakce s Pd(0) nebo směsí zinek/kyselina octová).

Mezi vhodné chránicí skupiny používané pro chránění guanidinové skupiny ve vedlejším řetězci v peptidech obsahujících zbytek argininu patří nitroskupina, adamantyloxykarbonylová skupina, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonylová skupina (Mtr), 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonylová skupina (Pmc) a (zejména) 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonylová skupina (Pbf).

Vhodnými chránicími skupinami používanými pro chránění hydroxylové skupiny obsažené ve vedlejším řetězci jsou t-butylová skupina, benzylová skupina a tritylová skupina (Trt). Vhodnými chránicími skupinami používanými pro imidazolové skupiny ve vedlejším řetězci v peptidech obsahujících zbytek histidinu jsou tritylová skupina, benzylová skupina, tosylová skupina, dinitrofenylová skupina, skupina Adoc, skupina Boc nebo skupina Fmoc.

Vhodnými chránicími skupinami používanými pro chránění karboxylové skupiny ve vedlejším řetězci jsou různé estery (například methylesterová skupina, ethylesterová skupina, t-butylesterová skupina, benzylesterová skupina, nitrobenzylesterová skupina, allylová skupina a 9-fluorenylmethylesterová skupina).

Reakce štěpení chránících skupin je možné provádět při teplotách v rozmezí 4 až 40 °C (s výhodou při teplotě blízké teplotě místnosti) a v časovém rozmezí 10 minut až 24 hodin.

Vhodné způsoby kondenzace používané pro kondenzaci jednotlivých aminokyselin zahrnují běžně používané azidy, symetrické anhydridy, smíšené anhydridy a různé aktivní estery a karbodiimidy. V případě různých karbodiimidů (například dicyklohexylkarbodiimidu nebo diisopropylkarbodiimidu), je možné také použít mnoho přísad (například 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) a N-hydroxysukcinimid). Dále je možné kondenzace aminokyselin dosáhnout také za použití mnoha jiných činidel,

například 1H-benzotriazol-1-yl-oxytrispyrrolidinofosfoniumhexafluorofosfátu (PyBOP), (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborátu (TBTU) a (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborátu (HBTU). Kondenzační reakci je možné provádět při teplotách v rozmezí -20 až 40 °C a v časovém rozsahu 10 minut až 24 hodin. Vhodným médiem pro provádění kondenzační reakce je například N,N-dimethylformamid (DMF). Zvláště vhodným způsobem je použití HBTU, HOBT a diisopropylethylaminu v dimethylformamidu.

Příklady těchto a jiných způsobů syntézy peptidů jsou uvedeny v mezinárodních patentových přihláškách uvedených zde jako odkazy. Hydrofobní zbytek P, který je skupinou vzorce R-, skupinou R.CO-, skupinou R.SO₂-, skupinou R.O.CO-, skupinou R.NHCO-, skupinou R.O.CS-, skupinou R.S.CO-, skupinou R.NHCS-, skupinou R.S.CS- a skupinou R.CS- (nebo takovou skupinou přítomnou jako substituent na koncové aminoskupině P, kde P je hydrofobní aminokyselina nebo hydrofobní aminokyselina nesoucí další aminokyselinu) může být zaveden například v koncovém kroku pomocí alkylace, acylace nebo pomocí jiné standardní modifikace funkční skupiny koncové aminokyseliny. Pokud je třeba modifikovat C-konec (aby se získalo příslušné Q), je možné jej provést po syntéze peptidu s využitím běžných způsobů pro modifikaci funkčních skupin. Alternativně je možné příslušné Q získat pomocí vhodné volby počáteční výchozí pryskyřice a/nebo chráněné jednotky, která se nejprve kondenzuje s pryskyřicí (například za použití vhodné chráněné skupiny obecného vzorce H-Q). Typické příklady přípravy peptidových sloučenin obecného vzorce I jsou uvedeny v příkladech níže.

Typickým způsobem pro měření stability derivátu peptidu podle předkládaného vynálezu je následující způsob, kdy, aby se minimalizovalo mikrobiální znečištění a degradace, všechno vybavení, které se používá pro přípravu roztoků peptidu se

sterilizuje v autoklávu a veškeré manipulace s materiálem se provádí ve skříní s laminárním proděním třídy II. Přibližně 20 ml roztoku McIlvainaova pufru obsahujícího kyselinu citronovou a fosfát při pH 3 nebo 7,6 obsahujícího 0,02% azid sodný se filtruje do 50 ml baňky za použití sterilní 0,22 μ m filtrační jednotky a 20 ml stříkačky. V uzavřené viálce se přesně zváží přibližně 1,2 mg peptidu. Za použití sterilní pipetové špičky se k peptidu ve viálce přidá dostatečné množství roztoku pufru, aby se získala koncentrace 0,1 mg/ml. Viálka se uzavře a protřepe se za rozpuštění peptidu. Za použití sterilní pipetové špičky se přibližně 1 ml alikvotní díly roztoku peptidu převedou do 10 ml HPLC viálek, které se potom uzavřou. 5 viálek se skladuje při teplotě -18 až 37 °C. Plocha píků peptidu pro roztok se určí pomocí HPLC za použití vhodných standardů před a po skladování při -18 až 37 °C 1, 2, 3 a 4 týdny, za použití nové viálky v každém časovém úseku a dvojnásobném stanovení vzorku. Procentuální obsah peptidu zbylého po skladování při 37 °C v každém časovém úseku se určí z poměru plochy píku peptidu v každém časovém úseku ku počáteční ploše. Výhodné deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu obsahují více než 90 % a s výhodou více než 95 %, zbylého peptidu po skladování při 37 °C jak při pH 3, tak při pH 7,6.

Deriváty peptidů obecného vzorce I se obvykle podávají teplokrevným živočichům (včetně člověka) z terapeutických nebo profylaktických důvodů teplokrevným živočichům (včetně člověka), kteří takovou léčbu potřebují, ve formě farmaceutických prostředků, které jsou ve farmacii známé.

V souladu s dalším rysem předkládaný vynález poskytuje farmaceutický prostředek, který obsahuje derivát peptidu obecného vzorce I, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, ve spojení s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem.

Prostředek může být ve formě vhodné pro orální použití, například ve formě tablet, tobolek, vodného nebo olejového roztoku, suspenze nebo emulze; pro nasální použití, například ve formě prášku pro vdechování, nosního spreje nebo nosních kapek; pro vaginální nebo rektální použití, například čípků; pro inhalační podávání, například dobře rozetřeného prášku nebo kapalného aerosolu; pro podávání pod jazyk nebo pro bukalní podávání, například ve formě tablet nebo tobolek; nebo pro parenterální použití (včetně nitrožilního, podkožního, mezi-svalového, nitrocévního a infuzního podávání), například ve formě sterilního vodného roztoku nebo olejového roztoku nebo suspenze. Prostředky mohou být ve formě vhodné pro místní podávání, jako jsou krémy, masti a gely. Také mohou být ve formě náplastí na pokožku. Prostředky jsou obecně popsány v kapitole 25,2 v „Comprehensive Medicinal Chemistry“, díl 5, vydavatel Hansch a kol., Pergamon Press 1990.

Obecně je možné výše uvedené prostředky připravit pomocí běžných postupů za využití běžných přísad. Avšak v případě prostředků pro orální podávání může být vhodné, aby prostředky obsahovaly povlaky pro ochranu polypeptidové aktivní složky před působením enzymů v žaludku.

Výhodným prostředkem podle předkládaného vynálezu je prostředek vhodný pro orální podávání v jednotlivé dávkovací formě, například tabletě nebo tobolce, která obsahuje 2,5 až 500 mg, a s výhodou 10 až 100 mg, polypeptidu v jednotlivé dávce, nebo prostředek pro parenterální podávání, který obsahuje 0,5 až 100 mg polypeptidu na ml, a s výhodou 1 až 10 mg polypeptidu na ml.

Prostředek pro parenterální podávání je s výhodou roztok v izotonické solance nebo izotonické dextróze pufrovaný, pokud je to nutné, na pH 5 až 9. Alternativně prostředky pro parenterální podávání mohou být upraveny pro pomalé uvolňování aktivní složky, kdy je množství polypeptidu na jednotlivou



dávku obvykle vyšší, než množství používané při běžném injekčním podávání prostředku. Výhodný prostředek pro pomalé uvolňování je prostředek s kontinuálním uvolňováním, například prostředek typu, který je posaný v evropské patentové přihlášce číslo 58481 nebo, pro peptidové deriváty obecného vzorce I obsahující nejméně jednu bazickou skupinu, prostředek posaný v mezinárodní patentové přihlášce číslo WO93/24150. Určité deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu mají takové charakteristiky rozpustnosti, které umožňují přípravu a zpracování prostředků pro parenterální podávání s pomalým uvolňováním, zvláště prostředků obsahujících biologicky rozložitelné polyestery, jako jsou polylaktidy a přípravu prostředků s pomalým uvolňováním, které mají výhodnou uvolňovací charakteristiku. Dále deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu obsahující jednu nebo více bazických skupin, zvláště arginin, mohou také tvořit peptidové polymerní soli s polyestery zakončenými kyselinou, jako jsou polylaktidy a takové peptidy a peptidové polymerní soli tvoří další aspekt podle předkládaného vynálezu. Určité takové soli mají charakteristiku rozpustnosti, která umožňuje zvláště vhodným způsobem přípravu a zpracování prostředků pro parenterální podávání s pomalým uvolňováním, například jak je popsáno v WO93/24150, a přípravu prostředků s pomalým uvolňováním s výhodným uvolňovacím profilem a výhodnou stabilitní charakteristikou při skladování. Výhodné prostředky pro parenterální podávání s pomalým uvolňováním obsahují 1 až 100 mg (například 5 až 50 mg) polypeptidu na jednotlivou dávku. Výhodné prostředky pro parenterální podávání s pomalým uvolňováním jsou také upravené pro uvolňování v periodě nejméně 5 dní.

Výhodné deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu zahrnují deriváty, které, pokud jsou ve formě vytlačovaného polymerního prostředku pro skladování, vykazují minimální ztrátu způsobenou degradací na výlisku, nebo které vykazují minimální degradaci

při uvolnění z takového prostředku pro skladování. Typické způsoby pro měření úrovně degradace peptidů podle předkládaného vynálezu jsou následující:

Příprava vytlačovaného polymerního prostředku peptidu pro skladování

Asi 20 mg peptidu se přesně zváží a přidá se dostatečné množství polymeru (50/50 % molárních kopolymeru poly(D,L-kyselina mléčná/kyselina glykolová) o přibližné střední molární hmotnosti 20kD a přibližné polydisperzité 1,7, což se určí pomocí vytěšňovací chromatografie (size exclusion chromatography) za získání přibližně 20% (hmotn./hmotn.) směsi. Ta se rozpustí v ledové kyselině octové prosté anhydridu za získání 10% (hmotn./obj.) roztoku. Roztok se suší za chladu a získaný zmrazený produkt se skladuje před použitím za vakua.

Asi 100 mg zmrazeného materiálu se vloží do bubnu malého laboratorního extrudéru a plunžrový píst se stlačí a vzorek se tak spojí. Extrudér se zahřeje na teplotu 90 až 95 °C a při této teplotě se udržuje 10 minut, potom se látka sušená za mrazu protlačuje za tlaku za získání válcovitého výlisku o průměru přibližně 1 mm.

Analýza obsahu peptidu v extrudovaném polymerním prostředku peptidu pro skladování

Dvě přibližně 5 mm dlouhé extrudované části polymeru obsahujícího peptid se přesně zváží a rozpustí se v 1 ml ledové kyseliny octové prosté anhydridu v oddělených 25 ml odměrných baňkách. Přibližně po 1,5 hodině se objem každé baňky doplní destilovanou vodou na 25 ml, čímž dojde ke srážení polymeru. Pevný podíl se odfiltruje za použití 0,5 µm Millex PTFE filtru a roztoky A se shromáždí.

Série standardních roztoků se připraví ze zásobního roztoku peptidu v destilované vodě při 0,5 mg/ml a zásobního roztoku

polymeru v ledové kyselině octové prosté anhydridu při 2,5 mg/ml, přičemž se každý roztok doplní destilovanou vodou na 10 ml:

Koncentrace peptidu ($\mu\text{g/ml}$)	Objem zásobního roztoku polymeru (μl)	Objem zásobního roztoku peptidu (μl)
50	1000	1000
40	1000	800
30	1000	600
20	1000	400
10	1000	200
5	1000	100
0	1000	0

Každý standard se filtruje přes 5 μm Millex PTFE filtr a alikvotní díly filtrátu, společně s alikvotními díly roztoků A, se analyzují pomocí HPLC za použití dvojího stanovení každého vzorku. Obsah peptidu v prostředku extrudovaného polymeru pro skladování se vypočte z koncentrace peptidu v roztoku A, která se určí pomocí porovnání plochy píku peptidu v roztoku A s plochou píku peptidu ze standardních roztoků. Výhodné deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu vykazují minimální ztrátu způsobenou degradací na výlisku a tedy obsah peptidu v prostředku extrudovaného polymeru se blíží teoretické hodnotě okolo 20 % hmotnostních.

Degradace peptidu při in vitro uvolnění z extrudovaného polymerního prostředku pro skladování

Roztok McIlvaina pufrovacího roztoku obsahujícího kyselinu citronovou/fosfát při pH 7,6 obsahující 0,02 % azidu sodného se filtruje přes 0,22 μm filtr a skladuje se při 4 °C. Do dvou

malých viálek se umístí přibližně 10 mg extrudovaného polymeru pro skladování obsahujícího peptid a přidají se 2 ml pufovacího roztoku. Viálky se potom uzavřou a skladují se ve vodní lázni při 37 °C 1 měsíc. Ve vhodných časových intervalech v průběhu měsíce se z každé viálky odeberou tři 0,6 ml alikvotní díly uvolněného média a analyzují se pomocí HPLC nebo se před HPLC analýzou zmrazené skladují v HPLC viálkách při -18 °C. Do každé viálky obsahující skladovací hmotu se přidá 1,8 ml pufovacího roztoku, aby se vyměnilo uvolněné médium, které odstraňovalo v každém časovém úseku.

Průměrné množství neporušeného peptidu v uvolňovacím médiu v každém časovém úseku se určí pomocí HPLC za použití dvojnásobného stanovení porovnáním plochy píku peptidu a uvolněném médiu s plochou píku peptidu ze standardního pufovacího roztoku peptidu o známé koncentraci. Přibližné průměrné množství degradovaného produktu peptidu v uvolněném médiu v každém časovém úseku se určí pomocí HPLC porovnáním plochy dalších nových píků v uvolněném médiu s plochou píku peptidu ze standardních pufovacích roztoků peptidu o známých koncentracích a za předpokladu, že se nemění extinkční koeficient. Průměrný kumulativní *in vitro* uvolňovací profil nepoškozeného peptidu a celkové množství peptidu (nepoškozeného peptidu a degradačního produktu peptidu) se určí z množství nepoškozeného peptidu a degradačního produktu peptidu v uvolněném médiu v každém časovém úseku. Výhodné deriváty peptidů podle předkládaného vynálezu vykazují minimální degradaci při *in vitro* uvolňování a tedy vykazují celkovou degradaci peptidového produktu nižší než 10 % a s výhodou nižší než 5 % celkového množství peptidu po 1 měsíci *in vitro* uvolňování v McIlvainově pufovacím roztoku při pH 7,6 a při 37 °C.

Prostředky podle předkládaného vynálezu se obvykle podávají člověku tak, že například se denní dávka pohybuje v rozmezí

10 µg až 5000 mg, s výhodou 0,1 až 100 mg, na pacienta vážícího 70 kg, přičemž je možné tuto dávku podávat po částech. Přesné množství podávaného prostředku a způsob a formapodávání může záviset na velikosti, věku a pohlaví pacienta a na konkrétním onemocnění nebo stavu, který se léčí a na jeho závažnosti, v souladu s principy používanými v lékařské praxi.

~~Derivát peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky~~
přijatelná sůl se může také s výhodou podávat pro léčebné a profylaktické účely společně s jedním nebo více farmakologickými činidly, které jsou v této oblasti obecně známy jako cenné látky při léčbě nebo zmírnění symptomů (nebo jako činidla upravující onemocnění) jednoho nebo více onemocnění nebo stavů uvedených výše, jako je NSAID (jako je ibuprofen nebo piroxicam), analgetika (jako je paracetamol), kortikosteroidy, svalové relaxanty, inhibitory lipoxxygenázy, methotrexát, azathioprin, D-penicillamin, Cyklosporin A nebo terapie monoklonálními protilátkami (jako je anti-CD4 nebo anti-TNF). Při diabetu mohou být peptidové sloučeniny podávány společně s insulinem nebo jinými léčivými pro diabetes nebo komplikace diabetu (jako je inhibitor aldosreduktázy). Je třeba poznamenat, že taková kombinovaná léčba tvoří další aspekt podle předkládaného vynálezu.

V souladu s dalším aspektem předkládaný vynález poskytuje způsob léčby autoimunních nebo zánětlivých onemocnění zprostředkovaných T-buňkami závislými na MHC třídy II, například jednoho nebo více onemocnění nebo stavů uvedených výše, přičemž způsob zahrnuje podávání účinného množství derivátu peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli teplokrevným živočichům (včetně člověka), pokud takovou léčbu potřebují. Předkládaný vynález také poskytuje použití derivátu peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli při přípravě nových léčiv pro

použití při léčbě autoimunních nebo zánětlivých onemocnění zprostředkovaných T-buňkami závislými na MHC třídy II.

Kromě výše uvedeného použití sloučenin při léčbě člověka, derivát peptidu obecného vzorce I je také využitelný ve veterinární léčbě podobných stavů u teplokrevných živočichů, jako jsou psi, kočky, koně a dobytek. Obecně se při takové

~~léčbě derivát peptidu obecného vzorce I podává v analogickém~~
množství a analogickým způsobem, jako je popsáno výše při podávání člověku. Deriváty peptidů obecného vzorce I jsou také cenné jako farmakologické nástroje při vývoji a standardizaci testovacích systémů pro hodnocení účinků molekul MHC třídy II na laboratorní zvířata jako jsou kočky, psi, králíci, opice, krysy a myši, při výzkumu nových nebo zlepšených léčebných činidel nebo diagnostických činidel.

Předkládaný vynález bude dále ilustrován následujícími příklady, které vynález neomezují, ve kterých, pokud není uvedeno jinak:

~~(i) zahušťování a odpařování se provádí pomocí rotačního~~
odpařování za vakua;

(ii) operace se provádí při teplotě místnosti, t.j. při teplotě 18 až 26 °C;

(iii) výtěžky, pokud jsou uvedeny, jsou určeny pouze pro lepší srozumitelnost a nejsou nutně maximálními dosažitelnými výtěžky, které lze získat po důsledném výzkumu;

(iv) používají se následující zkratky (i ve schématech 1 a 2):

Phv = 5-fenylvaleryl; Boc = terc-butoxykarbonyl; tBu = terc-butyl; DMF = N,N-dimethylformamid; HOBT = 1-hydroxy-benzotriazol; Met = methionin; Fmoc = 9-fluorenylmethoxykarbonyl; Fmoc-Pip-OH = N-(9-fluorenylmethoxykarbonyl)piperidin-4karboxylová kyselina; Fmoc-Papa-OH = 4-[N-(9-fluorenylmethoxy-

karbonyl)amino]fenyloctová kyselina; Z nebo CbZ = benzyloxykarbonyl; Pmc=2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl; Pbf = 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; Trt = tri-tyl; THF = tetrahydrofuran; DMSO = dimethylsulfoxid; HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorofosfát; DIPEA = diisopropylethylamin; TFA = trifluoroctová kyselina; HPLC = vysokotlaká kapalinová chromatografie; a RP-HPLC = vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi (která se, pokud není uvedeno jinak, provádí na koloně Vydac C18 218TP54, 4,6 x 250mm);

(v) velmi rychlá chromatografie a chromatografie na silikagelu se provádí na Merck Kieselgel 60 (č. 9385) získaném od E. Merck, Darmstadt, Německo;

(vi) ^1H NMR spektra se určují při 200 MHz v deuteriochloroformu nebo perdeuterodimethylsulfoxidu (d_6 -DMSO) za použití tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřního standardu, a jsou vyjádřena jako hodnoty chemického posunu (δ) v miliontinách vzhledem k TMS za použití běžných zkratk pro označení důležitých píků: s, singlet; m, multiplet; t, triplet; š, široký; d, doublet;

(vii) pro zavedení Lys, Thr, Arg nebo His zbytků se použily následující Fmoc-chráněné aminokyseliny:

pro Lys: Fmoc-Lys(Boc)-OH; pro Thr: Fmoc-Thr(OtBu)-OH; pro Arg: Fmoc-Arg(Pmc)-OH nebo Fmoc-Arg(Pbf)-OH; a pro His: Fmoc-His(Trt)-OH;

(viii) pokud se ve vzorci objeví -II-, znamená to zbytek L-aminokyseliny vzorce II, jak je uvedeno níže, bývají uvedeny hodnoty n, X, R^1 a R^2 ; a

(ix) pokud se ve vzorci objeví -IIIa-, znamená to skupinu obecného vzorce IIIa, jak je uvedeno níže.

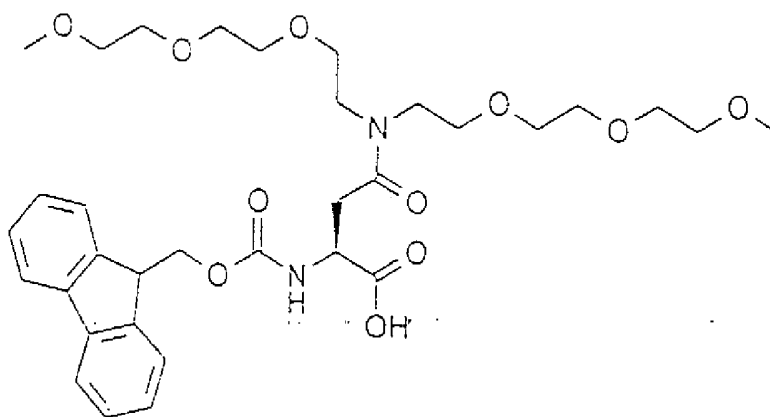
Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (sekv. č.:1)

(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CH₂OCH₂CH₂-OCH₂CH₂OCH₃)

1.1 Příprava N²-(9-fluorenylmethoxykarbonyl)-N¹,N¹-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)-L-asparaginu



(a) 1-Brom-2-(2-methoxyethoxy)ethan (30 g) se v dusíkové atmosféře přidá k míchajícímu se roztoku N-benzilyldiethanolaminu (10 g) v tetrahydrofuranu (100 ml). Po částech se potom za chlazení vodní lázní přidá hydrid sodný (5,3 g, 60% disperze v minerálním oleji). Po dokončení přidávání se směs míchá 2 hodiny a po částech se přidá další hydrid sodný (4,4 g 60% disperze v minerálním oleji). Směs se potom nechá míchat 16 hodin při teplotě místnosti. K reakční směsi se opatrně přidá voda (50 ml) a rozloží se tak přebytek hydridu sodného a ze směsi se odpaří organická rozpouštědla. Ke zbytku se přidá voda a směs se pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové okyslí na pH 2 a potom se extrahuje diethyletherem (2x100 ml). Extrakty se vylijí. pH vodné vrstvy se potom pomocí přidání

koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného upraví na 12 a extrahuje se diethyletherem (2x150 ml). Etherové extrakty se spojí, promyjí solankou, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se do sucha. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za použití gradientu chloroform až 5 % methanol/chloroform za nasycení koncentrovaným vodným roztokem amoniaku. Příslušné frakce se spojí a odpaří do sucha za získání gumovité látky (12 g). Přidá se methanol (100 ml), potom 10% palladium na uhlí (2,5 g) a mravenčan amonný (7,2 g) a směs se míchá v dusíkové atmosféře 1 hodinu při 60 °C. Směs se potom ochladí, filtruje a odpaří do sucha. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za použití gradientu chloroform až 10 % methanol/chloroform za nasycení koncentrovaným vodným roztokem amoniaku. Příslušné frakce se spojí a odpaří do sucha za získání N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)aminu ve formě gumy (7,1 g).;

NMR (deuterochloroform): 2,8 (m, 4H), 3,3 (s, 6H), 3,45 (m, 4H), 3,6 (m, 16H).

--(b) N-Methylmorfolin (176 g), α -benzylester kyseliny N-terc-butyloxykarbonyl-L-asparagové (2,6 g), hydroxybenzotriazol (2,16 g) a hydrochlorid 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (1,68 g) se za míchání přidá k N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)aminu (2,5 g) v dimethylformamidu (12 ml). Směs se míchá 16 hodin a potom se přidá 2% kyselina octová ve vodě (50 ml). Směs se extrahuje diethyletherem (2x50 ml) a spojené organické extrakty se promyjí roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a suší se nad síranem hořečnatým. Těkavé látky se odpaří za získání α -benzylesteru kyseliny N²-terc-butyloxykarbonyl-N⁴,N⁴-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)-L-asparagové ve formě gumy (2,8 g);

NMR (deuterochloroform): 1,4 (s, 9H), 2,9 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 3,4 (s, 6H), 3,6 (m, 24H), 4,6 (m, 1H), 5,2 (kv, 2H), 5,8 (d, 1H), 7,4 (s, 5H).

(c) 10% Palladium na uhlí (0,8 g) a cyklohexen (1,6 g) se přidá k roztoku α -benzylesteru kyseliny N²-terc-butyloxykarbonyl-N⁴,N⁴-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)-L-asparagové (2,6 g) v methanolu (20 ml) a směs se 2 hodiny zahřívá na 55 °C. Směs se potom ochladí, filtruje a odpaří. Ke zbytku se přidá aceton (20 ml) a voda (8 ml) a koncentrovaná kyselina chlorovodíková (2 ml). Směs se zahřívá 1 hodinu na 55 °C, ochladí se a pomocí přebytku pevného hydrogenuhličitanu sodného se pH upraví na 7. Ke směsi se přidá fluorenylmethylsukcinimidylkarbonát (1,36 g) a směs se míchá 16 hodin. Těkavé složky se odpaří a zbytek se extrahuje mezi vodu (25 ml) a diethylether (50 ml). Vodná vrstva se oddělí a pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové se okyselí na pH 3. Směs se potom extrahuje dichlormethanem (50 ml). Organický extrakt se promyje vodou, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se za získání N²-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-N⁴,N⁴-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)-L-asparaginu [níže uvedený jako Fmoc-Asp(PE)-OH] (2 g) ve formě gumy;

NMR (deuterochloroform): 2,8 (kv, 1H), 3,4 (kv, 1H), 3,4 (s, 6H), 3,6 (m, 24H), 4,2-4,6 (m, 4H), 6,3 (d, 1H), 7,4 (m, 4H), 7,6 (m, 2H), 7,8 (d, 2H).

1.2 příprava Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂

(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CH₂OCH₂-CH₂OCH₂CH₂OCH₃)

Peptid se připraví pomocí Fmoc syntézou na pevné fázi, přičemž se vyjde z pryskyřice „Fmoc Rink Amid MBHA Resin“ (Novabiochem, 0,50 g; 0,25 mmol), v postupu se kombinuje automatizovaná

syntéza a ruční syntéza za použití Bond Elut zkumavky (Varian, 15 ml, opatřena na dně filtrem).

Fmoc-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH-pryskyřice se nejprve získá za použití ABI 431 přístroje pro autometickou syntézu peptidů pomocí odstranění chránících skupin z pryskyřice a následnou kondenzací a odstranění chránicí skupiny z Fmoc-Pip-OH (353 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol) a Fmoc-Val-OH (339 mg, 1 mmol), za podmínek doporučených výrobcem pro jednoduché acylace zahrnující HBTU/HOBT. Po odstranění chránících skupin se pryskyřice promyje dimethylformamidem (10x10-20 ml). Karboxylová kyselina (1 mmol) se aktivuje HBTU (1 ekvivalent), HOBT (1 ekvivalent) a DIPEA (2 ekvivalenty) v dimethylformamidu asi 11 minut před převedením na pryskyřici. Acylace se provádí přibližně 60 minut a pryskyřice se potom promyje dimethylformamidem (10 x 10-20 ml). Odstraněné chránicí skupiny Fmoc v každém kroku se provádí pomocí 20% roztoku piperidinu v dimethylformamidu (dvě zpracování s 5 ml vždy po 10 minutách). Po každém odstranění chránicí skupiny se pryskyřice důkladně promyje dimethylformamidem (5x10 ml).

Zbývající zbytky v sekvenci se postupně kondenzují a odstraňují se z nich chránicí skupiny ručně. Kondenzace se provádí pomocí přidání roztoku vhodné N-Fmoc chráněné aminokyseliny (1 mmol), dimethylformamidu (1,5 ml), HOBT (165 mg, 1 mmol) a diisopropylkarbodiimidu (155 μ l, 1 mmol) k pryskyřici. Kondenzace probíhá přibližně 30 minut, promyje se dimethylformamidem (5x10 ml) a u malého množství pryskyřice se zkontroluje, zda kondenzace proběhla úplně pomocí Kaiserova testu (E. Kaiser, a kol., (1970), Anal. Biochem. 34, 595). Odstranění chránicí skupiny se provede tak, jak je popsáno výše. Tímto způsobem se Fmoc-Asp(PE)-OH (323 mg, 0,5 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol) a kyselina 5-fenylvalerová (178

mg, 1 mmol) postupně kondenzují k pryskyřici. Kyselina fenyl-valerová se kondenzuje dvojnásobně než se dosáhne pozitivního výsledku Kaiserova testu.

Peptid se odštěpí z pryskyřice za použití směsi kyseliny trifluoroctové (7,9 ml) a triethylsilanu (0,395 ml). Po 2 hodinách se pryskyřice promyje dichlormethanem (asi 150 ml) a výsledný roztok se odpaří do sucha. Vzniklá pevná látka se extrahuje mezi ether (25 ml) a vodu (25 ml) a potom se etherová vrstva extrahuje dalším podílem vody (2x25 ml). Vodné vrstvy se spojí a suší za chladu.

Surový produkt se čistí pomocí preparativní RP-HPLC (Vydac 218TP1022 kolona, 250mm x 22mm), surová látka se nanese v 10 ml směsi 20% acetonitril/voda. Chromatografie probíhá za eluce gradientem acetonitril/voda obsahujícím 0,1 % kyseliny trifluoroctové při průtoku 12 ml/minutu. Frakce obsahující produkt se spojí a suší za mrazu za získání Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (kde II je zbytek L-aminokyseliny vzorce II, kde n = 1; X = karbonylová skupina a R¹ = R² = -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₃) jako bílé pevné látky (83 mg).

Produkt se charakterizoval pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýza aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (Vydac C18 kolona, 218TP54, 4,6x250mm, eluce acetonitril a voda obsahující 0,1 % kyseliny trifluoroctové, za použití gradientu 10-50 % acetonitrilu gradient za 30 minut, průtok 1,0 ml/min), zjištěna 94% čistota, retenční čas 23,29 minuty.

Hmotová spektroskopie, m/e (ES⁺) 1220,7 (MH⁺).

Analýza aminokyselin (kyselá hydrolyza po dobu 24 hodin za použití roztoku 6N kyseliny chlorovodíkové obsahující 1 % fenolu při 130 °C) poskytla Ala 5,82, Val 0,98, Asp 1,19.

Fmoc-Pip-OH se získá způsobem, který je analogický způsobu popsanému v E. Atherton a R. C. Sheppard ("Solid fase peptid synthesis: a practical approach", IRL press, 1989, strana 51) z N-Fmoc-L-methioninu:

Fmoc-Pip-OH: NMR (perdeuterodimethylsulfoxid) 1,3 (m, 2H), 1,7 (m, 2H), 2,5 (m, 2H), 2,9 (t, 2H), 3,7 (m, 1H), 4,2 (t, 1H), 4,4 (d, 2H), 7,4 (m, 4H), 7,7 (d, 2H), 7,9 (d, 2H);

Hmotová spektroskopie m/e (ES⁺) 352,2 (MH⁺)

Příklad 2

Příprava Phv-II-Ala-Ala-Lys-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (sekv. č.: 2) (vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CH₂OCH₂-CH₂OCH₂CH₂OCH₃)

Syntéza se provede za použití podobného způsobu jako je popsáno v příkladu 1.2 pomocí postupné kondenzace (ruční) Fmoc-Lys(Boc)-OH (468 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), Fmoc-Asp(PE)-OH (323 mg, 0,5 mmol) a kyseliny 5-fenylvalerové (178 mg, 1 mmol) na Fmoc-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH-pryskyřici (získáno za použití ruční kondenzace). Peptid se odštěpí z pryskyřice a surový produkt se čistí za použití podobných podmínek jako jsou podmínky popsané v příkladu 1. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 20-50 % acetonitrile za 30 minut, průtok 1,0 ml/minutu), retenční čas = 16,4 minuty.

Hmotová spektroskopie, m/e (ES⁺) 1277,8 (MH⁺).

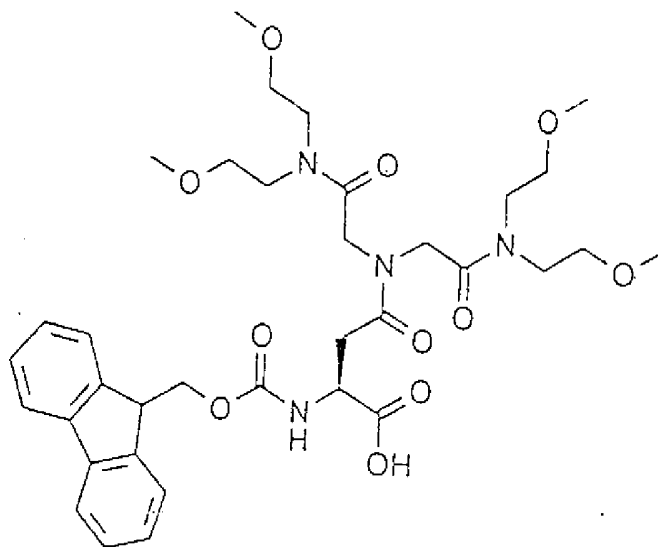
Analýza aminokyselin poskytla Asp 1,07, Lys 1,05, Ala 4,9, Val 0,92.

Příklad 3

Příprava Phv-Ala-Arg-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂ (sekv. č.: 3)

(vzorec II: $n=1$; X=karbonylová skupina; $R^1=R^2=-CH_2NOC(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

3.1 Příprava N²-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-N⁴,N⁴-bis(N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl)-L-asparaginu



(a) N-methylmorpholin (2 g), hydroxybenzotriazol-(4-g), bis(2-methoxyethyl)amin (3,5 g) a hydrochlorid 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylkarbodiimidu (3,8 g) se přidá ke kyselině N-(benzyloxykarbonyl)iminodioctové (2,7 g) v dimethylformamidu (15 ml) a směs se míchá 16 hodin. Těkavé podíly se odpaří a extrahují se mezi vodu a dichlormethan. Organický extrakt se promyje vodou, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se. Zbytek se čistí pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce gradientem chloroform až 10 % methanol/chloroform za získání N-(benzyloxykarbonyl)iminodi-(N,N-bis(2-methoxyethyl))-acetamidu ve formě gumy (2,3 g);

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 3,1-3,4 (4 singlety způsobené rotamery, 12H), 3,5 (m, 16H), 4,2 (s, 4H), 5,05 (s, 2H), 7,3 (m, 5H).

(b) 10% Palladium na uhlí (0,2 g) a cyklohexen (2 ml) se přidají k N-(benzyloxykarbonyl)iminodi-[N,N-bis(2-methoxyethyl)]acetamidu (3,5 g) v ethanolu (20 ml) a směs se míchá při 55 °C v dusíkové atmosféře 4 hodiny. Reakční směs se ochladí, filtruje a odpaří. K roztoku zbytku v dimethylformamidu (15 ml) se za míchání přidá N-methylmorfolin (1,4 g), hydroxybenzotriazol (1,85 g), α -benzylester kyseliny N-terc-butyloxykarbonyl-L-asparagové (2,4 g) a hydrochlorid 1-(3dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (1,6 g). Směs se míchá 16 hodin a potom se přidá 2% kyselina octová ve vodě (50 ml) a extrahuje se diethyletherem (2 x 50 ml). Spojené organické extrakty se promyjí roztokem hydrogenuhličitanu sodného, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se za získání α -benzylesteru N²-terc-butyloxykarbonyl-N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)-karbamoylmethyl]-L-asparaginu (4,1 g) ve formě gumy;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 1,4 (s, 9H), 2,6 (m, 2H), 3,2 (překrývající se singlety způsobené rotamery, 12H), 3,4 (m, 16H), 4,0-4,4 (m, 5H), 5,1 (s, 2H), 6,8 (d, 1H), 7,4 (s, 5H).

(c) Použitím analogického postupu jako v příkladu, části (c), ale za použití α -benzylesteru N²-terc-butyloxykarbonyl-N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)-karbamoylmethyl]-L-asparaginu (4 g) jako výchozí látky, se získá N²-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl]-L-asparagin (níže uváděný jako Fmoc-Asp(TE)-OH) (3 g) ve formě gumy;

NMR (deuterochloroform): 2,8 (m, 1H), 3,1 (m, 1H), 3,3 (překrývající se singlety způsobené rotamery), 12H), 3,6 (m, 16H), 4,2-4,8 (m, 8H), 6,4 (d, 1H), 7,4 (m, 4H), 7,6 (d, 2H), 7,8 (d, 2H).

3.2 Příprava Phv-Ala-Arg-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂

(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CON(CH₂CH₂-OCH₃)₂)

Syntéza se provádí podobným způsobem, jako je popsáno pro příklad 1,2 pomocí odstranění chránicí skupiny z pryskyřice a postupné kondenzace a odstranění chránicí skupiny s Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Ala-OH, (2S)-[(3R)-3-(N-9-fluorenylmethyloxykarbonylamino)-2-oxo-pyrrolidin-1-yl]propionovou kyselinou (Fmoc-IIIa-OH), Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(TE)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH a 5-fenylvalerovou kyselinou při příslušných kondenzačních krocích, které se provádí ručně. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 10-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minutu), retenční čas = 21,88 minuty.

Hmotová spektroskopie, m/e (ES⁺) 1395,8 (MH⁺).

Analýza aminokyselin poskytla Asp 1,04, Thr 0,93, Ala 3,12, Arg 0,92.

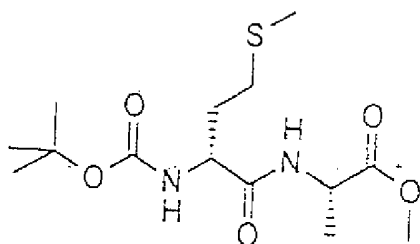
Fmoc-Papa-OH se získá analogickým způsobem, jako je popsáno v E. Atherton a R. C. Sheppard ("Solid fase peptid synthesis: a practical approach", IRL press, 1989, strana 51) z N-Fmoc-L-methioninu:

Fmoc-Papa-OH: NMR (perdeuterodimethylsulfoxid) 3,5 (s, 2H), 4,25 (t, 1H), 4,5 (d, 2H), 7,1 (d, 2H), 7,4 (m, 6H), 7,75 (d, 2H), 7,9 (d, 2H), 9,6 (s, 1H);

Hmotová spektroskopie m/e (ES⁺) 372,1 (M-H)⁺.

(2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-fluorenylmethyloxykarbonyl]amino)-2-oxo-pyrrolidin-1-yl]propionová kyselina (Fmoc-IIIa-OH) se získá následujícím způsobem:

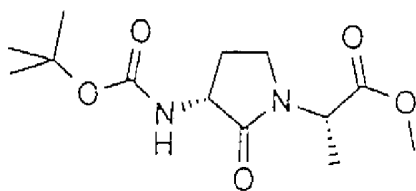
(i) Příprava Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe



N-methylmorpholin (5,6 g), hydrochloridu methylesteru L-alaninu (3,9 g), HOBT (4,6 g) a 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid (5,3 g) se přidá k roztoku Boc-(D)-methioninu (7 g, 0,028 mol) v suchém dimethylformamidu (50 ml). Směs se míchá přes noc. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a zbytek se extrahuje mezi dichlormethan (100 ml) a 5% vodný roztok kyseliny octové (50 ml). Za stání krystalizuje HOBT a odstraní se filtrací a organická vrstva se oddělí a promyje se vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří. Zbytek (8,5 g) se čistí pomocí velmi rychlé chromatografie na nálevce s fritou za eluce směsí dichlormethan a ether (0 až 100 % ether). Frakce obsahující produkt se spojí a odpaří za získání Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe (7,2 g) ve formě gumy, která krystalizuje stáním;

NMR (deuteriochloroform): 1,4 (d, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,95 (m, 1H), 2,1 (s, 3H), 2,1 (m, 1H), 2,6 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 4,3 (š s, 1 H), 4,6 (m, 1 H), 5,3 (m, 1 H), 6,9 (š s, 1 H).

(ii) Příprava methyl (2S)-2-[(3R)-3-(N-[terc-butyloxykarbonyl]-amino)-2-oxopyrrolidin-1-yl]propionátu

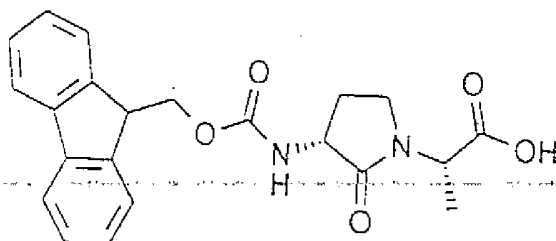


Poznámka: Tato sekvence musí být připravena za suchých podmínek se suchým rozpouštědlem, jinak probíhá epimerace. Methyljodid

(10 ml) se přidá k Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe (8 g) ve směsi dimethylformamidu (20 ml) a dichlormethanu (20 ml) a směs se nechá 16 hodin stát a potom se odpaří do sucha. Přidá se další dichlormethan (2x50 ml) a znovu se odpaří, aby se odstranil zbytek methyljodidu a zbytek se rozpustí ve směsi dimethylformamid (300 ml) a dichlormethan (300 ml). Směs se ochladí přibližně na 5 °C a najednou se přidá hydrid sodný (0,76 g 80% disperze v minerálním oleji) a směs se míchá při teplotě místnosti 2 hodiny. Přidá se nasycený vodný roztok chloridu amonného (50 ml) a směs se odpaří do sucha a potom se extrahuje mezi ether a vodu. Etherový extrakt se promyje solankou a suší se a odpaří se za získání gumy, která se čistí pomocí velmi rychlé chromatografie a nálevce s fritou (25 % ethylacetát:hexan až 100 % ethylacetát) za získání methyl (2S)-2-[(3R)-3-(N-[terc-butyloxykarbonyl]amino)-2-oxo-pyrrolidin-1-yl]propionátu ve formě gumy (4,2 g), která krystalizuje stáním:

NMR (deuterochloroform): 1,4 (s, 9H), 1,4 (d, 3H), 1,8 (m, 1H), 2,6 (m, 1H), 3,4 (m, 2H), 3,7 (m, 3H), 4,2 (m, 1H), 4,9 (kv, 1H), 5,2 (šs, 1H).

(iii) Příprava kyseliny (2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-fluorenylmethyloxykarbonyl]amino)-2-oxopyrrolidin-1-yl]propionové (Fmoc-IIIa-OH)



Methyl (2S)-2-[(3R)-3-(N-[terc-butyloxykarbonyl]amino)-2-oxopyrrolidin-1-yl]propionát (4 g) se zahřívá k varu ve směsi acetonu (60 ml), vody (40 ml) a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (24 ml) 3 hodiny a směs se odpaří do sucha.

Přidá se voda a odpaření se opakuje. Zbytek se rozpustí ve vodě (15 ml) a přidá se přebytek pevného hydrogenuhličitanu sodného. Přidá se 9-fluorenylmethylsukcinimidylkarbonát (5,2 g) v acetonu (30 ml). Směs se míchá 16 hodin a potom se rozpouštědlo odstraní odpařením a zbytek se extrahuje mezi vodu a ether. Vodná vrstva se oddělí, okyselí se pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 3 a extrahuje se dichlormethanem. Organická vrstva se promyje vodou, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se za získání bílé pěny, která krystalizuje po trituraci etherem za získání kyseliny (2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-fluorenylmethyl-oxo-karbonyl]amino)-2-oxo-pyrrolidin-1-yl]propionové (4,2 g) jako bílé pevné látky, teplota tání 190-193 °C (za rozkladu);

NMR (deuterochloroform): 1,4 (d, 3H), 2,0 (m, 1H), 2,6 (m, 1H), 3,4 (m, 2H), 4,2 (t, 1H), 4,4 (m, 3H), 4,9 (m, 1H), 5,8 (šs, 1H), 7,4 (m, 4H), 7,6 (d, 2H), 7,7 (d, 2H).

Příklad 4

Příprava Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (sek. č. 4)

(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CON(CH₂-CH₂OCH₃)₂)

Příprava se provádí za použití podobného způsobu jako v příkladu 1,2, za použití Fmoc-Asp(TE)-OH místo Fmoc-Asp(PE)-OH ve vhodném kondenzačním stupni.

Produkt byl charakterizován pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 10-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minuta), retenční čas = 23,9 minuty.

Hmotová spektroskopie, m/e (ES⁺) 1274,7 (MH⁺).

Analýza aminokyselin Asp 1,03, Ala 5,94, Val 0,98.

Příklad 5

Příprava Phv-Arg-Ala-Ala-IIIa-Ala-II-Ala-Papa-NH₂ (sekv. č.: 5)
(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=-CH₂CH₂OCH₂CH₂-OCH₂CH₂OCH₃)

Příprava se provádí za použití podobného způsobu jako v příkladu 1,2, pomocí postupné kondenzace a odstranění chránících skupin (ručně) Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(PE)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-IIIa-OH, Fmoc-Ala-OH (dvakrát), Fmoc-Arg(Pbf)-OH a 5-fenylvalerové kyseliny, následného odštěpení pryskyřice a čištění pomocí preparativní RP-HPLC. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 10-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minuta), retenční čas = 20,45 minuty.

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 656,4 (M⁺2H⁺).

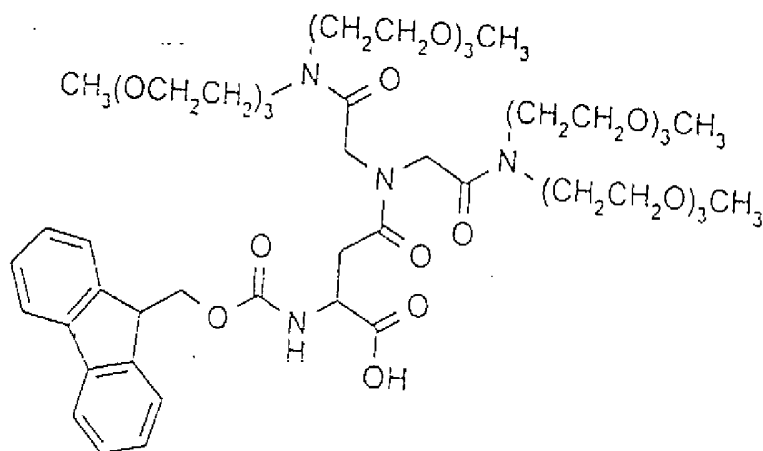
Analýza aminokyselin: Arg 1,06, (Ala + IIIa) 4,85, Asp 1,09

Příklad 6

Příprava Phv-Arg-Ala-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂ (sekv. č.: 6)

(vzorec II: n=1; X=karbonylová skupina; R¹=R²=CH₂CON[(CH₂-CH₂O)₃CH₃]₂)

6.1 Příprava N^2 -(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)- N^4, N^1 -bis[N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)karbamoylmethyl]-L-asparaginu



Za použití analogického způsobu jako v příkladu 3.1 pro přípravu Fmoc-Asp(TE)-OH, ale za použití úměrného množství bis(2-2[-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)aminu v části (a) místo bis(2-methoxyethyl)aminu, se získá N^2 -(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)- N^4, N^1 -bis[N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)karbamoylmethyl]-L-asparagin (níže uvedený jako Fmoc-Asp(TPE)-OH) ve formě oleje;

NMR (deuteriochloroform): 2,9 (m, 1 H), 3,1 (m, 1 H), 3,4 (m, 12H), 3,6 (m, 48H), 4,2-4,6 (m, 8H), 7,4 (m, 4H), 7,6 (m, 2H), 7,8 (d, 2H).

Při provádění kroků (a) a (b) se získají následující meziprodukty v tomto pořadí:

N-(benzyloxykarbonyl)iminodi-[N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)]-acetamid;

NMR (deuteriochloroform): 3,4 (m, 12H), 3,6 (m, 48H), 4,3 (s, 2H), 4,4 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,3 (s, 5H).

α -benzylester N^2 -terc-butyloxykarbonyl- N^4, N^1 -bis[N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)karbamoylmethyl]-L-asparaginu;

NMR (deuterochloroform): 1,9 (s, 9H), 2,7 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 3,4 (m, 12H), 3,6 (m, 48H), 4,4 (m, 5H), 5,2 (s, 2H), 5,9 (šd, 1H), 7,4 (m, 5H).

6.2 Příprava Phv-Arg-Ala-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NHZ

(vzorec II: $n=1$; X=karbonylová skupina; $R^1=R^2=-CH_2CH_2OCH_2CH_2-OCH_2CH_2OCH_3$)

Příprava se prováděla za použití podobného postupu jako je popsáno v příkladu 1.2, postupnou kondenzací a odstraněním chránících skupin (ručně) Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-IIIa-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(TPE)-OH, Fmoc-Ala-OH (dvakrát), Fmoc-Arg-(Pbf)OH a 5-fenylvalerové kyseliny, následným odštěpením pryskyřice a čištěním pomocí preparativní RP-HPLC. Produkt se charakterizoval pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 10-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minuta); retenční čas = 23,61 minuty.

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 1748,0 (MH⁺)

Analýza aminokyselin: Arg 1,01, Ala 3,18, IIIa 1,05, Asp 0,97, Thr 0,78.

Příklad 7

Příprava Phv-Ala-Ala-Ala-II-Thr-Pro-Arg-Gly-Papa-NH₂ (sekvence č.: 7)

(vzorec II: $n=1$; X=karbonylová skupina; $R^1=R^2=-CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

Příprava se prováděla za použití podobného postupu jako je popsáno v příkladu 1.2, postupnou kondenzací a odstraněním chránících skupin (ručně) Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(TE)-OH,

Fmoc-Ala-OH (třikrát) a 5-fenylvalerové kyseliny, následným odštěpením pryskyřice a čištěním pomocí preparativní RP-HPLC. Produkt se charakterizoval pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 20-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minuta), retenční čas = 16,07 minuty.

Hmotová spektroskopie: m/e (ES^+) 1395,7 (MH^+)

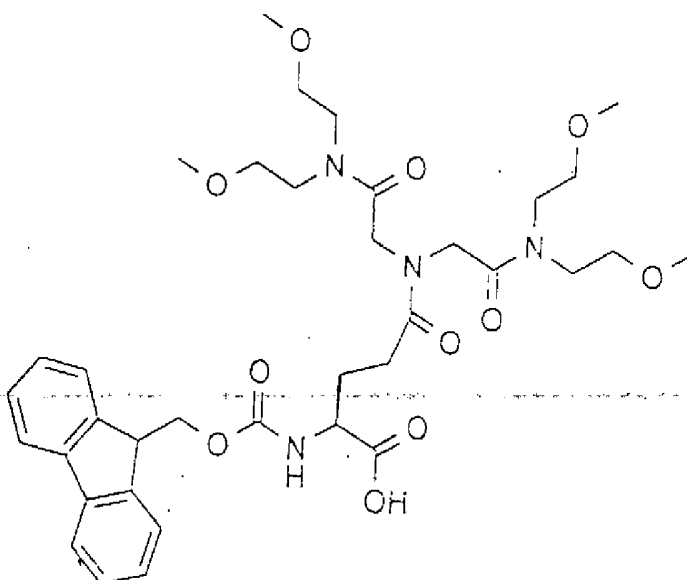
Analýza aminokyselin: Arg 1,01, Ala 3,06, Asp 1,02, Thr 0,92, Pro 0,92, Gly 1,05

Příklad 8

Příprava Phv-II-Arg-Ala-His-Val-IIIa-Ala-Papa-NH₂ (Sekvence č.: 8)

(vzorec II: $n=2$; X=karbonylová skupina; $R^1=R^2=-CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

8.1 Příprava N²-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl]-L-glutaminu



Za použití analogického způsobu jako v příkladu 3.1 pro přípravu Fmoc-Asp(TE)-OH, ale za použití příslušného množství

α -benzylesteru N-terc-butyloxykarbonyl-L-glutamové kyseliny v části (b) místo α -benzylesteru N-terc-butyloxykarbonyl-L-asparagové kyseliny, se získá N^2 -(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)- N^4, N^4 -bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl]-L-glutamin (níže uvedený jako Fmoc-Glu(TE)-OH) ve formě oleje:

NMR (deuteriochloroform): 2,0-2,4 (m, 4H), 3,3 (m, 12H), 3,5 (m, 16H), 4,2-4,6 (m, 8H), 7,4 (m, 4H), 7,6 (m, 2H), 7,8 (d, 2H).

Při kroku (b) se získá následující meziprodukt: α -benzylester N^2 -terc-butyloxykarbonyl- N^4, N^4 -bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl]-L-glutaminu ve formě gumy;

NMR (deuteriochloroform): 1,4 (s, 9H), 2,0 (m, 1H), 2,2 (m, 1H), 2,4 (m, 2H), 3,3 (s, 12H), 3,5 (m, 16H), 4,1-4,5 (m, 5H), 5,2 (s, 2H), 7,3 (s, 5H).

8.2 Příprava Phv-II-Arg-Ala-His-Val-IIIa-Ala-Papa-NH₂

(vzorec II: $n=2$; X=karbonylová skupina; $R^1=R^2=-CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

Příprava se prováděla za použití podobného postupu jako je popsáno v příkladu 1.2, postupnou kondenzací a odstraněním chránících skupin (ručně) Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-IIIa-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(TE)-OH a 5-fenylvalerové kyseliny, následným odštěpením pryskyřice a čištěním pomocí preparativní RP-HPLC. Produkt se charakterizoval pomocí HPLC, hmotové spektroskopie a analýzy aminokyselin, jak je uvedeno níže.

RP-HPLC (gradient 10-50 % acetonitril za 30 minut, průtok 1,0 ml/minutu, retenční čas = 22,23 minuty).

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 1472,2 (MH⁺).

Analýza aminokyselin: Arg 0,95, Ala 2,17, His 0,98, Glu 0,99, Val 0,92, IIIa 0,96.

Příklad 9

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu je možno podávat při léčebném nebo profylaktickém použití teplokrevným živočichům — jako je člověk ve formě běžných farmaceutických prostředků, přičemž typický příklad je následující:

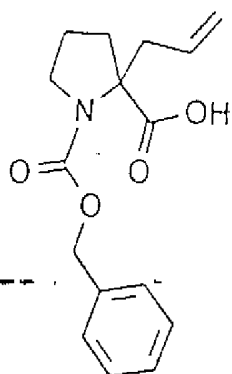
Roztok pro injekční podávání

0,01 to 100 mg aktivní složky se rozpustí ve 2 ml vodného nosiče pro injekční podávání za získání koncentrace aktivní složky 0,01 to 100 mg/ml. Vodné vehikulum pro injekční podávání je pufrováno na pH mezi 5 až 8 za použití farmaceuticky přijatelných pufrovacích látek (například fosfátu nebo acetátu) a obsahuje farmaceuticky přijatelná činidla upravující tonus (například chlorid sodný nebo dextrózu), pomocí kterých se získá isotonický roztok. Vehikulum může popřípadě také obsahovat jiné farmaceuticky přijatelné přísady, jako jsou rozpouštědla (například dimethylsulfoxid, ethanol, propylen-glykol nebo polyethylenglykol) konzervační látky a antioxidanty. Použitou aktivní látkou může být sloučenina uvedená v příkladech výše a může být běžně přítomna ve formě farmaceuticky přijatelné soli.

Poznámka:

(1) Pro peptidy obsahující skupinu vzorce IV, (S)-2-[1-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl]propionová kyselina (Fmoc-IV-OH) může být získána následujícím způsobem:

(i) Příprava (RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)prolinu

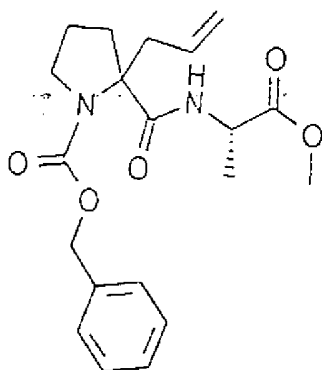


Methylester N-benzyloxykarbonylprolinu (13 g) v tetrahydrofuranu (20 ml) se v dusíkové atmosféře při -78°C přikape k lithiumdiisopropylamidu (27,5 ml, 2M v hexanu/tetrahydrofuranu) v tetrahydrofuranu (100 ml). Směs se míchá 30 minut a potom se přikape allyljodid (5,5 ml) a směs se míchá dalších 30 minut a potom se nechá ohřát na teplotu místnosti. Směs se potom přidá k vodnému roztoku chloridu amonného (200 ml) a extrahuje se etherem (2x200 ml). Etherová vrstva se odpaří a zbytek se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za použití gradientu hexanu až 20 % ethylacetát/hexan. Po odpaření vhodných frakcí do sucha se získá methyl (RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)prolinát (9 g) ve formě oleje.

8,5 g této látky se rozpustí v methanolu (40 ml) a přidá se hydroxid sodný (4,5 g) ve vodě (20 ml) a směs se zahřívá 60 minut k varu. pH směsi se potom pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upraví na 7 a methanol se odpaří. Potom se pH směsi upraví na 3 a směs se extrahuje etherem (2x50 ml). Spojené etherové extrakty se odpaří za získání (RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)prolinu ve formě gumy;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid (100°C)): 1,9 (m, 2H), 2,1 (m, 2H), 2,6 (kv, 1H), 2,9 (kv, 1H), 3,4 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 5,0 (m, 4H), 5,75 (m, 1H), 7,3 (m, 5H).

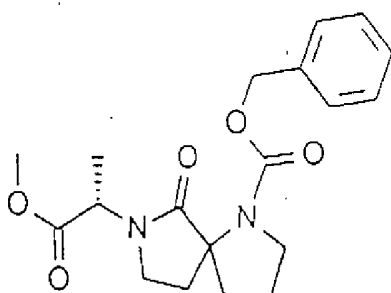
(ii) Příprava methylesteru [(RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)]prolyl-(S)-alaninu



HOBT (7,7 g), N-methylmorpholin (6,6 g), hydrochlorid methylesteru L-alaninu (4,5 g) a 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid (5,7 g) se přidá k (RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)prolinu (6,5 g) v dimethylformamidu (30 ml) a směs se míchá 18 hodin a potom se odpaří. Zbytek se extrahuje mezi ether a vodu, filtruje, čímž se odstraní HOBT a organická vrstva se oddělí. Organická vrstva se odpaří a zbytek se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za použití gradientu 20 % ethylacetátu v hexanu až 50 % ethylacetátu v hexanu. Příslušné frakce se spojí a odpaří do sucha za získání methylesteru [(RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)]prolyl-(S)-alaninu (7 g);

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid (100 °C)): některé zdvojené píky způsobené směsí diastereomerů, 1,25 a 1,3 (2d, 3H), 1,75 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,65 (m, 1H), 2,9 (m, 1H), 3,4 (m, 1H), 3,65 (2s, 3H), 3,7 (m, 1H), 4,3 (2kv, 1H), 5,0 (m, 4H), 5,7 (m, 1H), 7,3 (m, 5H), 7,4 a 7,5 (šs, 1H).

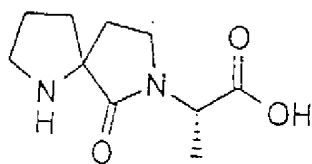
(iii) Příprava methyl (S)-2-(1-benzyloxykarbonyl-6-oxa-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)propionátu. (CbZ-IV-OMe)



Oxid osmičelý (1,5 ml 4% vodného roztoku) se přidá k methylesteru[(RS)-2-allyl-N-(benzyloxykarbonyl)]prolyl-(S)-alaninu (1,45 g) ve směsi methanol (30 ml) a voda (20 ml). Směs se míchá 10 minut v argonové atmosféře a po částech se přidá 2,45 g jodistanu sodného. Směs se míchá 2 hodiny a potom se přidá 100 ml vody a směs se extrahuje ethylacetátem (2x70 ml). Spojené extrakty se suší a odpaří za získání 1,4 g gummy. Guma se rozpustí v dichlormethanu (30 ml) a přikape se triethylsilan (0,65 g) a kyselina trifluoroctová (4 g). Směs se míchá 3 hodiny, odpaří se a zbytek se extrahuje mezi vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného a ether. Etherový extrakt se oddělí a odpaří do sucha. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za použití gradientu 25 % ethylacetát v hexanu až 100 % ethylacetát. Příslušné frakce se spojí a odpaří do sucha za získání methyl (S)-2-(1-benzyloxykarbonyl-6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)propionátu (0,8 g);

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid (100 °C)): některé zdvojené píky způsobené směsí diastereomerů, 1,25 a 1,35 (2d, 3H), 1,95 (m, 6H), 3,1-3,5 (m, 4H), 3,6 a 3,65 (2s, 3H), 4,5 a 4,65 (2kv, 1H), 5,05 (m, 2H), 7,25 (m, 5H).

(iv) Příprava (S)-2-(6-oxo-1,7-diazaspiro-[4,4]non-7-yl)propionové kyseliny (H-IV-OH)

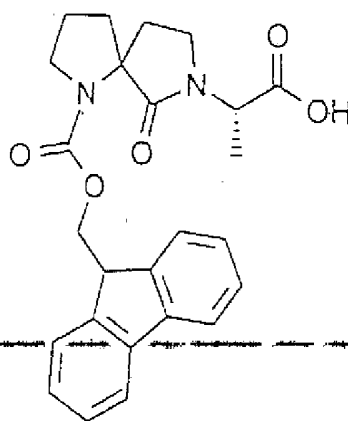


Uhličitan draselný (2,5 g) se přidá k methyl (S)-2-(1-benzyloxykarbonyl-6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)propionátu (3,3 g) ve směsi methanol (40 ml) a voda (40 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti 10 hodin. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové se pH upraví na 5 a směs se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí ve vodě (40 ml) a pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové se pH upraví na 3. Směs

se extrahuje dichlormethanem (2x50 ml). -Spojené extrakty se suší nad síranem hořečnatým a odpaří se za vzniku pěny (2,8 g). Pěna se rozpustí v methanolu (20 ml) a přidá se cyklohexen (0,7 g) a 10% palladium na uhlí (0,5 g). Směs se zahřívá 2 hodiny k varu, ochladí se, filtruje a filtrát se odpaří za získání (S)-2-(6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)propionové kyseliny ve formě pěny (1,9 g);

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): některé zdvojené píky způsobené směsí diastereomerů, 1,25 a 1,3 (2s, 3H), 1,8 (m, 4H), 2,0 (m, 2H), 3,0 (m, 2H), 3,3 (m, 2H), 4,5 (m, 1H).

(v) Příprava (S)-2-[1-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-6-oxo-1,7-diazaspiro-[4,4]non-7-yl]propionové kyseliny (Fmoc-IV-OH)



Přebytek pevného hydrogenuhlíčitanu sodného se přidá ke kyselině (S)-2-(6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl)propionové (0,42 g) ve vodě (2 ml) a potom se přidá 9-fluorenylmethylsukcinimidylkarbonát (0,7 g) v acetonu (3 ml). Směs se míchá 18 hodin. Směs se potom nalije do vody (10 ml), extrahuje se etherem (10 ml) a vodná vrstva se oddělí. (Etherový extrakt se vylije). Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové se pH vodné vrstvy upraví na 3 a potom se extrahuje dichlormethanem (2x10 ml). Extrakty se spojí, suší nad síranem hořečnatým a odpaří se za získání (S)-2-[1-(9-fluorenylmethyloxykarbonyl)-6-oxo-1,7-diazaspiro[4,4]non-7-yl]propionové kyseliny (0,62 g) ve formě bílé pěny;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid (100 °C)): některé zdvojené píky způsobené směsí diastereomerů, 1,3 (2d, 3H), 1,6-2,0 (m, 6H), 3,05 (m, 1H), 3,2-3,45 (m, 3H), 4,2-4,4 (m, 1H), 4,5 (m, 1H), 6,2 (s, 2H), 7,35 (m, 4H), 7,8 (m, 4H).

(2) Pro sloučeniny obsahující skupinu vzorce Va, (3S)-3-(9-fluorenylmethoxykarbonylamino)-2-oxoperhydroazepin-1-octová kyselina může být připravena následujícím způsobem:

(i) (3S)-3-Amino-ε-kaprolaktam (25 g) a triethylamin (19,7 g) se rozpustí v tetrahydrofuranu (200 ml) a ochladí se na 5°C. Během 30 minut se přikape benzylchlorformiát (33 g) v tetrahydrofuranu (50 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 18 hodin a potom se nalije do vody (500 ml). Reakční směs se extrahuje ethylacetátem (3x100 ml). Spojené extrakty se suší nad síranem hořečnatým a odpaří. Zbytek se trituruje etherem (40 ml) a filtruje se za získání 20 g (S)-3-benzyloxykarbonylamino-ε-kaprolaktamu ve formě bílé pevné látky;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 1,1-2 (m, 6H), 2,9-3,2 (m, 2H), 4,1-4,25 (m, 1H), 5,0 (s, 2H), 7,25-7,4 (m, 5H), 7,75 (t, 1H).

(ii) Směs hydridu sodného (2 g) v dimethylformamidu (100 ml) se ochladí v proudu argonu na 0°C. Po částech se během 20 minut přidá (3S)-3-benzyloxykarbonylamino-ε-kaprolaktam (10 g) takovou rychlostí, aby teplota reakční směsi nepřekročila 5 °C. Míchání pokračuje při 0 °C 40 minut a během 10 minut se přikape terc-butylbromacetát (8,2 g). Reakční směs se míchá 1 hodinu při 0 °C a dalších 18 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se nalije do vody (600 ml) a extrahuje se ethylacetátem (6x75 ml). Spojené extrakty se promyjí vodou (3x100 ml), suší se nad síranem hořečnatým a odpaří. Zbytek se čistí pomocí MPLC na silikagelu za eluce směsí 20 % ethylacetát/dichlormethan za

získání terc-butyl (3S)-3-benzyloxykarbonylamino-2-oxoperhydroazepin-1-acetátu (15 g) ve formě oleje;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 1,4 (s, 9H), 1,5-1,9 (m, 6H), 3,5-3,65 (m, 1H), 3,9-4,15 (m, 2H), 4,4 (m, 1H), 5,0 (s, 2H), 7,1 (d, 1H), 7,35 (m, 5H);

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 377 (MH⁺).

(iii) tert-Butyl (3S)-3-benzyloxykarbonylamino-2-oxoperhydroazepin-1-acetát (15 g) se rozpustí v ethanolu (150 ml) a propláchne se argonem. Přidá se 10% palladium na uhlí (1,5 g) a baňka se evakuuje a naplní se vodíkem z balónku. Reakční směs se míchá 4 hodiny při teplotě místnosti. Reakční směs se potom propláchne argonem a filtruje se přes křemelinu. Filtrát se odpaří za získání terc-butyl (3S)-3-amino-2-oxoperhydroazepin-1-acetátu (7,7 g) ve formě viskózního oleje;

NMR (deuteriochloroform): 1,45 (s, 9H), 1,55-2,05 (m, 6H), 3,2-3,3 (d, 1H), 3,55-3,75 (dva překrývající se dublety, 2H), 3,95-4,25 (kv, 2H).

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 243,2 (MH⁺).

(iv) Roztok terc-butyl (3S)-3-amino-2-oxoperhydroazepin-1-acetátu (7 g) v tetrahydrofuranu (50 ml) se přidá k roztoku uhličitanu sodného (3 g) ve vodě (30 ml). Potom se během 30 minut za míchání přikape roztok N-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcimimidu (9,7 g) v tetrahydrofuranu (100 ml). Přidá se 200 ml vody a reakční směs se extrahuje ethylacetátem (3x100 ml). Spojené extrakty se promyjí 100 ml solanky, suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se. Zbytek se čistí pomocí MPLC na silikagelu za eluce nejprve dichlormethanem a postupně až směsí 15 % ethylacetát/dichlormethan za získání terc-butyl (3S)-3-(9-fluorenylmethoxykarbonylamino)-2-oxoperhydroazepin-1-acetátu (10,9 g) jako čirého oleje;

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 1,45 (s, 9H); 1,5-2,15 (m, 6H), 3,1-3,25 (m, 1H), 3,6-3,75 (m, 1H), 4,0-4,5 (m, 5H), 6,25 (d, 1H), 7,25-7,45 (m, 4H), 7,6 (d, 2H), 7,75 (d, 2H);

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 465,2 (MH⁺).

v) terc-Butyl (3S)-3-(9-fluorenylmethoxykarbonylamino)-2-oxoperhydroazepin-1-acetát (10,5 g) se rozpustí v dichlormethanu (30 ml) a přidá se kyselina trifluoroctová (20 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 18 hodin. Přidá se dichlormethan (100 ml) a reakční směs se promyje vodou (4x100 ml), suší se nad síranem hořečnatým a odpaří se. Zbytek se čistí pomocí MPLC na silikagelu za eluce směsí 25 % ethylacetát/dichlormethan, potom ethylacetátem, za získání oleje. Po trituraci isohehexanem se získá bílá pěna, která se filtruje a suší za vakua při 60 °C za získání (3S)-3-(9-fluorenylmethoxykarbonylamino)-2-oxoperhydroazepin-1-octové kyseliny (5,5 g);

NMR (perdeuterodimethylsulfoxid): 1,4-1,95 (m, 1H), 3,15-3,4 (m, 1H), 3,55-3,7 (m, 1H), 3,9-4,2 (m, 2H), 4,25-4,45 (m, 2H), 7,15 (d, 1H), 7,25-7,45 (m, 4H), 7,75 (m, 2H), 7,85 (d, 2H);

Hmotová spektroskopie: m/e (ES⁺) 407,1 (M-H⁺).

Chemické vzorce:

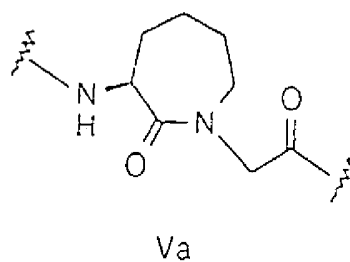
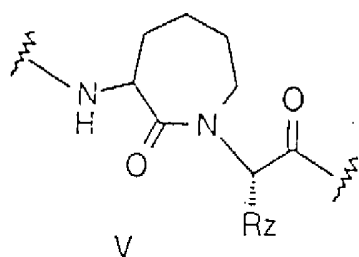
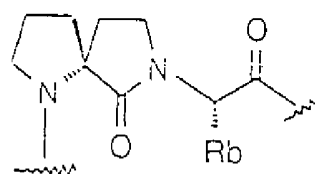
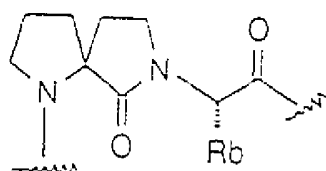
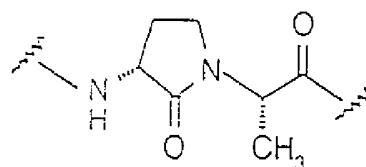
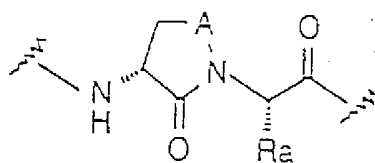
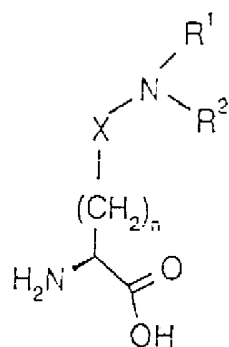
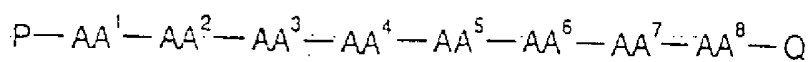
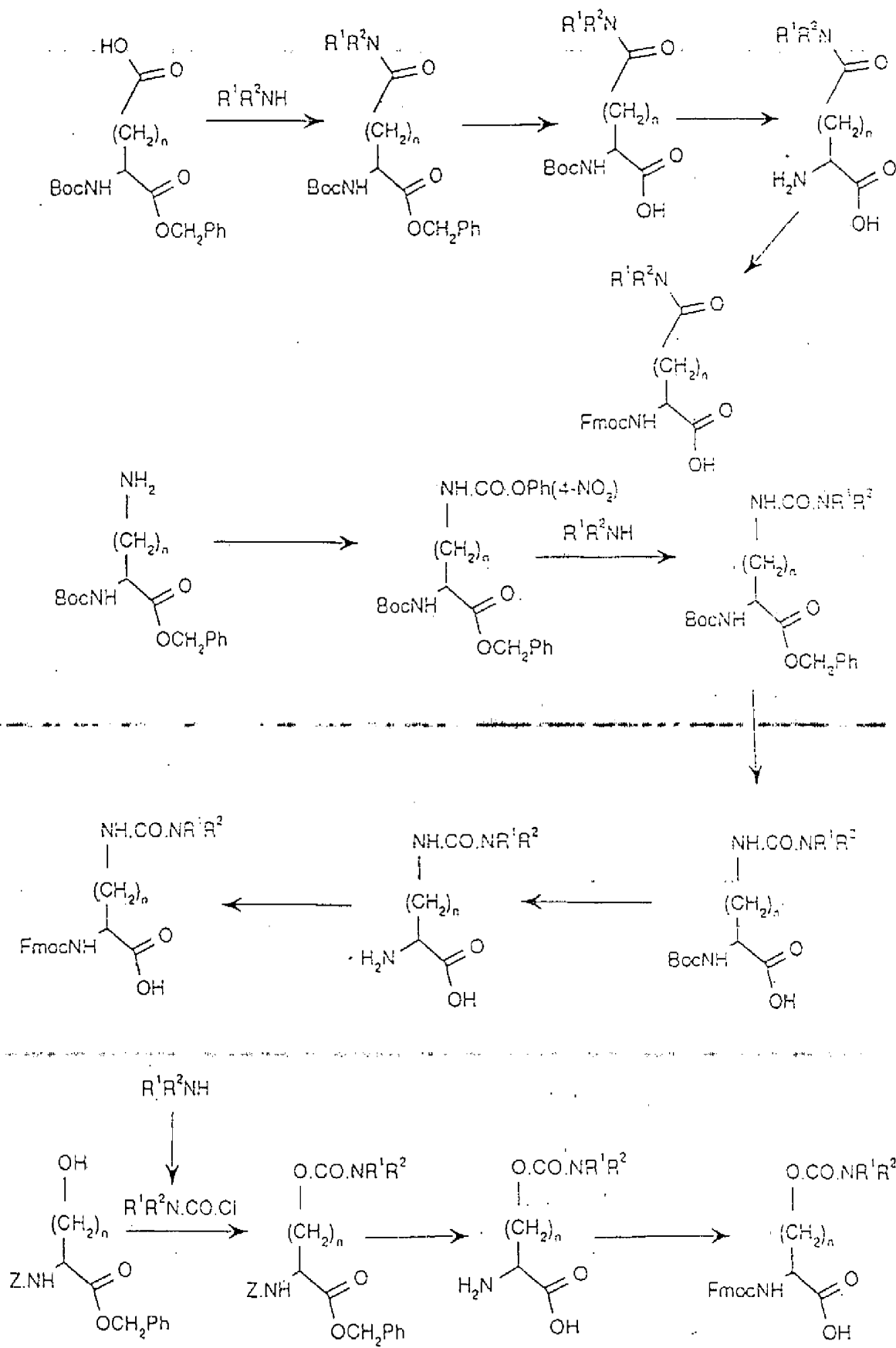


Schéma 1



05.12.90

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Žadatel:

(A) Jméno: ZENECA LIMITED

(B) Ulice: 15 STANHOPE GATE (C) CITY: Londýn

(E) Stát: Velká Británie

(F) Poštovní kód (ZIP): W1Y 6LN

(G) Telefon: 0171 304 5000

(H) Telefax: 0171 304 5151

(I) Telex: 0171 834 2042

(ii) Název vynálezu: Deriváty peptidů, způsob jejich přípravy a farmaceutický prostředek, který je obsahuje

(iii) Počet sekvencí: 8

(iv) Počítačová forma:

(A) Typ nosiče: Floppy disk

(B) Počítač: IBM PC compatible

(C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1,0, verze #1,30 (EPO)

(vi) Údaje o předchozí přihlášce:

(A) Číslo přihlášky: GB 9611881.5

(B) Priorita dne: 7. 6. 1996

(vi) Údaje o předchozí přihlášce:

(A) Číslo přihlášky: GB 9622890.3

(B) Priorita dne: 2. 11. 1996

(2) Údaje o sekvenci identifikační číslo 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Další informace:/produkt="jiný"/poznámka="5-fenylpenta-
noyl-Ala"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Další informace:/produkt="jiný"/poznámka=" (N⁴,N⁴-
bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)]-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 8

(D) Další informace:/produkt="jiný"/poznámka="Ala-piperi-
din-9-karboxamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo: 1:

Xaa Ala Ala Xaa Val Ala Ala Xaa

1

5

(2) Údaje o sekvenci identifikační číslo: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky: —

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) pozice: 1

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka= "S-Fenylpentanoyl-[N⁴,N⁴-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl))Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 8

(D) Jiné údaje: /product="jiný"/poznámka= "Ala-piperidin-9-karboxamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo: 2:

Xaa Ala Ala Lys Val Ala Ala Xaa

1

5

(2) Údaje o sekvenci identifikační číslo 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Další informace: /produkt="jiný"/poznámka="S-Fenylpentanoyl-Ala"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka="(N⁹,N⁹-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl])-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 6

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka="[(S)-2-((R)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)propanoyl]-Ala-4-aminofenyl-acetamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 3:

Xaa Arg Ala Xaa Thr Xaa

1

5

(2) Údaje o sekvenci identifikační číslo 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Další informace: /produkt="jiný"/poznámka="5-Fenylpen-tanoyl-Ala"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka="(N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl])-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 8

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="Ala-piperidin-9-karboxamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 9:

Xaa Ala Ala Xaa Val Ala Ala Xaa

1 5

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="5-Fenylpentanoyl-Arg"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="[(S)-2-((R)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)propanoyl]-Ala"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 5

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="[N¹,N¹-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl)]-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 6

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="Ala-9-aminofenyl-acetamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 5:

Xaa Ala Ala Xaa Xaa Xaa

1 5

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 6:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="5-Fenylpentanoyl-Arg"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="(N⁴,N⁴-bis[N,N-bis(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl]karbamoylmethyl])-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno označení: Peptid

(B) Pozice: 6

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="[(S)-2-((R)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)propanoyl)-Ala-4--aminofenylacetamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 6:

Xaa Ala Ala Xaa Thr Xaa

1

5

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 7:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákna: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="5-Fenylpentanoyl-Ala"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 4

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="(N¹,N¹-bis[N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl])-Asn"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 8

(D) Jiné údaje:/produkt="jiný"/poznámka="Gly-9-aminofenyl-acetamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 7:

Xaa Ala Ala Xaa Thr Pro Arg Xaa

1

5

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 8:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Typ vlákn: jednoduché

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 1

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka="5-Fenylpentanoyl-(N⁴,N⁴-bis(N,N-bis(2-methoxyethyl)karbamoylmethyl))-Gln"

(ix) Znaky:

(A) Jméno/označení: Peptid

(B) Pozice: 6

(D) Jiné údaje: /produkt="jiný"/poznámka="[(S)-2-((R)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)propanoyl]-Ala-9-aminofenyl-acetamid"

(xi) Popis sekvence: sekvence identifikační číslo 8:

Xaa Arg Ala His Val Xaa

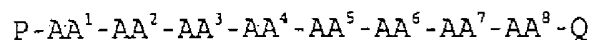
1

5

L. K. H.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

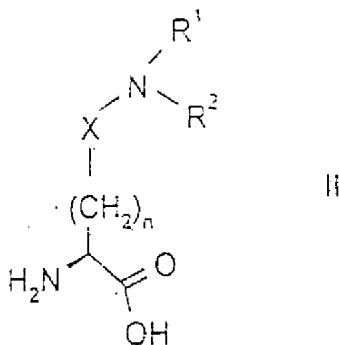
1. Derivát peptidu obecného vzorce I



nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, kde

P je hydrofobní zbytek;

AA¹, AA², AA³, AA⁴, AA⁵, AA⁶, AA⁷ a AA⁸ jsou zbytky L-aminokyselin, kde 1, 2 nebo 3 ze zbytků AA¹, AA⁴ a AA⁷ jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II



kde n je celé číslo 1, 2, 3 nebo 4;

X je skupina -NH-CO-, skupina -CO- nebo skupina -O.CO-;

R¹ a R² jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří (A), (B) a (C),
kde

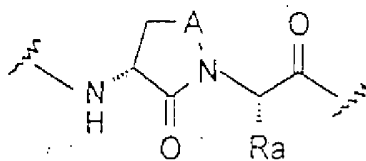
(A) je skupina obecného vzorce $-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}-\text{N}(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, kde a je celé číslo 1 nebo 2 a R³ a R⁴ jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny, kterou tvoří skupina $-[(\text{CH}_2)_b\text{O}]_m-\text{R}^5$, kde R⁵ je methylová skupina nebo ethylová skupina a m je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud m je 1, b je 2 nebo 3 a pokud m je 2, 3, 4 nebo 5, b je v každé jednotce $-(\text{CH}_2)_b\text{O}-$ nezávisle vybráno z 2 a 3;

(B) je skupina obecného vzorce $-(\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d-\text{CO}-\text{N}(\text{R}^5)(\text{R}^6)$, kde c je celé číslo 2 nebo 3, d je celé číslo 1, 2 nebo 3, a R⁵ a R⁶ jsou nezávisle vybrány ze skupin obecného vzorce $-[(\text{CH}_2)_e\text{O}]_p-\text{R}^b$,

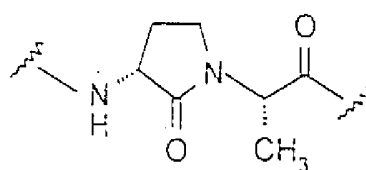
kde R^b je methylová skupina nebo ethylová skupina a p je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud p je 1, e je 2 nebo 3 a pokud p je 2, 3, 4 nebo 5, e je v každé jednotce $-(CH_2)_eO-$ nezávisle vybráno z 2 a 3; a

(C) je skupina obecného vzorce $-[(CH_2)_fO]_g-R^7$, kde R^7 je methylová skupina nebo ethylová skupina a g je celé číslo 1, 2, 3, 4 nebo 5; pokud g je 1, f je 2 nebo 3 a pokud g je 2, 3, 4 nebo 5, hodnota f v každé jednotce $(CH_2)_fO-$ je nezávisle 2 a 3;

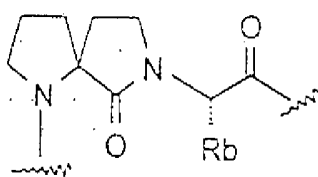
nebo AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^6 , AA^7 , a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, kde jeden nebo více ze zbytků AA^1 a AA^7 jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše, a AA^4 společně s AA^5 tvoří skupinu obecného vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va;



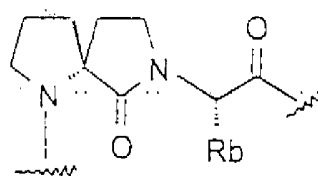
III



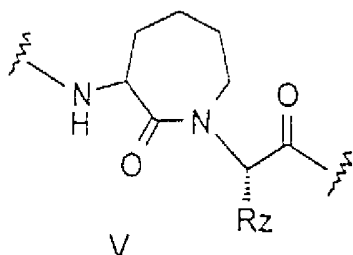
IIIa



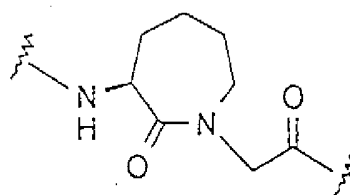
IV



IVa



V



Va

kde Ra, Rb a Rz jsou nezávisle vybrány ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, a A je atom kyslíku nebo methylenová skupina;

nebo AA¹, AA², AA³, AA⁴, AA⁵ a AA⁶ jsou zbytky L-aminokyselin, kde jedna nebo obě skupiny AA¹ a AA⁴ jsou vybrány ze zbytků L-aminokyselin obecného vzorce II, jak je definováno výše, a AA⁶ společně s AA⁷ tvoří skupinu obecného vzorce III, IIIa, IV, IVa, V nebo Va, jak je definováno výše;

a Q je hydroxylová skupina, aminoskupina, skupina NRcRd, kde Rc je vybráno ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, 2-karbamoylcyklopentylová skupina, 2-pyridylmethylová skupina, 4-karbamoylcyklohexylová skupina, 4-karbamoylcyklohexylmethylová skupina, 3-karbamoylfenylová skupina, 4-karbamoylfenylová skupina, 4-(karbamoylmethyl)-fenylová skupina, 4-(karboxymethyl)fenylová skupina, 2-morfolinoethylová skupina a skupina obecného vzorce -A¹-G¹, kde A¹ je alkylenová skupina obsahující 3 až 7 atomů uhlíku nebo

A¹ je vybráno ze

(1) skupin obecného vzorce -A²-B²-, kde A² je p-fenylenevá skupina nebo 1,4-cyklohexylenevá skupina a B² je alkylenová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku nebo A² je methylenová skupina a B² je p-fenylenevá skupina nebo 1,4-cyklohexylenevá skupina; a

(2) skupin obecného vzorce -A³-B³-C³-, kde A³ je methylenová skupina, B³ je p-fenylenevá skupina nebo 1,4-cyklohexylenevá skupina a C³ je alkylenová skupina obsahující 1 až 3 atomy uhlíku; a

G¹ je skupina obecného vzorce -N=C[N(Rp)₂]₂, kde každá skupina Rp je nezávisle vybrána ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku, methylová skupina, ethylová skupina a propylová skupina; a Rd

je atom vodíku nebo alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku; nebo Q je 1-piperazinylová skupina, 4-methyl-1-piperazinylová skupina, 4-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1-piperazinylová skupina, 4-amidino-1-piperazinylová skupina, 1-piperidylová skupina nebo 1-piperidylová skupina substituovaná v poloze 4, kde substituent v poloze 4 je vybrán ze skupiny, kterou tvoří karboxylová skupina, karbamoylová skupina, N-(2-aminoethyl)karbamoylová skupina a N-(4-aminobutyl)karbamoylová skupina; nebo Q je sekvence 1 až 6 aminokyselinových zbytků nebo jejich amid.

2. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle nároku 1, kterým je derivátem peptidu obecného vzorce $P-AA^1-AA^2-AA^3-II-AA^5-AA^6-AA^7-AA^8-Q$, kde AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^5 , AA^6 , AA^7 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, P a Q mají stejný význam, jako bylo definováno v nároku 1, a II je zbytek L-aminokyseliny obecného vzorce II, jak je definováno v nároku 1.

3. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle nároku 1, kterým je derivátem peptidu obecného vzorce $P-AA^1-AA^2-AA^3-IIIa-AA^5-II-AA^8-Q$, kde skupiny AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^5 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, P a Q mají stejný význam jako je uvedeno v nároku 1, II je zbytek L-aminokyseliny obecného vzorce II, jak je definováno v nároku 1, a IIIa je skupina obecného vzorce IIIa, jak je definováno v nároku 1.

4. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle nároku 1, kterým je derivátem peptidu obecného vzorce $P-AA^1-AA^2-AA^3-II-AA^5-IIIa-AA^8-Q$, kde skupiny AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^5 a AA^8 jsou zbytky L-aminokyselin, P a Q mají stejný význam, jako je definováno v nároku 1, II je zbytek L-aminokyseliny obecného vzorce II, jak je definováno v nároku 1, a IIIa je skupina obecného vzorce IIIa, jak je definováno v nároku 1.

5. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle nároku 1, kterým je derivátem peptidu obecného vzorce

P-II-AA²-AA³-AA⁴-AA⁵-IIIa-AA⁸-Q, kde AA², AA³, AA⁴, AA⁵ a AA⁸ jsou zbytky L-aminokyselin, P a Q mají stejný význam, jako je definováno v nároku 1, II je zbytek L-aminokyseliny obecného vzorce II, jak je definováno v nároku 1, a IIIa je skupina obecného vzorce IIIa, jak je definováno v nároku 1.

6. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, kde P je alifatická skupina, aromatická skupina nebo smíšená alifaticko/aromatická organická skupina obsahující 5 až 20 atomů uhlíku nebo heterocyklická nebo smíšená alifaticko/heterocyklická organická skupina obsahující 5 až 20 atomů uhlíku a 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané ze skupiny, kterou tvoří atom kyslíku, atom síry a atom dusíku.

7. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, kde ve zbytku L-aminokyseliny obecného vzorce II, n je 1 nebo 2, X je karbonylová skupina a R¹ a R² jsou obe stejné skupiny obecného vzorce (A) nebo obě stejné skupiny obecného vzorce PC), jak je definováno v nároku 1.

8. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podle nároku 7, kde R¹ a R² jsou obě skupina vzorce -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₃ nebo obě skupina -CH₂CON(CH₂CH₂OCH₃)₂ nebo jsou obě skupina -CH₂CON[(CH₂CH₂O)₃CH₃]₂.

9. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, kde AA¹ až AA⁸, pokud jsou přítomny, jsou vybrány za zbytků následujících aminokyselin:

AA¹ je vybráno z Ala, Ile, Tyr, Val, Glu, Lys, Arg, Gly, Gap, GapMe, a 3,3,3-trifluoralaninu;

AA² je vybráno z Ala, Lys, Glu, Sar, Val, Arg, Gly, Pro, Ile, Tic, 3,3,3-trifluoralaninu a N⁶-diethylLys;

AA³ je vybráno z Ala, His, Gln, Val, Thr, Glu, Gly, Asp, Asn a N³-diethylDap;

AA⁴ je vybráno z Ala, Lys, Asn, Arg, Thr, Glu, Sar, Gly, Pro, His a N⁶-diethylLys;

AA⁵ je vybráno z Thr, Val, Ala, Gly, Dap, Dab, Pro, Hyp, Asn, Ser, a N³-diethylDap;

AA⁶ je vybráno z Gly, Leu, Lys, Ala, Pro, Glu, Sar, His a Dap;

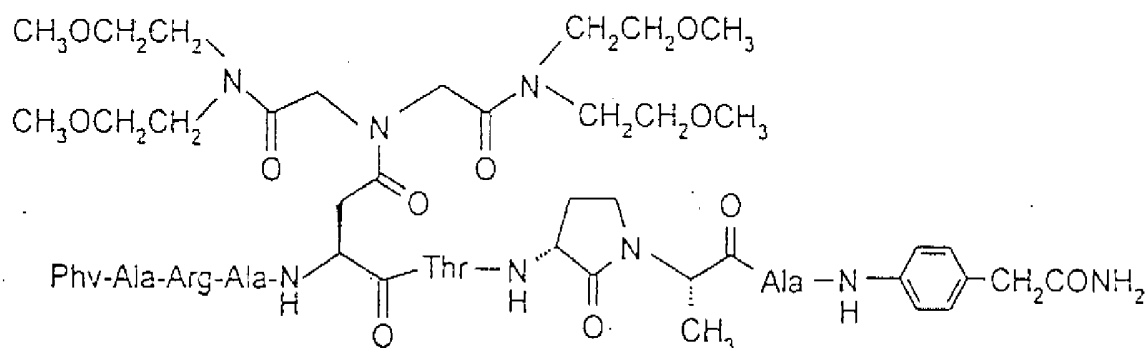
AA⁷ je vybráno z Pro, Ala, Lys, Arg, Glu, Sar, Gly, Oic a Dic;
a

AA⁸ je vybráno z Ala, Gly, Dap, azaalaninu a azaglycinu.

10. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, kde Q je vybráno ze skupiny, kterou tvoří 4-karbamoyl-1-piperidylová skupina a 4-(karbamoyl-methyl)anilinoskupina.

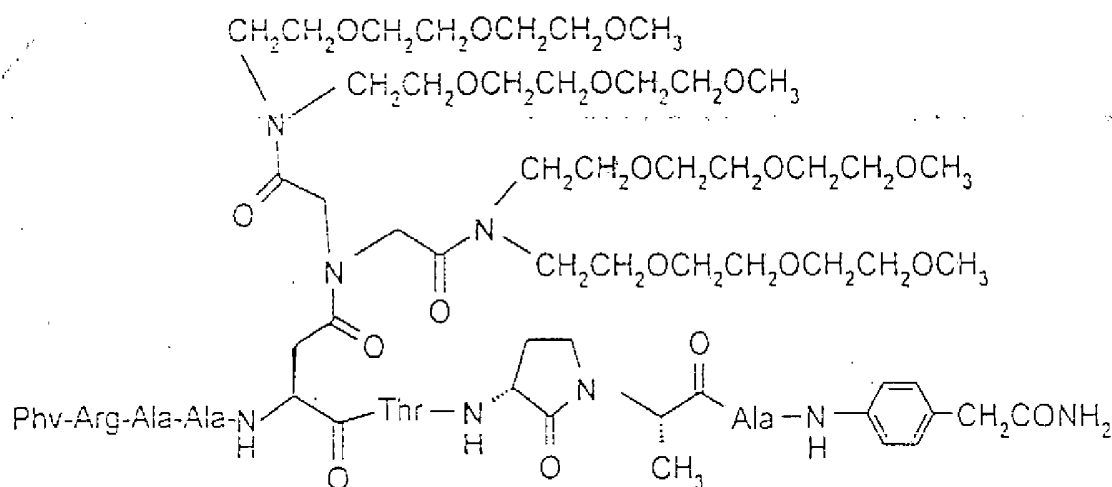
11. Derivát peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, kde hydrofobní skupinou P je 5-fenylvalerylová skupina.

12. Derivát peptidu podle nároku 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, kterým je sloučenina



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde Phv je 5-fenylvalerylová skupina.

13. Derivát peptidu podle nároku 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, kterým je sloučenina



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde Phv je 5-fenyl-valerylová skupina.

14. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje derivát peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl podle kteréhokoli z nároků 1 až 13, společně s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem.

15. Způsob přípravy derivátu peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle nároku 1 vyznačující se tím, že zahrnuje postupnou kondenzaci ve vhodném pořadí vhodně chráněných aminokyselin nebo sekvencí dvou nebo více vhodně chráněných aminokyselin, vhodně chráněné skupiny obecného vzorce H-II-OH, H-III-OH, H-IIIa-OH, H-IV-OH, H-IVa-OH, H-V-OH nebo H-Va-OH a popřípadě vhodně chráněné skupiny obecného vzorce H-Q, následovanou případnou úpravou funkční skupiny N-koncové aminoskupiny, zavedením hydrofobní skupiny P a odstraněním jakýchkoli zbývajících chránících skupin a jakéhokoli pevného nosiče.

16. Způsob léčby T-buňkami zprostředkovaného na MHC třídy II závislého autoimunního nebo zánětlivého onemocnění vyznačující se tím, že zahrnuje podávání účinného množství derivátu peptidu

obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle nároku 1 teplokrevným savcům v případě, že takovou léčbu potřebují.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se léčí revmatoidní arthritida a cystická fibróza.

18. Použití derivátu peptidu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle nároku 1 pro přípravu nových léčiv pro použití při léčbě T-buňkami zprostředkovaného na MHC třídy II závislého autoimunního nebo zánětlivého onemocnění.

19. Chráněná nebo nechráněná aminokyselina obecného vzorce II nebo její sůl, kde n , X , R^1 a R^2 mají stejný význam, jako je definováno v nároku 1.