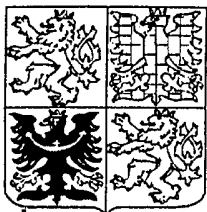


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 20.12.91
(32) 23.10.89
(31) 89/425906
(33) US
(40) 16.06.93

(21) 3979-91.N

(13) A3

(51) Int. Cl.⁵:

C 07 K 5/12

- (71) SmithKline Beecham Corporation, Philadelphia, Pennsylvania, US;
- (72) Ali Fadia El-Fehail, Philadelphia, Pennsylvania, US;
Samanen James Martin, Philadelphia, Pennsylvania, US;
- (54) Cyklické protiagregační peptidy
- (57) Cyklické protiagregační peptidy, které jsou schopné inhibovat shlukování krevních destiček. Řešení se rovněž týká farmaceutických prostředků, které tyto látky obsahují. Výsledné cyklické protiagregační peptidy jsou zvláště vhodné pro použití v kombinaci s fibrinolytickými látkami při uzávěrech tepen a thromboze hlubokých žil k obnovení nebo alespoň zlepšení krevního oběhu v postižené oblasti.

Cyklické protiagregační peptidy

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	03 VI 92	030213
----------------------------------	----------	--------

Oblast techniky

Vynález se týká nových peptidů, které inhibují agregaci destiček, farmaceutických prostředků s jejich obsahem a metod pro použití těchto peptidů. Zvláštní pozornost je věnována metodě, využívající kombinaci vynalezených peptidů s fibrinolytickými látkami.

Dosavadní stav techniky

Vzniku krevní sraženiny předchází složitý proces. Sraženina se skládá ze shluku krevních destiček propojených polymerní fibrinovou sítí. Proces srážení normálně začíná po poranění tkáně a má za následek zpomalení nebo zastavení průtoku krve cévou. Další faktory s odlišnou etiologií, jako je aterosklerotická plaka, zánět cév /flebitida/ a septikemie, mohou také iniciovat tvorbu sraženiny. V některých případech je nevhodný vznik sraženiny a následující omezení průtoku krve příčinou mozkové mrtvice, plicní embolie nebo poruchy srdeční činnosti.

Krevní destičky mají klíčovou úlohu v tvorbě sraženiny. V současné době se v antitrombotické léčbě používají látky, které ovlivňují arachidonát - prostaglandinový systém z destiček a endoteliálních buněk, jako jsou např. analogy prostacyklinu, inhibitory cyclooxygenázy, inhibitory syntézy tromboxanu a antagonisté tromboxanového receptoru. Dále se používají látky s protisrážlivým účinkem, jako je heparin. Všechny tyto látky inhibují jednu nebo obě rozeznatelné fáze agregace destiček. V prvotní fázi, která je odpovědí na chemické podněty, jako je adenosin difosfát /ADP/, kolagen, noradrenalin nebo trombin, je zahájena aktivace destiček. V následující druhotné fázi, která je spuštěna samotnými destičkami, se syntetizuje tromboxan A_2 /Tx A_2 / a uvolňuje se další ADP ze zásobních granulí destiček, což dále aktivuje destičky.

Prostacyklin, který se také nazývá prostaglandin I_2 / PGI_2 /, a stabilní analogy PGI_2 inhibují jak primární, tak sekundární fázi agregace destiček. Podávání těchto analogů bylo však provázeno nežádoucími změnami krevního tlaku. Viz Aiken a další, Prostaglandins 19, 629, 1980.

Inhibitory cyklooxygenázy a tromboxan syntetázy blokují vznik TxA_2 . Antagonisté TxA_2 blokují účinky TxA_2 tím, že se váží na receptor pro TxA_2 . Tyto způsoby léčby účinkují jenom na druhotnou fázi aktivace destiček. Použití inhibitorů cyklooxygenázy bylo provázeno ulcerogenezí a potlačením syntézy prostaglandinu.

Heparin brání aktivaci fibrinogenu trombinem, čímž je znemožněna aktivace receptoru GPIIb - IIIa trombinem. Takto je inhibována jen prvotní fáze agregace destiček, zatímco aktivace destiček jinými způsoby, jako např. kolagenem, ADP a noradrenalinem, je ovlivněna málo.

Inhibitory cyklooxygenázy, analogy prostaglandinů a heparin inhibují agregaci destiček nepřímo, tím že inhibují prvotní nebo druhotnou fázi aktivace destiček a fibrinogenu. Vystává tedy potřeba selektivních terapeutických prostředků, které by blokovaly agregaci destiček přímo, bez ohledu na to, zda se jedná o prvotní nebo druhotnou fázi aktivace destiček.

Agregace destiček je zřejmě hlavně zprostředkována GPIIb-IIIa receptorovým komplexem destiček. Von Willebrandův faktor, což je plasmatický protein, spolu s fibrinogenem se váže na GPIIb - IIIa receptory, vytváří příčné vazby mezi přilehlými destičkami a tím ovlivňuje agregaci destiček. Dalšími bílkovinami, které se váží na GPIIb-IIIa jsou fibronektin, vitronektin a trombospondin. Fibronektin se nachází v plasmě a je také strukturální bílkovinou intracelulární matrix. Vazba mezi strukturálními bílkovinami a GPIIb-IIIa může způsobit adhezi destiček k poškozeným cévním stěnám.

Důležitost GPIIb-IIIa receptoru pro agregaci destiček

byla prokázána metodami, které blokují receptor. Collier a další, Blood 66, 1456-9, 1985, ukázali, že protilátky k tomuto komplexu inhibují agregaci destiček vyvolanou podáním ADP v pokusech na psech.

Peptidové fragmenty lidského plasmatického fibronektinu a syntetické peptidy obsahující RGD sekvenci podporují vazbu buněk a zesilují fagocytozu, jak je doloženo v U.S. Patent 517686, U.S. Patent 4 589 831, U.S. Patent 4 661 111 a U.S. Patent 4 614 517. Lineární a cyklické peptidy obsahující RGD sekvenci byly také popsány v WO 89/05150, PCT US88/04403. Bylo zjištěno, že peptidy obsahující RGD sekvenci inhibují agregaci destiček. V práci Níevelsteina a dalších, Thromb. and Hemostasis, 58, 2133, 1987 je uvedeno, že peptidy, obsahující RGDS inhibují trombinem indukovanou agregaci destiček a jejich adhesi k fibronektinu. Tyto peptidy mohou interagovat s GPIIb-IIIa komplexem. U.S. Patent 4 683 291 popisuje peptidy obsahující Arg a Lys i RGD sekvenci, které inhibují vazbu fibrinogenu na destičky a brání agregaci destiček. Nevýhodou těchto peptidů je jejich malá stabilita v plasmě a nízká účinnost. EP 0 275 748 uvádí lineární tetra- až hexapeptidy a cyklické hexa- až oktapeptidy, které se vážou na GPIIb-IIIa receptor a inhibují agregaci destiček. Tyto cyklické peptidy mají mezi dvěma cysteinylovými zbytky disulfidový můstek. Další lineární a cyklické peptidy jsou popsány v EP-A 0 341 915. Tyto cyklické struktury obsahují disulfidový kruh tvořený dvěma alifatickými aminokyselinovými zbytky, které mají sulfhydrylové skupiny.

Zde popisovaný vynález předkládá cyklické sloučeniny, jejichž cyklická struktura zahrnuje homodetický peptid, v němž je kruh utvořen peptidovou vazbou, nebo heterodetický peptid, jehož kruh tvoří alkylenový, sulfidový nebo disulfidový můstek. Tento vynález dále přináší cyklické sloučeniny, v nichž se jednotka B-Gly-Asp-2, která bude později uvedena -viz vzorec I, vícekrát opakuje. Je pozoruhodné, že syntéza tak neobvyklých kruhových struktur poskytla farmakologicky aktivní sloučeniny. Bylo také zjištěno, že protiagregační aktivita není podmíněna ani koncovou aminoskupinou, ani koncovou

karbonylovou skupinou. Sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu jsou odolné vůči štěpení proteázami plasmy a selektivně inhibují jenom vazbu k fibrinogenovému receptoru, aniž by měly vliv na ostatní integrinové receptory, jako je vitronektin nebo fibronektin. Výhodou vynalezených sloučenin je tedy jejich schopnost inhibovat agregaci destiček bez toho, aby ve větší míře inhibovaly adhesi destiček k jiným integrinovým receptorům.

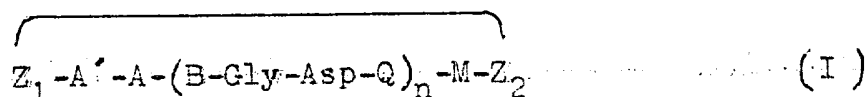
V současné době léčba okluzí tepen a trombózy hlubokých žil zahrnuje použití fibrinolytických látek pro rozpuštění krevní sraženiny nebo vmetku, aby se obnovil nebo zlepšil krevní oběh. Fibrinolytické látky, jako je tkáňový aktivátor plasminogenu /tPA/, urokináza /UK/, pro-Urokináza /pUK/ a streptokináza /SK/, stejně jako mutací změněné bílkoviny nebo deriváty, jsou proteolytické enzymy, které způsobují hydrolýzu fibrinu na specifických místech a tak umožňují rozštěpení fibrinové sítě. V živém organismu proteolyticky aktivují plasminogen v krvi za vzniku plasminu, který způsobí rozpuštění fibrinové sraženiny. Štěpení fibrinu na menší peptidy vede k rozpuštění krevní sraženiny nebo vmetku. Tato léčba je však komplikovaná tím, že se cévy mohou znovu ucpat vytvořením druhotné krevní sraženiny.

Pro obnovení průtoku krve v cévě ucpané krevní sraženinou se nejčastěji používá fibrinolytická terapie. Faktory, které jsou odpovědné za iniciaci vzniku krevní sraženiny však fibrinolytická terapie nemůže ovlivnit. Z tohoto důvodu se často používá heparin, aby se zabránilo opakovanému ucpání cév. U pacientů, kteří mají velmi silně zúžené tepny, je riziko opakované trombózy po obnovení krevního oběhu velmi vysoké. Viz Gold a další, Circ., 73, 347-52, 1986. Navíc byl pozorováno, že při použití SK a tAP může dojít k zvýšené agregaci destiček. Viz Ohlstein a další, Thromb. Res., 4, 575-85, 1987. Léčba vyššími dávkami tPA může být provázena systémovým krvácením a není doporučována jako prevence opakovaného ucpání cév. Ukazuje se tedy, že je potřeba vypracovat metodu, která by zabránila opakovanému tvoření krevní sraženiny po fibrinolytické terapii.

U.S. Patent 917 122 popisuje antagonisty TxA_2 pro použití v metodě, sloužící inhibici opakovanému ucpání cév po obnovení krevního oběhu a snížení dávky tPA nutné pro fibrinolyzu. Yasuda a další, Clin. Res., 34, 2, 1986, ukázali, že opakovanému ucpání cév krevní sraženinou z fibrinu a destiček po rozpuštění sraženiny tPA může být zabráněno myší monoklonální protilátkou k GPIIb-IIIa u psů. Tento vynález popisuje metodu, která brání opětovnému ucpání cév podáváním peptidů, které inhibují přímo agregaci destiček.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je sloučenina obecného vzorce I:



kde

A' je buď nepřítomen, nebo představuje Asn, Gln, Ala nebo Abu;

A je buď nepřítomen, nebo představuje D- nebo L-aminokyselinu, a to Arg, HArg, $(\text{Me}_2)\text{Arg}$, $(\text{Et}_2)\text{Arg}$, Abu, Ala, Gly, His, Lys nebo její $\alpha\text{-R}'$ substituovaný derivát, dále pak Dtc, Tpr nebo Pro;

B znamená D- nebo L-aminokyselinu, a to Arg, HArg, NArg, $(\text{Me}_2)\text{Arg}$, $(\text{Et}_2)\text{Arg}$, Lys, nebo její $\alpha\text{-R}'$ substituovaný derivát;

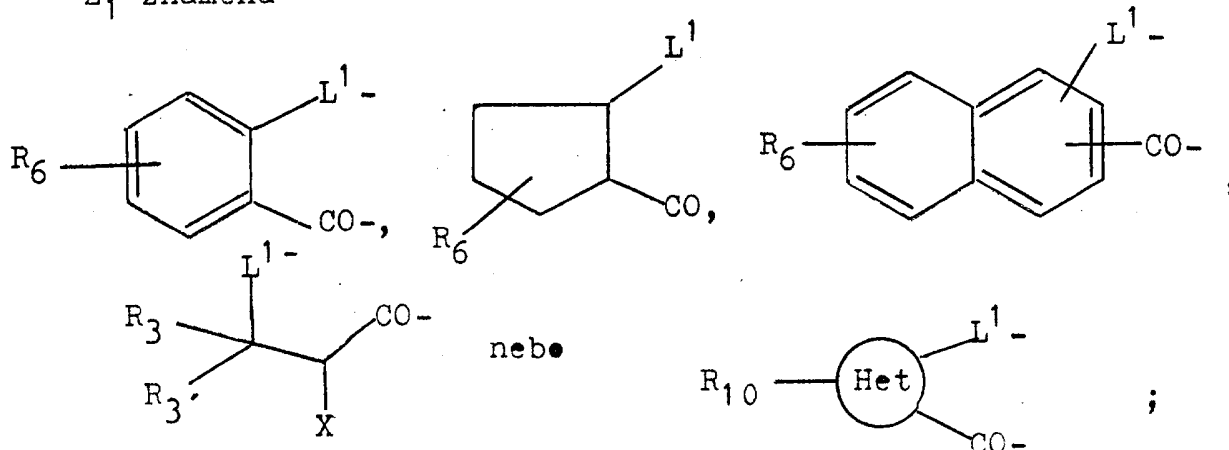
Q je buď nepřítomen, nebo představuje D- nebo L-aminokyselinu, a to Tyr, $(\text{Alk})\text{Tyr}$, Phe, $(4'\text{W})\text{Phe}$, HPhe, Phg, Pro, Trp, His, Ser, $(\text{Alk})\text{Ser}$, Thr, $(\text{Alk})\text{Cys}$, $(\text{Alk})\text{Pen}$, Ala, Val, Nva, Met, Leu, Ile, Nle nebo Nal, nebo její $\alpha\text{-R}'$ substituovaný derivát;

M je buď nepřítomný, nebo znamená D- nebo L-aminokyselinu, a to Glu, Phe, Pro, Lys, Ser anebo, je-li n rovno 1, B-Gly-Glu-Q;

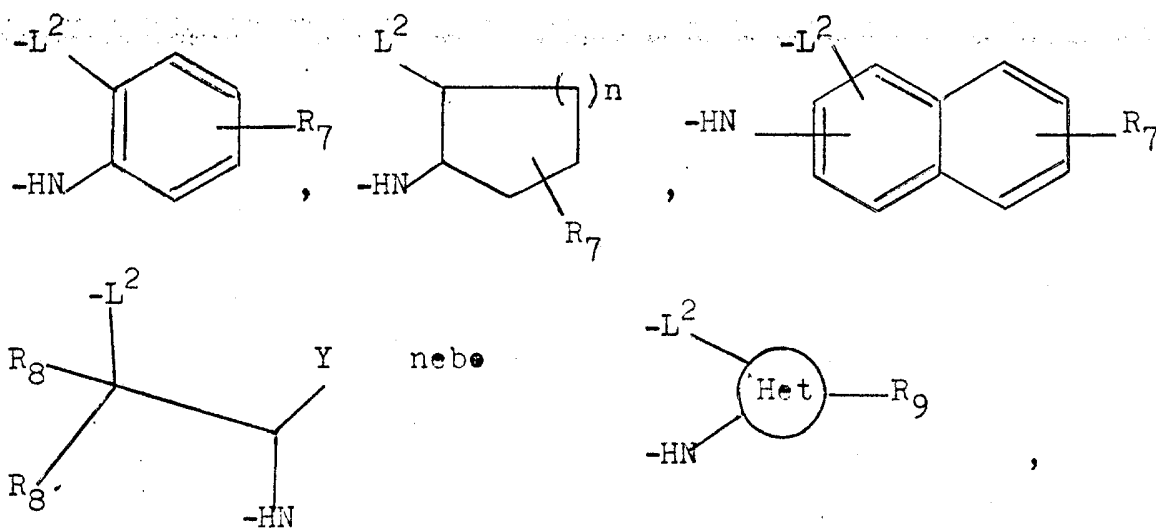
W je buď halogen nebo Alk;

R' je buď Alk nebo PhCH_2 ;

Z_1 znamená



Z_2 znamená



kde Z_1 a Z_2 jsou spojeny kovalentní vazbou mezi L^1 a L^2 ;

nebo Z_1 a Z_2 jsou kovalentní vazba mezi aminokoncovým zbytkem a karboxykoncovým zbytkem;

L^1 a L^2 znamenají $-\text{S}-$ nebo $-(\text{CH}_2)_p-$;

X je $\text{R}_4\text{R}_5\text{N}$ nebo H ;

Y je H , CONR_1R_2 nebo CO_2R_2 ;

R_1 a R_2 jsou H , Alk nebo $(\text{CH}_2)_p\text{Ar}$;

R_3 a R_3' jsou H , Alk, $(\text{CH}_2)_p\text{Ar}$ anebo dohromady znamenají $-(\text{CH}_2)_4-$ nebo $-(\text{CH}_2)_5-$;

- R_4 je H nebo Alk;
- R_5 je R_{11} , $R_{11}CO$, $R_{11}OCO$, $R_{11}OCH(R_{11}')CO$, $R_{11}NHCH(R_{11}')CO$, $R_{11}SCH(R_{11}')CO$, $R_{11}SO_2$ nebo $R_{11}SO$;
- R_6 je Alk, OAlk, halogen nebo X;
- R_7 je H, Alk, OAlk, halogen nebo Y;
- R_8 a R_8' jsou H, Alk, $(CH_2)_pPh$, $(CH_2)_pNph$, anebo dohromady představují $-(CH_2)_4-$ nebo $-(CH_2)_5-$;
- R_9 je H, Alk nebo Y;
- R_{10} je H nebo Alk;
- R_{11} a R_{11}' jsou H, C_{1-5} alkyl, C_{3-7} cykloalkyl, Ar, Ar- C_{1-5} alkyl, Ar- C_{3-7} cykloalkyl;
- Ar je fenyl nebo fenyl substituovaný jednou nebo dvěma C_{1-5} alkylovými, trifluorometylovými, hydroxy-, C_{1-5} alkoxy- nebo halogenovými skupinami;
- n je 1 nebo 2;
- q je 0 nebo 1;
- p je 0, 1, 2 nebo 3

a farmaceuticky aktivní soli výše zmíněných látek;

podmínkou je, aby když n rovná se 1 a Z_1 je X-Cys, X-Pen nebo X-APmp, Z_2 není Cys-Y, Pen-Y nebo APmp-Y.

Tento vynález se také týká farmaceutického prostředku, inhibujícího agregaci destiček a tvorbu krevní sraženiny, který obsahuje sloučeninu vyjádřenou obecným vzorcem I a farmaceuticky vhodný nosič.

Součástí vynálezu je metoda, která zabrání agregaci destiček v organismu savce, u kterého hrozí agregace destiček. Metoda spočívá ve vnitřním podání účinného množství sloučeniny obecného vzorce I.

Hodnotu vynálezu je nutno také posuzovat z toho hlediska, že poskytuje metodu bránící opakovanému ucpání tepny nebo žíly po trombolytické léčbě organismu savce. Metoda

spočívá v interním podání účinného množství fibrinolytické látky a sloučeniny, připravené dle obecného vzorce I. Tyto látky, v kombinaci se známými fibrinolytickými látkami, jako je streptokináza /SK/, urokináza /UK/, pro-urokináza /pUK/ a tkáňový aktivátor plasminogenu /tPA/, nebo varianty či mutanty těchto látek, účinně brání opakovanému vytvoření krevní sraženiny.

Vynález se také týká farmaceutických přípravků určených pro rozpuštění krevní sraženiny a obnovení krevního oběhu; navíc přípravky brání opakovanému ucpání tepny nebo žíly savce. Přípravek se skládá z fibrinolytické látky, ze sloučeniny dle obecného vzorce I a z farmaceutického nosiče.

Vynález také představuje sestavu, která ve společném obalu obsahuje fibrinolytickou látku a sloučeninu obecného vzorce I, a používá se při metodě trombolytické terapie.

Podrobný popis vynálezu

Předmětem vynálezu jsou cyklické sloučeniny, podobné peptidům, které obsahují sekvenci Gly-Asp. Vynalezené látky inhibují agregaci destiček a předpokládá se, že interagují s GPIIb-IIIa receptorem a dalšími adhesními bílkoviny.

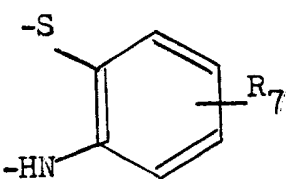
Vynález se týká sloučenin, které, jak už bylo dříve řečeno, jsou peptidy obecného vzorce I.

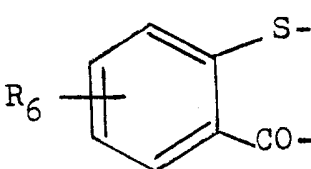
B značí Arg nebo HArg, nebo α -R' substituovaný derivát Arg nebo HArg. Nejvhodnější v pozici B je MeArg.

V pozici A je nejvhodnější Dtc, Tpr nebo Pro, když A' značí Asn, Gln, Ala nebo Abu.

Y představuje CONH_2 nebo CO_2H .
preferované

V jedné subgenerické skupině sloučenin L^1 a L^2 obě představují S.

Pro Z_2 je vhodné buď  nebo Pcs.

Pro Z_1 je vhodné buď  nebo Cys.

Pro R_6 a R_7 je vhodné H.

Je vhodné, aby A' nebylo přítomné.

A je Sar nebo není přítomno.

V jiné preferované subgenerické skupině sloučenin jsou Z_1 a Z_2 dohromady kovalentní vazba.

Je vhodné, aby A a A' nebyly přítomné, n bylo 2 a Z_1 a Z_2 byly dohromady kovalentní vazba.

Pro 2 se hodí Ser, /Me/Ser, Thr, Tyr, Phe nebo Nal, je-li n rovno 2. Nejvhodnější pro 2 je Phe.

V jiné subgenerické skupině sloučenin je L^1 i L^2 CH_2 .

Ve vzorcích zde uváděných znamená X u X-Cys, X-Pen a X-APmp aminoskupinu těchto aminokyselin. Podobně Y, je-li použito u Cys-Y, Pen-Y a APmp-Y, se týká substituovaných karboxylových skupin těchto aminokyselin. Když Z_1 a Z_2 nejsou arylové zbytky, rozumí se, že mohou mít jedno nebo dvě chirální centra a že tento vynález zahrnuje každou jednotlivou neracemickou sloučeninu, kterou lze syntetizovat a oddělit konvenčními postupy.

Když Z_1 nebo Z_2 jsou fenyl, v pozici 1 je alkylénová nebo merkaptó skupina, v pozici 2 je amino/karboxylová skupina, mohou být substituované v 3., 4. nebo 5. pozici R_6 nebo R_7 . Když Z_1 nebo Z_2 jsou naftyl, merkaptó nebo alkylénová skupina může být v pozici 1 nebo 2, amino/karboxylová skupina má orto polohu a naftylový kruh může být substituovaný v kterékoliv pozici.

Het představuje substituovaný heterocyklus, jako je

pyridin, pyrol, pyrolidin, imidazol, triazol, thiophen, furan a thiazol. Tyto heterocykly tvoří makrocyclický kruh uvnitř peptidu prostřednictvím dvou substituentů v orto poloze. Například Z_1 je heterocyklická karboxylová kyselina, která je připojena k peptidu prostřednictvím karboxylu a k Z_2 skrze můstek v orto poloze, podle definice L^1 . Podobně, Z_2 může být heterocyklický amin, který je připojen k peptidu prostřednictvím aminu a k Z_1 skrze můstek v orto poloze, který je označen L^2 .

Alkyl o 1 až 4 atomech uhlíku zde zahrnuje methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl a isobutyl. Ar představuje fenyl nebo fenyl substituovaný jedním nebo dvěma alkyly o 1 až 4 atomech uhlíku, trifluorometyl, C_{1-4} alkoxy nebo halogenovou skupinu.

Tento vynález zahrnuje sloučeniny, v nichž je kterákoliv peptidová vazba $-CONH-$ nahrazena isosterickou vazbou. Příkladem isosterických vazeb jsou: $-NHCO-$, $-CH=CH-$, $-CH_2CH_2-$, $-COCH_2-$, $-COO-$, $-CHOHCH_2-$, $-CH_2NR_4-$, $-CSNH-$ a $-CH_2S-$.

Specifickými sloučeninami toho vynálezu jsou:

cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Cys-NH₂;
N^α-Ac-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Pcs-NH₂;
cyklo-(S,S)-Mba-Sar-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-Sar-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-D-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-N-Me-Man;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp- 2R,3S Pcs-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp- 2R,3R Pcs-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Pen-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-MeArg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;

N^{α} Ac-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;
 N^{α} Ac-Cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Lys-Gly-Glu-Ser-Cys-NH₂;
 cyklo-(1 α ,6 γ)-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂;
 cyklo-(1 α ,6 γ)-Gly-MeArg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂;
 cyklo-(1,8)-Arg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe;
 cyklo-(1,8)-MeArg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe;
 cyklo-(1,10)-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe;
 cyklo-(1,6)-Gly-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Pro;
 cyklo-(1,6)-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-D-Pro;
 cyklo-(1,6)-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro;
 cyklo-(1,6)-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Pro;
 cyklo-(1,6)-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Phe;
 cyklo-(1,5)-D-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser;
 cyklo-(1,5)-Ala-Arg-Gly-Asp-D-Ser a
 cyklo-(1,3)- N^{α} -[2-(2-(2-amido-fenyl)etyl)benzoyl]-MeArg-Gly-Asp-amid.

Preferovanými sloučeninami tohoto vynálezu jsou:

cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Man;
 cyklo-(S,S)-Mba-Sar-MeArg-Gly-Asp-Man;
 N^{α} Ac-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-Pcs a
 cyklo(1,8)-MeArg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe.

Pro popis peptidů je používáno běžně zavedeného názvosloví.

Aminokyselina	třípísmenný kód	jednopísmenný kód
alanin	Ala	A
arginin	Arg	R
kyselina asparagová	Asp	D
cystein	Cys	C
glutamin	Gln	Q
kyselina glutamová	Glu	E
glycin	Gly	G

aminokyselina	třípísmenný kód	jednopísmenný kód
histidin	His	H
isoleucin	Ile	I
leucin	Leu	L
lysin	Lys	K
methionin	Met	M
fenylalanin	Phe	F
prolin	Pro	P
serin	Ser	S
threonin	Thr	T
tryptofan	Trp	W
tyrosin	Tyr	Y
valin	Val	V
asparagin nebo kyselina asparagová	Asx	B
glutamin nebo kyselina glutamová	Glx	Z

Podle zavedených konvencí se amino konec peptidu píše nalevo a karboxy konec napravo. Není-li řečeno jinak, u všech chirálních aminokyselin /AK/ se předpokládá L-konfigurace. Další zkratky mají následující význam:

Pen	L-penicilamin či β, β dimetylcystein
APmp	kyselina 2-amino-3,3-cyklopentametylen-3-merkaptopropionová
Dtc	kyselina 5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová
Tpr	kyselina thiazolidin-4-karboxylová
Mpa	kyselina 3-merkaptopropionová
Pmp	kyselina 3,3-cyklopentametylen-3-merkaptopropionová
Mdp	kyselina 3-merkapt-3-metylbutanová
Pcs	3-fenylcystein, racemický v poloze 3
(3S)Pcs	(2R,3S)-3-fenylcystein
(3R)Pcs	(2R,3R)-3-fenylcystein
Man	2-merkapt-anilin

Mba	kyselina 2-merkaptobenzoová
HArg	homoarginin
NArg	norarginin
(Me ₂)Arg	N',N"-dimetylarginin
(Et ₂)Arg	N',N"-dietylarginin
Nva	norvalin
Nle	norleucin
α-MeAsp	N ^α -metylasparagová kyselina
Nal	beta-2-naftylalanin
Phg	fenylglycin
HPhe	homofenylalanin
Abu	kyselina 2-aminomáselná
(Alk)Tyr	O-C ₁₋₄ alkyl-tyrosin
(Alk)Ser	O-C ₁₋₄ alkyl-serin
(Alk)Thr	O-C ₁₋₄ alkyl-threonin
(Alk)Cys	S-C ₁₋₄ alkyl-cystein
(Alk)Pen	S-C ₁₋₄ alkyl-penicilamin
(4'W)Phe	fenylalanin, substituovaný v pozici 4 fenylového kruhu zbytkem W
t-Bu	terciární butylový radikál
Boc	t-butyloxykarbonylový radikál
Fmoc	fluorenylmetoxykarbonylový radikál
Ph	fenylový radikál
Cbz	karbobenzyloxy radikál
BrZ	o-bromobenzyloxykarbonylový radikál
ClZ	o-chlorobenzyloxykarbonylový radikál
Bzl	benzylový radikál
4-MBzl	4-metylbenzylový radikál
Ac	acetyl
Alk	alkyl s řetězcem o 1 až 4 atomech uhlíku
Nph	1- nebo 2- naftyl
cHex	cyklohexyl
DCC	dicyclohexylkarbodiimid
DMAP	dimethylaminopyridin
DIEA	diisopropyletylamin
EDC	N-etyl-N'-(dimethylaminopropyl)-karbodiimid
HOBT	1-hydroxybenzotriazol
THF	tetrahydrofuran
DMF	dimethylformamid

PPA	cyklický anhydrid kyseliny 1-propanfosfonové
DPPA	difenylfosforylazid
BOP	benzotriazol-1-yloxy-tris(dimetylamino)fosfonium hexafluorofosfát
HF	kyselina fluorovodíková
TFA	kyselina trifluoroctová

Pro vytváření peptidových vazeb se nejčastěji používají karbodiimidy, aktivované anhydridy a estery nebo acylhalidy, a to zejména reagentie EDC, DCC, DPPA, PPA, BOP, HOBT, N-hydroxysukcinimid a oxalylchlorid.

α -R' substituované deriváty aminokyselin, které jsou předmětem tohoto vynálezu a označují se (α -R')AA, představují aminokyseliny s jednou substitucí na α -aminoskupině skupinou R', přičemž R' je buď Alk nebo benzyl. R' je přednostně metyl. N $^{\alpha}$ -metylgarginin a N $^{\alpha}$ -metylglycin, označované (α -Me)Arg a (α -Me)Gly, se zde také označují jako MeArg a Sar /sarkosin/ podle dřívějších konvencí. Všechny ostatní N- α -substituované aminokyseliny budou mít ve svém názvu označení α -. Ty aminokyseliny, které jsou alkylované na merkaptanové, guanidinové nebo hydroxylové skupině toto označení postrádají. (α -Me)Ser je N $^{\alpha}$ -metylserin, Me Ser je O-metylserin, (α -Me,Et)Ser je N $^{\alpha}$ -metyl,O-etylserin a (α -Me,Et₂)Arg je N $^{\alpha}$ -metyl-N', N"-dietylgarginin.

Peptidy jsou přednostně připravovány na pevné fázi metodou Merrifielda /J.Am.Chem.Soc., 85, 2149, 1964/, metody pro výstavbu peptidového řetězce v roztoku však mohou také být úspěšně použity. Metody pro syntézu na pevné fázi a v roztoku je možno kombinovat, t.j. například připravit di-, tri-, tetra-, nebo pentapeptidy syntézou na pevné fázi a pak buď spojeny, nebo dále modifikovány syntézou v roztoku. Většina peptidů, které jsou předmětem tohoto vynálezu byla připravena podle metod Ali a další, J.Med.Chem. 29, 984, 1986 a J.Med.Chem., 30, 2291, 1987.

Reaktivní funkční skupiny bočních řetězců každé aminokyseliny nebo peptidu jsou vhodně chráněny metodami běžně používanými v oboru chemie peptidů. Boc, Cbz nebo Fmoc skupiny mohou být užity pro chránění aminoskupiny, zejména pro α -aminoskupinu. Pro ochranu α -aminoskupiny je nejčastěji používána Boc skupina. Postranní karboxylový řetězec Asp nebo Glu může být chráněn t-Bu, cHex nebo benzyl esterem. Bezylová skupina nebo vhodně substituovaná benzylová skupina se používá pro ochranu merkaptoskupiny cysteinu nebo jiných zbytků obsahujících thiol, ale také hydroxylu serinu nebo threoninu. Tosylová skupina se užívá pro ochranu imidazolylové skupiny His. Tosyl nebo nitroskupina se používá pro ochranu guanidinového dusíku Arg. Vhodně substituovanou karbobenzyloxy skupinu nebo benzylovou skupinu je možno použít pro ochranu hydroxylové skupiny Tyr, Ser nebo Thr, nebo pro ϵ -aminoskupinu lysinu. Ftalamidová skupina může být také použita pro ochranu ϵ -aminoskupiny lysinu. Karbobenzyloxy nebo benzylová chránící skupina může být vhodně substituována v orto i para poloze chloro, bromo, nitro nebo metylovým radikálem, čímž je modifikována reaktivita chránící skupiny. Cystein a další aminokyseliny obsahující síru mohou být také chráněny vytvořením disulfidu s thioalkylovou nebo thioarylovou skupinou. S výjimkou skupiny Boc, nejlepšími chránícími skupinami jsou ty, které nelze odstranit mírným okyselením. Tyto chránící skupiny je možno odstranit katalytickou hydrogenací, sodíkem v kapalném amoniaku, působením HF nebo podobnými metodami.

Při syntéze na pevné fázi je peptid vystaven postupně od karboxylového konce směrem k aminokonci. Syntéza na pevné fázi je zahájena tím, že se kovalentně připojí karboxy konec chráněné aminokyseliny na vhodnou pryskyřici, jako je benzhydrylaminová pryskyřice /BHA/, metylbenzhydrylaminová pryskyřice /MBHA/, chlorometylová pryskyřice /CMR/, hydroxymetylová pryskyřice /HMR/ nebo SASRINová pryskyřice, jak je uvedeno v U.S. Patentu č. 4 244 946. BHA nebo MBHA pryskyřice je použita jako nosič v případě, že má být na karboxylovém konci peptidu karboxamid. CMR nosič se běžně užívá,

jestliže na karboxylovém konci výsledného peptidu má být karboxylová skupina, karboxamid nebo ester.

Jakmile se první chráněná aminokyselina naváže na vhodnou pryskyřici, aminoskupina se zbaví chránicí skupiny mírným okyselením a volná karboxylová skupina druhé chráněné aminokyseliny se naváže na aminoskupinu první aminokyseliny. Tento proces se provádí postupně, bez izolování meziproductů, až po získání požadovaného peptidu. Hotový peptid pak může být odblokován a odštěpen z nosiče.

Přidáním alkalie ve vodném roztoku alkoholu k peptidu na CMR nosiči se peptid od nosiče odštěpí a aminokyselina na karboxylovém konci peptidu bude mít volnou karboxylovou skupinu. Přidá-li se k peptidu na CMR nosiči amoniak nebo alkylaminy v alkoholovém rozpouštědle, má výsledný peptid karboxamid nebo alkylkarboxamid na karboxylovém konci.

Má-li být výsledkem ester, přidá se k CMR nosiči s peptidem příslušný alkohol, jako například metyl-, etyl-, propyl-, butyl-, nebo benzylalkohol, v přítomnosti trietylaminu a výsledný peptid bude odštěpen od nosiče jako ester.

Estery peptidů zahrnuté v tomto vynálezu mohou také být připraveny konvenčními metodami z výchozí karboxylové kyseliny. Běžně se k karboxylové kyselině přidává alkohol za přítomnosti kyselého katalyzátoru. Další metoda spočívá v tom, že se karboxylová kyselina přemění na aktivovaný acylový meziproduct, jako je halid kyseliny, a přidá se alkohol, nejlépe v kombinaci s louhem.

Metody pro přípravu C-koncových esterů peptidů, které zároveň nevedou k esterifikaci karboxylové skupiny postranního řetězce kyseliny asparagové, jsou poněkud pracnější, ale také se v peptidové chemii běžně používají. Jako výchozí látka se například vezme ester C-koncové aminokyseliny nebo dipeptidu a syntézou v roztoku je připojen zbytek kyseliny

asparagové, jehož postranní řetězec je vhodně chráněný. Karboxylová skupina postranního řetězce je pak selektivně zbavena chránicí skupiny a navázána na chlorometylovou pryskyřici. Aminoskupina je uvolněna a peptidový řetězec je vybudován syntézou na pevné fázi. Když je pak odštěpen produkt z nosiče pomocí HF, vzniklý peptid má karboxylovou kyselinu na postranním řetězci a na C-konci ester. Je také možno zahájit postup syntézy alkylamidem vhodně chráněné aminokyseliny nebo dipeptidu a výsledkem bude C-koncový alkylamid peptidu.

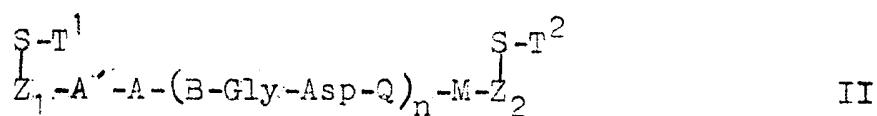
Aby bylo možno tímto procesem získat estery a substituované amidy, je vhodné chránit 4-karboxylovou skupinou kyseliny asparagové benzylestery anebo benzylestery substituovanými halogenem nebo alkylovou skupinou. Je-li aminoskupina chráněna skupinou Boc, je možno odstranit benzylesterovou chránicí skupinu hydrogenací a navázat CMR nosič.

Jestliže Z_2 nemá zbytek karboxylové kyseliny anebo na aminokyselině /nebo dipeptidu/, která má být připojena ke kyselině asparagové před navázáním na pryskyřici je benzylová skupina nebo substituované benzylové chránicí skupiny /například pro hydroxylovou, thiolovou nebo aminoskupinu/, je vhodné chránit karboxylovou skupinu postranního řetězce kyseliny asparagové t-butylesterovou skupinou nebo jinou skupinou nestálou v kyselém prostředí. V tomto případě je aminoskupina kyseliny asparagové chráněna skupinou nestálou v zásaditém prostředí, jako například fluorenylmetoxykarbonylovou skupinou /Fmoc/. Potom co se v roztoku naváže kyselina asparagová na anilin, amin nebo aminokyselinu /či dipeptid/, t-butyl ester je odstraněn hydrolyzou v mírně kyselém prostředí a karboxyl postranního řetězce je připojen na pryskyřici běžnými metodami. Fluorenylmetoxykarbonylová skupina je pak odstraněna v mírně zásaditém prostředí a je zahájena syntéza peptidu na pevné fázi. Tato metoda je nejvýhodnější v případě, že koncový zbytek Z_2 je substituovaný nebo nesubstituovaný o-merkaptotoarylamín, který nemá karboxylový substituent.

Nejvhodnějším způsobem pro odštěpení peptidu z nosiče je vystavit pryskyřici s peptidem působení bezvodé HF v

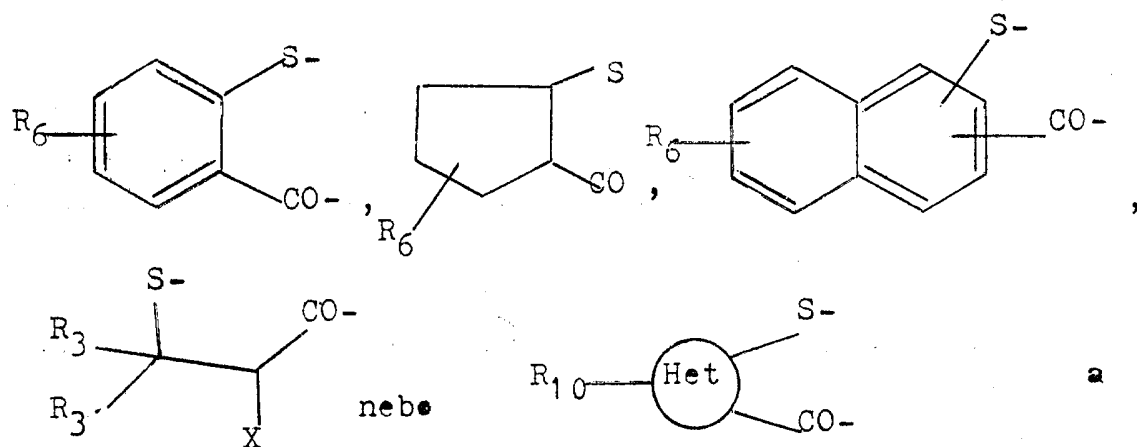
přítomnosti látky vázající kationty, jako například anisol nebo dimetoxybenzen. Tato metoda zároveň odstraní všechny chránící skupiny s výjimkou thioalkylové skupiny chránící síru a odštěpí peptid z pryskyřice. Peptidy uvolněné tímto způsobem z CMR nosiče jsou karboxylové kyseliny, peptidy odštěpené z BHA pryskyřice jsou ve formě karboxamidu.

V jedné preferované subgenerické skupině látek znamenají L^1 a L^2 obě S. Cyklické disulfidové sloučeniny obecného vzorce I jsou vytvořeny z lineárního peptidu dle vzorce II

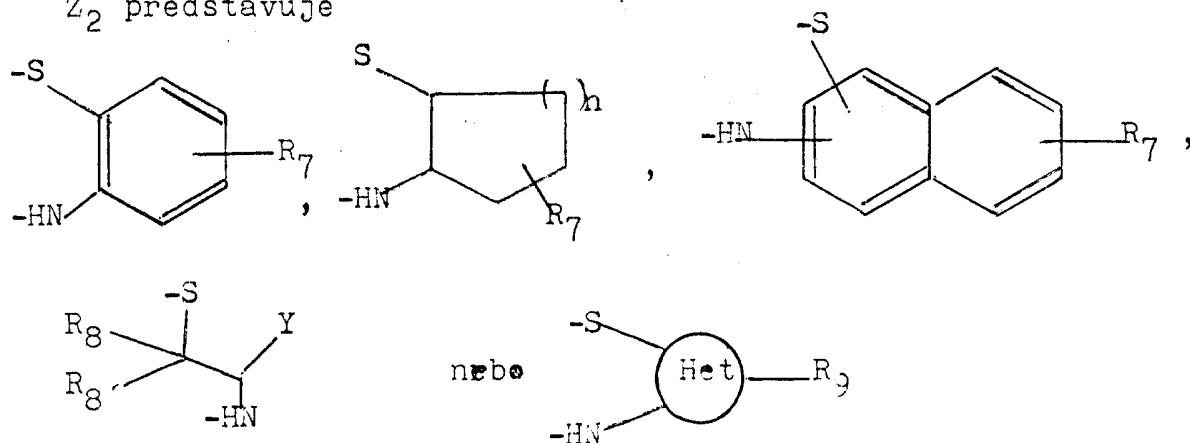


kde A' , A, B, Q, M a n mají stejný význam, jako je uveden při popisu obecného vzorce I.

Z_1 značí



Z_2 představuje



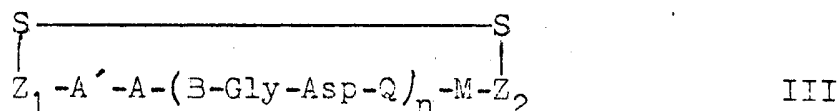
přičemž chemicky reaktivní centra jsou chráněna dříve popsaným způsobem a na atom síry u Z_1 a Z_2 jsou navázány T^1 nebo T^2 . T^1 a T^2 jsou odstranitelné skupiny, jako je thioalkyl, thioaryl, substituovaná benzylová skupina nebo vodík. Vhodnými odstranitelnými skupinami jsou vodík, C_{1-4} alkylthioskupina, zejména etylthioskupina, benzylová a 4-methylbenzylová skupina. Nejvýhodnější je, když je T^1 a T^2 vodík nebo jedna ze skupin T^1 a T^2 je vodík a druhá je C_{1-4} alkylthioskupina.

Disulfidová vazba může být vytvořena dvěma metodami. Jestliže jsou v lineárním peptidu aminokyseliny obsahující síru chráněny rozdílnými skupinami, takovým způsobem, že může vzniknout monomerkaptan, je možno provést cyklizaci basicke katalyzovaným nukleofilním odštěpením chránící skupiny druhé aminokyseliny obsahující síru. Nejlepšími odstranitelnými chránícími skupinami jsou thioalkylová nebo thioarylová skupina. Je možno například chránit jednu aminokyselinu obsahující síru thioethylovou skupinou a druhou chránit substituovanou benzylovou skupinou. Působením HF na takovýto peptid se odstraní benzylová skupina z jedné aminokyseliny, kdežto druhá aminokyselina bude chráněna jako etyldisulfid. Tento merkaptodisulfid se v zředěném roztoku o pH 7 až 8 míchá, thioethylová skupina se odstraní a z lineárního peptidu vznikne cyklický.

Jestliže lineární peptid obecného vzorce II je zbaven chránících skupin a vznikne tak dimerkaptan, je možno použít oxidační činidlo k převedení dimerkaptanu na disulfid. Takovými činidly jsou hexakynoželezitan alkalických kovů, zejména hexakynoželezitan draselný a sodný, plynný kyslík, diiodometan nebo jód. Působí-li na sloučeninu obecného vzorce II oxidační činidlo, dojde k její cyklizaci. Reakce probíhá ve vhodném inertním rozpouštědlu, jako je vodný roztok metanolu nebo voda, ve značném zředění, při teplotách od 0 do 40°C. Hodnota pH je většinou udržována mezi 7 a 8, Cyklizaci je možno provést, když je peptid vázán na pryskyřičný nosič nebo dokud jsou ostatní funkční skupiny ještě chráněny, je

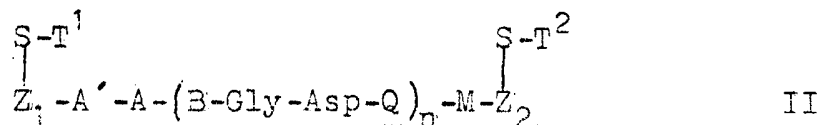
však lépe použít volný peptid, zbavený chránících skupin.

Předmětem vynálezu je také proces pro přípravu sloučeniny obecného vzorce III



kde A', A, B, Q, M, Z₁, Z₂ a n mají stejný význam, jako bylo uvedeno u vzorce I. Proces zahrnuje:

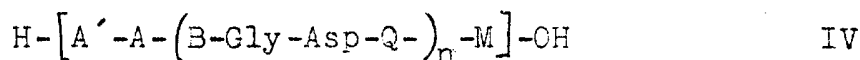
a/ oxidativní cyklizaci sloučeniny vzorce II



kde A', A, B, Q, M, Z₁, Z₂ a n mají stejný význam, jako bylo uvedeno u vzorce I a T¹ a T² jsou H, nebo

b/ nukleofilní cyklizaci sloučeniny obecného vzorce II působením zásady. A', A, B, Q, M, Z₁, Z₂ a n značí totéž jako u vzorce I a pro T¹ a T² platí, že jedno je odstranitelná skupina a druhé H.

Jinou subgenerickou skupinou sloučenin jsou homodetické peptidy, v nichž Z₁ a Z₂ jsou dohromady kovalentní vazba. Tyto peptidy jsou připraveny z lineárního peptidu obecného vzorce IV, kde A', A, B, Q, M a n značí totéž jako u vzorce I.



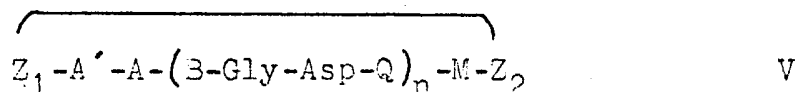
Tyto lineární peptidy se připravují takovým způsobem, že se uvolní a cyklizuje koncová aminoskupina a koncová karboxy-skupina peptidu, zatímco karboxyl postranního řetězce Asp zůstává chráněn. Cyklizace lze pak dosáhnout běžnými činidly, používanými pro vytvoření peptidové vazby, jako jsou karbo-diimidy nebo aktivované anhydridy. Příkladem takových reagen-cií jsou difenylfosforylazid, činidlo BOP, cyklický anhydrid kyseliny 1-propanfosfonové, a DCC/HOBT. Je zřejmé, že

koncová aminoskupina peptidu IV, označená jako $H-[HN-AA-]$, a koncová karboxyskupina, označená jako $[-AA-CO]-OH$, se mohou navázat na kterýkoliv zbytek peptidu, t.j. A' , A, B, Gly, Asp, Q nebo M, protože vytvoření jakékoliv peptidové vazby v cyklických peptidech může být uskutečněno v posledním kroku přípravy stejného konečného produktu.

Když jsou v peptidu přítomny Asp nebo Glu, je možno cyklizaci uskutečnit buď skrz β -karboxyskupinu postranního řetězce Asp nebo γ -karboxyskupinu postranního řetězce Glu, nebo koncové karboxyskupiny aminokyseliny. V případě Asp je nejlepší cyklizace přes koncovou karboxyskupinu, kdežto u Glu je lepší cyklizace přes γ -karboxyskupinu. Metody, použitelné pro cyklizaci přes kteroukoliv z těchto karboxyskupin, jsou běžně dostupné, jak je zde uvedeno.

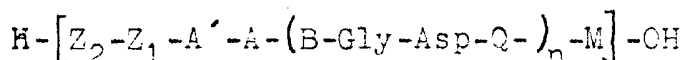
Jestliže jsou Z_1 a Z_2 spojeny alkylenovým můstkem, aminokyselina Z_1-Z_2 se zvlášť zakoupí nebo syntetizuje a inkorporuje se do peptidu jako poslední aminokyselinový zbytek při syntéze. Lineární peptid je vystaven buď syntézou v roztoku nebo na pevné fázi a cyklizován stejným způsobem, jako je uvedeno shora pro případ, kdy jsou Z_1 a Z_2 kovalentní vazba. Kyselina 2-aminokorková a 1-(2-karboxyfenyl)-2(2-aminofenyl)etan představují Z_1-Z_2 , spojené alkylenovým můstkem.

Tento vynález se také týká procesu pro přípravu sloučeniny obecného vzorce V

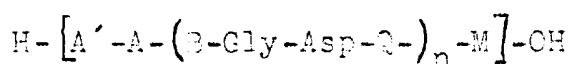


Při tomto procesu dochází k:

i/ cyklizaci sloučeniny obecného vzorce:



když L^1 a L^2 jsou CH_2 p; nebo



když Z_1 a Z_2 jsou dohromady kovalentní vazba; kde H- a OH- představují amino a karboxylové skupiny kterýchkoliv sousedních zbytků cyklického peptidu a A', A, B, Q, M a n mají stejný význam, jako bylo výše uvedeno, a všechny reaktivní skupiny jsou libovolně chráněné,
ii/ odstranění chránících skupin.

Koncová aminoskupina peptidu je modifikována alkyací nebo acetylací podle běžně užívaných postupů. Tyto modifikace je možno uskutečnit s aminokyselinou před její inkorporací do peptidu nebo s peptidem po tom, co byla ukončena syntéza a koncová aminoskupina uvolněna, ale před odstraněním chránících skupin.

V typickém případě se na volné aminoskupině provede acetylace za použití acylhalidu nebo anhydridu odpovídající alkylové nebo arylové kyseliny v přítomnosti terciárního aminu. Monoalkylace se nejlépe provede redukční alkyací aminoskupiny odpovídajícím alifatickým aldehydem nebo ketonem v přítomnosti mírného redukčního činidla, jako je kyanoborohydrid litný nebo sodný. Dialkylaci je možno provést působením nadbytku halidu v přítomnosti zásady.

(se uskutečňuje)

Syntéza peptidů v roztoku za použití běžných metod pro tvorbu amidových vazeb. V typickém případě se chráněná BOC-aminokyselina, která má volnou karboxylovou skupinu, naváže na chráněnou aminokyselinu, která má volnou aminoskupinu, za použití vhodného karbodiimidového činidla, jako je N,N'-dicyklohexylkarbodiimid /DCC/, nejlépe v přítomnosti katalyzátoru, jako například 1-hydroxybenzotriazol /HOBT/ nebo dimetylamino pyridinu /DMAP/. Další vhodné metody zahrnují vytvoření aktivovaných esterů, anhydridů nebo halidů kyselin na volné karboxylové skupině chráněné BOC-aminokyseliny a následnou reakci s volným aminem chráněné aminokyseliny, nejlépe v přítomnosti zásady. Například, chráněná Boc-aminokyselina nebo peptid je v bezvodém rozpouštědle, jako je metylenchlorid nebo tetrahydrofuran /THF/, v přítomnosti zásady, jako je N-metylmorfolin, DMAP nebo trialkylamin,

vystaven působení isobutylchloroformátu, aby vznikl "aktivovaný anhydrid", který potom reaguje s volným aminem druhé chráněné aminokyseliny nebo peptidu. Peptid vytvořený těmito metodami může být selektivně zbaven chránících skupin za použití konvenčních postupů na amino nebo karboxylovém konci a pak navázán na jiné peptidy nebo aminokyseliny pomocí podobných metod.

α -R' substituované deriváty aminokyselin, které jsou předmětem tohoto vynálezu a zahrnují deriváty Arg, HArg, (Me₂-Arg, (Et)₂Arg, Ala, Gly, His, Abu, Tyr, (Alk)Tyr, Phe, (4'W)Phe, HPhe, Phg, Trp, His, Ser, (Alk)Ser, Thr, (Alk)Thr, Cys, (Alk)Cys, Pen, (Alk)Pen, Ala, Val, Nva, Met, Leu, Ile, Nle a Nal se připravují metodami běžnými v chemii. Substituent R' může být Alk nebo benzyl. Typické metody pro přípravu těchto derivátů jsou uvedeny v U.S. Patentu č. 4 687 758; Cheung a další, Can.J.Chem., 55, 906, 1977; Freidinger a další, J.Org.Chem., 48, 77, 1982; a Shuman a další, Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Symposium, Rich, D., Gross, E., Eds, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 617, 1981, jež zde tímto citujeme. V typickém případě se roztok Cbz- nebo Boc-aminokyseliny v DMF/THF kondensuje s příslušným alkylhalidem, jako je metyl nebo etyljodid, v přítomnosti zásady, jako je natriumhydrid nebo kaliumhydrid. Je možno přidat korunkový ether, jako je 18-korunka-6 s natrium hydridem pro usnadnění reakce. Obecně řečeno, [v tomto procesu a v následujících aminoskupina funkční skupinu, jako je hydroxyl, merkaptan, amino, guanidino, indolyl, pak je tato skupina chráněna tak, jak bylo dříve popsáno. Například, na Boc-Tyr(Bzl) se působí natriumhydridem a metyljodidem rozpouštěnými v THF/DMF při 0°C a směs se míchá při pokojové teplotě 24 hod. Výsledným produktem je Boc-(α -Me)Tyr(Bzl).

Alternativní postup spočívá v tom, že volný amin aminokyseliny reaguje se vhodným aldehydem, jako je acetaldehyd nebo benzaldehyd, v přítomnosti redukčního činidla, jako je natrium kyanoborohydrid. Výsledkem tohoto postupu je mono-alkylace a používá se zejména pro přípravu α -benzy-

lovaných aminokyselin. α -Benzylované aminokyseliny mohou také sloužit jako meziprodukty v přípravě α -methyaminokyselin. Například, α -methylarginin se připraví ve třech krocích:

- 1/ reakcí Arg(Tos) s benzaldehydem a natrium kyanoborohydridem v methanolu za vzniku (α -Bzl)Arg(Tos);
- 2/ redukcí benzylovaného produktu směsí formaldehydu a kyseliny mravenčí, kdy produktem je (α -Bzl, α -Me)Arg(Tos);
- 3/ odstraněním benzylové skupiny katalytickou hydrogenací (5% Pd/C v ledové kyselině octové/HCl) ; produktem je MeArg(Tos).

α -R' substituované deriváty aminokyselin mohou být také připraveny redukcí oxazolidinonů připravených z Fmoc- nebo Cbz-aminokyselin. V typickém případě se Fmoc- nebo Cbz-aminokyselina zahřívá s příslušným aldehydem, jako je acetaldehyd nebo benzaldehyd, v přítomnosti kyseliny toluensulfonové v toluenovém roztoku; výsledkem je 5-oxo-oxazolidin substituovaný v poloze 2. Redukce tohoto oxazolidinonu triethylsilanem a TFA v chloroformu přímo poskytne Cbz- nebo Fmoc- α substituovanou aminokyselinu. Použije-li se formaldehyd, oxazolidinon není substituován v poloze 2 a vzniknou α -methyaminokyseliny.

Adiční soli kyselin a peptidů se připraví standardním způsobem ve vhodném rozpouštědle a nadbytku kyseliny chlorovodíkové, bromovodíkové, sírové, fosforečné, octové, maleinové, jantarové nebo methansulfonové. Zvláště se osvědčila sůl s kyselinou octovou. Některé ze sloučenin tvoří vnitřní soli nebo zwitteriony, které mohou být přijatelné. Kationové soli se připraví tak, že na výchozí sloučeninu působí nadbytek alkalického činidla, jako je hydroxid, uhličitán nebo alkoxid, které obsahuje příslušný kation; je také možno použít vhodný organický amin. Farmaceuticky přijatelné soli mohou obsahovat například kationy Li^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} a NH_4^+ .

Tento vynález se týká farmaceutického prostředku, který obsahuje peptid obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelný nosič. Farmaceutické prostředky^z peptidů, připravených výše popsanými způsoby, a další^{ch} peptidových^{ch} nebo polypeptidových^{ch} deri-

vátů fibronektinu, fibrinogenu nebo Von Willebrandova faktoru mohou být připraveny jako roztoky nebo lyofilizované prášky pro parenterální podání. Prášky mohou být upraveny přidáním vhodného ředidla nebo jiného farmaceuticky přijatelného nosiče před použitím. Tekutý přípravek je, obecně řečeno, pufrovaný, izotonický, vodný roztok. Vhodným rozpouštědlem je například normální izotonický fyziologický roztok, standardní 5% dextrosa ve vodě nebo pufrovaný roztok octanu amonného. Takováto léková forma je zvláště vhodná pro parenterální podávání, může však být také použita pro orální podání, v inhalátoru pro odměřené dávky, nebo v rozprašovači pro vdechování. Může být žádoucí přidat polyvinylpyrolidon, želatina, hydroxycelulosa, arabská guma, polyethylenglykol, mannitol, chlorid sodný nebo citrát sodný.

Pro orální podávání je možno tyto peptidy upravit ve formě kapslí, tablet, emulze nebo sirupu. Farmaceuticky přijatelné pevné nebo tekuté nosiče mohou být přidány pro zlepšení nebo stabilizaci přípravku, anebo k usnadnění přípravy. Pevné nosiče zahrnují škrob, laktosu, dihydrát síranu vápenatého, terru albu, magnesiumstearát, kyselinu stearovou, mastek, pektin, arabskou gumu, agar nebo želatinu. Tekuté nosiče zahrnují sirup, podzemnicový olej, olivový olej, fyziologický roztok a vodu. Nosič může obsahovat materiál, umožňující pozvolné uvolňování, jako je glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát, a to buď samotný, nebo v kombinaci s voskem. Množství pevného nosiče se liší, nejlepší je od 20 mg do 1 g na dávkovou jednotku. Farmaceutické prostředky se připravují metodami běžnými ve farmacii, což představuje mletí, míchání, granulaci a kompresi pro tabletovou formu, anebo mletí, míchání a plnění v případě tvrdých želatinových kapslí. Použije-li se kapalný nosič, preparát je ve formě sirupu, elixíru, emulze, nebo vodné či nevodné suspenze. Takováto tekuté lékové formy mohou být podávány per os přímo nebo plněny do měkkých želatinových kapslí.

Pro rektální podávání se peptidy tohoto vynálezu mohou kombinovat s přísadami, jako je kakaové máslo, glycerin,

želatina nebo polyethylenglykoly, a tvarovat do formy čípků.

Tento vynález také poskytuje metodu pro inhibici agregaci krevních destiček a tvorby krevní sraženiny v organismu savce, zvláště člověka, což zahrnuje vnitřní podání peptidu obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelného nosiče. Tato terapie je indikována v případech akutního infarktu myokardu /AIM/, trombóza hlubokých žil, plicní embolie, disekující aneurysma, přechodný ischemický záchvat/PIZ/, mrtvice a další poruchy související s infarktem, a dále u nestabilní anginy. Chronické nebo akutní stavy hyperagregace, jako je roztroušená intravaskulární koagulace /RIK/, septokemie, chirurgický nebo infekční šok, pooperační nebo poporodní trauma, chirurgické kardiopulmonární obchvaty, nekompatibilní krevní transfuze, odtržení placenty, trombotická trombocytopenická purpura /TTP/, účinky hadího jedu a poruchy imunity mohou být k této léčbě citlivé. Navíc mohou peptidy, které jsou předmětem tohoto vynálezu být použity v metodě pro prevenci metastatických stavů.

Peptid se podává pacientovi buď orálně nebo parenterálně takovým způsobem, aby koncentrace účinné látky v plasmě byla dostatečně vysoká pro inhibici agregace destiček. Farmaceutický prostředek obsahující peptid se podává v dávce od 0,2 do 50 mg/kg způsobem, který vyhovuje stavu pacienta. Pro akutní terapii je nejlepší parenterální aplikace. V případech, kdy hyperagregace přetrvává déle, je nejúčinnější intravenózní infuze peptidu v 5% roztoku dextrosy ve vodě nebo fyziologickém roztoku, i když postačí intramuskulární injekce bolusu.

V případech, kdy je agregace destiček chronicky zvýšená, ale stav není kritický, je vhodné podávat orálně kapsle nebo tablety, případně je možné injekční podání bolusu do svalu. Peptid je podáván jedenkrát až čtyřikrát denně v množství od 0,4 do 50 mg/kg, čímž se dosáhne denní dávka přibližně od 0,4 do 200 mg/kg/den.

Tento vynález dále poskytuje metodu, která zabraňuje

opakovanému ucpání tepny nebo žíly po fibrinolytické terapii, čehož se dosáhne vnitřním podáním peptidu obecného vzorce I a fibrinolytické látky. Bylo zjištěno, že podání peptidu při fibrinolytické terapii buď úplně zabrání opětovnému ucpání cév nebo ucpání oddálí.

V textu, popisujícím tento vynález, je termín "fibrinolytická látka" používán tak, že znamená jakoukoliv přírodní látku nebo syntetický produkt, které přímo či nepřímo způsobují rozpuštění sraženiny fibrinu. Známou skupinou fibrinolytických látek jsou aktivátory plasminogenu. Užitečnými aktivátory plasminogenu jsou například anistreplase, urokinasa /UK/, pro-urokinasa /pUK/, streptokinasa /SK/, tkáňový aktivátor plasminogenu /tPA/, stejně jako jejich pozměněné formy a varianty, které si uchovávají aktivitu aktivátoru plasminogenu. Tyto změny spočívají chemické modifikaci nebo v přidání, ubrání nebo záměně jedné nebo více aminokyselin, nebo v tom, že jedna nebo více funkčních oblastí bylo přidáno, vypuštěno nebo změněno, jako například kombinací aktivního místa jednoho aktivátoru plasminogenu s oblastí pro vazbu fibrinu jiného aktivátoru plasminogenu nebo molekuly vázající fibrin.

Jinou variantou jsou molekuly tPA, v nichž bylo pozměněno jedno nebo více glykosylačních míst. Nejvýhodnějšími aktivátory plasminogenu jsou modifikace tPA, u nichž je pozměněná primární sekvence aminokyselin v oblasti růstového faktoru tak, aby se zvýšil poločas aktivátoru plasminogenu v plasmě. Varianty růstového faktoru tPA jsou popsány Robinsonem a dalšími, EP-A 0 297 589 a Brownem a dalšími, EP-A 0 240 334 a GB 8815135.2. Jinými variantami jsou hybridní bílkoviny, jako jsou ty popsané v EP 0 028 489, EP 0 155 387 a EP 0 297 882, které zde tímto citujeme. V našem vynálezu preferujeme použití hybridní bílkoviny anistreplasy. Fibrinolytické látky mohou být izolovány z přírodních zdrojů, jsou běžně produkovány metodami genového inženýrství.

Užitečné lékové formy tPA, SK, UK a pUK jsou například popsány v EP-A 0 211 502 /U.S.Ser.No. 890 432/, German Patent Application No. 3032606, EP-A 0 092 182 a U.S. Patent 4 568 543, jejichž citace jsou zde zahrnuty. Fibrinolytická látka může

mít lékovou formu vodného pufovaného izotonického roztoku, jako je octan sodný nebo amonný, nebo adipat pufovaný na pH 3,5 až 5,5. Dále se může přidat polyvinylpyrolidon, želatina, hydroxycelulosa, arabská guma, polyethylen, glycol, mannitol a chlorid sodný. Směs se může lyofilizovat.

Farmaceutický prostředek může být upraven tak, že peptid a fibrinolytická látka^{jsou} ve stejném obalu, lepší je však použít oddělených obalů. Když jsou obě účinné látky v roztoku, mohou být obsaženy v systému pro infuze či injekce, uzpůsobeném pro simultánní nebo následné podání.

Tato terapie je indikována v případech infarktu myokardu, trombózy hlubokých žil, plicní embolie, mrtvice a dalších poruch souvisejících s infarktem. Peptid se podává buď zároveň s parenterální aplikací tPA nebo jiné fibrinolytické látky, anebo jeho podání aplikaci tPA těsně předchází či následuje. Po obnovení průtoku může být prospěšné pokračovat s podáváním peptidu ještě nějaký čas, aby se v největší možné míře zamezilo opětovnému ucpání cév. Účinná dávka tPA, SK, UK nebo pUK je od 0,5 do 5 mg/kg a účinná dávka peptidu je od 0,1 do 25 mg/kg.

Aby bylo možno podávat inhibitor a fibrinolytickou látku zároveň nebo odděleně, zhotoví se souprava, která obsahuje v jednom obalu, jako je krabice či jiná schránka, jednotlivé lahvičky, sáčky, nebo podobné nádoby, z nichž každá obsahuje účinné množství inhibitoru pro parenterální podání, jak bylo dříve popsáno, a účinné množství tPA nebo jiné fibrinolytické látky pro parenterální podání, jak bylo zhora uvedeno. Takováto souprava může obsahovat obě farmaceuticky účinné látky v oddělených nádobách nebo ve stejné nádobě, třeba v lyofilizované formě, a nádoby s roztoky pro rozpuštění preparátu. Toto uspořádání může být obměněno tak, že lyofilizovaná látka a roztok na její rozpustění jsou umístěny ve dvou komorách jedné nádoby, aby bylo možno je smíchat před použitím. Fibrinolytická látka a peptid mohou být plněny zvlášť do dvou nádob nebo lyofilizováni pohromadě a výsledný

prášek se plní do jedné nádoby.

Když jsou obě účinné látky připraveny ve formě roztoku, mohou být plněny do systému pro infuze či injekce, uzpůsobeném pro simultánní nebo následné podání. Například inhibitor agregace destiček může být ve formě vhodné pro intravenózní injekci nebo v infusním sáčku spojeném hadičkami v serii s druhým sáčkem, obsahujícím fibrinolytickou látku. Použije-li se takovýto systém, může pacient dostat nejprve injekci bolusu peptidu nebo jeho infuzi a potom infuzi fibrinolytické látky.

Farmakologická aktivita peptidů byla stanovena v následujících testech:

Inhibice agregace destiček in vivo

Inhibice tvorby krevní sraženiny je sledována in vivo tak, že se registruje systemický a hemodynamický účinek infuze peptidů u psů v narkoze podle metody popsané Aikenem a dalšími, Prostaglandins, 19, 629-43, 1980.

Inhibice agregace destiček

Dospělým psím míšencům bez premedikace byly odebrány vzorky krve, ke kterým byl přidán citrát, aby se zabránilo koagulaci. Plasma obohacená destičkami /POD/ byla připravena centrifugací při 150 x g 10 min při teplotě místnosti. Promyté destičky byly připraveny centrifugací POD při 800 x g 10 min. Takto získaný buněčný pelet byl dvakrát promyt Tyrodovým pufrům o pH 6,5 bez Ca^{++} a znovu suspendován v Tyrodově pufru o pH 7,4 s 1,8 mM Ca^{++} ; výsledná suspence měla 3×10^5 buněk/ml. Ve všech testech agregace destiček byly peptidy přidány 3 min před přidáním agonisty. Konečná koncentrace agonisty byla 0,1 jednotka trombinu/ml a 2 mM ADP /Sigma/. Agregace byla měřena v Chrono-Log Lumi-Aggregometru. Transmittance světla naměřené 5 min po přidání agonisty byla použita pro výpočet procent agregace podle vzorce

$$\% \text{ agregace} = \frac{[(90 - CR) + (90 - 10)]}{90} \times 100$$

kde CR je odečet ze záznamu, 90 je základní linie a 10 je odečet blanku POD. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny vynesáním inhibice agregace v procentech proti koncentraci peptidu. V testech byla použita základní koncentrace peptidu 200 mM a sestupná řada koncentrací ředěním na polovinu, aby byla získána odpovídající závislost účinku na dávce.

Stabilita peptidu v přítomnosti proteas v plasmě byla ověřována inkubací peptidu v POD po 3 hod před přidáním agonisty; v běžně prováděných testech agregace trvala pre-inkubace jenom 3 min.

Sloučeniny uvedené v Příkladech 1 - 21 se vyznačují hodnotou IC_{50} od 0,1 do 50 μM v testu agregace psích krevních destiček stimulované ADP. Sloučeniny uvedené v Příkladech 22, 24, 25 a 28 mají IC_{50} větší než 200 μM . Je s výhodou, mají-li sloučeniny hodnotu IC_{50} menší než 10 μM .

Následující příklady nemají sloužit k omezení vynálezu, ale mají ilustrovat, jak se dají připravit a užívat sloučeniny, které jsou předmětem vynálezu. Mnohé další možnosti se zřejmě nabízejí tomu, kdo má zkušenosti v tomto oboru.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech je teplota uváděná ve stupních Celsia. Analýza aminokyselin byla provedena na Dionex autoion 100. Analýza obsahu peptidů se zakládá na analýze aminokyselin. Hmotnostní spektrum bylo stanoveno pomocí hmotnostního spektrometru VG Zab, ostřelováním rychlými atomy. Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na deskách s tenkou vrstvou /0,25 mm/ silikagelu. ODS značí oktadecylsilylsilikagelový chromatografický nosič. Zkratky představující eluční činidla jsou n-BuOH: n-butanol, HOAc: kyselina octová, H₂O: voda, EtOAc: ethylacetát, i-ProH: isopropanol, P: pyridin a CA: kyselina chloroctová. Vysokotlaková kapalinová chromatografie ^{/HPLC/} byla prováděna na gradientovém chromatografickém systému/Beckman 344/ s registračním integrátorem /CRIB/

za použití izokratického nebo plynulého gradientu. Syntéza peptidů na nerozpustném nosiči byla prováděna pomocí automatizovaného syntetizátoru /Beckman 990/. Údaje o čistotě peptidů jsou založeny na integraci chromatogramu HPLC. MeArg byl připraven metodou popsanou Alim a dalšími, U.S. Patent 4 687 758, 1987.

Příklad 1

Příprava cyklo (S,S)-(2-merkpto)benzoyl-arginyl-glycyl-aspartyl-cysteinamidu /cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Cys-NH₂/

Obecný postup syntézy peptidu na nerozpustném nosiči benzhydrylaminové pryskyřici

Amidy peptidů byly syntetizovány za použití benzhydrylaminové pryskyřice jako nerozpustného nosiče. Chráněné aminokyseliny byly přidávány postupně od karboxylového konce až po dosažení požadovaného složení. Alfa-aminoskupina byla chráněna t-butyloxykarbonylovou skupinou /Boc/. Funkční skupiny postranního řetězce byly chráněny následujícími skupinami: arginin a histidin tosylovou /Tos/; cystein a 3-fenylcystein p-methylbenzyllovou /MBzl/ nebo ethylthiovou /SEt/; serin a threonin benzyletherovou /Bzl/; lysin p-chlorkarbobenzoxy /ClZ/; kyselina glutamová a asparagová benzylesterovou /OBzl/ nebo cyklohexylesterovou /C-cHex/; tyrosin p-bromkarbobenzoxy /BrZ/. Boc skupina byla odstraněna působením 50% kyseliny trifluoroctové /TFA/ v methylenchloridu. Sól aminu a TFA byla neutralizována působením 7% diisopropylethylaminu /DIEA/ v methylenchloridu. Amino-kyseliny byly navázány k narůstajícímu peptidu za použití tří ekvivalentů Boc-amino-kyseliny, tří ekvivalentů 1-hydroxybenzotriazolu /HOBt/ v DMF a tří ekvivalentů dicyklohexylkarbodiimidu /DCC/ v methylenchloridu. Ukončení kopulační reakce bylo ověřeno ninhydrinovým testem a reakce byla opakována, jak bylo potřeba. Celkový postup byl následující:

- | | |
|--|------------|
| 1. promýt methylenchloridem | 1 x 1 min |
| 2. promýt 50% TFA | 1 x 1 min |
| 3. odstranění chránicí skupiny 50% TFA | 1 x 20 min |

- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| 4. promýt methylenchloridem | 6 x 1 min |
| 5. neutralizovat pomocí 7% DIEA | 3 x 2 min |
| 6. promýt methylenchloridem | 4 x 1 min |
| 7. promýt dimethylformamidem | 2 x 1 min |
| 8. Boc-aminokyselina + HOBt v DMF | ponechat |
| 9. DCC v methylenchloridu | 2 hod |
| 10. promýt dimethylformamidem | 2 x 1 min |
| 11. promýt methylenchloridem | 3 x 1 min |

Při navázání prvního α -koncového zbytku na BHA pryskyřici se syntéza začíná u pátého kroku. Pro navázání všech následujících aminokyselin začíná syntéza prvním krokem.

a/ kyselina 2-S-ethylmerkaptobenzoová

K 50 ml hexanu promytého argonem bylo přidáno 3,7 ml /50 mmol/ a 4,0 ml /50 mmol/ sulfurylchloridu; roztok byl 30 min míchán. Po přidání 100 ml toluenu byla ihned přidána kyselina 2-merkaptobenzoová /7,71 g, 50 mmol/. Reakční směs byla míchána 3 hod při teplotě místnosti a pevný produkt byl vysrážen. Sedlina byla odfiltrována, usušena a chromatografována na silikagelu v ethylacetátu. Získalo se g /36% žlutohnědého pevného produktu.

b/ cyklo- S-S -Mba-Arg-Gly-Asp-Cys-NH₂

Chráněný meziprodukt peptid-pryskyřice, Mba(SET)-Arg(Tos)-Gly-Asp O-Bzl -Cys 4-MBzl -MBHA, byl syntetizován na nerozpustném nosiči 4-methylbenzhydrylaminové pryskyřici za použití automatizovaného syntetizátoru /Beckman 990/ v množství 1 mmolu. Všechny aminokyseliny byly na aminoskupině chráněny t-butyloxykarbonylem a byly postupně navazovány pomocí N,N-dicyklohexylkarbodiimidu/1-hydroxybenzotriazolu DCC/HOBt způsobem popsáným Ailem a dalšími, J.Med.Chem., 30, 2291, 1987 a J.Med.Chem. 29, 984, 1986. Po připojení poslední aminokyseliny se peptid od pryskyřice oddělil a zbavil ochranních skupin postranního řetězce pomocí 20 ml bezvodého HF v přítomnosti anisolu /2,0 ml/ při 0°C po 30 min.

Po odpaření HF ve vakuu byl zbytek promyt bezvodým etherem, surový peptid byl extrahován 0,2 M kyselinou octovou a extrakt byl zředěn na 2 l deionizovanou vodou. pH vodného roztoku bylo upraveno na hodnotu 8-9 koncentrovaným amoniakem. Roztok byl probublán dusíkem, aby se odstranil ethylmerkaptan. Proces cyklizace proběhl za 24 - 48 hod. Reakční směs byla lyofilizována a výtěžek byl 320 mg pevné látky. Chromatografie s obrácenými fázemi za středního tlaku /10% acetonitril/H₂O - 0,1% TFA/ poskytla částečně purifikovaný produkt. Další čištění pomocí filtrace na gelu Sephadex G-25 v 0,2 M kyselině octové poskytne požadovanou sloučeninu. MS(FAB) $[K+H]^+$ 583; TLC R_F 0,22 /n-BuOH: HOAc : H₂O : EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,48 /B:W:I:C, 65:20:15:3/; HPLC k' 2,2 /sloupec Vydac 218 TP ODS, 12% acetonitril/H₂O- 0,1% TFA, UV detekce při 220 nm/, k' 3,6 sloupec Vydac 218 TP ODS, gradient, A:acetonitril, B: H₂O-0,1% TFA; 0-50% A během 10 min, UV detekce při 220 nm/; obsah peptidu 45%; analýza aminokyselin: Asp /0,94/, Gly /1,00/, Arg /0,42/, Cys /0,53/.

Příklad 2

Příprava N^α-acetyl-cyklo(S,S)-cysteinyl-arginyl-glycyl-aspartyl-(2-merkapt)fenylamid /cyklo-(S,S)-Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Man/

a/ 2-(4-methylbenzyl)thioanilin /Man-4-MBzl/

K roztoku 2-thioanilinu /5,0 ml, 42 mmol/ v ethanolu /50 ml/ byl přidán triethylamin /5,9 ml, 423 mmol/ pod argonem. α-Bromo-p-xylen /7,78 g, 42 mmol/ v ethanolu /50 ml/ byl pak přidán po kapkách. Reakční směs se míchala 1 hod, byla zahuštěna ve vakuu na malý objem, zředěna bezvodým etherem a filtrována, aby se odstranil triethylaminydrombromid. Filtrát byl vysušen a produktem byl žlutý olej /5 g, 52%/.

Chromatografie /silikagel, 20% ethylacetát/hexan/ poskytla požadovanou sloučeninu jako žlutý olej /4,26 g/.

b/ Fmoc-Asp(O-t-Bu)-Man(4-MBzl)

Fmoc-Asp(O-t-Bu) /5,0 g, 122 mmol/ byl rozpuštěn v THF /50 ml/, N-methylmorpholin /1,3 ml, 118 mmol/ byl pak přidán a roztok byl ochlazen pod argonem v lázni s ethanolem a ledem po dobu 10 min. Potom byl přidán isobutylchloroform /1,6 ml, 123 mmol/, reakční směs byla míchána 5 min a pak následovalo přidání roztoku Man(4-MBzl) /2,8 g, 122 mmol/ v THF /50 ml/. Chlazená reakční směs byla míchána 40 min a při teplotě místnosti 4 hod. Vysrážená aminová sůl byla zfiltrována a filtrát byl odpařen za vzniku olejovité látky. Olej byl rozpuštěn v ethylacetátu /100 ml/, promyt 1 M HCl /2 x 50 ml/, nasyceným roztokem soli /1 x 50 ml/, 10% roztokem uhličitanu sodného /1 x 50 ml/ a nasyceným roztokem soli /1 x 50 ml/. Látka byla usušena bezvodým Na_2SO_4 a zahuštěna na oranžový olej. Krystalizací z methanolu byl získán požadovaný produkt jako bílá pevná látka /3,93 g, 26%/; teplota tání 129-130°C. H_2O

c/ Fmoc-Asp-Man(4-MBzl)

Směs Fmoc-Asp(O-t-Bu)-Man(4-MBzl) /3,5 g/ a 50% TFA v methylenchloridu /50 ml/ byla míchána při teplotě místnosti 45 min. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl vysrážen přidáním etheru. Sraženina byla usušena na vzduchu a výtěžek byla bílá pevná látka /2,23 g, 70%/; teplota tání 155-156°C.

d/ Fmoc-Asp(O-Bzl-pryskyřice)-Man(4-MBzl)

K nabobtnané a promyté hydroxymethyl^eové pryskyřici /1,0 g, 1 mmol, CH_2Cl_2 / byl přidán roztok Fmoc-Asp-Man(4-MBzl) /1,42 g, 2,5 mmol/ a DCC /10 ml, 0,3 M v CH_2Cl_2 / v dioxenu /25 ml/. Reakční směs byla míchána 18 hod a postupně promyta CH_2Cl_2 , směsí CH_2Cl_2 :EtOH, 1:1 a CH_2Cl_2 . Nezareagovaná hydroxymethyl^eová pryskyřice byla fixována pomocí benzoylchloridu /0,5 ml/ v CH_2Cl_2 po 30 min. Pryskyřice byla promyta stejným postupem jako dříve a usušena. Výtěžkem byl peptid vázaný na pryskyřici /1,16 g/.

e/ N^{α} -acetyl-cyklo(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Man

Chráněný meziprodukt peptidu navázaného na pryskyřici, Na-Ac-Cys(SET)-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-Bzl-pryskyřice)-Man(4-MBzl), byl připraven z Asp(O-Bzl-pryskyřice)-Man 4-MBzl pomocí metody použité u Příkladu 1b, postupným připojením Boc-Gly, Boc-Arg(Tos) a Boc-Cys(SET). Po připojení poslední aminokyseliny byla koncová Boc skupina odstraněna pomocí TFA a peptid byl acetylován za použití směsi acetanhydridu /10 ekv/ a diisopropylethylaminu /10 ekv/ v dimethylformamidu. Peptid byl pak odštěpen z pryskyřice, cyklizován a izolován stejným způsobem, jaký byl uveden u Příkladu 1b. Výtěžek činil 310 mg surového peptidu. Chromatografií za středního tlaku na sloupci ODS s obrácenými fázemi /10% acetonitril:H₂O - 0,1% TFA/ byl získán požadovaný peptid /24 mg/. MS/FAB $[M+H]^+$ 597,2; TLC R_F 0,57 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,23, /n-BuOH:H₂O:i-PrOH:CA 65:20:15:3/; HPLC k' = 4,9 /sloupec Vydac 218 Tp ODS, 10% acetonitril/H₂O - 0,1% TFA, UV detekce při 220 nm/, k' 4,5 /sloupec Vydac 218 Tp ODS, gradient A:acetonitril, B:H₂O-0,1% TFA, 0 - 50% A během 15 min, UV detekce při 220nm/. Obsah peptidu 44,6%. Analýza aminokyselin: Asp/1,00/, Gly/1,03/, Arg/0,24/, Cys/0,5/.

Příklad 3

Příprava cyklo(S,S)-(2-merkapt)benzoyl-(N^{α} -methyl)arginyl-glycyl-aspartyl-(2-merkapt)fenylamidu /cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Man/

Chráněný meziprodukt peptidu navázaného na pryskyřici, Mba(SET)-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-Bzl-pryskyřice)-Man(4-MBzl), byl připraven odštěpen a cyklizován stejným způsobem jako v Příkladu 2 v 1,3 mmolovém množství. Po ukončení cyklizace a přechodu vodného roztoku sloupcem Amberlitu XAD-2 /1:1 acetonitril:H₂O - 0,1% TFA/ byl roztok koncentrován a lyofilizován. Výtěžkem bylo 100 mg surového peptidu. Chromatografií za středního tlaku na sloupci ODS s obrácenými fázemi /30% acetonitril/H₂O - 0,1% TFA/ byl získán požadovaný

produkt/14 mg/. MS (FAB) m/e $[M+H]^+$ 602,3; TLC: R_f 0,63 ,
/n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/; HPLC k' 3,2 /sloupec Vydac
218 TP ODS, 20% acetonitril/H₂O - 0,1% TFA, detekce při 220
nm/, k' 2,3, /sloupec Vydac 218 TP ODS, gradient, A: aceto-
nitril, B: H₂O - 0,1% TFA, 20-50% A během 10 min, detekce
při 220 nm/; obsah peptidu 79%. Analýza aminokyselin:
Asp /1,00/, Gly /1,21/.

Příklad 4

Příprava cyklo-(S,S)-(2-merkaptobenzoyl-(N^ω-methyl)arginyl
glycyl-aspartyl-(2-merkaptofenylamidu [cyklo(S,S)-Mba-
MeArg-Gly-Asp-Man]

a/ Boc-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Ke studenému roztoku Boc-Asp(O-cHex), /31,5 g, 100 mmol/
v THF /500 ml/ a N-methylmorpholinu /13,1 g, 120 mmol/ byl
po kapkách přidán isobutylchloroformát /15,6 ml, 1,2 mmol/.
Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl přidán
roztok Man 4-MBzl /22,0 g, 96 mmol/ v THF /500 ml/. Reakč-
ní směs byla ochlázena na teplotu místnosti a míchána 18 hod.
Po skončení reakce byla reakční směs zfiltrována a filtrát
byl usušen. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu /500 ml/
a postupně promyt 5% vodným roztokem kyseliny citronové
/3 x 150 ml/, vodou /1 x 400 ml/, 10% roztokem NaHCO₃ ve vodě
/1 x 400 ml/, vodou /1 x 400 ml/ a nasyceným roztokem soli
/1 x 300/. Roztok byl vysušen bezvodým K₂CO₃^a zfiltrován.
Bylo získáno 53 g požadované sloučeniny.

b/ Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Boc-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl) /52 g/ byl smíchán s 50%
TFA/methylenchloridem /400 ml/ a ponechán 45 min při teplotě
místnosti. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl několik-
rát promyt methylenchloridem, aby se odstranily stopy TFA.
Produkt byl vysrážen jako TFA sůl přidáním ethe u. Sraženina
byla usušena na vzduchu. Výtěžkem byla bílá pevná látka
/46,7 g, 89%.

c/ Boc-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Ke studenému roztoku Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl) /46,7 g, 86,4 mmol/ v DMF /100 ml/ byl přidán diisopropylethylamin /15 ml, 86,1 mmol/. Potom byl přidán N-hydroxybenzotriazol /14,0 g, 104 mmol/ a dále Boc-Gly /16,6 g, 94,8 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána v chladu a pak byl přidán N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)karbodiimid /18,2 g, 94,9 mmol/. Reakční směs byla ponechána při teplotě místnosti a míchána 18 hod. Reakční směs byla zahuštěna na malý objem a nalita do 1,5 l 10% roztoku K_2CO_3 ve vodě. Vysrážený produkt byl shromážděn filtrací a promyt vodou do neutrálního pH. Bylo získáno 50,6 g požadované sloučeniny.

d/ Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Sloučenina, získaná postupem, popsáním v Příkladu 4c /11,7 g, 20 mmol/, byla smíchána s 80 ml 50% TFA/ CH_2Cl_2 tak, jak je uvedeno u Příkladu 4b. Výtěžek byl požadovaný produkt /12,4 g/.

e/ Boc-Me-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 4d /12,4 g, 20 mmol/ v DMF byl při 0°C přidán DIEA /3,6 ml, 20 mmol/. Potom byl přidán HOBt /3,4 g, 20 mmol/ následovaný Boc-N-MeArg(Tos) /10,1 g, 22 mmol/. Reakční směs byla míchána několik minut a pak byl po částech přidán EDC /4,4 g, 22 mmol/. Reakční směs byla ponechána při teplotě místnosti a míchána 18 hod. Reakční směs byla zahuštěna na malý objem a nalita do 10% roztoku K_2CO_3 ve vodě. Vysrážený produkt byl získán filtrací a promyt vodou do neutrálního pH. Výtěžek činil 20,4 g požadované sloučeniny.

f/ MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Sloučenina získaná v Příkladu 4e /17,7 g, 19,5 mmol/ byla smíchána s 50% TFA/ CH_2Cl_2 /80 ml/ jako v Příkladu 4b. Byla získána TFA sůl požadované sloučeniny.

g/ Mba(SET)-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

Ke studenému roztoku sloučeniny^z Příkladu 4f /20 mmol/ v DMF /20 ml/ byl po kapkách přidán DIEA /3,5 ml, 22 mmol/. Potom byl postupně přidán Mba(SET) /4,6 g, 22 mmol/, EDC /4,2 g, 22 mmol/ a 4-N,N-dimethylaminopyridin /DMAP/ /2,9 g, 24 mmol/. Reakční směs byla při teplotě místnosti míchána dalších 24 hod. Pak byl přidán další podíl Mba(SET) /4,6 g, 22 mmol/, DMAP /2,9 g, 24 mmol/ a EDC /4,2 g, 22 mmol/ a míchání pokračovalo dalších 24 hod, aby reakce byla úplná. Reakční směs byla zahuštěna, zbytek byl rozpuštěn v CH₂Cl₂, roztok byl postupně promýván vodou, 5% roztokem kyseliny citronové ve vodě, vodou a nasyceným solným roztokem. Organické extrakty byly usušeny bezvodým Na₂SO₄, zfiltrvány a zkoncentrovány na pevný zbytek /19,1 g/. Chromatografií na silikagelu v 10% MeOH/CH₂Cl₂ byla získána požadovaná sloučenina /3,0 g/.

h/ cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Man

Chráněný lineární peptid z Příkladu 4g /8,5 g, 8,5 mmol/ byl vystaven působení bezvodého HF /30 ml/ a anisolu /8,5 ml/ při 0°C po dobu 1 hod. HF byl odstraněn při 0°C ve vakuu a odparek byl promyt etherem. Výtěžkem bylo 5,0 g žlutohnědé pevné látky. Pevná látka byla rozpuštěna ve vodě /16 l/ a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,0 amoniakem. Roztok byl probubláván dusíkem, aby se odstranil vzniklý ethylmerkaptan. Po 7 dnech byl vodný roztok přečištěn na sloupci Amberlitu XAD-2 /50% methanol/H₂O /. Po lyofilizaci byl výtěžek 3,0 g. Látka byla dále purifikována rychlou chromatografií /za středního tlaku na sloupci ODS s obrácenými fázemi /20% acetonitril/H₂O-0,1% TFA/ a výtěžek byl 2,3 g částečně purifikovaného materiálu. Konečná purifikace pomocí gelové filtrace na Sephadexu G-15 v 0,2 M kyselině octové poskytla požadovanou sloučeninu /1,0 g/.

Příklad 5

Příprava cyklo(S,S)-(2-merkaptobenzoyl-(N^α-methyl)arginyl-glycyl-aspartyl-(3-fenyl)cysteinamidu /cyklo-(S,3)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Pcs/

Diastereoisomerní 3-fenylcystein byl připraven podle metody popsané Nagai a další, v Peptide Chemistry, ed.M. Ueki, Proceedings of the 26th Symposium on Peptide Chemistry, Tokyo, October 24-26, 1988, Protein Research Foundation, Minoh-shi, Osaka, pages 247-52. Pomocí standardních metod je tento materiál přeměněn na S-(4-methoxyfenyl)-N-(t-butoxykarbonyl)-3-fenylcystein. Chráněný meziprodukt peptid-pryskyřice, Mba(SEt)-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-Bzl)-Pcs(4-MBzl)-MBHA, byl syntetizovaný na pevném nosiči 4-methylbenzhydrylamínové pryskyřici. Všechny aminokyseliny byly chráněny t-butyl-oxykarbonylem na aminoskupině a byly postupně připojovány metodou, která užívá N,N-dicyklohexylkarbodiimid/1-hydroxybenzotriazol /DCC/HOBt/, jak bylo ukázáno v Příkladu 1. Po připojení poslední aminokyseliny byl peptid odštěpen z pryskyřice za odstranění ochránících skupin postranních řetězců za použití bezvodého HF /20 ml/ v přítomnosti anisolu /2,0 ml/ při 0°C po dobu 30 min. Po odpaření HF ve vakuu se odparek promyje bezvodým etherem, surový peptid se extrahuje 0,2 M kyselinou octovou a extrakt se zředí deionizovanou vodou na 2 l. pH vodného roztoku se upraví na hodnotu 7 - 8 koncentrovaným amoniakem a roztok se 24 - 48 hod probublává dusíkem. Po lyofilizaci reakční směsi byl získán surový produkt, který byl podroben chromatografii za středního tlaku na sloupci s obrácenými fázemi /acetonitril/H₂O-0,1% TFA/, aby byl získán požadovaný produkt.

Příklad 6

Příprava cyklo-(S,S)-Mba-S^α-Arg-Gly-Asp-Men

a/ Boc-Asp(OtHex)-Men(4-MBzl)

Ke studenému roztoku Boc-Asp(OtHex) /31,5 g, 100 mmol/

a N-methylmorpholinu /13,1 g, 120 mmol/ v THF /500 ml/ byl po kapkách přidán isobutylchloroformat /15,6 ml, 1,2 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl přidán roztok Man 4-Bzl /22,0 g, 96 mmol/ v THF /500 ml/. Reakční směs byla 18 hod míchána při teplotě místnosti. Po ukončení reakce /monitorováno pomocí TLC/ byla sůl aminu odfiltrována a filtrát byl vysušen. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu /500 ml/ a postupně promyt 5% roztokem kyseliny citronové ve vodě /3 x 150 ml/, vodou /1 x 400 ml/, vodným roztokem NaHCO_3 /1 x 300 ml/, vodou /1 x 400 ml/ a nasyceným solným roztokem /1 x 30 ml/. Roztok v organickém rozpouštědle byl vysušen pomocí bezvodého K_2CO_3 , zfiltrován a koncentrován. Výtěžek požadovaného produktu byl 53 g.

b/ Asp(C-cHex)-Man(4-MBzl)

Boc-Asp(C-cHex)-Man(4-MBzl), /1/ /52 g/ byl smíchán s 50% roztokem TFA v methylenchloridu /400 ml/ a ponechán 45 min při teplotě místnosti. Rozpouštědlo bylo odstraněno a odparek byl několikrát azetropován z methylenchloridu, aby se odstranily stopy TFA. Produkt byl vysrážen přidáním etheru, pevná látka byla usušena na vzduchu a výtěžkem byla bílá pevná látka /46,7 g, 88%.

c/ Boc-Gly-Asp(C-cHex)-Man(4-MBzl)

Ke studenému roztoku sloučeniny z Příkladu 6b /46,7 g, 86,4 mmol/ v DMF /100 ml/ byl přidán DIEA /15 ml, 86,1 mmol/, aby bylo pH upraveno na neutrální. Po přidání HOBt /14,0 g, 104 mmol/ byl přidán Boc-Gly /16,6 g, 94,8 mmol/. Reakční směs byla v chladu několik minut míchána a pak byl po částech přidán EDC /18,2 g, 94,9 mmol/. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti, pak byla zahušťována na malý objem a nalita do 1,5 l 10% roztoku K_2CO_3 ve vodě. Vysrážený produkt byl získán filtrací a promyt vodou. Výtěžek požadované sloučeniny byl 50,6 g.

d/ Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

/80 ml/

Působením 50% TFA na sloučeninu z Příkladu 6c /2,92g, 5 mmol/ podle postupu popsaném v Příkladu 6b bylo získáno 2,93 g /98%/ požadované sloučeniny.

e/ Boc-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6d /1,4 g, 2,3 mmol/ v DMF /4 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /410 μ l, 2,3 mmol/, aby se upravilo pH na neutrální. Po přidání HOBt /380 mg, 2,76 mmol/ byl ještě přidán Boc-Arg Tos /1,2 g, 1,32 mmol/. Reakční směs byla míchána za chladu několik minut a pak byl po částech přidán EDC /493 mg, 1,32 mmol/. Reakční směs byla ponechána při teplotě místnosti a míchána 18 hod. Reakční směs pak byla odpařena, odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K₂CO₃ /2 x /, vodou /1 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým K₂CO₃, zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek byl 1,91 g požadované sloučeniny.

f/ Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K sloučenině z Příkladu 6e /1,9 g, 2,1 mmol/ byl přidán 50% TFA /10 ml/ podle postupu uvedeném u Příkladu 6b. Výtěžek požadované sloučeniny byl 1,59 g/.

g/ Boc-Sar-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6f /0,8 g 2,3 mmol/ v DMF /2 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /153 μ l/, aby se dosáhlo neutrálního pH. Po přidání HOBt /143 mg, 2,76 mmol/ byl přidán Boc-Sar /183 mg, 2.53. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl po částech přidán EDC /186 mg, 2,53 mmol/. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti. Potom byla směs odpařena, zbytek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/

10% K_2CO_3 /2 x/ , vodou /1 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým K_2CO_3 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek požadované látky byl 0,78 g/.

h/ Sar-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K sloučenině z Příkladu 6g /780 mg, 0,8 mmol/ byl přidán 50% TFA /5 ml/ podle postupu uvedeném v Příkladu 6b. Výtěžek požadované látky byl 500 mg.

i/ Mba(SET)-Sar-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6 h /0,85 g, 0,5 mmol/ v DMF /2 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /89 μ l/, aby bylo dosaženo neutrálního pH. Po přidání HOBt /248 mg, 1,8 mmol/ byl přidán Mba(SET) /334 mg, 0,55 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl po částech přidán EDC /353 mg, 0,55 mmol/. Reakční směs byla při teplotě místnosti míchána 18 hod. Směs byla pak odpařena a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K_2CO_3 /2 x /, vodou /1 x/, 5% kyselinou citronovou /2 x /, vodou /3 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek požadované sloučeniny byl 0,45 g.

j/ cyklo(S,S)-Mba-Sar-Arg-Gly-Asp-Man

Chráněný lineární peptid z příkladu 6i /423 mg/ byl vystaven působení bezvodého HF /10 ml/ v přítomnosti anisolu /1 ml/ 1 hod při 0°C. HF byl pak odstraněn ve vakuu při 0°C a odparek byl rozetřen s etherem. Směs byla usušena ve vakuu. Výtěžkem bylo 235 mg surového cyklizovaného peptidu. Peptid byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek částečně vyčištěné požadované sloučeniny byl 65 mg. Alikvot /18 mg/ této látky přečištěn pomocí preparativní HPLC /5 μ Altex

Ultrasphere ODS, 10 mm x 25 cm, 20% acetonitril/voda - 0,1% kyselina trifluorctová, UV detekce při 220 nm/ a výtěžkem byla přečištěná požadovaná sloučenina /6,0 mg/. MS /FAB/ m/e 65,1 $[M+H]^+$; HPLC k' 6,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 4,5 mm x 25 cm, gradient, A: acetonitril, B: voda -0,1% kyselina trifluorctová, 10%-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 6,9 /Altex Ultrasphere ODS, 20% acetonitril/voda-0,1% trifluorctová kyselina, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /1,03/, Arg /1,11/.

Příklad 7

Příprava cyklo-(S,S)-Mba-Sar-MeArg-Gly-Asp-Man

a/ Boc-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6d /0,6 g, 1,0 mmol/ v DMF /42 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /130 μ l, 2,2 mmol/, aby se upravila hodnota pH na neutrální. Po přidání HOBt /165 mg, 1,2 mmol/ byl přidán Boc-MeArg(Tos) /0,5 g, 1,1 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl přidán EDC /210 mg, 1,2 mmol/. Reakční směs byla potom 18 hod míchána při teplotě místnosti. Po usušení byl odparek rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K_2CO_3 /2 x/, vodou /1 x/, 5% kyselinou citrónovou /2 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek činil 780 mg /86% požadované sloučeniny.

b/ MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K sloučenině z Příkladu 7a /789 mg, 0,86 mmol/ byl přidán 50% TFA /4 ml/ podle postupu popsáném v Příkladu 6b a byla získána požadovaná sloučenina.

c/ Boc-Sar-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 7b /0,8 g, 0,86 mmol/ v 2 ml DMF, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /153 ul/, aby se dosáhlo neutrálního pH. Po přidání HOBt /143 mg, 1,03 mmol/ byl přidán Boc-Sar /183 mg, 0,95 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl přidán EDC /186 mg, 0,95 mmol/. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti. Reakční směs byla odpařena a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K₂CO₃ /2 x/, vodou /1 x/, 1 N HCl /1 x/, vodou /3 x/ a nasyceným roztokem soli /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek byl 0,65 g požadované sloučeniny.

d/ Sar-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K sloučenině z Příkladu 7c /650 mg, 0,8 mmol/ byl přidán 50% TFA /5 ml/ podle postupu uvedeném u Příkladu 6b. Výtěžek činil 510 mg požadované sloučeniny.

e/ Mba(SET)-Sar-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6d /0,5 g, 0,5 mmol/ v DMF /2 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /120 ml, 0,6 mmol/, aby se dosáhlo neutrálního pH. Po přidání HOBt /150 mg, 0,55 mmol/ byl přidán Mba(SET) /394 mg, 0,55 mmol/. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl po částech přidán EDC /260 mg, 0,55 mmol/. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a pak odpařena. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K₂CO₃ /2 x/, vodou /1 x/, 5% kyselinou citronovou /2 x/, vodou /3 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zconcentrován. Výtěžek činil 0,46 g požadované sloučeniny.

f/ cyklo-(S,S)-Mba-Sar-MeArg-Gly-Asp-Man

Chráněný lineární peptid z Příkladu 7d /450 mg/ byl uveden do reakce s bezvodým HF /10 ml/ v přítomnosti 1 ml anisolu při 0°C. Za 1 hod byl HF odstraněn ve vakuu a odparek byl rozetřen s etherem. Pevná látka byla usušena ve vakuu. Výtěžkem byl surový cyklizovaný peptid /268 mg/. Další čištění probíhalo gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Příslušné frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem byl částečně purifikovaný peptid. Alikvot /65 mg/ tohoto produktu byl dále purifikován pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 10 mm x 25 cm, 20% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek požadované sloučeniny činil 6,9 mg. MS /FAB/ m/e 673,2 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,68 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,74 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 11,8 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A:acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 10-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 8,6 /Altex Ultrasphere ODS, 20% acetonitril/voda- 0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,34/, Gly /1,00/.

Příklad 8

Příprava cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Man

a/ Mba(SET)-Arg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 6f /0,80 g, 0,88 mmol/ v DMF /2 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA, aby bylo pH upraveno na neutrální. Potom byl přidán Mba SET /380 mg, 0,97 mmol/, reakční směs byla několik min míchána, pak byl přidán EDC /340 mg, 0,97 mmol/ a 4-dimethylaminopyridin /215 mg/. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a potom usušena. Odparek byl smíchán s ethylacetátem a postupně promyt vodou /1 x/, 10% K₂CO₃ /2 x/, vodou /1 x/, 5% kyselinou citrónovou /2 x/, vodou

/3 x/ a nasyceným solným roztokem /1 x/. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek činil 0,41 g požadované sloučeniny.

b/ cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Man

Na chráněný lineární peptid Příkladu 8b /223 mg/ bylo působeno bezvodým HF /10 ml/ v přítomnosti 1 ml anisolu i hod při 0°C. Potom byl HF odpařen za vakua při 0°C a odparek byl rozetřen s etherem. Pevná látka byla usušena ve vakuu. Výtěžek činil 22 mg surového cykлизovaného peptidu. Jeho alikvot /20 mg/ byl přečištěn na HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 10 mm x 25 cm, 18% acetonitril/voda-0,1% trifluoroctová kyselina, UV detekce při 220 nm/. Výtěžkem bylo 5,0 mg čištěné požadované sloučeniny. MS /FAB/ m/e 588 $[\text{M}+\text{H}]^+$; TLC R_f 0,68 /n-BuOH:HOAc:H₂O: EtOAc 1:1:1:1/; a 7,70 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% trifluoroctová kyselina, 10%-50% acetonitril v 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 3,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 20% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /0,81/, Gly /1,28/, Arg /1,00/.

Příklad 9

Příprava cyklo-(S,S)-Mba-D-MeArg-Gly-Asp-Man

a/ Boc-D-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku sloučeniny z Příkladu 7 d /0,6 g, 1,0 mmol/ v DMF /42 ml/, vychlazeném na 0°C, byl přidán DIEA /130 μ l, 2,2 mmol/, aby bylo pH upraveno na neutrální hodnotu. Pak bylo přidáno 202 mg, 1,5 mmolu HOBt a následovalo 0,663 g 1,5 mmolu Boc-D-MeArg(Tos). Peakční směs byla několik min míchána a potom bylo přidáno 288 mg, 1,5 mmolu TDC. Peakční směs byla ochlázena na teplotu místnosti, míchána 18 hod a

pak odpařena. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt 1 x vodou, 2 x K_2CO_3 , vodou 1 x, 2 x 5% kyselinou citronovou, 3 x vodou a 1 x nasyceným roztokem soli. Ethylacetátový extrakt byl usušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a koncentrován. Výtěžek činil 500 mg požadované sloučeniny.

b/ D-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K sloučenině z Příkladu 9a /500 mg, 0,5 mmol/ bylo přidáno 5 ml 50% TFA podle postupu popsaného v Příkladu 6 b. Výtěžkem bylo 658 mg požadované sloučeniny.

c/Mba(3Et)-D-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-Man(4-MBzl)

K roztoku 658 mg, 0,71 mmolu sloučeniny z Příkladu 9b ve 4 ml DMF bylo přidáno 120 ml, 0,85 mmolu DIEA, aby bylo pH upraveno na neutrální. Potom bylo přidáno 306 mg, 1,42 mmolu Mba(3Et), reakční směs byla několik minut míchána a pak bylo přidáno 274 mg, 1,42 mmolu EDC a 174 mg, 1,42 mmolu 4-dimethylaminopyridinu. Reakční směs byla míchána 16 hod při teplotě místnosti a zahuštěna. Zbytek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt 1 x vodou, 2 x 10% K_2CO_3 , 1 x vodou, 2 x 5% kyselinou citronovou, 3 x vodou a 1 x nasyceným solným roztokem. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek činil 0,37 g požadované sloučeniny.

d/ cyklo-(S,S)-Mba-D-MeArg-Gly-Asp-Man

K 370 mg chráněného lineárního peptidu z Příkladu 9c bylo při 0°C přidáno 10 ml bezvodého HF v přítomnosti 1 ml anisolu. Po 1 hod byl HF odstraněn ve vakuu a zbytek byl zbytek rozetřen s etherem. Pevná látka byla usušena ve vakuu. Výtěžek činil 246 mg surového cyklizovaného peptidu, který byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1N kyselině octové/vodě. Příslušné frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 13 mg čištěné požadované sloučeniny. MS /FAB/ m/e 602 $[K+H]^+$; TLC R_f 0,74

/n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,68 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 6,7 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina tri-fluoroctová, 10-50% acetonitrilu za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 6,1 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 21% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /1,21/.

Příklad 10

Příprava cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-N-Me-Man

a/ 2-N-Methylaminofenyldisulfid

K roztoku 8,0 g, 0,44 mmolu 3-methylbenzothiazolu ve 100 ml ethanolu bylo přidáno 14,5 g, 0,26 mmolu pevného hydroxidu draselného. Reakční směs byla 10 hod vařena pod zpětným chladičem a pak ponechána při teplotě místnosti přes noc. Rozpouštědlo bylo odstraněno a odparek byl rozdělen mezi ethylacetát a vodný roztok hydroxidu sodného o pH 12. Vodná fáze byla okyselena koncentrovanou HCl na pH 8, extrahována ethylacetátem, usušena, sfiltrována a zahuštěna. Výtěžkem byly 3 g volného thiolu ve formě oleje. Olej byl rozpuštěn v ethylacetátu a roztok byl 90 min probubláván vzduchem. Organický roztok byl zahuštěn a výtěžek činil 2,65 g požadované sloučeniny ve formě oleje.

b/ N-MeMan(4-MBzl)

K roztoku 2,65 g, 0,6 mmolu sloučeniny z Příkladu 10a ve 150 ml ethanolu bylo po částech přidáno 0,26, 0,6 mmolu tetrahydroboritanu sodného. Tím bylo dosaženo úplné redukce. K reakční směsi byl pak přidán roztok 3,5 g, 19,2 mmolu α-bromxyleny v ethanolu a směs byla přes noc míchána při teplotě místnosti. Přebytek tetrahydroboritanu sodného byl odfiltrován a filtrát byl chromatografován na silikagelu v 20 ethylacetátu-hexanu. Výtěžek činil 1,8 g požadované sloučeniny.

c/ Boc-Asp(O-cHex)-N-MeMan 4-MBzl

Ke studenému roztoku 1,4 g, 4,5 mmolu Boc-Asp(O-cHex) a 0,59 ml, 5,3 mmolu N-methylmorfolinu v 20 ml THF bylo po kapkách přidáno 0,69 ml, 5,3 mmolu isobutylchloroformatu. Reakční směs byla několik minut míchána a pak byl přidán roztok 1,0 g, 4,1 mmolu N-Me-Man 4-MBzl ve 3 ml THF. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti. Po skončení reakce byla sůl aminu odstraněna filtrací a filtrát byl vysušen. Odparek byl chromatografován na silikagelu v 20-30% ethylacetátu/hexanu. Výtěžek činil 0,95 g požadované sloučeniny.

d/ Asp(O-cHex)-N-MeMan(4-MBzl)

K 0,88 g, 1,6 mmolu Boc-Asp(O-cHex)-N-Me-Man(4-MBzl) byl přidán 50% roztok TFA v 5 ml methylenchloridu a směs byla ponechána 45 min při teplotě místnosti. Rozpuštědlo bylo odstraněno a methylenchlorid byl několikrát odpařen, aby se odstranily zbytky TFA. Produkt byl vysrážen přidáním etheru. Sraženina byla usušena na vzduchu. Výtěžkem byla požadovaná sloučenina v podobě bílé pevné látky.

e/ Boc-Gly-Asp(O-cHex)-N-Me-Man(4-MBzl)

Ke studenému roztoku 880 mg, 1,6 mmolu sloučeniny z Příkladu 10d v 5 ml DMF bylo přidáno 285 μ l DIEA, aby bylo dosaženo neutrální pH. Po přidání 300 mg, 1,92 mmolu HOBt bylo přidáno 340 mg, 1,92 mmolu Boc-Gly. Reakční směs byla několik minut v chladu míchána a pak bylo přidáno 375 mg, 1,92 mmolu EDC po částech. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a potom usušena. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt 1 x vodou, 2 x 10% K_2CO_3 , 1 x vodou a 1 x nasyceným solným roztokem. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek činil 980 mg požadované sloučeniny.

f/ Gly-Asp(O-cHex)-N-MeMan(4-MBzl)

K 1,3 g, 1,9 mmolu sloučeniny z Příkladu 10e bylo přidáno 10 ml 50% TPA podle postupu popsaném v Příkladu 6b a byla tak získána požadovaná sloučenina.

g/ Boc-MeArg(Tos)-Gly-Asp(C-cHex)-N-MeMan(4-MBzl)

K roztoku 1,9 mmolu sloučeniny z Příkladu 10f ve 4 ml DMF, vychlazeném na 0°C, bylo přidáno 330 µl DIEA, aby bylo dosaženo neutrální pH. Po přidání 318 mg, 2,1 mmolu bylo přidáno 320 mg, 2,1 mmolu Boc-Me-Arg Tos. Reakční směs byla několik minut míchána a pak bylo přidáno 400 mg, 2,13 mmolu EDC. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a pak usušena. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt 1 x vodou, 2 x K₂CO₃, 1 x vodou a 1 x nasyceným solným roztokem. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek požadované sloučeniny byl 1,7 g.

h/ MeArg(Tos)-Gly-Asp(C-cHex)-N-MeMan(4-MBzl)

K 1,7 g sloučeniny z Příkladu 10g bylo přidáno 15 ml 50% TPA podle postupu popsaném v Příkladu 6b. Výtěžek požadované sloučeniny byl 1,36 g, 80%.

i/ Mba(SET)-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-NMeMan

K roztoku 1,3 g, 1,4 mmolu sloučeniny z Příkladu 10h ve 2 ml DMF, vychlazeném na 0°C bylo přidáno 250 µl DIEA, aby bylo dosaženo neutrálního pH. Potom bylo přidáno 550 mg, 2,3 mmolu Mba(SET), reakční směs byla několik minut míchána, pak bylo přidáno 340 mg, 1,54 mmolu EDC a později 350 mg 4-dimethylaminopyridin. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a pak zahuštěna. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a postupně promyt 1 x vodou, 2 x 10% K₂CO₃, 1 x vodou, 2 x 5% kyselinou citrónovou, 3 x vodou a 1 x nasyceným solným roztokem. Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zkoncentrován. Výtěžek požadované sloučeniny činil 1,5 g.

j/ cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-N-MeMan

K 800 mg chráněného linárního peptidu z Příkladu 10i bylo přidáno 10 ml bezvodého HF a 1 ml anisolu při 0°C. Po 1 hod byl HF odstraněn při 0°C ve vakuu a zbytek byl rozetřen s etherem. Pevná látka byla usušena ve vakuu. Výtěžek činil 628 mg surového cyklizovaného peptidu. Peptid byl přečištěn chromatografií na ODS silikagelu v 20% acetonitrilu/ vodě-0,1% TFA 20 mg poíl byl přečištěn pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 10 mm x 25 cm, 18% acetonitril/voda-0,1% trifluorooctová kyselina, UV detekce při 220 nm. Výtěžkem bylo 5 mg čisté požadované sloučeniny. MS /FAB/ m/e 616,2 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,82 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,77 /n-BuOH:HOAc:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 10,5 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% trifluorooctová kyselina, 10 - 50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm, k' 3,3 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 23% acetonitril/voda -0,1% trifluorooctová kyselina, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /1,05/.

Příklad 11

Příprava N^{Ac}-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-(2R,3S)Poc-NH₂

Pryskyřice s chráněným pentapeptidem Boc-Cys(SEt)-MeArg(Tos)-Gly-Asp(O-cHex)-(2R,3S)-3-phenylcystein(4MBzl)-MeBHA byla připravena podle Příkladu 1 v 0,5 mmolárním množství. Po odstranění N-terminální Boc skupiny 50% TFA v methylenchloridu a neutralizaci výsledné soli s TFA 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid navázaný na pryskyřici acetylován 0,47 ml acetanhydridu a 0,86 ml DIEA v methylenchloridu /20 ml/ 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice za současného odstranění chránících skupin postranních řetězců působením 10 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 1 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla

pak extrahována 1% kyselinou octovou/vodou /2 x 30 ml/ a 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na 1 l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,65 přidáním koncentrovaného amoniaku. Cyklizace bylo dosaženo probubláváním inertním plynem, například argonem, v němž volná sulfhydrylová skupina vytvořená odštěpením chránicí MBzl skupiny síry vytěsnila SEt skupinu chránicí druhou síru. Proces cyklizace trval 48 - 72 hod. Roztok byl podroben chromatografii na CDS silikagelu za použití stupňového gradientu a/ voda b/ 12% acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, vysušeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové / vody. Výtěžek činil 80 mg požadovaného čistého peptidu. MS /FAB m/e 682,2 $[M+H]^+$; TLC R_F 0,56 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,61 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 13,1 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 5,7 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 15% acetonitril/voda- 0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /0,97/, Gly /1,00/, Cys /1,00/, Cys /0,38/, β -fenyl-Cys /0,63/.

Příklad 12

Příprava N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-(2R,3R)Pcs-NH₂

Pryskyřice s chráněným pentapeptidem Boc-Cys(SEt)-MeArg(Tos)- Gly-Asp(O-cHex)-(2R,3R)-3-fenylcystein(4MBzl)-MeBHA byla připravena podle Příkladu 1 v množství 0,5 mmol. Po odstranění N-terminální Boc skupiny 50% TFA v methylenchloridu a neutralizací výsledné soli s TFA 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid navázaný na pryskyřici acetylován 0,47 ml acetanhydridu a 0,86 ml DIEA ve 20 ml methylenchloridu po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice za současného odstranění chránicích skupin postranních řetězců působením 10 ml bezvodého HF v přítomnosti 1 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min.

Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Potom byla pryskyřice extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a ještě 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny na 1 l deionizovanou vodou. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,65 přidáním amoniaku. Cyklizace bylo dosaženo probubláváním roztoku argonem; argon odežene ethanthiol uvolněný tím, že volná sulfhydrylová skupina Pcs nukleofilně vytěsňuje SEt skupinu, která chrání sulfhydrylovou skupinu cysteinu. Po 72 hod byl roztok chromatografován na ODS silikagelu, v postupném gradientu: a/ voda b/ 11% acetonitril/voda-0,1% TFA. Odpovídající frakce byla spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/vody. Výtěžkem bylo 32 mg požadovaného peptidu. MS /FAB/ m/e 682 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,70 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, 0,67 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 8,35 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, gradient. A:acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril ze 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 4,45 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 12% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin. Asp /1,00/, Gly /0,26/, Cys /0,33/, β -fenylylCys /0,56/.

Příklad 13

Příprava N^αAc-cyklo-/S,S/-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂

Pryskyřice s chráněným deka-peptidem Boc-Cys/MBzl/-Arg/Tos/-Gly-Asp/O-cHex/-Ser/Bzl-Cys/SEt/-MeBHA byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-termi-nální Boc skupiny pomocí 50% TFA v methylenchloridu a neutra-lizací vzniklé soli TFA přidáním 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován 40 min v přítomnosti 0,95 ml acetanhydridu a 1,72 ml DIEA v 30 ml DMF

Peptid byl odštěpen z pryskyřice na odstranění ochranných skupin postranních řetězců působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min.

Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na objem 2l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,65 přidáním amoniaku a reakční směs byla 72 hod probublávána argonem. Roztok byl chromatografován na ODS silikagelu za použití stupňového gradientu: a/ voda b/ acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z kyseliny octové/vodý. Výtěžek činil 300 mg, 80% částečně čištěného peptidu. Podíl 172 mg byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v systému 1% kyselina octová/voda. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 74 mg požadované sloučeniny. MS /FAB/ m/e 1094,3 $[M+H]^+$; TLC R_F 0,25 /n-BuOH: HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,37 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 7,5 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 4,3 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /2,03/, Gly /2,07/, Cys /2,03/, Ser /1,01/, Arg /1,02/.

Příklad 14

Příprava N^αAc-cyklo-/S,S/-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Pen-NH₂

Pryskyřice s chráněným deka-peptidem Boc-Cys/SEt/-Arg/Tos/-Gly-Asp/C-cHex/-Ser/Bzl/-Arg/Tos/-Gly-Asp/O-cHex/-Ser/Bzl/-Cys/4MBzl/-MeBHA byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1,0 mmolu. Po odstranění N-terminální Boc skupiny působením 50% TFA v methylenchloridu a neutralizací výsledné soli TFA pomocí 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován působením 0,24 ml acetenhydridu a 1,72 ml DIEA v 30 ml DMF po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice se současným odstraněním

chránících skupin z postranních řetězců působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla extrahována nejdříve 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na objem 2 l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,65 amoniakem a reakční směs byla 72 hod probublávána argonem. Potom byl roztok chromatografován na ODS silikagelu za použití stupňového gradientu: a/ voda b/ 5% acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/vody. Výtěžek činil 800 mg, 80% částečně přečištěného peptidu. Podíl /172 mg/ byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15, v 1% kyselině octové/vodě: Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 74 mg čisté požadované látky. MS /FAB/ m/e 1094,2 $[M+H]^+$; TLC R_F 0,25 /n-BuOH:H₂O:EtOAc 1:1:1/, R_F 0,37 /n-BuOH:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 7,5 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% TFA, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 4,3 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 5% acetonitril/voda-0,1% trifluoroctová kyselina, UV detekce při 220 nm/. Analýzy aminokyselin: Asp /2,00/, Gly /2,07/, Cys /2,09/, Ser /1,91/, Arg /1,89/.

Příklad 14

Příprava N^α-Ac-cyklo-/S,S/-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Pen-NH₂

Pryskyřice s chráněným deka-peptidem Boc-Cys/SEt/-Arg/Tos/-Gly-Asp/O-cHex/-Ser/Bzl/-Arg/Tos/-Gly-Asp/O-cHex/-Ser/Bzl/-Cys/4MBzl/-MeBNA byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-terminální Boc skupiny působením 50% TFA v methylenchloridu a neutralizací vzniklé soli TFA pomocí 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován působením 0,94 ml acetanhydridu a 1,72 ml DIEA v 30 ml DMF po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice za odstranění ochranných skupin postranních řetězců působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a potom ještě 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na objem 2 l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,5 - 8,0 přidáním emoniaku a reakční směs byla probublávána 72 hod argonem. Roztok byl chromatografován na CDS silikagelu v stupňovém gradientu: a/ voda b/ 6% acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odpařek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/vody. Výtěžek činil 1,0 g, 100% surového peptidu. Podíl 106 mg byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové /vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 90 mg částečně vyčištěného peptidu. Podíl 60 mg tohoto peptidu bylo čištěno HPLC /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 7% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek činil 56 mg požadované čisté látky. MS /FAB/ m/e 1122,6 $[X+H]^+$; TLC R_{f0} ,34 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,42 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 3,18 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 7,1 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 6,5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /2,00/, Gly /2,21/, Cys+Pen /1,66/, Ser /1,96/, Arg /2,16/.

Příklad 15

Příprava N^αAc-cyklo-/S,S/-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-MeArg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂

Pryskyřice s chráněným decapeptidem Boc-Cys/SEt/-Arg/Tos/-Gly-Asp/C-CHex/-Ser/Bzl/-MeArg/Tos/-Gly-Asp/C-CHex/-Ser/Bzl/-Cys/4MBzl/-MeNH₂ byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-terminální Boc skupiny působením

50% TFA v methylenchloridu a neutralizaci vzniklé soli TFA pomocí 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován působením 0,94 ml acetanhydridu a 1,72 ml DIEA v 30 ml DMF po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice za odstranění skupin, chránících postranní řetězce, působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla extrahována nejdříve 1% kyselinou octovou/vodou /2 x 30 ml/ a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na 1,5 l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,9 přidáním amoniaku a reakční směs byla 72 hod probublávána argonem. Roztok byl lyofilizován. Výtěžek činil 400 mg surového peptidu. Podíl 200 mg bylo purifikováno gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpočívající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 20 mg čisté požadované sloučeniny. MS /FAB/ m/e 1108,3 [M+H]⁺ TLC R_f 0,23 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,45 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 5,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% trifluoroctová kyselina, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/; k' 0,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 10% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /2,11/, Gly /2,26/, Cys /1,84/, Ser /2,00/, Arg /0,84/.

Příklad 16

Příprava N^αAc-cyklo-/S,S/-Cys-MeArg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂

Pryskyřice s nevázaným chráněným deka-peptidem Boc-Cys/SEt/-MeArg/Tos/-Gly-Asp/C-cHex/-Ser/Bzl/-Arg/Tos/-Gly-Asp/C-cHex/-Ser/Bzl/-Cys/4MBzl/-MeNH₂ byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-terminální Boc skupiny působením 50% TFA v methylenchloridu a neutralizací vzniklé

soli TFA pomocí 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován acetanhydridem /0,94 ml/ a DIEA /1,72 ml/ v 30 ml DMF po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice spolu s odstraněním skupin, chránících postranní řetězce, působením 10 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 1 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla pak extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a dále 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na objem 1,5 l. Hodnota pH vodného roztoku bylo upraveno na 7,6 amoniakem a reakční směs byla 72 hod probublávána argonem. Roztok byl chromatografován na ODS silikagelu stupňovým gradientem: a/ voda b/ 5% acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odpařek byl lyofilizován z 1% kyselina octová/voda. Výtěžek částečně vyčištěného peptidu činil 800 mg. Podíl 200 mg byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v systému 1% kyselina octová/voda. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek přečištěné látky byl 20 mg. MS /FAB/ m/e 1108,4 $[M+H]^+$; TLC R_F 0,22 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,32 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 6,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% TFA, 5-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 6,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 4% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /2,00/, Gly /2,21/, Cys /1,45/, Ser /1,70/, Arg /1,12/.

Příklad 17

Příprava H⁺Ac-cyklo-/S,S/-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Lys-Gly-Glu-Ser-Cys-NH₂

Pryskyřice s chráněným dekapeptidem Boc-Cys(SBzl)-Arg(Tos)-Gly-Asp(Bzl)-Ser(Bzl)-Lys(Trt)-Gly-Glu(O-Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(4-MBzl)-MeBHA byla připravena podle Příkladu 1 v 0,5 mmol

množství. Po odstranění N-koncové Boc skupiny působením 50% TFA v methylenchloridu a neutralizací vzniklé TFA soli pomocí 7% DIEA v methylenchloridu byl peptid vázaný na pryskyřici acetylován působením 0,94 ml acetanhydridu a 1,72 ml DIEA v 30 ml DMF po dobu 40 min.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice a chránicí skupiny byly odstraněny z postranních řetězců působením 20 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 2 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla nejdříve extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly zředěny deionizovanou vodou na 2 l. Hodnota pH vodného roztoku byla upravena na 7,65 amoniakem a reakční směs byla 72 hod probublávána argonem. Roztok byl lyofilizován a chromatografován na ODS silikagelu v systému 4% acetonitril-0,1% TFA-voda. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/vody. Výtěžek činil 120 mg částečně vyčištěného peptidu. Peptid byl dále purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v systému 1% kyselina octová/voda. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek požadované čisté sloučeniny činil 40 mg. MS /FAB/ m/e 1030 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,23 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,38 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 9,4 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 5-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 5,6 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 3% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /2,12/, Cys /1,23/, Ser /1,62/, Glu /1,02/, Lys /1,03/, Arg /0,90/.

Příklad 18

Příprava cyklo- α , β -Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂

Pryskyřice s chráněným hexapeptidem Boc-Gly-Arg/Tos/-Gly-Asp/Bzl/-Ser/Bzl/-Glu-OH-Bu/-NH₂ byla připravena podle

Příkladu 1 v množství 1 mmolu. N-koncová Boc skupina na glycinu a t-butylester na postranním řetězci kyseliny glutamové byly odstraněny působením 50% TFA v methylenchloridu. Vzniklá sůl TFA byla neutralizována 7% DIEA v methylenchloridu a peptid vázaný na pryskyřici byl podroben cyklizaci mezi alfa aminem glycinu a gama karboxyskupinou kyseliny glutamové za použití 3 mmolů činidla BOP a 6 mmolů DIEA v DMF. Úplnost cyklizace byla ověřena nikhydrinovým testem a podle potřeby byl postup opakován.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice a skupiny chránící postranní řetězce byly odstraněny působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla nejprve extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly lyofilizovány. Výtěžek surového peptidu činil 566 mg, 94%.

Surový peptid byl přečištěn rychlou chromatografií na ODS silikagelu s obrácenými fázemi v 1% acetonitril/voda-0,1% TFA. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/voody. Výtěžek částečně vyčištěného peptidu činil 137 mg. 90 mg podíl tohoto částečně purifikovaného peptidu byl dále čištěn HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 1,5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek čisté požadované sloučeniny činil 31 mg. MS /FAB/ m/e 601,2 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,49 TLC R_f 0,38 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,46 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 7,4 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B:voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 5,88 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 1% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /2,85/, Gly /2,00/, Ser /1,03/, Glu /1,96/, Arg /1,04/.

Příklad 12

Příprava cyklo-[α ,6]-Gly-MeArg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂

Pryskyřice s chráněným hexapeptidem Boc-Gly-MeArg/Tos/-Gly-Asp/Bzl/-Ser/Bzl/-Glu/t-But/-BHA byla připravena podle Příkladu 1 v množství 1 mmolu. N-koncová Boc skupina na glycinu a t-butylester na bočním řetězci kyseliny glutamové byly odstraněny působením 50% TFA v methylenchloridu. Vzniklá sůl TFA byla neutralizována pomocí 7% DIEA v methylenchloridu a peptid vázaný na pryskyřici byl podroben cyklizaci mezi alfa aminem glycinu a gama karboxyskupinou kyseliny glutamové působením 3 mmolů BOP činidla a 6 mmolů DIEA v DMF.

Peptid byl odštěpen z pryskyřice a chránicí skupiny byly odstraněny z postranních řetězců působením 30 ml bezvodého kapalného HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byla pryskyřice promyta ethyletherem a usušena na vzduchu. Pryskyřice byla nejprve extrahována 2 x 30 ml 1% kyselinou octovou/vodou a pak 2 x 30 ml 10% kyselinou octovou/vodou. Spojené extrakty byly lyofilizovány. Výtěžek surového peptidu činil 692 mg, 100%.

Surový peptid byl purifikován rychlou chromatografií na ODS silikagelu s obrácenými fázemi v 1,5% acetonitril/voda-0,1% TFA. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny a odparek byl lyofilizován z 1% kyseliny octové/vody. Výtěžek byl 356,8 mg částečně přečištěného peptidu. Podíl 66 mg částečně přečištěného peptidu byl dále purifikován pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 2% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek požadované čisté sloučeniny činil 31 mg. MS /FAB/ m/e 615 [M+H]⁺; TLC R_F 0,36 TLC R_F 0,38 /n-BuOH:HCOAc:H₂O:EtAc 1:1:1:1/, R_F 0,42 /n-BuOH:HCOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 7,43 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient. A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 4,43 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 3% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp/1,20%, Gly /1,93%, Ser /2,15%, Phe /1,05%.

Příklad 20

Příprava cyklo-/1,8/-Arg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe

Obecný postup pro syntézu homodetických peptidů na nerozpustném nosiči - metoda FMOC-SASRIN

Cyklické homodetické peptidy byly syntetizovány za použití pryskyřice SASRIN /Bachem/ jako pevného nosiče. Ochráněné aminokyseliny byly přidávány postupně od karboxykonce až po dosažení požadované sekvence. Alfa aminoskupina byla chráněna pomocí 9-fluorenylmethoxykarbonylové skupiny /FMOC/. Funkční skupiny postranních řetězců byly chráněny následujícím způsobem: arginin a N^α-methylarginin tosylen /Tos/ nebo 4-methoxyl-2,3,6-trimethylfenylsulfonylem /Mtr/; serin benzyletherem /Bzl/; kyselina glutamová a asparagová benzylem /Bzl/ nebo t-butal-esterem /t-Bu/. FMOC skupina byla odstraněna působením 20% piperidinu v DMF. Peptid byl prodlužován přidáním 2-3 ekvivalentů aminokyseliny chráněné FMOC skupinou, 2-3 ekvivalentů HOBt v DMF a 2-3 ekvivalentů DCC v methylenchloridu. Průběh reakce byl ověřován pomocí ninhydrinového testu. Pokud bylo třeba, byl postup zopakován. Obecný postup byl následující:

- | | |
|---|------------|
| 1. Promytí DMF | 5 x 1 min |
| 2. Promytí 20% piperidinem v DMF | 1 x 1 min |
| 3. Sejmutí ochránící skupiny | |
| 20% piperidinem v DMF | 1 x 7 min |
| 4. Promytí DMF | 10 x 1 min |
| 5. Ninhydrinový test | |
| 6. FMOC-AA + HOBt v DMF, ponechat | 2 min |
| 7. DCC v methylenchloridu | 2 hod |
| 8. Promýt DMF | 5 x 1 min |
| 9. Promýt methylenchloridem | 2 x 1 min |
| 10. Ninhydrinový test | |
| 11. Opakovat od kroku 1, jestliže byl ninhydrinový test negativní anebo navázat od kroku 6, když byl ninhydrinový test pozitivní. | |

Po dokončení požadovaného chráněného peptidu byla FMOC

skupina chránící N-konec odstraněna a chráněný peptid byl z pryskyřice odštěpen působením 1-2% TFA v methylenchloridu /3 x 15 min/. Methylenchloridové extrakty s TFA byla spojena a odpařením byl získán chráněný peptid.

Cyklizace bylo dosaženo tak, že chráněný peptid /0,2 mmol, 0,4 mM roztok v bezvodém DMF/ byl vystaven působení N-methyl-morfolinu /5 ekvivaletů/ a 1,2 ekvivaletů kyseliny 1-propanfosfonové po dobu 1 hod při 0°C. Pak byl přidán další ekvivalent PPA a reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti. Rozpouštědlo bylo odstraněno a odparek byl roztřen s vodou, čímž byl získán požadovaný cyklický chráněný peptid. Skupiny chránící funkční skupiny postranních řetězců byly sejmuty působením bezvodého HF v přítomnosti 10% anisolu při 0°C po dobu 50 min. HF byl odstraněn ve vakuu, surový peptid byl rozpouštěn v 0,2 M kyselině octové, promyt 3 x etherem a lyofilizací byl získán požadovaný surový peptid.

Cyklo-/1,8/-Arg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe

Pryskyřice s chráněným oktapeptidem FMOC-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byla připravena jak popsáno shora v množství 2 mmolů. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny 20% piperidinem v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen působením 1% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 2,2 g, 97% bílé pevné látky Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly. Ke 300 mg, 0,2 mmola chráněného peptidu bylo při 0°C přidáno 500 ml DMF, 110 μ l, 1,0 mmol NMM a potom 152 μ l, 0,24 mmol PPA. Reakční směs byla 1 hod míchána při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a míchání pokračovalo 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno, a odparek byl roztřen s vodou. Výtěžek činil 325 mg, 100% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,8/Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe. Peptid byl při 0°C 50 min vystaven působení 20 ml bezvodého HF v přítomnosti 2 ml anisolu. Po odstranění HF ve vakuu byl nechráněný peptid rozpouštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Výtěžek činil 247 mg surového peptidu

cyklo-/1,8/-Arg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe, který byl dále přečištěn gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Pro další purifikaci byla použita metoda HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A:acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 10-40% acetonitril za 10 min, UV detekce při 220 nm/. MS /FAB/ m/e 951,2 $[M+H]^+$; TLC R_F 0,61 /n-BuOH:HOAc: H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_F 0,63 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5: 10:10/; HPLC k' 7,73 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 4,29 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 20% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /2,00/, Gly /2,03/, Phe /2,01/, Arg /1,89/.

Příklad 21

Příprava cyklo-/1,8/-MeArg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe

Pryskyřice s chráněným octapeptidem FMOC-Asp/C-t-Bu/-Phe-MeArg/Tos/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byla připravena podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu.. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid odštěpen z pryskyřice působením 1% TFA v methylenchloridu. Výtěžek činil 1,22 g, 84% chráněného lineárního peptidu ve formě bílé pevné látky. K 585 mg, 0,4 mmolu chráněného peptidu v 1 l DMF bylo přidáno 220 μ l, 2,0 mmolu NMM a 304 μ l, 0,43 mmolu PPA při 0°C. Po 1 hod míchání při 0°C byl přidán další podíl PPA a míchání pokračovalo 18 hod. Potom bylo odstraněno rozpouštědlo a odparek byl rozetřen s vodou. Výtěžek činil 550 mg, 95% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,8/-MeArg/Tos/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-Phe. Peptid byl vystaven působení 30 ml bezvodého HF v přítomnosti 3 ml anisolu při 0°C po dobu 50 min. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid rozpouštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt etherem /3 x 20 ml/ a lyofilizován. Výtěžkem bylo 406 mg surového cyklo-/1,8/-MeArg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe. 200 mg surového peptidu bylo purifikováno gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovída-

jící frakce byly spojeny a lyofilizovány. Peptid byl dále purifikován pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 5 μ l 10 mm x 25 cm, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 10-50% acetonitril za 10 min, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek činil 26 mg požadované čisté látky. MS /FAB/ m/e 965,4 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,65 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,63 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 8,14 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 9 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 14% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,37/, Gly /2,00/, Phe /1,95/, Arg /1,03/.

Příklad 22

Příprava cyklo-/1,10/-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe

Pryskyřice s navázaným chráněným deka-peptidem FMOC-Asp/C-t-Bu/-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byla připravena podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen pomocí 1,5% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 1,7 g, 100% bílé pevné látky Asp/C-t-Bu/-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly. 500 mg, 0,3 mmolu chráněného peptidu v 750 ml DMF bylo smícháno s 165 μ l, 1,5 mmol NMM a 228 μ l, 0,36 mmol PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána dalších 18 hod. Rozpuštědlo bylo odstraněno a odparek byl rozetřen s vodou. Výtěžkem byl 1,0 g, 100% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,10/-Pro-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-D-Phe. K peptidu bylo přidáno 30 ml barvadího HF a 3 ml anisolu a reakční směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid rozpouštěn v 0,2 M kyselině octové /60 ml/, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Výtěžkem bylo 370 mg

surového produktu cyklo-/1,10/-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Phe. 196 mg surového peptidu bylo purifikováno gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Podíl 58 mg částečně purifikovaného peptidu byl přečištěn pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 26% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoracetová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek požadované čisté sloučeniny činil 24 mg. MS /FAB/ m/e 1145,5 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,55 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,58 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 12,9 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoracetová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 6,09 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 25% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoracetová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /2,00/, Gly /2,08/, Pro /2,71/, Phe /2,02/, Arg /1,74/.

Příklad 23

Příprava cyklo-/1,6/-Gly-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Pro

Pryskyřice s navázaným chráněným hexapeptidem FMOC-Asp/C-t-Bu/-D-Pro-Gly-Pro-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byla připravena podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid odštěpen z pryskyřice pomocí 2% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 1,2 g, 100% bílé pevné látky Asp/C-t-Bu/-D-Pro-Gly-Pro-Arg/Mtr-Gly. K 703 mg, 0,8 mmolu chráněného peptidu v 2 l DMF bylo přidáno 440 μ l, 4,0 mmolu NMM a 608 μ l, 3,25 mmolu PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána dalších 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl roztčen s vodou. Výtěžkem bylo 286 mg, 43% cyklického chráněného peptidu. K peptidu bylo přidáno 20 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a reakční směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl nechráněný peptid rozpouštěn v 60 ml 0,1 M kyseliny octové, promyt 3 x 10 ml etherem a lyofilizován. Bylo získáno 280 mg surového produktu cyklo-/1,6/-Gly-Pro-Arg-Gly-Asp-D-Pro. Podíl 213 mg surového peptidu byl purifik-

ván gelovou filtrací na Sephadexu G-15, 1% kyselina octová/voda. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek čisté požadované sloučeniny byl 147 mg. MS /FAB/ m/e 580,3 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,44 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,45 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 6,87 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 3,08 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 50 acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /2,00/, Pro /2,00/, Arg /1,05/.

Příklad 24

Příprava cyklo-/1,6/-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-D-Pro

Pryskyřice s navázaným chráněným hexapeptidem FMOC-Asp/C-t-Bu/-D-Pro-Pro-Gly-Arg/Mtr/-Gly-SASBIN byla připravena podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid odštěpen z pryskyřice pomocí 2% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 221 mg, 100% chráněného lineárního peptidu jako bílé pevné látky. K 320 mg, 0,37 mmolu chráněného peptidu v 1 l DMF bylo přidáno 220 μ l, 2,0 mmolu NMM a 304 μ l, 0,48 mmolu PPA. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další díl PPA a směs byla míchána 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl rozetřen s vodou. Výtěžek činil 97 mg, 31% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,6/-Pro-Gly-Arg/Mtr/-Gly-Asp/C-t-Bu/-D-Pro. 168 mg chráněného peptidu bylo smícháno s 20 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a ponecháno 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbevený chránicích skupin, rozpuštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován; bylo získáno 156 mg cyklo-/1,6/-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-D-Pro. Pořím 150 mg surového peptidu byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 50 mg požadované čisté sloučeniny. MS /FAB/ m/e 580,3 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,3 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/,

R_f 0,42 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 3,44 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin : Asp /1,06/, Gly /2,00/, Pro /1,81/, Arg /1,29/.

Příklad 25

Příprava cyklo-/1,6/-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro

Pryskyřice s navázaným chráněným hexapeptidem FMOC-Asp /O-t-Bu/-Ser/Bal/-Pro-Gly-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byla připravena podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen pomocí 1% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 863 mg, 91% chráněného lineárního peptidu ve formě bílé pevné látky. K 703 mg, 0,3 mmol chráněného peptidu v 2 l DMF bylo přidáno 440 μ l, 4,0 mmol NMM a 638 μ l, 0,35 mmol PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další díl PPA a směs byla míchána 18 hod. Rozpuštědlo bylo odstraněno a zbytek byl rozetřen s vodou. Výtěžkem bylo 328 mg, 88% cyklického chráněného peptidu. Ke 300 mg peptidu bylo přidáno 20 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený ochránících skupin, rozpuštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Výtěžkem bylo 256 mg surového cyklo-/1,6/-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-D-Pro. Počít 172 mg surového peptidu byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15, 1% kyselina octová/voda. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. 50 mg částečně vyčištěného peptidu bylo dále purifikováno HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 4% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek požadované čisté látky činil 33 mg. MS /FAB/ m/e 570,3 [M+H]⁺; TLC R_f 0,42 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,45 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 6,3 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp

/0,94/, Gly /2,00/, Pro /1,03/, Arg /1,03/, Ser /0,9/.

Příklad 26

Příprava cyklo-/1,6/-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Pro

Chráněný hexapeptid navázaný na pryskyřici FMOC-Asp /O-t-Bu/-Gly-D-Pro-Pro-Arg/Tos/-Gly-SASRIN byl připraven podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny působením 20% piperidinu v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen pomocí 2% TFA v methylenchloridu. Výtěžek chráněného lineárního peptidu byl 663 mg, 82% bílé pevné látky. K 646 mg, 0,8 mmol chráněného peptidu v 1,4 l DMF bylo přidáno 440 μ l, 4,0 mmolu NMM a 604 μ l, 0,96 mmol PPA při 0°C. Reakční směs byly míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl roztřesen s vodou. Výtěžkem bylo 400mg, 63% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,6/-Pro-Arg/Tos/-Gly-Asp/O-t-Bu/-Gly-D-Pro. K 400 mg chráněného peptidu bylo přidáno 20 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený ochranných skupin, rozpouštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Produktem byl surový cyklo-/1,6/-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Pro. Podíl 75 mg surového peptidu byl purifikován pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 7% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžkem bylo 35 mg požadované čisté sloučeniny. MS /FAB/ m/e 580,5 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,35 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,5 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 6,7 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 1-50% acetonitril za 20 min. UV detekce při 220 nm/, k' 4,3 /5 μ Ultrasphere ODS, 5,5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /1,99/, Pro /2,05/, Arg /1,02/.

Příklad 27

Příprava cyklo-/1,6/-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Phe

Chráněný hexapeptid navázaný na pryskyřici FMOC-Asp/O-t-Bu/-Gly-D-Phe-Pro-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byl připraven podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny pomocí 20% piperidinu v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen působením 2% TFA v methylenchloridu. Výtěžek bílé pevné látky Asp/O-t-Bu/-Gly-D-Phe-Pro-Arg/Tos/-Gly činil 936 mg, 100%. K 733 mg, 0,8 mmolu chráněného peptidu v 1,6 l DMF bylo přidáno 440 μ l, 4,0 mmolu NMM a 604 μ l, 0,36 mmolu PPA. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána dalších 18 hod. Po odstranění rozpouštědla byl zbytek rozetřen ve vodě. Výtěžek cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,6/-Asp/O-t-Bu/-Gly-D-Phe-Arg/Tos/-Gly činil 636 mg, 84%. K chráněnému peptidu bylo přidáno 10 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a směs byla nechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený chráněných skupin smíchán s 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Výtěžek byl 462 mg surového cyklo-/1,6/-Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-D-Phe. Podíl 211 mg surového peptidu byl purifikován gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek částečně vyčištěného peptidu byl 178 mg. 67 mg tohoto peptidu bylo purifikováno pomocí HPLC /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 15% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Výtěžek byl 53 mg požadované čisté sloučeniny. MS /FAB/ m/e 630,3 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,64 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,64 /n-BuOH:HOAc:H₂:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 3,5 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 1 - 50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 5,38 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 13% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /1,33/, Gly /1,34/, Pro /2,35/, Arg /1,32/.

Příklad 28

Příprava cyklo-/1,5/-D-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser

Chráněný hexapeptid navázaný na pryskyřici FMOC-Asp/Bzl/-Ser/Bzl/-D-Ala-Arg/Tos/-Gly-SASRIN byl připraven podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny pomocí 20% piperidinu v DMF byl peptid z pryskyřice odštěpen působením 1% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 400 mg, 64% bílé pevné látky Asp/Bzl/-Ser/Bzl/-D-Ala-Arg/Tos/-Gly. K 168 mg, 0.2 mmolu chráněného peptidu v 0,5 l DMF bylo přidáno 10 μ l, 1,0 mmol NMM a 152 μ l, 0,24 mmol PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl rozetřen s vodou. Výtěžkem bylo 164 mg, 67% cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,5/-D-Ala-Arg/Tos/-Gly-Asp/Bzl/-Ser/Bzl/. K chráněnému peptidu bylo přidáno 10 ml bezvodého HF a 1 ml anisolu a reakční směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený chránicích skupin rozpuštěn v 30 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 10 ml etheru. Bylo získáno 73 mg surového produktu cyklo-/1,5/-D-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser. Surový peptid /73 mg/ byl purifikován HPLC /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 1,5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm. Výtěžek požadované čisté sloučeniny byl 28 mg. MS /FAB/ m/e 487,1 $[K+H]^+$; TLC R_f 0,41 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,43 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 10,6 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0-50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 11,4 /5 μ Altex Ultrasphere CDS, 1,5% acetonitril/voda - 0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/; analýza aminokyselin: Asp /1,00/, Gly /0,23/, Ser /0,25/, Ala /0,25/, Arg /1,07/.

Příklad 29

Příprava cyklo-/1,5/-Ala-Arg-Gly-Asp-D-Ser

Chráněný hexapeptid vázaný na pryskyřici FMOC-Asp/O-t-Bu/-D-Ser/Bzl/-Ala-Arg/Mtr/-Gly-SASRIN byl připraven podle Příkladu 20 v množství 1 mmolu. Po odstranění N-koncové FMOC skupiny pomocí 20% piperidinu v DMF byl peptid odštěpen z pryskyřice působením 2% TFA v methylenchloridu. Výtěžkem bylo 360 mg, 100% bílé pevné látky Asp/O-t-Bu/-D-Ser/Bzl/-Ala-Arg/Mtr/-Gly. K 345 mg, 0,4 mmolu chráněného peptidu v 1 DMF bylo přidáno 220 μ l, 2,0 mmoly NMM a 304 μ l, 0,48 mmolu PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána dalších 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl rozetřen s vodou. Výtěžek cyklického chráněného peptidu cyklo-/1,5/-Ala-Arg/Mtr/-Gly-Asp/O-t-Bu/-D-Ser/Bzl/ činil 267 mg, 67%. K chráněnému peptidu bylo přidáno 20 ml bezvodého HF a 2 ml anisolu a směs byla ponechána 50 min při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený ochranných skupin, rozpouštěn v 60 ml 0,2 M kyseliny octové, promyt 3 x 20 ml etheru a lyofilizován. Výtěžek surového cyklo-/1,5/-Ala-Arg-Gly-Asp-D-Ser činil 208 mg. 70 mg surového peptidu bylo purifikováno gelovou filtrací na Sephadexu G-15 v 1% kyselině octové/vodě. Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžkem bylo 71 mg požadované čisté sloučeniny. MS /FAB/ m/e 487,2 $[M+H]^+$; TLC R_f 0,49 /n-BuOH:HOAc:H₂O:EtOAc 1:1:1:1/, R_f 0,38 /n-BuOH:HOAc:H₂O:pyridin 15:5:10:10/; HPLC k' 5,5 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, gradient, A: acetonitril B: voda-0,1% kyselina trifluoroctová, 0 - 50% acetonitril za 20 min, UV detekce při 220 nm/, k' 7,65 /5 μ Altex Ultrasphere ODS, 1,5% acetonitril/voda-0,1% kyselina trifluoroctová, UV detekce při 220 nm/. Analýza aminokyselin: Asp /0,32/, Gly /1,00/, Ser /0,32/, Ala /1,01/, Arg /1,06/.

Příklad 30

Příprava cyklo-/1,3/-N^α-[2-(2-(2-amido-fenyl)ethyl)-benzoyl]-MeArg-Gly-Asp-amidu

a/ hydrochlorid kyseliny 2-[2-(2-aminofenyl)ethyl]benzoové

Suspenze 5,6,11,12-tetrahydrodibenz[b,f]azocin-6-onu /8,5 g, 38 mmolu/ v 500 ml 6 N HCl byla zahřívána pod zpětným chladičem 16 hod. Reakční směs byla za horka zfiltrována, aby se odstranil nezreagovaný výchozí materiál, pak byla směs ochlazená a znovu zfiltrována. Výtěžkem bylo 10,5 g, 88% hydrochloridu kyseliny 2-[2-(2-aminofenyl)ethyl]benzoové.

b/ kyselina 2-[2-(2-(fenylmethoxykarbonylamino)fenyl)ethyl]-benzoové

Suspenze hydrochloridu kyseliny 2-[2-(2-aminofenyl)ethyl]-benzoové /330 mg, 1 mmol/ ve 2 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného ve vodě byla za intenzivního míchání doplněna 170 mg, 1 mmolem benzylochloroformátu a 1 ml 1N roztoku hydroxidu sodného ve vodě. Reakční směs byla míchána 16 hod, okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a zfiltrována. Pevný produkt byl promyt vodou a hexanem, rozpuštěn v methylenchloridu, organická fáze byla pak promyta vodou, usušena se síranem hořečnatým, zfiltrován a koncentrován ve vakuu. Výsledná pevná látka byla rozetřena s etherem. Výtěžkem bylo 0,2 g, 53% 2- 2- 2- fenylmethoxy-karbonylamino -fenyl ethyl benzoové kyseliny.

c/ t-butyl-2-[2-(2-(fenylmethoxykarbonylamino)fenyl)ethyl]-benzoát

K roztoku kyseliny 2-[2-(2-(fenylmethoxykarbonylamino)-fenyl)ethyl]benzoové /5,2 g, 0,014 mol/ ve 100 ml methylenchloridu byl přidán isobutylen /15 ml/ a kyselina sírová /0,14 ml/ a směs byla míchána při teplotě místnosti. Isobutylen byl pak přidáván po dobu několika dní, dokud reakce neskončila. Reakční směs byla promyta 5x vodným roztokem uhličitanu

sodného a pak vodou. Organická fáze byla vysušena síranem hořečnatým a koncentrována ve vakuu. Výsledný olej byl purifikován chromatografií na silikagelu v systému hexan: ethylacetát 95: 5. Výtěžkem bylo 1,8 g, 31% t-butyl-2-[2-(2-(fenylmethoxykarbonylamino)fenyl)-ethyl]-benzoátu.

d/ t-butyl-2-[2-(2-aminofenyl)ethyl]benzoát

K roztoku 1,8 g, 4 mmolů t-butyl-2-[2-(fenylmethoxykarbonylamino)fenylethyl]benzoátu v 140 ml ethanolu bylo přidáno 250 mg 10% palladia na uhlíku a reakční směs byla třepána s vodíkem dokud sorpce neskončila. Směs byla odplyněna, zfiltrována a koncentrována ve vakuu. Zbytek byl purifikován chromatografií na silikagelu v systému petrolether: ethyl-ether 3:1. Výtěžek činil 1,0 g t-butyl-2-[2-(2-aminofenyl)-ethyl]benzoátu o teplotě tání 58-59°C.

e/ t-butyl-2-[2-(2-(N^α-FMOC-Asp(O-Bzl)-amino)fenyl)ethyl]-benzoát

K studenému roztoku 480 mg, 1,1 mmol FMOC-Asp(O-Bzl) v 5 ml THF a 133 ml, 1,2 mmol N-methylmorpholinu bylo přidáno 156 μl, 1,2 mmol isobutylchloroformátu po kapkách. Reakční směs byla několik minut míchána, pak byl přidán roztok 295 mg, 1,0 mmol t-butyl-2-[2-(2-aminofenylethyl)]benzoátu v 3 ml THF. Reakční směs byla pak míchána 18 hod při teplotě místnosti. Po skončení reakce, jejíž průběh byl sledován pomocí TLC, byla reakční směs zahuštěna do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu /40 ml/ a postupně promýván 3 x 15 ml vody, 2 x 15 ml 10% vodného roztoku Na₂CO₃, 3 x 15 ml vody a 1 x 15 ml nasyceného roztoku soli. Organický roztok byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zahuštěn. Výtěžkem bylo 730 mg požadované sloučeniny.

f/ t-butyl-2-[2-(2-(Gly-Asp(O-Bzl)-amino)fenyl)ethyl]benzoát

t-Butyl-2-[2-(2-(N^α-FMOC-Asp(O-Bzl)-amino)fenyl)-ethyl]-benzoát /580 mg, 0,9 mmol/ byl smíchán s 8 ml, 10% piperidinu v DMF a směs byla pomechána 45 min při teplotě místnosti.

Po odstranění rozpouštědla ve vakuu byla získána bílá pevná látka t-butyl-[2-(2-Asp/O-Bzl/-aminofenylethyl)]benzoát jako bílá pevná látka. K roztoku odparku v bezvodém DMF /8 ml/ bylo přidáno 135 mg, 0,88 mmol HOBt, 262 mg, 0,88 mmol Fmoc-Gly a 153 μ l, 0,88 mmol DIEA, pak bylo přidáno 170 mg, 0,88 mmol EDC a směs byla míchána přes noc. Reakční směs byla zahuštěna a zbytek byl rozpuštěn v ethylacetátu. Ethylacetátový extrakt byl postupně promyt 3 x 15 ml vody, 2 x 15 ml 10% vodného roztoku NaHCO_3 , 3 x 15 ml vody a 1 x 15 ml nasyceného roztoku soli. Organický roztok byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a koncentrován. Výtěžek požadované sloučeniny, rekrystalované z etheru-hexanu činil 100 mg. Skupina Fmoc se z N $^{\alpha}$ -Fmoc-Gly zřejmě ztratila během zpracování.

g/ t-butyl-2-[2-(2-(Boc-MeArg/Tos/-Gly-Asp/O-Bzl/-amino)-fenyl)ethyl]benzoát

K studenému roztoku 140 mg, 0,25 mmol sloučeniny z Příklatu 30 f a 133 mg, 0,3 mmol Boc-MeArg/Tos/ ve 2 ml DMF bylo přidáno 87 μ l, 0,5 mmol DIEA a 50 mg, 0,3 mmol HOBt. Reakční směs byla za studena míchána několik minut a pak bylo po částech přidáno 60 mg, 0,3 mmol EDC. Reakční směs byla míchána 18 hod při teplotě místnosti a potom zahuštěna. Zbytek byl rozpuštěn v ethylacetátu a roztok byl postupně promyt 3 x 15 ml vody, 2 x 15 ml 10% vodným roztokem NaHCO_3 , 3 x 15 ml vody a 1 x 15 ml nasyceného roztoku soli. Organický roztok byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn. Výtěžek požadované sloučeniny byl 120 mg.

h/ 2-[2-(2-(MeArg/Tos/-Gly-Asp/O-Bzl/-amino)fenylethyl)]benzoová kyselina

Sloučenina z Příklatu 30 g byla při teplotě místnosti po 2 hod vystavena působení 50% roztoku TFA v methylenchloridu. Rozpouštědlo bylo odstraněno a methylenchlorid byl opakovaně odpařen ze zbytku, aby byly odstraněny stopy TFA. Tímto postupem byla získána požadovaná sloučenina.

i/ cyklo-/1,3/-N^α-[2-(2-(2-amido-fenyl)ethyl)benzoyl]MeArg-Gly-Asp-amid

K chráněnému lineárnímu peptidu z Příkladu 30 h bylo přidáno 5 ekvivalentů NMM a 1,2 ekvivalentu PPA při 0°C. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C, pak byl přidán další podíl PPA a směs byla míchána dalších 18 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbytek byl rozetřen s vodou. Tak byl získán cyklický chráněný peptid cyklo/1,3/-N^α-[2-(2-amido-fenylethyl)benzoyl]-MeArg/Tos/-Gly-Asp/O-Bzl/amid. Cyklický peptid byl 50 min vystaven působení bezvodého HF v přítomnosti anisolu při 0°C. Po odstranění HF ve vakuu byl peptid, zbavený chránících skupin, rozpuštěn v kyselině octové, promyt etherem a lyofilizován; takto byla získána požadovaná sloučenina.

Příklad 31

Příprava (2R,3S)-3-fenylcystein

a/ (4S)-3-(((4'S,5'R)-5'-fenyl-2'-thioxo-4'-oxazolidinyl)karbonyl)-4-(fenylmethyl)-2-oxazolidinon(1)

Při -78°C bylo k suspenzi 7,2 g, 17,6 mmol čerstvě připraveného triflatu cínatého, předem promytého třikrát bezvodým etherem pod argonem, a N-ethylpiperidinu v bezvodém THF /60 ml/ přidáno 4,4 g, 15,8 mmol 3-isothiokynoacetyl-2-oxazolidinon v 20 ml THF. Světle žlutý roztok byl míchán 2 hod při -78°C, pak byl na 5 min ohřát na -40°C, znovu ochlazen na -78°C a pak bylo přidáno 2,02 g, 19,1 mmol benzaldehydu in substantia. Reakční směs byla míchána 2,5 hod při -78°C a pak bylo přidáno 40 ml vodného fosfátového pufru o pH 7. Suspenze byla zfiltrována přes Celite. Filtrát byl oředěn 200 ml 1 N vodného roztoku hydrogensíranu sodného a 3 x extrahován Cl₂CH₂. Spojené organické fáze byly vysušeny nad bezvodým síranem sodným a zahuštěny. Těkavé látky byly odstraněny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v 200 ml vodného roztoku hydrogensíranu sodného. Zbytek byl peritifikován uhlíkem sloupčovou

chromatografií na silikagelu v methylenchloridu. Výtěžek požadované sloučeniny 1 byl 5,3 g, 87%. ^1H NMR $/\text{CDCl}_3/$. δ 2,980 /dd, $J = 13,6, 8,5$ Hz, 1 H, $\text{CHHPh}/$, 3,236 /dd, $J = 13,6, 3,5$ Hz, 1H, $\text{CHHPh}/$, 4,350-4,382 /m, 2 H, H-5/, 4,729-4,823 /m, 1 H, H-4/, 4,936 /dd, $J = 5,2, 1,9$ Hz, 1 H, C S $\text{NHCH}/$, 6,467 /d, $J = 5,2$ Hz, 1 H, C S $\text{OCH}/$, 7,206-7,449 /m, 10 H/.

b/ methyl(4S,5R)-5-phenyl-2-thioxooxazolidin-4-karboxylát /2/

K roztoku 6,96 g, 18,2 mmolu aldolového produktu 1 ve 42 ml bezvodého methanolu a 42 ml Cl_2CH_2 byla při 0°C pomocí kanyly přidána suspenze, vytvořená přidáním 6,7 ml, 20,02 mmolu, 1,1 ekvivalentu 3M bromidu methylhořečnatého v diethyletheru k 25 ml bezvodého methanolu. Reakční směs byla míchána 3 min a pak bylo přidáno 50 ml 1 N hydrogensíranu sodného ve vodě. Těkavé látky byly odstraněny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v 200 ml vodného roztoku hydrogensíranu sodného a 3 x extrahován Cl_2CH_2 . Spojené organické fáze byly vysušeny nad bezvodým síranem sodným a zahuštěny. Zbytek byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v methylenchloridu: etheru :methanolu 5:5:1. Výtěžek požadované sloučeniny činil 4,18 g, 96%. ^1H NMR $/\text{CDCl}_3/$. δ 3,875 /s, 3H/, 4,534 /d, $J = 6,1$ Hz, 1 H, H-4/, 5,967 /d, $J = 6,1$ Hz, 1 H, H-5/, 7,414 /s, 5 H/; ^{13}C NMR $/\text{CDCl}_3/$. δ 53,4, 64,6, 85,6, 125,6, 129,1, 129,5, 136,7, 168,5, 188,8.

c/ methyl(4S,5R)-3-(tert-butyloxykarbonyl)-5-phenyl-2-oxazolidin-4-karboxylát /3/

K roztoku 4,18 g, 17,6 mmolu thiooxazolidinu 2 v 80 ml Cl_2CH_2 bylo za stálého míchání při teplotě místnosti přidáno 4,25 g, 19.36 mmol t-butyl-pyrokarbonátu a 110 mg, 0,05 ekv. dimethylaminopyridinu rozpuštěných v 8 ml Cl_2CH_2 . Reakční směs byla míchána 30 min, pak byla ochlazená na 0°C a bylo přidáno 44 ml 30% vodný H_2O_2 a 44 ml 88% kyseliny mravenčí. Výsledná dvoufázová směs byla míchána 30 min a potom nalita do 500 ml 1 M vodného roztoku uhličitanu draselného. Vodný roztok byl extrahován 3 x Cl_2CH_2 . Spojené organické fáze byly

promyty 1 M vodným roztokem uhličitanu draselného, vysušeny nad bezvodým síranem sodným a zahuštěny. Bylo získáno 5,6 g, 100% napěněného oleje, který byl přečištěn rychlou sloupcovou chromatografií v systému 30% ethylacetát/hexan. Výtěžkem bylo 5,4 g, 95% požadovaného Boc chráněného oxazolidinonu 3. ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,504 /s, 9 H/, 3,385 /s, 3 H/, 4,642 /d, $J=4,3$ Hz, 1 H, H-4/, 5,389 /d, $J = 4,3$ Hz, 1 H, H-5/, 7,401 - 7,462 /m, 5H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 28,2, 53,3., 63,8, 76,0, 84,9, 125,2, 129,3, 129,6, 137,3, 150,3, 169,1.

d/ methyl/23,3R/2-(/tert-butyloxykarbonyl/ amino) -3-hydroxy-3-fenylpropionat /4/

K roztoku 5,6 g, 17,6 mmol methylesteru 3 v 300ml dioxyanu bylo při teplotě místnosti přidáno 44 ml, 88 mmol čerstvě připraveného 2 N vodného roztoku hydroxiidu litného. Vzniklá suspenze byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Těkavé látky byly odstraněny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v 300 ml 1 N vodného roztoku hydrosíranu sodného a 3 x extrahován Cl_2CH_2 . Spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem sodným, zahuštěny, zbytek byl znovu rozpuštěn v 300 ml etheru a ochlazen na 0°C . Pak byl přidáván etherový roztok diazometanu až do vzniku stálého nažloutlého zabarvení. Roztok byl míchán 15 min při 0°C a 30 min při teplotě místnosti. Rozpouštědlo bylo odstraněno a výsledný napěněný olej byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití stupňového gradientu: 30% ethylacetát-hexan, 50% ethylacetát-hexan/ Výtěžkem bylo nejdříve 4,01 g, 81% požadovaného Boc chráněného aminoalkoholu 4 a potom 460 mg, 12% de-Boc oxazolidinu. Aminoalkohol 4 byl získán jako bílá krystalická látka. Teplota tání $101-102^\circ\text{C}$ /ether-hexan/; $[\alpha]_D^{20} = -15,1^\circ$ /c = 0,93, CHCl_3 /; ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,333 /s, 9H/, 2,704 /bs, 1 H, OH/, 3,761 /s, 3 H/, 4,501 /bd, $J = 6,6$ Hz, 1 H, HO-/ , 5,237 /dd, $J = 3,5, 3,4$ Hz, 1 H/, 5,273-5,351 /m, 1 H/, 7,287-7,362 /m, 5H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 28,1, 52,4, 59,5, 73,8, 80,0, 126,0, 127,9, 128,2, 139,9, 155,5, 171,5; IR /KBr/ 3440 /br/, 2980, 1745, 1705, 1525, 1165 cm^{-1} ; MS m/z 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Analýza pro $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$: C, 61,02; H, 7,12. Nalezeno: C, 59,96; H, 6,24.

e/ methyl/2S,3R/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-methansulfonyl-3-fenylpropionát /6/

K roztoku 0,94 g, 3,18 mmol alkoholu 4 a 0,73 g, 7,18 mmol NET_3 v 10 ml Cl_2CH_2 bylo při 0°C přidáno 418 mg, 3,65 mmol methansulfonylchloridu. Reakční směs byla míchána 45 min při 0°C . Potom byla přidána studená zředěná HCl, směs byla zředěna Cl_2CH_2 a organická vrstva byla promyta vodným roztokem NaHCO_3 , nasyceným solným roztokem a vysušena nad Na_2SO_4 . Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu a surový mesylát 6 byl získán jako napěněná bílá pevná látka. V dalším postupu byl tento produkt použit bez dalšího přečištění. ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,417 /s, 3H/, 2,910 /s, 3 H, CH_3OMs /, 3,705 /s, 3 H, $\text{CH}_3\text{O-}$ /, 4,853 /dd, J = 9,6, 6,6 Hz, 1 H, H- C_2 /, 5,173 /bd, J = 9,6 Hz, 1 H, H-N/, 5,893 /d, J = 6,6 Hz, 1 H, H- C_3 /, 7,389-7,400 /m, 5H/; IR /KBR/ 3400, 2980, 2950, 1745, 1715, 1520, 1360, 1120 cm^{-1} .

f/ methyl/2R,3S/3-/acetylthio/2-(/tert-butyloxykarbonyl/-amino)-3-fenylpropionat /7/

Sůl DBU a kyseliny thiooctové byla připravena přidáním 1,2 g, 15,8 mmol kyseliny thiooctové k roztoku 1,68 g, 11,07 mmol DBU v 5 ml DMF. Tento roztok byl přidán k roztoku 1,18 g, 3,16 mmol mesylátu 6 v 10 ml DMF. Reakční směs byla míchána 30 hod při teplotě místnosti. Pak byla přidána voda a Cl_2CH_2 a směs byla 4 x promyta vodou. Organická vrstva byla promyta solankou a vysušena nad Na_2SO_4 . Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu a surový olej byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v systému 8% ethylacetát/toluen. Výtěžek požadovaného acetylovaného thiolu 7 ve formě bezbarvé kapaliny činil 0,97 g, 87%. $[\alpha]_D^{20} = +143,6^\circ$ c = 2,50, CHCl_3 /; ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,427 /s, 3H/, 2,330 /s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COOS}$ /, 3,685 /s, 3 H, $\text{CH}_3\text{O-}$ /, 4,903 /dd, J = 9,6, 4,7 Hz, 1 H, H- C_2 /, 5,073 /bd, J = 9,6 Hz, 1 H, H-N/, 5,138 /d, J = 4,7 Hz, 1 H, H- C_3 /, 7,289-7,400 /m, 5H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 28,1, 30,2, 40,9, 52,2, 57,3, 80,2, 128,2, 128,4, 128,6, 136,6, 155,1, 170,1, 193,3 /-COOS-/; IR /čistý/ 3380, 2990, 2960,

1750, 1690, 1520, 1340, 1170 cm^{-1} ; MS m/z 354 $[\text{M}+\text{H}]^+$;
Analýza pro $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{NS}$ - vypočteno: C, 57,79; H, 6,51.
Nalezeno: C, 57,64; H, 6,59.

g/ methyl/2R,3S/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-
merkaptó-3-fenylpropionát /9/

Acetylovaný thiol 7 /290 mg, 0,82 mmol/ byl rozpuštěn
v methanolu /4 ml/ a pak bylo přidáno 4,1 ml 0,2 N vodného
roztoku NaOH. Reakční směs byla míchána 20 min při teplotě
místnosti a průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Roztok
byl potom opatrně neutralizován zředěnou HCl. Těkavé látky
byly odstraněny ve vakuu a zbytek byl extrahován 3 x Cl_2CH_2 .
Organická vrstva byla promyta solankou a vysušena nad
 Na_2SO_4 . Surový produkt byl purifikován rychlou sloupcovou
chromatografií na silikagelu v systému 10% ethylacetát/hexan.
Požadovaný thiol 2 byl získán jako bílá pevná látka; výtěžek
byl 242 mg, 95%. Teplota tání $76-77^\circ\text{C}$ /ether-hexan/;
 $[\alpha]_D^{20} = +32,3 /c = 0,96, \text{CHCl}_3/$; $^1\text{H NMR} / \text{CDCl}_3 / . \delta$ 1,392
/s, 3 H/, 2,207 /d, J = 7,3 Hz, SH/, 4,800 /dd, J = 8,7, 6,3
Hz, 1 H, CH-N/, 5,059 /bd, J = 8,7 Hz, 1 H, NH/, 7,370-
7,282 /m, 5H/; $^{13}\text{C NMR} / \text{CDCl}_3 / . \delta$ 28,0, 52,1, 59,5, 80,1,
127,5, 127,6, 128,8, 138,8, 155,3, 171,5; IR /KBr/ 3335,
2990, 1740, 1635, 1530, 1165 cm^{-1} ; MS m/z 312 $\text{M}+\text{H}^+$.
Analýza pro $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{NS}$ - vypočteno: C, 57,88; H, 6,75;
nalezeno : C, 58,08; H, 6,88.

h/ kyselina /2R,3S/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-(/4-
methylbenzyl/thio)-3-fenylpropionová /10/

520 mg, 1,47 mmol acetylovaného thiolu 7 bylo rozpuštěno
v 8 ml methanolu. Pak bylo přidáno 1,62 ml, 1 M vodného roztoku
NaOH a dále 300 mg, 1,62 mmol bromylenu. Po 20 min bylo
zkontrolováno pH a pak byl přidán 1,1 ekvivalent zásady.
Reakční směs byla míchána 3 hod při teplotě místnosti a prů-
běh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Roztok byl opatrně
neutralizován zředěnou HCl. Těkavé látky byly odstraněny
ve vakuu a zbytek byl 3 x extrahován Cl_2CH_2 . Organická vrstva

byla promyta solankou a vysušena nad Na_2SO_4 . Surový produkt byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v systému 2% kyselina octová/20% ethylacetát/hexan. Výtěžek požadované kyseliny 10, získané jako bílá pevná látka, činil 480 mg, 79%. Teplota tání $131-132^\circ\text{C}$ /ether/hexan/; $[\alpha]^{20}_D = +211,7^\circ /c = 0,99, \text{CHCl}_3/$; $^1\text{H NMR} / \text{CDCl}_3/$. δ 1,403 /s, 9 H/, 2,316 /s, 3 H/, 3,515 /d, J = 13 Hz, 1 H/, 4,134 /d, J = 13 Hz, 1 H/, 4,790 /bs, 1 H/, 4,931-5,050 /m, 1 H/, 5,050-5,352 /bs, 1 H/, 7,082 /s, 4 H/, 7,287-7,307 /m, 5 H/; IR /KBr/ 3380, 3000, 1700, 1515, 1170 cm^{-1} . MS m/z 402 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Analýza pro $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{NS}$ - vypočteno: C, 65,81; H, 6,78. - nalezeno : C, 65,91; H, 7,00.

Příklad 32

Příprava /2R,3R/-3-fenylcysteinu

a/ /4R/-3-(/2'R,3'S/-2'-bromo-3'-hydroxy-3'-fenylpropanoyl)-4-/fenylmethyl/-2-oxazolidinon /12/

K suspenzi 4,74 g, 15,9 mmol 3-/bromoacetyl/-2-oxazolidinonu 11 ve 30 ml diethyletheru bylo při teplotě -78°C přidáno 2,25 g, 22,2 mmol triethylaminu a čerstvě destilovaný di-n-butylboryltriflat. Chlazení bylo přerušeno a roztok byl míchán 2 hod při teplotě místnosti. Výsledná dvoufázová hnědá směs byla postupně ochlazená na -78°C a pak bylo přidáno 1,27 g, 11,9 mmol čistého benzaldehydu. Reakční směs byla míchána 30 min při -78°C a 2,5 hod při 0°C , pak byla zředěna etherem, promyta 2 x 1 N vodným roztokem hydrogensíranu sodného, potom vodou a zahuštěna.

Zbytek byl rozpuštěn v 30 ml etheru a ochlazen na 0°C . Tento roztok byl po kapkách přidán ke směsi methanolu a 3% vodného roztoku peroxidu vodíku /1:1, 30 ml/. Reakční směs byla míchána 1 hod při 0°C , pak byla opatrně nalita do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a extrahována 2 x etherem. Spojené organické fáze byly promyty 2 x nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vysušeny nad síranem sodným a zahuštěny na bílou pevnou látku. Tento produkt byl purifikován

rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v systému 2% ethylacetát/methylenchlorid. Výtěžek bromohydrinu 12 byl 3,62 g, 75%.

b/ /4R/-3-(/2'S,3'S/-2'-azido-3'-hydroxy-3'-fenylpropanoyl)-4-/fenylmethyl/-2-oxazolidinon (13)

Roztok 3,1g, 7,67 mmol aldolového aduktu 12 a 0,99 g, 15,3 mmol azidu sodného v 26 ml DMSO byl míchán 5 hod při pokojové teplotě. Výsledný tmavý roztok byl zředěn 2:1 směsí hexan/methylenchlorid, promyt 4 x vodou, vysušen nad síranem sodným a zahuštěn na světlý olej, který krystalizoval. Rekrystalizací z etheru/hexanu bylo získáno 2,2 g, 80% bílého krystalického azidu 13. Teplota tání 115-116°C /ether/hexan/; $[\alpha]_D^{20} = -6,6^\circ /c = 2,2, CHCl_3/$; ^1H NMR /CDCl₃/. δ 2,745 /dd, J = 13,6, 9,6 Hz, 1 H, CHH-Ph/, 2,949 /d, J = 6,6 Hz, 1 H, -OH/, 3,310 /dd, J = 13,6, 3,4 Hz, 1 H, CHHPh/, 4,199-4,274 /m, 2H, H-5/ 4,714-4,752 /m, 1H, H-4/, 5,075 /dd, J = 8,5, 6,6 Hz, 1H, CH-OH/, 5,383 /d, J = 8,5 Hz, 1 H, CHN₃/, 7,197-7,532 /m, 10 H/. ^{13}C NMR /CDCl₃/. δ 37,3, 55,5, 63,1, 66,5, 74,8, 126,7, 127,3, 128,7, 128,8, 128,9, 129,3, 134,8, 139,5, 153,3, 169,6. IR /KBr/ 3420, 3025, 2100, 2760, 1700, 1400, 1225 cm⁻¹. MS m/z 349 [M+H-H₂O]⁺. Analýza pro C₁₉H₁₈O₄N₄ - vypočteno: C, 62,29; H, 4,95; N, 15,29. nalezeno : C, 62,03; H, 5,06; N, 15,23.

c/ methyl/2S,3S/-2-azido-3-hydroxy-3-fenylpropionat /14/

K roztoku 1,52 g, 4,15 mmol azidu 13 v 8 ml bezvodého methanolu a 8 ml Cl₂CH₂ byla při 0°C kanylou přidána suspenze, vytvořená přidáním 5,2 ml, 4,5 mmol, 0,88 M methylmagnesiumbromidu v diethyletheru k 5 ml bezvodého methanolu, Reakční směs byla míchána 3 min, pak bylo přidáno 20 ml 1 N vodného roztoku hydrogensíranu sodného a směs byla 3 x extrahována methylenchloridem. Spojené organické fáze byly vysušeny nad bezvodým síranem sodným a zahuštěny. Zbytek byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v methylenchloridu. Byla získána bílá krystalická látka - požadovaná sloučenina 14; výtěžek činil 807 ug, 88%. Teplota tání 40-41°C

/ether-hexan/; ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 3,084 /bs, 1 H, -OH/, 3,774 /s, 3 H/, 4,108 /d, $J = 7$ Hz, 1 H, CH- N_3 /, 5,003 /bd, $J = 6,4$ Hz, 1 H, HC-OH/, 7,372 /s, 5 H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 52,6, 74,5, 126,6, 128,6, 128,7, 136,1, 169,3; IR /KBr/ 3500 /b/, 3020, 2960, 2120, 1740, 1460, 1440 cm^{-1} ; MS m/z 238 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.
 Analýza pro $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_3$ - vypočteno: C, 54,30; H, 5,01; N, 19,00
 nalezeno: C, 54,31; H, 5,08; N, 18,78

d/ methyl/2S,3S/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-hydroxy-3-fenylpropionát /15/

80 mg komerčně dostupného palladia na aktivním uhlí ve 4 ml ethylacetátu bylo intenzivně mícháno 15 min ve vodíkové atmosféře. K této suspenzi byla přidána směs 800 mg, 3,6 mmol azidoalkoholu 14 a 943 mg, 4,32 mmol di-t-butyldikarbonátu ve 4 ml ethylacetátu. Výsledná směs byla míchána pod vodíkem 2 hod při teplotě místnosti a průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Směs byla zfiltrována přes Celite, filtrát byl zahuštěn ve vakuu a vzniklá pevná bílá látka byla purifikována rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v 30% ethylacetátu/hexanu. Výtěžek bílého krystalického Boc chráněného aminoalkoholu 15 byl 1,04 g, 98%. Teplota tání 101-102°C /ether-hexan/; $[\alpha]_D^{20} = +83,3^\circ /c = 1,05, \text{CHCl}_3$ /; ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,433 /s, 9 H/, 3,701 /s, 3 H/, 3,929 /bd, $J = 5,3$ Hz, 1 H, HO-/ , 4,710-4,760 /m, 1 H/, 5,168-5,188 /m, 1 H/, 5,190-5,310 /m, 1 H/, 7,248-7,380 /m, 5 H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 28,2, 52,2, 59,7, 74,9, 80,5, 126,0, 127,9, 128,2, 139,3, 156,1, 170,1; IR /KBr/ 3450, 3390, 3000, 1760, 1710, 1530, 1280, 1260 cm^{-1} ; MS m/z 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
 Analýza pro $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$ - vypočteno: C, 61,02; H, 7,12
 nalezeno : C, 60,96; H, 6,96.

e/ methyl/2S,3S/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-methansulfonvl-3-fenylpropionát /16/

K roztoku 1,94 g, 5,81 mmol alkoholu 15 a 1,25 g, 12,4 mmol triethylaminu v 15 ml Cl_2CH_2 bylo přidáno

0,96 g, 8,4 mmol methansulfonylchloridu. Reakční směs byla míchána 20 min při 0°C. Potom byla přidána studená zředěná HCl, směs byla zředěna Cl₂CH₂, organická vrstva byla promyta vodným roztokem NaHCO₃, pak solankou a vysušena na Na₂SO₄. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový mesylat 16, získaný v podobě bílé napěněné peně látky, byl použit bez dalšího čištění v následujícím kroku. ¹H NMR /CDCl₃/. δ 1,394 /s, 3 H/, 2,316 /s, 3 H/, 3,718 /s, 3 H/, 4,878 /dd, J = 8,7, 5,0 Hz, 1 H, H-2/, 5,231 /bd, J = 8,7 Hz, 1 H, H - N/, 5,317 /d, J = 5,0 Hz, 1 H, H-3/, 7,379-7,425 /m, 5 H/.

f/ methyl/2R,3R/-3-/acetylthio/2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-fenylpropionat /17/

K roztoku 2,72 g, 7,29 mmol mesylatu 16 v 17 ml DMF bylo přidáno 3 g, 20,9 mmol draselné soli kyseliny thiol-octové. Roztok velmi zhoustl, proto bylo přidáno 5 ml DMF. Roztok byl ponechán pod argonem 20 hod při teplotě místnosti. Pak byla přidána voda, Cl₂CH₂ a směs byla 4 x promyta vodou. Organická vrstva byla usušena nad Na₂SO₄. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový produkt obsahoval směs 6:1 požadovaného produktu 17 a oxazolidinonu 2, jak je doloženo ¹H NMR surového produktu. Tato směs byla purifikována rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu v gradientu 5% až 50% ethylacetát/hexan. Takto byl získán požadovaný acetylovaný thiol 17 /výtěžek: 1,65 g, 6%; žlutohnědá pevná látka/ a potom oxazolidinon 2 /výtěžek: 193 mg, 12%. Acetylovaný thiol byl rekrystalizován za vzniku bílé pevné látky. Teplota tání 87-83°C /ether-hexan/; $[\alpha]_D^{20} = -37,2^\circ$ /1,0, CHCl₃/; ¹H NMR /CDCl₃/. δ 1,431 /s, 9 H/, 2,355 /s, 3 H/, 3,616 /s, 3 H/, 4,766 /dd, J = 6,6, 6,3 Hz, 1 H, H-2/, 5,029 /bd, J = 6,6 Hz, 1 H, H-3/, 5,264 /bd, J = 6,3 Hz, 1 H, H-N/, 7,311 /s, 5 H/; ¹³C NMR /CDCl₃/. δ 28,3, 30,2, 50,5, 52,2, 58,5, 80,3, 128,1, 128,3, 128,6, 137,8, 154,9, 170,6, 193,5. IR /KBr/ 3380, 2990, 2960, 1745, 1690, 1520, 1240, 1170 cm⁻¹. MS m/z 354 [M+H]⁺; Analýza pro C₁₇H₂₃O₅NS: vypočteno: C, 57,77; H, 6,56; N, 3,97. nalezeno: C, 58,05; H, 6,92; N, 3,73.

g/ methyl/2R,3R/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/ amino)-3-(/4-methylbenzyl)thio -3-fenylpropionová kyselina /18/

500 mg, 1,4 mmol acetylovaného thiolu 17 bylo rozpuštěno v 2 ml methanolu, pak bylo přidáno 1,6 ml, 1M vodného roztoku NaOH a nakonec 300 mg, 1,62 mmol bromoxylenu. Po 20 min většina výchozího materiálu zmizelo, jak bylo zjištěno pomocí TLC. Roztok byl opatrně neutralizován zředěnou HCl. Těkavé látky byly odstraněny ve vakuu a zbytek byl extrahován Cl_2CH_2 3 x. Organická vrstva byla promyta solankou a vysušena nad Na_2SO_4 . Surový produkt byl přečištěn rychlou chromatografií na silikagelu v systému 5% až 20% ethylacetát/hexan. Požadovaný ester 18 byl získán jako bílá krystalická látka. Výtěžek byl 480 mg, 79%. Teplota tání $97-98^\circ\text{C}$ /ether-hexan/; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -171,8^\circ$ /c = 1,05, CHCl_3 /; ^1H NMR / CDCl_3 /. δ 1,384 /s, 9 H/, 2,326 /s, 3 H/, 3,393 /d, J = 13 Hz, 1 H/, 3,551 /d, J = 13 Hz, 1 H/, 3,572 /s, 3 H, OCH_3 /, 4,126 /d, J = 5,4 Hz, H-3/, 4,630 /dd, J = 8,8, 5,8 Hz, 1 H, H-2/, 5,220 /bd, J = 8,8 Hz, 1 H, H-N/, 7,028-7,107 /m, 4 H/, 7,291-7,362 /m, 5 H/; ^{13}C NMR / CDCl_3 /. δ 21,0, 28,3, 35,5, 51,6, 52,1, 57,5, 80,1, 127,8, 128,5, 128,7, 128,9, 129,2, 134,3, 136,9, 138,4, 154,7, 170,8; m/z 316 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{NS} \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$ - vypočteno: C, 65,76; H, 7,08; N, 3,33; nalezeno: C, 65,59; H, 7,03; N, 3,36.

h/ /2R,3R/-2-(/tert-butyloxykarbonyl/amino)-3-(/4-methylbenzyl/thio)-3-fenylpropionová kyselina /19/

380 mg, 0,91 mmol methylesteru 18 a 376 mg, 8,89 mmol bezvodého chloridu lithného bylo rozpuštěno v 10 ml DMF. Reakční směs byla 4 dny zahřívána na 90°C . Po ochlazení na teplotu místnosti byla k směsi přidána zředěná HCl. Potom byla směs několikrát extrahována ethylacetátem, organická vrstva byla promyta solankou a vysušena nad Na_2SO_4 . Surový produkt byl purifikován rychlou sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití stupňového gradientu: 20% ethylacetát/hexan, 25% ethylacetát/5% kyselina octová/hexan. Nejprve

se objevil výchozí materiál 18 /75 mg, 20%/ a potom požadovaná karboxylová kyselina jako bílá pevná látka; po rekrystalizaci byl výtěžek 341 mg, 77%. Teplota tání 107-108°C /ether-hexan/; $[\alpha]_D^{20} = -143,7^\circ /c = 1,66, \text{CHCl}_3/$; $^1\text{H NMR /CDCl}_3/$. δ 1,379 /s, 9 H/, 2,300 /s, 3 H/, 3,460 /d, J = 13,3 Hz, 1 H/, 3,588 /d, J = 13,3 Hz, 1 H/, 4,242 /d, J = 5,5 Hz, H-3/, 4,646 /dd, J = 8,7, 5,5 Hz, 1 H, H-2/, 5,273 /bd, J = 8,7 Hz, 1 H, H-N/, 7,055 /s, 4 H/, 7,259-7,340 /m, 5 H/; $^{13}\text{C NMR /CDCl}_3/$. δ 21,1, 28,2, 35,5, 50,8, 58,1, 80,5, 127,9, 128,6, 128,9, 129,2, 133,9, 136,9, 138,1, 155,3, 174,5; MS m/z 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Analýza pro $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{NS}$: C, 65,81; H, 6,78; N, 3,48 - vypočteno. Nalezeno: 65,83; H, 6,92; N, 3,57.

Příklad 33

Složení farmaceutického prostředku pro parenterální dávkování

Preparát obsahující 20 mg sloučeniny z Příkladu 1 nebo 2 v podobě sterilního suchého prášku byl připraven následujícím způsobem: 20 mg sloučeniny bylo rozpuštěno v 15 ml destilované vody. Roztok byl za sterilních podmínek zfiltrován do 25 ml vícedávkové ampule a lyofilizován. Prášek byl rozpuštěn v 20 ml 5% dextrosy ve vodě /D5W/ pro intravenózní nebo intramuskulární injekce. Dávkování je tak určeno injikovaným objemem. Další ředění může být provedeno přidáním odměřeného objemu tohoto roztoku preparátu k dalšímu objemu D5W pro injekce, nebo může být odměřená dávka přidána k jinému mechanismu pro podávání účinné látky, jako je lahev nebo sáček pro nitrožilní kapací infúzi či jiný systém pro injekci a infúzi.

Příklad 34

Složení farmaceutického prostředku pro orální dávkování

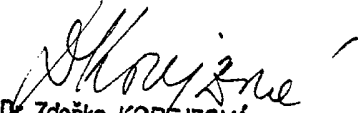
Kapsle pro orální podání byla připravena smícháním a umletím 50 mg sloučeniny z Příkladu 3 s 75 mg laktosy a 5 mg magnesiumstearatu. Prosátý prášek byl pak nasypán do tvrdé želatinové kapsle.

Příklad 35

Složení farmaceutického prostředku pro orální dávkování

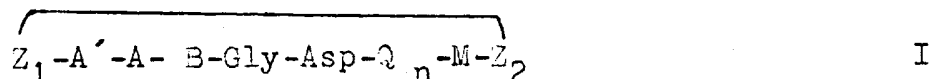
Tableta pro orální podání byla připravena smícháním a granulací 20 mg sacharosy, 150 mg dihydrátu síranu vápenatého a 50 mg sloučeniny z Příkladu 3 spolu s 10% roztokem želatiny. Mokrý granule byly prosátý, usušeny, smíchány s 10 mg škrobu, 5 mg talku a 3 mg kyseliny stearové; z této směsi byla vyli-
sována tableta.

Tento popis plně vysvětluje přípravu a použití slouče-
nin, které jsou předmětem vynálezu. Vynález však není omezen
zde popsaným přesným způsobem provedení, ale zahrnuje všechny
modifikace v rozmezí následujících nároků.


JUDr. Zdeňka KOREJZOVÁ
advokátka

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Cyklické protiagregační peptidy obecného vzorce I:



kde

A' je buď nepřítomen, nebo představuje Asn, Gln, Ala nebo Abu;
A je buď nepřítomen, nebo představuje D- nebo L-aminokyselinu,
a to Arg, HArg, (Me₂)Arg, (Et₂)Arg, Abu, Ala, Gly, His, Lys,
nebo její α-R' substituovaný derivát , dále pak Dtc,
Tpr nebo Pro;

B znamená D- nebo L-aminokyselinu, a to Arg, HArg, HArg,
(Me₂)Arg, (Et₂)Arg, Lys, nebo její α-R' substituované deriváty;

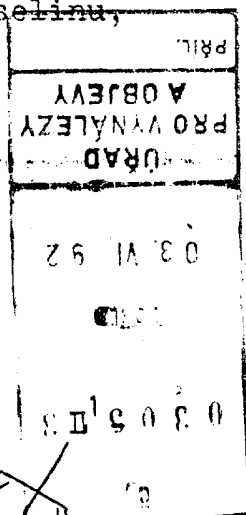
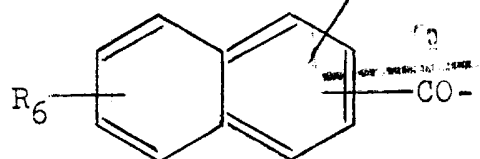
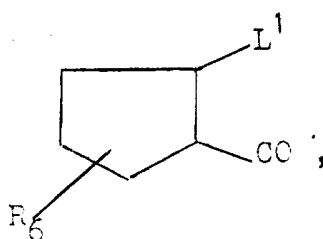
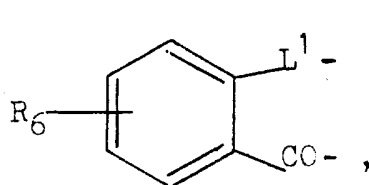
Q je buď nepřítomen, nebo představuje D- nebo L-aminokyselinu,
a to Tyr, (Alk)Tyr, Phe, (4'W)Phe, HPhe, Phg, Pro, Trp, His,
Ser, Alk Ser, Thr, (Alk)Cys, (Alk)Pen, Ala, Val, Nva, Met,
Leu, Ile, Nle nebo Nal, nebo její α-R' substituovaný derivát;

M je buď nepřítomný, nebo znamená D- nebo L-aminokyselinu,
a to Glu, Phe, Pro, Lys, Ser anebo, je-li n rovno 1,
B-Gly-Glu-Q;

W je buď halogen nebo Alk;

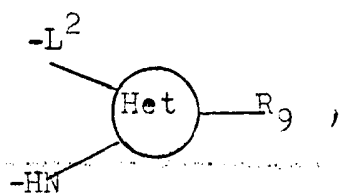
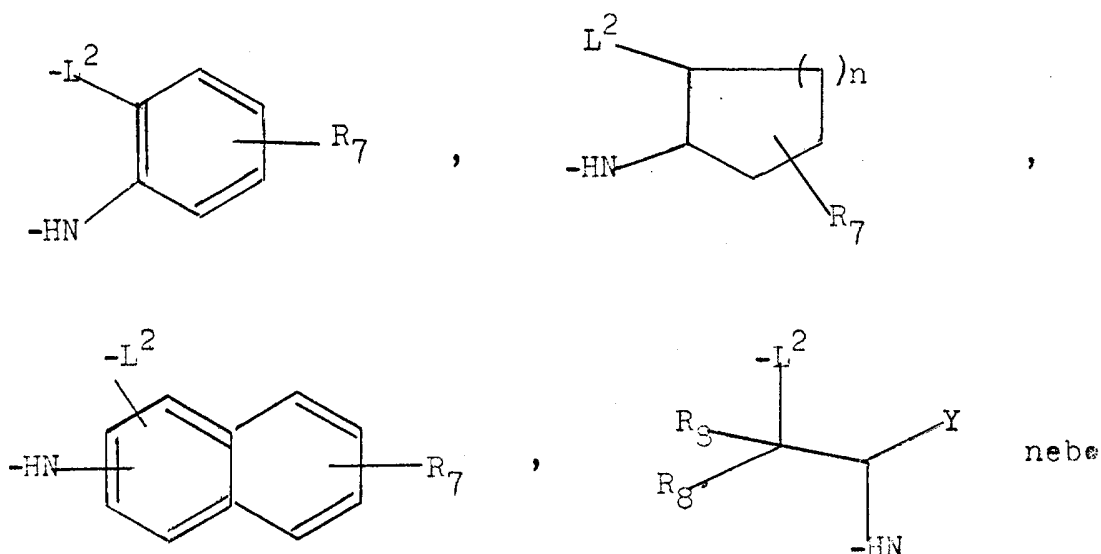
R' je buď Alk nebo PhCH₂;

Z₁ znamená





Z_2 znamená



kde Z_1 a Z_2 jsou spojeny kovalentní vazbou mezi L^1 a L^2
nebo Z_1 a Z_2 dohromady představují kovalentní vazbu mezi aminokoncovým zbytkem a karboxykoncovým zbytkem;

L^1 a L^2 znamenají $-3-$ nebo $-(CH_2)_p-$;

X je R_4R_5N nebo H;

Y je H, $CONR_1R_2$ nebo CO_2R_2 ;

R_1 a R_2 jsou H, Alk nebo $(CH_2)_pAr$;

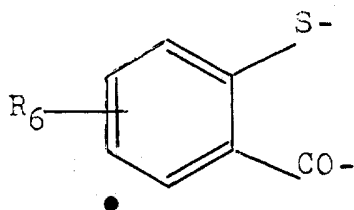
R_3 a R_3' jsou H, Alk, $(CH_2)_pAr$ nebo dohromady znamenají $-(CH_2)_4-$ nebo $-(CH_2)_5-$;

R_4 je H nebo Alk;

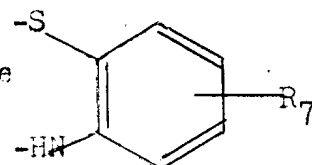
- R_5 je R_{11} , $R_{11}CO$, $R_{11}OCO$, $R_{11}OCH(R_{11}')CO$,
 $R_{11}NHCH(R_{11}')CO$, $R_{11}SCH(R_{11}')CO$, $R_{11}SO_2$ nebo $R_{11}SO$;
- R_6 je Alk, OAlk, halogen nebo X;
- R_7 je H, Alk, OAlk, halogen nebo Y;
- R_8 a R_8' jsou H, Alk, $(CH_2)_pPh$, $(CH_2)_pNph$, anebo dohromady
 představují $-(CH_2)_4-$ nebo $-(CH_2)_5-$;
- R_9 je H, Alk nebo Y;
- R_{10} je H nebo Alk;
- R_{11} a R_{11}' jsou H, C_{1-5} alkyl, C_{3-7} cykloalkyl, Ar,
 Ar- C_{1-5} alkyl, Ar- C_{3-7} cykloalkyl;
- Ar je fenyl nebo fenyl substituovaný jednou nebo
 dvěma C_{1-5} alkylovými, trifluoromethylovými, hydroxy-,
 C_{1-5} -alkoxy nebo halogenovými skupinami;
- n je 1 nebo 2;
- q je 0 nebo 1;
- p je 0, 1, 2 nebo 3
- a farmaceuticky aktivní soli výše zmíněných látek;
 podmínkou je, aby když n rovná se 1 a Z_1 je X-Cys, X-Pen
 nebo X-APmp, Z_2 není Cys-Y, Pen-Y nebo APmp-Y.

2. Sloučenina podle nároku 1, v níž jak L^1 tak L^2 předsta-
 vuje síru.

3. Sloučenina podle nároku 2, v níž Z_1 je



4. Sloučenina podle nároku 2, v níž Z_2 je



5. Sloučenina podle nároku 1, v níž Z_1 a Z_2 dohromady představují kovalentní vazbu.

6. Sloučenina podle nároku 1 - 5, v níž B je Arg, HArg nebo α -R' substituovaný derivát Arg nebo HArg.

7. Sloučenina podle nároku 1 - 6, v níž A' a A nejsou přítomné.

8. Sloučenina podle nároku 4, v níž B je MeArg.

9. Sloučenina podle nároku 1, kterou je:

cyklo(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Cys-NH₂;
N^α-Ac-cyklo(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-PcS-NH₂;
cyklo-(S,S)-Mba-Sar-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-Sar-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-Arg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-D-MeArg-Gly-Asp-Man;
cyklo-(S,S)-Mba-MeArg-Gly-Asp-N-Me-Man;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-(2R,3S)Pcs-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-(2R,3R)Pcs-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Pen-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-MeArg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-MeArg-Gly-Asp-Ser-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-NH₂;
N^αAc-cyklo-(S,S)-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Lys-Gly-Glu-Ser-Cys-NH₂;
cyklo-(1^α,6^γ)-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂;
cyklo-(4^α,6^γ)-Gly-MeArg-Gly-Asp-Ser-Glu-NH₂;
cyklo-(1,8)-Arg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe nebo
cyklo-(1,8)-MeArg-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly-Asp-Phe.

10. Farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

11. Farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu podle nároku 9 a farmaceuticky přijatelný nosič.

12. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 - 9 pro použití v léčivu.

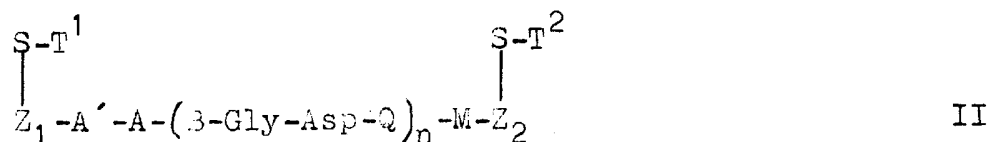
13. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 - 9 pro výrobu léčiva k léčení akutního infarktu myokardu.

14. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 - 9 pro výrobu léčiva k léčení mrtvice nebo přechodných ischemických záchvatů.

15. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 - 9 pro výrobu léčiva k léčení nestabilní anginy.

16. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 - 9 a fibrinolytické látky pro výrobu léčiva působícího trombolýzu a bránícímu opakovanému ucpání tepny nebo žíly savce.

17. Sloučenina obecného vzorce II:



kde:

A' je buď nepřítomen nebo Asn, Gln, Ala nebo Abu;

A je buď nepřítomen nebo D- či L-aminokyselina, a to Arg, HArg, (Me₂)Arg, (Et₂)Arg, Abu, Ala, Gly, His, Lys, nebo její α-R' substituovaný derivát, dále pak Dtc, Tpr nebo Pro;

β je D- nebo L-aminokyselina, a to Arg, HArg, NArg, (Me₂)Arg, (Et₂)Arg, Lys, nebo její α-R' substituovaný derivát;

Q je buď nepřítomen nebo D- nebo L-aminokyselina, a to Tyr, Alk Tyr, Phe, (4'W)Phe, HPhe, Phg, Pro, Trp, His, Ser,

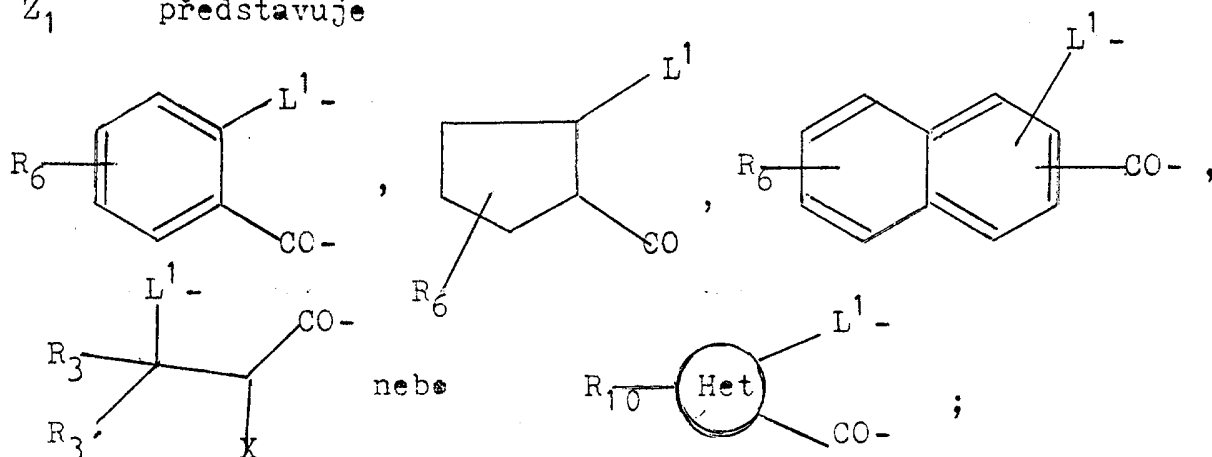
(Alk)Ser, Thr, (Alk)Thr, (Alk)Cys, (Alk)Pen, Ala, Val, Nva, Met, Leu, Ile, Nle či Nal, nebo její α -R' substituevaný derivát;

M buď není přítomen, nebo je D- nebo L-Glu, Phe, Pro, Lys, Ser nebo, je-li n rovne 1, B-Gly-Glu-Q;

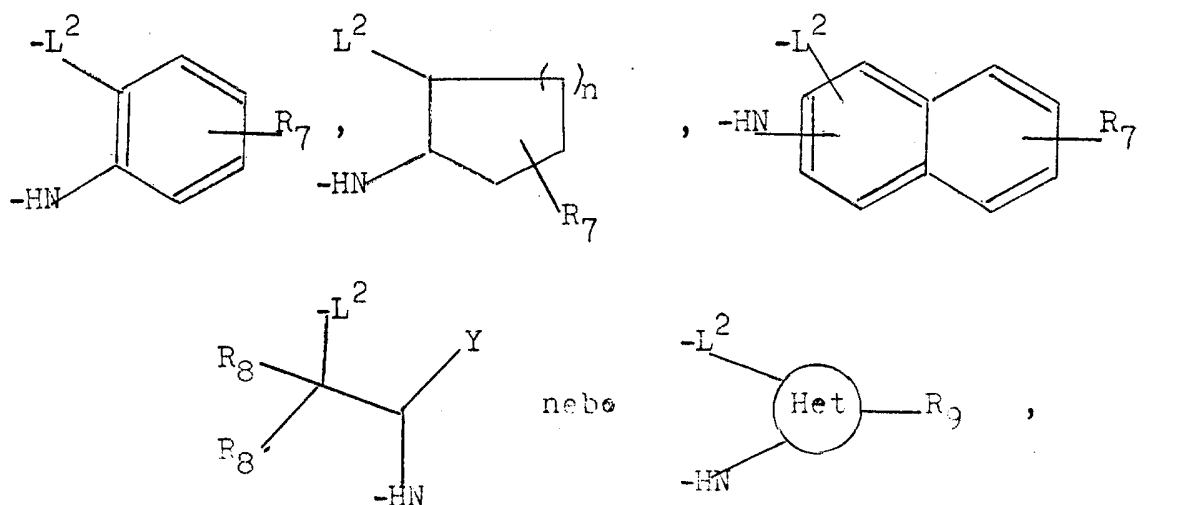
W je halogen nebo Alk;

R' je Alk nebo PhCH_2 ;

Z₁ představuje



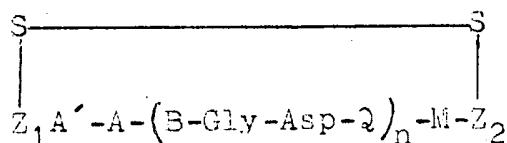
Z₂ představuje



, kde Z₁ a Z₂ jsou spojeny kovalentní vazbou mezi L¹ a L²;

- L^1 a L^2 jsou -S-;
 T je vodík nebo odstranitelná skupina;
 X je R_4R_5N nebo H;
 Y je H, $CONR_1R_2$ nebo CO_2R_2 ;
 R_1 a R_2 jsou H, Alk nebo $(CH_2)_pAr$;
 R_3 a R_3' jsou H, Alk, $(CH_2)_pAr$, nebo dehromady představují $-(CH_2)_4-$ nebo $-(CH_2)_5-$;
 R_4 je H nebo Alk;
 R_5 je R_{11} , $R_{11}CO$, $R_{11}OCO$, $R_{11}OCH(R_{11})CO$, $R_{11}NHCH(R_{11})CO$, $R_{11}SCH(R_{11})CO$, $R_{11}SO_2$ nebo $R_{11}SO$;
 R_6 je Alk, OAlk, halogen nebo X;
 R_7 je H, Alk, OAlk, halogen nebo Y;
 R_8 a R_8' jsou H, Alk, $(CH_2)_pPh$, $(CH_2)_pNph$, nebo dehromady představují $-(CH_2)_4-$ nebo $-(CH_2)_5-$;
 R_9 je H, Alk nebo Y;
 R_{10} je H nebo Alk;
 R_{11} a R_{11}' jsou H, C_{1-5} alkyl, C_{3-7} cykloalkyl, Ar, Ar- C_{1-5} alkyl, Ar- C_{3-7} cykloalkyl;
Ar je fenyl nebo fenyl substituovaný jednou či dvěma C_{1-5} alkylovými, trifluoromethylovými, hydroxy, C_{1-5} alkoxy nebo halogenovými skupinami;
 n je 1 nebo 2;
 q je 0 nebo 1 a
 p je 0, 1, 2 nebo 3,
za předpokladu, že je-li n rovno 1 a Z_1 X-Cys, X-Pen nebo X-APmp, pak Z_2 není Cys-Y, Pen-Y nebo APmp-Y.

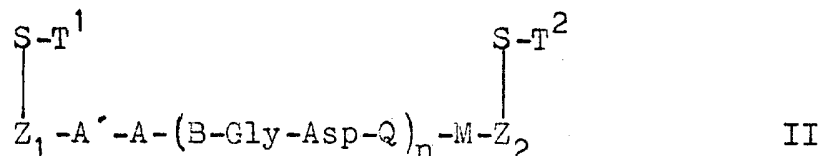
18. Postup přípravy sloučeniny obecného vzorce III:



III

kde A' , A , B , Q , M , Z_1 , Z_2 a n mají stejný význam, jaký je uveden u nároku 1 a L^1 a L^2 oba představují S ; to zahrnuje

a/ oxidativní cyklizaci sloučeniny obecného vzorce II:



kde:

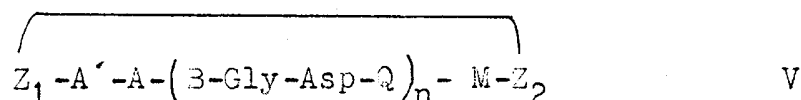
A' , A , B , Q , M a n mají stejný význam, jaký je uveden u nároku 1;

Z_1 a Z_2 jsou spojeny kovalentní vazbou mezi L^1 a L^2 , jak je uvedeno u nároku 1, a L^1 a L^2 obě představují S ;

T^1 a T^2 jsou H , nebo

b/ nukleofilní cyklizaci sloučeniny obecného vzorce II působením zásady, kde A' , A , B , Q , M , Z_1 , Z_2 a n mají význam definovaný výše a T^1 a T^2 představují jeden odstranitelnou skupinu a druhý H .

19. Postup přípravy sloučeniny obecného vzorce V:

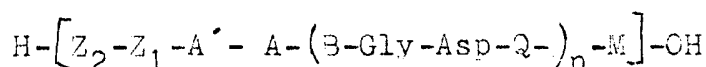


kde:

A' , A , B , Q , M a n mají stejný význam, jaký je uveden u nároku 1;

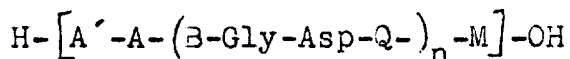
Z_1 a Z_2 jsou spojeny přes kovalentní vazbu mezi L^1 a L^2 , jak je uvedeno u nároku 1, a L^1 a L^2 každý představuje $(CH_2)_p$; nebo Z_1 a Z_2 dohromady představují kovalentní vazbu mezi aminokoncevým zbytkem a karboxykoncevým zbytkem; to zahrnuje

i/ cyklizaci sloučeniny obecného vzorce:



pomocí kondenzačního činidla, kde:

L^1 a L^2 jsou $(CH_2)_p$; nebo



kde Z_1 a Z_2 dohromady představují kovalentní vazbu;

H- a -OH zde představují amino a karboxylový zbytek kterýchkoliv dvou sousedních zbytků v cyklickém peptidu a A' , A, B, Q, M a n mají stejný význam, jaký je uveden u nároku 1 a reaktivní skupiny jsou vhodně chráněny a

ii/ odstranění všech chránících skupin.

20. Sloučenina obecného vzorce I uvedeného u nároku 1, co do obsahu zde popsána s odkazem na příklady.

21. Farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu uvedenou v nároku 20 a farmaceuticky přijatelný nosič.

22. Sloučenina uvedená v nároku 20 pro použití v léčivu.

23. Použití sloučeniny uvedené v nároku 20 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení akutního infarktu myokardu a /nebo/ mrtvice nebo přechodných ischemických záchvatů a /nebo/ nestabilní anginy.

24. Použití sloučeniny uvedené v nároku 20 a fibrinolytické látky pro výrobu farmaceutického prostředku působícího trombolýzu a bránícímu opakovanému ucpání tepny nebo žíly savce.

25. Sloučenina obecného vzorce II uvedeného v nároku 17, jejíž podstata je zde popsána a doložena příklady.

26. Postup pro přípravu sloučeniny obecného vzorce III uvedeného v nároku 18, tak jak je zde popsán a doložený příklady.

27. Postup pro přípravu sloučeniny obecného vzorce V uvedený v nároku 19, tak jak je zde popsán a doložený příklady.

Zastupuje:

JUDr. Zdenka KOREJZOVÁ
advokátka