

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 590

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000 - 1032

(22) Přihlášeno: 08.08.1994

(30) Právo přednosti:
09.08.1993 US 1993/104194

(40) Zveřejněno: 13.11.1996
(Věstník č. 11/1996)

(47) Uděleno: 19.12.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13.02.2002
(Věstník č. 2/2002)

(86) PCT číslo: PCT/US94/08875

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/04752

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 5/04	A 61 K 38/16
C 07 K 14/00	A 61 K 38/08
C 07 K 14/605	A 61 K 38/22
C 07 K 14/585	A 61 K 38/26
C 07 K 14/675	A 61 K 38/35
C 07 K 14/655	
C 07 K 14/695	
C 07 K 14/70	

(73) Majitel patentu:

BIOMEASURE, INC., Milford, MA, US;

(72) Původce vynálezu:

Kim Sun Hyuk, Chestnut Hill, MA, US;
Dong Zheng Xin, Framingham, MA, US;
Taylor John E., Upton, MA, US;
Moreau Sylviane, Upton, MA, US;
Keyes Susan Riley, Boston, MA, US;

(74) Zástupce:

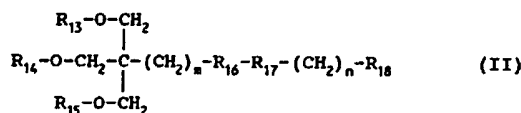
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název vynálezu:

**Somatostatinový nebo bombesinový derivát a
jejich použití**

(57) Anotace:

Jsou popsány peptidové deriváty, které obsahují jeden nebo více substituentů, obecného vzorce II, kde jednotlivé symboly mají specifický význam, které jsou odděleně napojeny amidovou, aminovou nebo sulfonamidovou vazbou na aminovou skupinu buď N-konce nebo postranního řetězce biologicky aktivní peptidové části. Tyto peptidové deriváty mají relativně zvýšenou biologickou aktivitu při srovnání s odpovídajícím samotným peptidem.



CZ 289590 B6

Somatostatinový nebo bombesinový derivát a jejich použití

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká terapeutických peptidových derivátů a způsobu jejich použití.

Dosavadní stav techniky

10

Byly dělány pokusy prodloužit aktivitu biologicky aktivních peptidů. Peptidy byly například modifikovány chemicky syntetickým přidáním cukerných skupin, aby se zvýšila doba, během níž jsou peptidy aktivní (Sandoz: spis WO 88/02 756, Sandoz: spis WO 89/09 786, DE patent 3 910 667 A1, evropská patentová přihláška EP číslo 0 374 089 A2 (1990) a Breipohl: US patent č. 4 861 755 (1989)). Pro zvýšení životnosti peptidu se používá také přidání kationtových zakončení (evropská patentová přihláška EP 0 363 589 A2 (1990)) a lipidních skupin (Whittaker: spis WO 91/09 837, Jung: US patent. č. 4 837 303 (1989)).

Podstata vynálezu

20

Obecně tento vynález poskytuje deriváty biologicky aktivních peptidů, které obsahují jeden nebo více substituentů odděleně navázaných na aminovou skupinu umístěnou na N-konci nebo na postranním řetězci peptidové skupiny. V této modifikované formě mají tyto deriváty vyšší a prodlouženější biologickou aktivitu při srovnání s odpovídajícími nemodifikovanými peptidy.

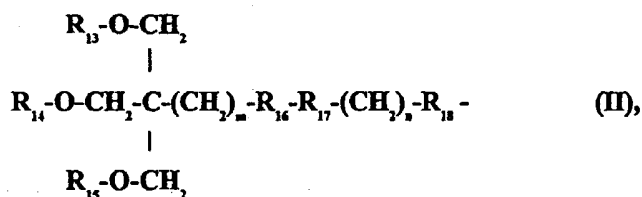
25

Peptidové deriváty jsou výhodné v tom, že nejsou drahé, jsou vysoce biokompatibilní, chybí jim škodlivé vedlejší účinky a jsou slučitelné s různými formami terapeutického podávání. Zvláště pak mnoha derivátů, které mají jako peptidovou část somatostatin, mají značně zlepšenou účinnost a selektivitu při srovnání s nemodifikovaným somatostatinem.

30

V jednom aspektu se tento vynález týká peptidového derivátu, který obsahuje biologicky aktivní peptidovou část a alespoň jeden substituent připojený na peptidovou skupinu, přičemž tento substituent je sloučenina obecného vzorce II

35



v němž

40

R_{13} , R_{14} a R_{15} nezávisle na sobě znamenají atom vodíku nebo acylovou skupinu se 2 až 24 atomy uhlíku,

R_{16} znamená skupinu NH nebo není přítomen,

45

R_{17} znamená skupinu CO, atom kyslíku nebo není přítomen,

– R_{18} – znamená skupinu CO, CH_2 , SO_2 nebo není přítomen,

m znamená číslo od 1 do 5 včetně, a

n znamená číslo od 1 do 5 včetně, a

5 ve sloučenině obecného vzorce II je peptidová část připojena ke každému substituentu vazbou CO-N, CH₂-N nebo SO₂-N mezi substituentem a atomem dusíku N-konce nebo postranního řetězce uvedené peptidové skupiny.

10 Ve výhodných provedeních R₂₃ znamená alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, R₂₂ znamená atom dusíku, atom uhlíku nebo skupinu CH a R₂₄ znamená atom uhlíku. Nebo R₂₂ znamená atom kyslíku, R₁₉, R₂₀, R₂₁ a R₂₃ nejsou přítomny a součet m + n znamená číslo 3, 4 nebo 5.

15 Substituentem může být také sloučenina obecného vzorce II, v tomto případě -R₁₈- znamená s výhodou skupinu CH₂ nebo skupinu SO₂, R₁₃, R₁₄ a R₁₅ znamenají atom vodíku a R₁₇ není přítomen. Ve zvláště výhodných provedeních substituent znamená skupinu (HOCH₂)₃C-NH-(CH)₂-SO₂ nebo skupinu (HOCH₂)₃C-CH₂.

20 Peptidová skupina je s výhodou vybrána ze skupiny sestávající ze somatostatinu, bombesinu, kalcitoninu, peptidu souvisejícího s kalcitoninovým genem (CRGP), amylinu, parathyroidního hormonu (PTH), peptidu uvolňujícího gastrin (GRP), hormonu stimulujícího melanocyty (MSH), adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu souvisejícího s příštítným tělískem (PTHrP), hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH), faktoru uvolňujícího růstový hormon (GHRF), peptidu uvolňujícího růstový hormon (GHRP), cholecystokininu (CCK), glukagonu, bradykininu, peptidu podobného glukagonu (GLP), gastrinu, enkefalinu, neuromedinů, endothelinu, látky P, neuropeptidu Y (NPY), peptidu YY (PYY), vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP), guanylinu, polypeptidu aktivujícího hypofýzovou adenylcyclázu (PACAP), beta-buněčného tropinu, adrenomedulinu a jejich derivátů, fragmentů a analogů.

30 Peptidová skupina s výhodou znamená somatostatin nebo jeho derivát, fragment nebo analog. Nejvýhodnějším somatostatinovým analogem je jedna z následujících sloučenin:

H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH₂,
H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂ a
H-D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂. Peptidovým zbytkem je s výhodou také bombesin nebo jeho derivát, fragment nebo analog.

35 V jiném aspektu tento vynález poskytuje dimerní peptidový derivát obsahující dvě biologicky aktivní peptidové skupiny a alespoň jeden substituent napojený na každou peptidovou skupinu.

40 Pojem „biologicky aktivní“ tak, jak se zde používá, znamená přirozeně se vyskytující, rekombinantní a syntetický peptid, který má fyziologickou nebo terapeutickou aktivitu. Obecně tento pojem zahrnuje všechny deriváty, fragmenty a analogy biologicky aktivních peptidů, které vykazují kvalitativně podobný nebo opačný účinek při srovnání s účinkem nemodifikovaného peptidu.

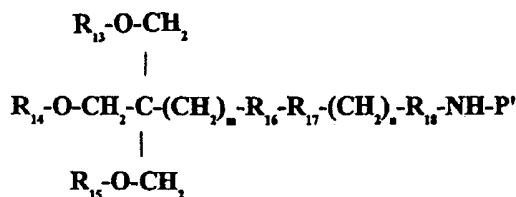
45 Obrázek 1 je graf dvou růstových křivek buněk AR42J v přítomnosti různých somatostatinových derivátů.

V další části tohoto spisu budou popsána výhodná provedení. Nejdříve budou popsány peptidové deriváty.

50 Peptidové deriváty podle vynálezu obecně obsahují dvě oddělené složky:

1) biologicky aktivní peptid a 2) alespoň jeden substituent, který má strukturu sloučeniny obecného vzorce II. Peptidové deriváty vyrobené podle způsobů zde popsaných zahrnují následující tři skupiny sloučenin:

Deriváty odvozené od sloučeniny obecného vzorce



- 5 v němž R_{13} , R_{14} , R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{18} , m , n a $NH-P'$ znamenají jak shora uvedeno.

Peptidové deriváty podle vynálezu jsou deriváty biologicky aktivních peptidů, které jsou vybrány ze skupiny sestávající ze somatostatinu, bombesinu, calcitoninu, peptidu souvisejícího s calcitoninovým genem (CRGP), amylinu, parathyroidního hormonu (PTH), peptidu uvolňujícího gastrin (GPR), hormonu stimulujícího melanocyty (MSH), adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu souvisejícího s příštitným tělískem (PTHrP), hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH), faktoru uvolňujícího růstový hormon (GHRF), peptidu uvolňujícího růstový hormon (GHRP), cholecystokininu (CCK), glukagonu, bradykininu, peptidu podobného glukagonu (GLP), gastrinu, enkefalinu, neuromedinů, endothelinu, látky P, neuropeptidu Y (NPY), peptidu YY (PYY), vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP), guanylinu, polypeptidu aktivujícího hypofýzovou adenylcyclázu (PACAP), betabuněčného tropinu, adrenomedulinu a jejich derivátů, fragmentů a analogů.

20 Ve zvláště výhodných provedeních peptidová skupina znamená somatostatin nebo derivát, fragment nebo analog somatostatinu. Mezi somatostatinové analogy, které se mohou používat podle tohoto vynálezu, patří, ale nejsou na ně omezena, následující sloučeniny:

H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂,
 25 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr,
 30 H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr,
 H-Gly-Pen-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr,
 H-Phe-Pen-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr,
 H-Phe-Pen-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr,
 H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol,
 35 H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Trp-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂,
 40 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-Phe-Lys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Asp-Thr-NH₂,
 Ac-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(Bu)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 45 Ac-D-hArg(Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-L-hArg(Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,

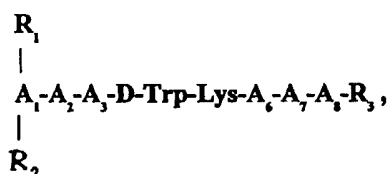
- Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt,
 Ac-L-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 5 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(Me)-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(Me)-Thr-Cys-Thr-NHEt,
 Ac-hArg(CH₃, hexyl)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-hArg(hexyl)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt,
 10 Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂,
 propionyl-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(iPr)-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-Nal-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Gly-hArg(Et)₂-NH₂,
 Ac-D-Lys(iPr)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CH₃)₂-D-hArg(CH₂CF₃)₂
 15 -Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-D-hArg(CH₂CF₃)₂
 -Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂,
 Ac-D-hArg(Et)₂-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-Cys-Lys-Asn-4-Cl-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Cys-NH₂,
 20 Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Phe-NH₂,
 Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Cl-Phe-NH₂,
 Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 25 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Nal-NH₂,
 H-pentafluor-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-Nal-Cys-pentafluor-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂,
 30 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂,
 Ac-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 35 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂,
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-N-Me-Phe),
 cyklo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe),
 40 cyklo(Pro-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-L-Trp-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-Trp(F)-Lys-Thr-Phe),
 45 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-p-Cl-Phe),
 cyklo(D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-D-Lys-Trp-D-Phe),
 cyklo(D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Phe),
 cyklo(D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-Lys-D-Trp-D-Phe),
 50 cyklo(D-Abu-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Phe),
 cyklo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe),
 cyklo(Pro-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe),
 cyklo(Pro-Phe-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe),
 cyklo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe),
 55 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba),

- cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-NH(CH₂)₄CO),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Ala),
 5 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Glu)-OH,
 cyklo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe),
 cyklo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly),
 cyklo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly),
 10 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp(NO₂)-Lys-Thr-Phe-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-Trp(Br)-Lys-Thr-Phe-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe(I)-Gaba),
 cyklo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr(But)-Gaba),
 15 cyklo(Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-OH,
 cyklo(Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-OH,
 cyklo(Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Tpo-Cys)-OH,
 cyklo(Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-MeLeu-Cys)-OH,
 cyclo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba),
 20 cyclo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Phe-Gaba),
 cyclo(Phe-Phe-D-Trp(5F)-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba),
 cyclo(Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys(Ac)-Thr-Phe-NH-(CH₂)₃CO),
 cyclo(Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba),
 cyclo(Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba) a
 25 cyclo(Orn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba),

- kde Lys^{*} znamená amidový můstek vytvořený mezi Lys^{*} a Asp. Peptidové sloučeniny, jejichž seznam je shora uveden, jsou popsány v následujících odkazech, které jsou zde zahrnuty jako citace: evropská patentová přihláška P5 164 EU, Van Binst G. a spol.: Peptide
 30 Research 5, 8 (1992), Horvath A. a spol.: Abstrakt „Conformations of Somatostatin Analogs Having Anti-Tumor Activity“, 22. evropské peptidové symposium, 13. až 19. září 1992, Interlaken, Švýcarsko, PCT přihláška WO 91/09056 (1991), evropská patentová přihláška EP 0 363 589 A2 (1990) a EP 0 203 031 A2 (1986), US patenty č. 4 904 642, 4 871 717, 4 853 371, č. 4 725 577, 4 684 620, 4 650 787, 4 603 120, 4 585 755, číslo 4 522 813, 4 486 415,
 35 4 485 101, 4 435 385, 4 395 403, číslo 4 369 179, 4 360 516, 4 358 439, 4 328 214, 4 316 890, číslo 4 310 518, 4 291 022, 4 238 481, 4 235 886, 4 224 190, číslo 4 211 693, 4 190 648, 4 146 612 a 4 133 782.

- Každý zbytek aminokyseliny shora uvedených somatostatinových analogů má strukturu
 40 obecného vzorce NH-C(R)H-CO-, v němž R znamená postranní řetězec. Čárky mezi zbytky aminokyselin představují peptidové vazby, které spojují aminokyseliny. Jestliže je zbytek aminokyseliny opticky aktivní, má L-konfiguraci, pokud není výslovně uvedena D-forma. Jestliže jsou v peptidu přítomny dva zbytky Cys, tvoří se mezi těmito zbytky disulfidový můstek. Tato vazba však není uváděna v seznamu zbytků.

- 45 Dalšími výhodnými somatostatinovými analogy podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce

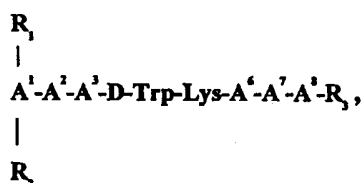


v němž A₁ znamená D- nebo L-formu -Nal, Trp, -pyridyl-Ala, Phe, substituovaného Phe nebo je vynechána a A₂ a A₇ nezávisle na sobě znamenají Cys, Asp nebo Lys. Tyto skupiny jsou navzájem kovalentně svázány disulfidovým můstkem nebo amidovým můstkem. Z dalších pak A₃ znamená -Nal, Phe nebo o-, m- nebo -substituovaný X-Phe, kde X znamená atom halogenu, skupinu OH, NH₂, NO₂ nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, A₆ znamená Val, Thr, Ser, Ala, Phe, -Nal, Abu, Ile, Nle nebo Nva a A₈ znamená Phe, Thr, Tyr, Trp, Ser, -Nal, alkoholovou skupinu nebo je vynechána, R₁ a R₂ nezávisle na sobě znamenají atom vodíku, nižší acylovou nebo nižší alkylovou skupinu a R₃ znamená skupinu OH nebo NH₂ nebo je vynechána. Jestliže buď A₂ nebo A₇ znamená Cys, potom s výhodou druhá skupina znamená také Cys, jestliže A₈ znamená α-aminoalkohol, potom R₃ je vynechána a jestliže ani A₂ ani A₇ neznámá Cys, potom A₂ znamená jinou skupinu než A₇.

Zvláště výhodnými somatostatinovými analogy podle tohoto provedení jsou:

- 15 Me-D-Phe-Cys-Tyr-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂,
 H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂,
 20 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol.

Ve výhodných provedeních mají lineární somatostatinové analogy podle vynálezu strukturu obecného vzorce



25 v němž

- A¹ znamená D- nebo L-izomer Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, -Nal, -pyridyl-Ala, Trp, Phe, 2,4-dichlor-Phe, pentafluor-Phe, p-X-Phe nebo o-X-Phe, kde X znamená CH₃, atom chloru, bromu nebo fluoru, skupinu OH, OCH₃ nebo NO₂,
 30 A² znamená Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, -Nal, pyridyl-Ala, Trp, 2,4-dichlor-Phe, pentafluor-Phe, o-X-Phe nebo p-X-Phe, kde X znamená skupinu CH₃, atom chloru, bromu nebo fluoru, skupinu OH, OCH₃ nebo NO₂,
 35 A³ znamená pyridyl-Ala, Trp, Phe, -Nal, 2,4-dichlor-Phe, pentafluor-Phe, o-X-Phe nebo p-X-Phe, kde X znamená skupinu CH₃, atom chloru, bromu nebo fluoru, skupinu OH, OCH₃ nebo NO₂,
 40 A⁶ znamená Val, Ala, Leu, Ile, Nle, Thr, Abu nebo Ser,
 A⁷ znamená Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, -Nal, pyridyl-Ala, Trp, 2,4-dichlor-Phe, pentafluor-Phe, o-X-Phe nebo p-X-Phe, kde X znamená skupinu CH₃, atom chloru, bromu nebo fluoru, skupinu OH, OCH₃ nebo NO₂,
 45 A⁸ znamená D- nebo L-izomer Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, Phe, -Nal, pyridyl-Ala, Trp, 2,4-dichlor-Phe, pentafluor-Phe, p-X-Phe nebo o-X-Phe,

kde X znamená skupinu CH₃, atom chloru, bromu nebo fluoru, skupinu OH, OCH₃ nebo NO₂, nebo jeho alkohol a

5 R₁ a R₂ nezávisle na sobě znamenají atom vodíku, nižší acylovou nebo nižší alkylovou skupinu a R₃ znamená skupinu OH nebo NH₂ nebo je vynechán. S výhodou buď A¹ nebo A⁸ a buď A² nebo A⁷ musí znamenat aromatickou aminokyselinu a jestliže A⁸ znamená alkohol, potom musí být R₃ vynechán. Dále A¹, A², A⁷ a A⁸ nemohou současně všechny znamenat aromatické aminokyseliny. Mezi zvláště výhodné analogy podle tohoto aspektu patří:

- 10 H-D-Phe-p-chlor-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-p-NO₂-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂,
 H-D-Nal-p-chlor-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂,
 H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂μ
 H-D-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂,
 15 H-D-Phe-p-chlor-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂ a
 H-D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-D-Nal-NH₂.

20 V ještě jiných výhodných provedeních peptidový zbytek znamená bombesin nebo derivát, fragment nebo analog bombesinu. Mez bombesinové analogy, které se mohou používat podle předloženého vynálezu, patří, ale nejsou na ně omezeny: neuromedin C, neuromedin B, litorin a peptid uvolňující gastrin (GRP), který mají následující sekvenci aminokyselin:

H-Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-
 His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.

25 Další bombesinové analogy, které se mohou používat v předloženém vynálezu, zahrnují sloučeniny, které jsou popsány v následujících odkazech, jejichž obsahy jsou zde uvedeny jako citace: Coy a spol.: Peptides, Proceedings of the 11th Amer. Peptide Symposium, Rivier a spol. (red.), ESCOM, str. 65 až 67 (1990), Wang a spol.: Journal Biol. Chemistry 265, 15695 (1990).
 30 Mahmoud a spol.: Cancer Research 51, 1798 (1991), Wang a spol.: Biochemistry 29, 616 (1990), Heimbrook a spol.: „Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems“, UCLA Symposium on Mol. and Cell. Biol. New Series, díl 86, Tam a Kaiser (red.), Martinez a spol.: J. Med. Chem. 28, 1874 (1985), Gargosky a spol.: Biochem. J. 247, 427 (1987), Dubreuil a spol.: Drug Design Delivery 2, 49, Harwood Academic Publishers, Anglie (1987), Heikkila a spol.:
 35 J. Biol. Chem. 262, 16456 (1987), Caranikas a spol.: J. Med. Chem. 25, 1313 (1982), Saeed a spol.: Peptides 10, 597 (1989), Rosell a spol.: Trends in Pharmacological Sciences 3, 211(1982), Lundberg a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1120 (1983), Engberg a spol.: Nature 293, 222 (1984), Mizrahi a spol.: Euro. J. Pharm. 82, 101 (1982), Leander a spol.: Nature 294, 467 (1981), Woll a spol.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 155, 359 (1988), Rivier a spol.:
 40 Biochem. 17, 1766 (1978), Cuttitta a spol.: Cancer Surveys 4, 707 (1985), Aumelas a spol.: Int. J. Peptide Res. 30, 596 (1987), Szepeshazi a spol.: Cancer Research 51, 5980 (1991), Jensen a spol.: Trends Pharmacol. Sci. 12, 13 (1991), US patenty číslo 5 028 692, 4 943 561, 4 207 311, 5 068 222, 5 081 107 a číslo 5 084 555, evropské patentové přihlášky EP č. 0 315 367 A2 (1989), 0 434 979 A1 (1991), 0 468 497 A2 (1992), 0 313 158 A2 (1989) a 0 339 193 A1 (1989),
 45 PCT přihlášky č. WO 90/01037 (1990) a 90/02545 (1992) a anglická přihláška GB 1 231 051 A (1990).

Peptidy podle vynálezu se mohou připravovat ve formě farmaceuticky přijatelných solí. Příklady výhodných solí jsou soli s terapeuticky přijatelnými organickými kyselinami, např. kyselinou
 50 octovou, mléčnou, maleinovou, citronovou, jablečnou, askorbovou, jantarovou, benzoovou, salicylovou, methansulfonovou, toluensulfonovou nebo pamovou, a také s polymerními kyselinami, jako je tanin nebo karboxymethylcelulóza, a soli s anorganickými kyselinami, jako jsou halogenovodíkové kyseliny včetně kyseliny chlorovodíkové, kyselina sírová a kyselina fosforečná.

55

V další části tohoto spisu je popsána syntéza sloučenin obecného vzorce II. Při popisu syntéz sloučenin podle předloženého vynálezu se používají následující zkratky:

- 5 Nal znamená naftylalanin (1 nebo 2),
 Abu znamená α -aminomáselná kyselina,
 D znamená pravotočivá,
 L znamená levotočivá,
 HOAc znamená kyselina octová,
 BOP znamená
 10 benzotriazol-1-yloxytri(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfát,
 BOC znamená terc. butyloxykarbonylová skupina,
 DCC znamená dicyklohexylkarbodiimid,
 EDC znamená 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid,
 DEPC znamená diethylkyanofosfonát,
 15 DMF znamená dimethylformamid,
 CH_2Cl_2 znamená dichlormethan,
 MeOH znamená methanol,
 EtOH znamená ethanol
 DIEA znamená N,N-diizopropylethylamin,
 20 HOBT znamená 1-hydroxybenzotriazol,
 HBTU znamená
 O-benzotriazol-1-yl, N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorofosfát a
 TFA znamená trifluoroctová kyselina.
- 25 Výchozí materiály a meziprodukty pro sloučeniny obecného vzorce II jsou komerčně dostupné. Výchozí materiály se mohou také snadno připravovat způsoby, které jsou dobře známy odborníkům a jsou obsaženy v odborné literatuře. Například chemii derivátů souvisejících s kyselinou askorbovou je možno nalézt v J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1220 (1974), Carbohyd. Res. 67, 127 (1978), Yakugaku Zasshi 86, 376 (1966), US patentu č. 4 552 888,
 30 J. Med. Chem. 31, 793 (1988), 34, 2152 (1992) a 35, 1618 (1992), jejichž obsahy jsou zde zahrnuty jako odkazy. Chemii derivátů souvisejících s tris lze nalézt v Arch. Biochem. Biophys. 96, 653 (1962) a Biochem. 5, 467 (1966), jejichž obsahy jsou zde také zahrnuty jako odkazy.
- 35 V obecném smyslu lze kondenzaci sloučenin obecného vzorce II na příslušné volné skupiny chráněných aminokyselin nebo peptidů provádět podle dobře známých způsobů používaných při syntéze peptidů (např. DCC, DCC-HOBT, DIC-HOBT PPA, EDC-HOBT, DEPT, BOP, HBTU) s použitím báze (např. DIEA) v inertním rozpouštědle (např. DMF, THF, dichlormethanu, ethylacetátu nebo v jejich kombinacích). Odstranění chránicích skupin se také může provádět dobře známými způsoby (např. odstraněním skupiny přidáním kyseliny nebo báze,
 40 TFA, dioxanu s HCl, amoniaku, methoxidu sodného piperidinu). Ve většině případů by se reakční teplota měla pohybovat v rozmezí od -30°C do teploty místnosti. První stupeň syntézy obecně zahrnuje reakci mezi epoxidem a volnou aminovou skupinou chráněné aminokyseliny nebo peptidu. Komplexace a odstranění chránicích skupin se dosáhne dobře známými způsoby, jako jsou ty, které popsal McManus a spol.: Synth. Communications 3, 177 (1973), jejichž
 45 obsahy jsou zde zahrnuty jako odkazy. Následující syntézy, čištění meziproduktů a produktů se mohou provádět konvenčními způsoby, jako je chromatografie nebo HPLC. Sloučeniny se identifikují konvenčními technikami, jako je NMR, aminokyselinová analýza a hmotnostní spektrometrie.
- 50 Následující příklady ilustrují výhodné způsoby přípravy sloučenin podle vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

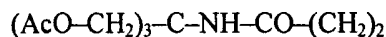


10 Roztok diterc.butyldikarbonátu (0,36 g) v 10 ml DMF se přikape k roztoku acetátu D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂ (2 g, BIM-23014) ve 45 ml DMF. Po 2 h za teploty místnosti se rozpouštědlo za sníženého tlaku odstraní. Získá se tak odparek, který se zchromatografuje na silikagelu (150 g), eluce směsí chloroformu s methanolem v poměru 9:1. Příslušné frakce se spojí a rozpouštědlo se za sníženého tlaku odstraní. Získá se odparek, který obsahuje

15 D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys(BOC)-Val-Cys]-Thr-NH₂ (1,45 g). TLC (silikagel, chloroform s methanolem v poměru 3:1): R_f = 0,52.

Příklad 2,1

20



25 0,03 ml DIEA se přidá k ledem ochlazenému roztoku diacetátu 2-N-(sukcinyl)amino-2-(acetoxymethyl)-1,3-propandiolu (83 mg) a HBTU (92 mg) ve 2 ml DMF. Po 30 minutách míchání při 0 až 5 °C se přidá roztok D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys(BOC)-Val-Cys]-Thr-NH₂ (100 mg) ve 2 ml DMF obsahující 0,03 ml DIEA. Směs se nejdříve míchá 1 h při 0 až 5 °C, potom přes noc za teploty místnosti. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Získá se tak suchý odparek, který se roztřepe mezi ethylacetát a vodný nasycený NaCl, ethylacetátová vrstva se promyje vodným 5% (hmotn.) roztokem hydrogenuhlčitanu sodného a nakonec vodným nasyceným NaCl. Výsledný roztok se vysuší síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se za sníženého tlaku odpaří. Zůstane odparek, který obsahuje (AcO-CH₂)₃-C-NH-CO-(CH₂)₂

35 -CO-D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys(BOC)-Val-Cys]-Thr-NH₂ (0,14 g). TLC (silikagel, eluce směsí chloroformu s MeOH a AcOH v poměru 4:1:0,1): R_f = 0,82.

Příklad 2,2 Odstranění skupiny BOC

40

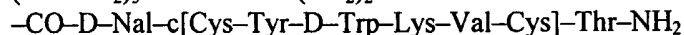
30 mg shora uvedené sloučeniny se nechá 45 minut reagovat s 50% (hmotn.) TFA v chloroformu za teploty místnosti. Těkavé sloučeniny se za sníženého tlaku odstraní. Získá se tak odparek. Stopy TFA se několikrát odpaří společně s ethanolem. Odparek se trituruje etherem a potom se vysuší. Získá se tak 30 mg produktu. TLC (silikagel, eluce chloroform s MeOH a AcOH v poměru 3:1:1): R_f = 0,24.

45

Příklad 2,3 Jiná provedení

50

Podobným způsobem se syntetizují také následující somatostatinové deriváty:



BIM-23158

55

(HO-CH₂)₃-C-NH-CO-(CH₂)₂
 -CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-NH₂
 BIM-23167

5 (HO-CH₂)₃-C-NH-CO-(CH₂)₂
 -CO-D-Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH₂
 BIM-23173

10 (HO-CH₂)₃-C-NH-CH₂-CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂
 BIM-23179

(HO-CH₂)₃-C-NH-CH₂
 -CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH₂
 BIM-23182

15

Příklad 3

Syntéza BI-23201

20

Podle tohoto vynálezu se syntetizuje následující somatostatinový derivát, který je označován také jako BIM-23201:

25 (HO-CH₂)₃-C-CH₂-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂.

Příklad 3,1

30 (HO-CH₂)₃-C-CH₂-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂

Po dávkách se přidají 2 g molekulového síta (0,3 nm) a NaCNBH₃ (36 mg) během 15 min k roztoku

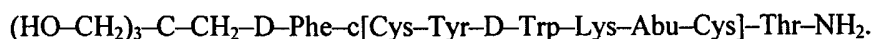
35 D-Phe-c[Cys-Tyr(OBt)-D-Trp-Lys(BOC)-Thr(OBt)-Cys]-Nal-NH₂ (250 mg) a tris(acetoxymethyl)acetaldehydu (120 mg) získaného oxidací triacetyl-pentaerythritolu pyridiniumdichromátem nebo směsí DMSO/oxalylchlorid/ triethylamin) v methanolu (10 ml) obsahujícím 10 % (hmotn.) kyseliny octové. Směs se pak míchá 30 minut za teploty místnosti a zahřívá se 4 h. Po filtraci se zbytek roztřepe mezi ethylacetát a vodu. Ethylacetátová vrstva se promyje vodou, potom vodným hydrogenuhličitánem sodným a vysuší se síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se
 40 za sníženého tlaku odpaří. Získá se odparek (0,4 g), který se rozpustí v methanolu (5 ml), nechá se zreagovat s roztokem NaOMe v MeOH (pH 10), míchá se 1 h a nakonec se zneutralizuje 1N HCl na pH 5 až 6. Po odpaření rozpouštědla se odparek rozpustí v 90% (hmotn.) vodné TFA a směs se míchá 30 minut. Těkavé podíly se za sníženého tlaku odstraní. Stopy TFA a vody ve výsledném odparku se odstraní společným odpařováním s ethanolem (dvakrát). Odparek se
 45 vysuší, ztitruje se etherem a nakonec se vyčistí HPLC za podobných podmínek jak shora popsáno. Získá se 41 mg (HO-CH₂)₃-C-CH₂

-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂ jako bezbarvá pevná látka. Hmotnostní spektrum (m/e): 1262,8.

50

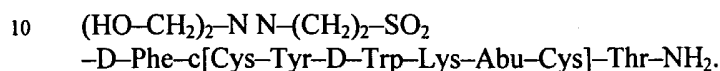
Příklad 3,2 Jiná provedení

55 Podobným způsobem se syntetizuje následující somatostatinový derivát, který je označován také jako BIM-23195:



5 Příklad 4 Syntéza BIM-23197

Podle tohoto vynálezu se syntetizuje následující somatostatinový derivát, který je označován také jako BIM-23197:



Příklad 4,1

15

2-Bromethansulfonylchlorid

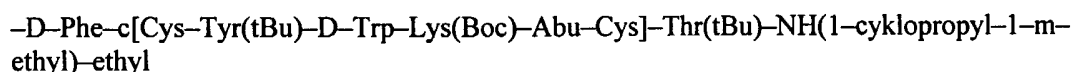
2-Bromethansulfonát sodný (4,0 g) se nechá reagovat s PCl_5 (11,8 g) za chlazení v ledové lázni. Po získání kapalně fáze se roztok zahřívá 1,5 h v oleji na 90 až 120 °C, ochladí se na teplotu místnosti, vlije se do 50 g rozdrobeného ledu a pak se míchá 15 minut. Směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 20 ml) a spojené extrakty se promyjí vodou (2 x), 5% (hmotn.) hydrogen-
 20 uhličitánem sodným (2 x) a opět vodou (2 x). Vysušením nad bezvodým síranem hořečnatým a destilací za sníženého tlaku se získá 2-bromethansulfonylchlorid jako bezbarvá kapalina (1,95 g, 42 až 44 °C/133 Pa).

25

Příklad 4,2



30



Roztok 2-bromethansulfonylchloridu (30 mg) v DMF (1 ml) se přikape k roztoku

35

H-D-Phe-c[Cys-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Boc)-Abu-Cys]-Thr(tBu)-(1-cyklopropyl-1-methyl)-
 ethylu (150 mg) a DIEA (55 mg) v DMF (2 ml) pod dusíkem při 0 °C. Reakční směs se míchá
 3 h při 0 až 5 °C, rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, odparek se rozpustí v ethylacetátu
 a promyje se 5% (hmotn.) kyselinou citronovou (2 x), 5% (hmotn.) hydrogenuhličitanu sodným
 40 (2 x) a solným roztokem (2 x). Roztok se pak vysuší nad bezvodým síranem hořečnatým, zfiltruje
 a za sníženého tlaku se zahustí dosucha. Produkt se dále přečistí na krátké koloně silikagelu,
 eluce ethylacetátem. Frakce, které obsahují produkt, se spojí a rozpouštědlo se za sníženého tlaku
 odstraní. Získá se tak 105 mg $\text{Br}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_2$

45

-D-Phe-c[Cys-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Boc)-Abu-Cys]-Thr(tBu)-NH(1-cyklopropyl-1-methyl)-ethylu jako světle žlutá pevná látka. TLC (silikagel, chloroform/MeOH/HOAc v poměru 9:1:0,1): $R_f = 0,36$.

50 Příklad 6 Vazebné testy

Pro demonstrování vazebné afinity somatostatinových (SRIF) analogů na somatostatinový receptor se shora popsané vyčištěné sloučeniny testují v testu navázání somatostatinu zahrnujícím měření in vitro inhibice navázání $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{11}]\text{SRIF-14}$ na krysí AR42J pankreasové membrány.
 55 Jak je uvedeno v tabulce I, vyčištěné somatostatinové analogy podle tohoto vynálezu vykazují

- vysoké vazebné afinity na tyto receptory. V tabulce je pro každý somatostatinový derivát uvedena molekulová hmotnost, stanovená hmotnostní spektrometrií a vypočtená z molekulární struktury. Podobně byl v testu navázání bombesinu testován vyčištěný shora popsáný bombesinový analog. Test navázání spočíval v měření in vitro inhibice navázání [125I-Tyr¹¹]bombesinu na kryší AR42J pankreasové membrány. V tomto testu byla stanovena vazebná afinita bombesinového analogu na GRP receptor kolem 21 nM.

Příklad 7 Test inhibice růstového hormonu (GH)

- Skupině 5 kryších samců Sprague Dawley (každý o hmotnosti mezi 250 a 300 g) byl injekčně s.c. podán somatostatinový derivát nebo solný roztok. Třicet minut před zvolenou dobou po podání léčivého přípravku uvedené v tabulce II (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) byly krysy anestetizovány Nembutalem (i.p., 50 mg/kg). 15 minut po anestezii byl odebrán podíl krve kardiálním vpichem přes heparin, aby se změřil základní GH. Dále byla podána s.c. injekce D-Ala²-GRF (10 µg/kg). Po 15 minutách byla odebrána krev, aby byl kvantitativně stanoven stimulovaný GH, který se měří v plazmě radioimunoanalytickým testem dodaným NIADDKD. Ze získaných rozdílů mezi základní a stimulovanou hodnotou GH se vypočte inhibice GH. Tabulka II ukazuje účinek různých vyčištěných somatostatinových analogů jako funkci času. Účinnost D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH₂ (BIM-23060) na inhibování růstového hormonu u kryš je srovnána s jinými somatostatinovými deriváty (BIM-23167, BIM-23179 a BIM-23181) podle výsledku. Všechny deriváty vykazují překvapující prodloužené trvání působení, které klesá v závislosti na času.
- Pro stanovení ED₅₀ (tj. koncentrace každé sloučeniny potřebné pro inhibování 50 % uvolněného růstového hormonu po příslušné době) příslušné sloučeniny byly provedeny další pokusy se somatostatinovým analogem D-Phe-c[Cys-Tyr-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH₂ a s BIM-23190, BIM-23195 a BIM-23197. Pokusy byly prováděny v dávkovém rozmezí mezi 25 µg/kg a 0,25 µg/kg. Tabulka III ukazuje překvapující zlepšení somatostatinových derivátů proti nemodifikovanému peptidu v různých časových intervalech, což ukazuje na to, že inhibice uvolnění stimulovaného GH sloučeninami podle výsledku závisí na čase.

Příklad 8 Antiproliferační test

- Shora popsané vyčištěné somatostatinové analogy byly testovány také na aktivitu proti rychle proliferujícím buňkám. Tabulka IV popisuje účinek těchto peptidů na růst AR42J nádorových buněk kryšího pankreasu. Na rozdíl od přírodního somatostatinu vykazují deriváty podle výsledku podstatnou anti-proliferační aktivitu. Na obrázku 1 je vidět, že jak BIM-23041C (somatostatinový analog) tak BIM-23118 (derivát sloučeniny BIM-23014) inhibují růst AR42J nádorových buněk kryšího pankreasu v závislosti na koncentraci, přičemž BIM-23118 je z těchto dvou sloučenin aktivnější. Obě sloučeniny inhibují růst nádorových buněk ve větším rozsahu než nemodifikované somatostatinové analogy v ekvivalentních koncentracích.

Příklad 9 Test příjmu thymidinu

- V tomto testu se zásobní kultury švýcarských 3T3 buněk pěstují v Dulbeccem modifikovaném Eaglesově médiu (DMEM) doplněném 10 % plodového telecího séra ve vlhké atmosféře s 10 % hmotn. CO₂ a 90 % hmotn. vzduchu při 37 °C. Buňky se pak vysejí do klastrových misek s 24 jamkami a použijí se 4 dny po poslední změně média. Aby se buňky zachovaly ve fázi G1/G0 buněčného cyklu, DMEM médium bez séra se použije 24 h před testem příjmu thymidinu. Buňky se pak dvakrát promyjí 1 ml podíly DMEM (bez séra, 0,5 µM) a [methyl-³H]thymidinu (20 Ci/mmol, New England Nuclear). Bombesinové deriváty se nejdříve testují při koncentraci 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 a 100 nM. Po 28 h při 37 °C se testuje inkorporace [methyl-

³H]thymidinu v podílech nerozpustných v kyselině. Buňky se nejdříve dvakrát promyjí ledem ochlazeným 0,9% NaCl (1ml podíly). Radioaktivita rozpustná v kyselině se pak odstraní 30 minutovou inkubací při 40 °C s 5% (hmotn.) trichloroctovou kyselinou (TCA). Kultury se pak jednou promyjí (1 ml) 95 % (hmotn.) ethanolem a solubilizují se 30 minutovou inkubací s 1 ml 0,1N NaOH. Solubilizovaný materiál se přenesení do baněk obsahujících 10 ml ScintA (Packard). Radioaktivita se stanoví kapalinovou scintilační spektrometrií. Tento test ukazuje schopnost bombesinových derivátů stimulovat příjem thymidinu do buněk. Vypočtená EC₅₀ byla 0,48 nM, což ukazuje, že bombesinové deriváty podle vynálezu jsou účinnými stimulatory příjmu thymidinu.

Peptidové deriváty podle vynálezu se mohou podávat savcům, zvláště člověku, jedním z tradičních způsobů podávání (např. orálně, parenterálně, transdermálně nebo transmukozálně), v prostředcích s trvalým uvolňováním použitím biodegradovatelného a bioslučitelného polymeru nebo místním podáváním (např. v případě protirakovinových bombesinových nebo somatostatini-
 15 statinových derivátů do plic) pomocí micel, gelů nebo liposomů. Dávkování je obvykle stejné jako běžně používané dávkování u terapeutických peptidů u lidí.

Peptidové deriváty podle vynálezu jsou vhodné také pro zlepšené léčení těch onemocnění, která jsou citlivá na léčení odpovídajícím nemodifikovaným peptidem. Zvláště shora popsané somatostatini-
 20 statinové deriváty jsou vhodné pro léčení rakoviny, akromegalie, pankreatitidy, proliferace způsobené úrazem, diabetes, diabetické retinopatie, restenózy po angioplastii, AIDSu, neurogenního zánětu, artritidy a gastrointestinálních problémů včetně diarey.

25 Tabulka I

In vitro vazebné afinity a molekulové hmotnosti somatostatini-
 20 statinových peptidových derivátů

	MW _{TEST}	MW _{VYP}	IC ₅₀ (nM)
SRIF-14	—	—	0,17
SRIF-28	—	—	0,23
BIM-23107	1340,4	1340,40	0,30
BIM-23118	1313,5	1313,52	0,30
BIM-23135	1426,2	1426,64	2,52
BIM-23158	1299,6	1299,54	0,33
BIM-23167	1347,6	1347,55	0,09
BIM-23173	1235,5	1235,46	0,11
BIM-23179	1305,9	1305,55	0,12
BIM-23181	1435,0	1434,62	0,25
BIM-23182	1193,8	1193,42	0,12
BIM-23183	1323,0	1322,49	0,22
BIM-23190	1202,8	1202,47	0,20
BIM-23191	1314,9	1314,61	0,08
BIM-23195	1150,8	1150,39	0,08
BIM-23196	1243,7	1243,50	0,09
BIM-23197	1252,7	1252,55	0,29
BIM-23201	1262,8	1262,53	0,14
BIM-23202	1247,0	1246,53	0,18

Tabulka II

5 Inhibice uvolňování stimulovaného růstového hormonu u krys somatostatinovými peptidovými deriváty

	Inhibice v % ke kontrole při dávce 25 µg/kg:			
	2 h	4 h	6 h	8 h
BIM-23060	86,39	64,96	47,62	38,15
BIM-23167	92,67	79,54	59,72	50,14
BIM-23179	92,79	63,85	67,78	68,26
BIM-23181	99,24	77,07	60,56	56,12

Tabulka III

10

Inhibice uvolňování stimulovaného růstového hormonu u krys somatostatinovými peptidovými deriváty podávanými s.c.

	ED ₅₀ (µg/kg)			
	2 h	4 h	6 h	8 h
BIM-23023	0,48	1,11	2,26	4,32
BIM-23190	0,68	0,57	0,76	1,04
BIM-23195	1,19	3,13	2,08	3,23
BIM-23197	1,01	0,59	1,14	1,59

15

Tabulka IV

Antiproliferační aktivita somatostatinových peptidových derivátů

růst buněk (procenta ke kontrole) ¹	
SRIF-14	91,3
SROF-18	98,0
BIM-23014C	74,1
BIM-23107	67,5
BIM-23109	72,1
BIM-23118	61,0
BIM-23135	62,9
BIM-23167	60,2
BIM-23173	67,9
BIM-23181	69,1
BIM-23182	68,7
BIM-23183	69,1
BIM-23195	69,2
BIM-23197	66,4

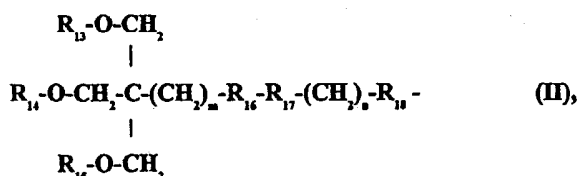
20

¹ Koncentrace 100 nM, nádorové buňky AR42J krysího pankreatu po 8 dnech.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Somatostatinový nebo bombesinový derivát, který obsahuje jeho biologicky aktivní peptidový podíl a alespoň jeden substituent připojený na peptidový podíl, přičemž tímto substituentem je sloučenina obecného vzorce II



10

v němž

R_{13} , R_{14} a R_{15} nezávisle na sobě znamenají atom vodíku nebo acylovou skupinu se 2 až 24 atomy uhlíku,

15

R_{16} znamená skupinu NH nebo není přítomen,

R_{17} znamená skupinu CO, atom kyslíku nebo není přítomen,

20

$-R_{18}-$ znamená skupinu CO, CH_2 , SO_2 nebo není přítomen,

m znamená číslo od 1 do 5 včetně a

n znamená číslo od 1 do 5 včetně

25

přičemž peptidový podíl je připojen ke každému substituentu vazbou CO-N, CH_2 -N nebo SO_2 -N mezi tímto substituentem a atomem dusíku N-konce nebo postranního řetězce uvedeného peptidového podílu.

30

2. Somatostatinový nebo bombesinový derivát podle nároku 1, v němž $-R_{18}-$ znamená skupinu CH_2 nebo SO_2 .

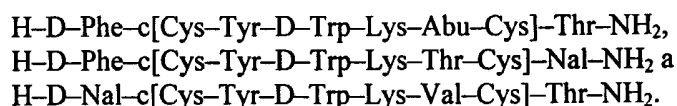
3. Somatostatinový nebo bombesinový derivát podle nároku 1, v němž R_{13} , R_{14} a R_{15} znamenají atom vodíku a R_{17} není přítomen.

35

4. Derivát podle nároku 1, v němž peptidový podíl znamená somatostatin nebo jeho derivát, fragment nebo analog.

5. Derivát podle nároku 1, v němž somatostatinový analog znamená jednu z následujících sloučenin:

40



45

6. Derivát podle nároku 1, v němž peptidový podíl znamená bombesin nebo jeho derivát, fragment nebo analog.

7. Použití somatostatinového derivátu podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění pacienta.

5 8. Použití bombesinového derivátu podle nároku 1, pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění pacienta.

9. Použití somatostatinových nebo bombesinových derivátů podle nároku 7 nebo 8, kde onemocněním je rakovina.

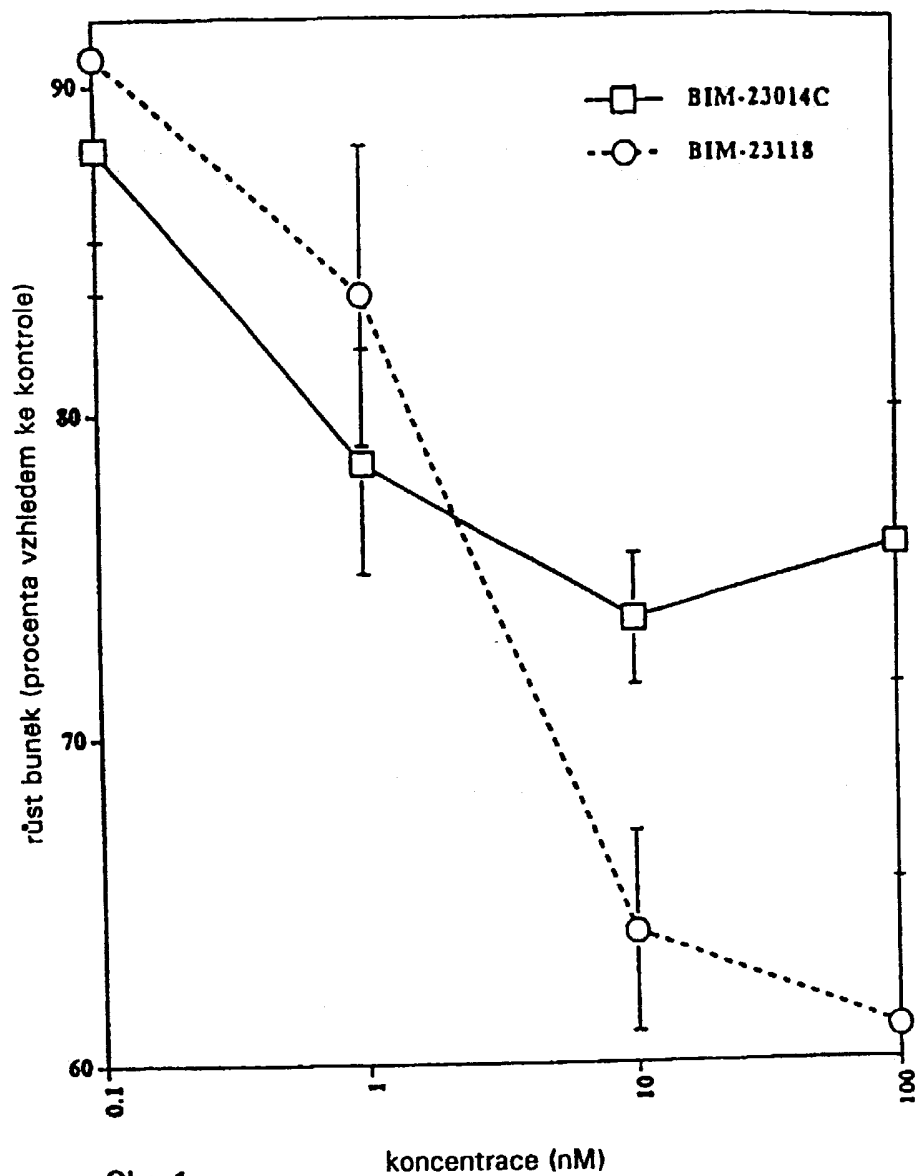
10 10. Somatostatinový derivát podle nároku 1 pro použití jako léčiva pro léčení rakoviny.

11. Bombesinový derivát podle nároku 1 pro použití jako léčiva pro léčení rakoviny.

15

1 výkres

Vliv somatostatinových analog na proliferaci
AR42J kryších pankreatických nádorových buněk



Obr. 1

Konec dokumentu
