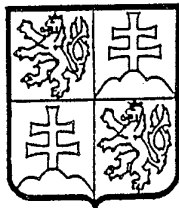


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA

(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

276 972

(21) Číslo přihlášky : 6901-84
(22) Přihlášeno : 13.09.84
(30) Prioritní data : 25.10.83 - US - 83/545094
(40) Zveřejněno : 15.04.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :
C 07 K 7/10
A 61 K 37/43

(73) Majitel patentu : THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES,
La Jolla, California, US

(72) Původce vynálezu : Rivier Jean E. F., La Jolla, California, US;
Vale Wylie W. Jr., La Jolla, California, US

(54) Název vynálezu : Peptidy, způsob jejich výroby a farmaceutické
prostředky s jejich obsahem

(57) Anotace :

Řešení se týká peptidů vzorce I, kde R₁ znamená Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, Leu, His nebo D-His, při substituci typu calfa_{Me} nebo Nalfa_{Me} nebo bez substituce, R₂ znamená Ala nebo D-ala, R₃ znamená Asp nebo D-Asp, R₈ znamená Ser, Asn, D-Ser, nebo D-Asn, R₁₀ znamená Tyr nebo D-Tyr, R₁₂ znamená Arg nebo Lys, R₁₃ znamená Ile nebo Val, R₁₅ znamená GSly nebo D-Ala, R₁₇ znamená Leu nebo D-Leu, R₁₈ znamená Tyr nebo Ser, R₂₃ znamená Leu nebo D-Leu, R₂₄ znamená His nebo Gln, R₂₅ znamená Glu, Asp, D-Glu nebo D-Asp, R₂₇ znamená Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva nebo Val, R₂₈ znamená Asn, nebo Ser, R₃₄ znamená Arg nebo Ser, R₃₈ znamená Gln nebo Arg, R₃₉ znamená Arg nebo Gly, R₄₀ znamená Ser nebo Ala, R₄₂ znamená Phe, Ala nebo Val, R₄₃ znamená Asn nebo Arg, R₄₄ znamená Val nebo Leu, přičemž buď a) R₁ má substituci typu calfa_{Me}, nebo Nalfa_{Me} nebo b) R₁₇ a/nebo R₂₃ znamená D-Leu nebo c) R₂₅ znamená D-Glu nebo D-Asp, přičemž navíc je možno vynechat některý ze zbytků R₄₄, R₄₃-R₄₄, R₄₂-R₄₃-R₄₄, R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄, R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-
-R₄₄, Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-
-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-
-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,
způsobu jejich výroby a farmaceutických
prostředků pro uvolňování růstového hormonu
s jejich obsahem.

Peptidy, způsob jejich výroby a farmaceutické prostředky s jejich obsahem

Oblast vynálezu

Vynález se týká peptidů, které ovlivňují funkci hypofýzy u lidí i jiných živočichů. Jde zvláště o peptidy, které podporují uvolnění růstového hormonu z hypofýzy. Vynález se také týká způsobu výroby těchto peptidů a farmaceutických prostředků s jejich obsahem.

Dosavadní stav techniky

Fysiologové dlouho věděli, že hypothalamus řídí sekreční funkci adenohypofýzy tak, že produkuje zvláštní látky, které podporují nebo brzdí vyměšování jednotlivých hormonů hypofýzy. V roce 1982 byl izolován z extraktů nádoru lidské slinivky břišní faktor, který uvolňuje růstový hormon (hpGRF), tato látka byla čištěna, charakterizována, syntetizována a vyzkoušena a bylo prokázáno, že podporuje uvolňování růstového hormonu hypofýzou. Mimo to byly syntetizovány a charakterizovány také další obdobné faktory, a to kryší faktor, uvolňující růstový hormon (rGRF) a odpovídající faktor z vepře (pGRF).

Nyní byly syntetizovány nové polypeptidy, které uvolňují růstový hormon z baněk hypofýzy, pěstovaných v tkáňové kultuře, tyto peptidy alespoň částečně odolávají rozkladu enzymu v živočišném organismu. Uvedené peptidy splňují alespoň jeden z následujících požadavků:

- a) zbytek v poloze 1 je substituován buď způsobem N^{alfa}_{Me} ,
nebo C^{alfa}_{Me} ,
- b) D-Leu je v poloze 17 a/nebo v poloze 23 a/nebo
- c) D-Glu nebo D-Asp se nachází v poloze 25.

Peptidy mohou splňovat větší počet těchto požadavků, musí však splňovat alespoň jeden z nich. Zbytkem v poloze 1 může být Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His a D-His (tento zbytek může nést methylovou skupinu buď v poloze alfa na uhlíkovém atomu, nebo na alfa-aminoskupině). Peptidy obvykle obsahují D-Alfa v poloze 2 a/nebo D-Asp v poloze 3 a/nebo D-Arg nebo D-Ser v poloze 8 a/nebo D-Tyr v poloze 10 a/nebo D-Alfa v poloze 15. Peptidy s výhodou jsou substituovány také skupinami D-Met, Nle nebo Nve místo Met v poloze 27.

Farmaceutické prostředky mohou obsahovat analogy, vyrobené způsobem podle vynálezu o délce 28 až 44 zbytků aminokyselin nebo netoxické soli těchto zbytků ve formě disperze v kapalině, přijatelné z farmaceutického nebo veterinárního hlediska nebo v pevném nosiči. Takto získaný prostředek je možno použít v klinickém lékařství, a to v lidském a veterinárním lékařství k léčebným účelům a také k účelům diagnostickým. Sloučeniny je možno užít k urychlení růstu teplokrevných živočichů včetně drůbeže a v zemědělství i k urychlení růstu studenokrevných živočichů,

například ryb a podobně.

Nomenklatura pro nové peptidy byla užita podle publikace Schroder a Lubke "The Peptides", Academie Press (1965) tak, že v souladu s běžným názvoslovím se aminoskupina na N-terminálním zakončení nachází na levé straně a karboxylová skupina na C-terminálním zakončení se nachází na pravé straně. U přírodních aminokyselin se rozumí těmito kyselinami přirozeně se vyskytující látky, které se nacházejí v bílkovinách, a to Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp a His. Nle znamená norleucin a Nva znamená norvalin. V případě, že zbytek aminokyseliny má isomerní formy, rozumí se vždy L-forma, není-li výslovně uvedeno jinak.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou peptidy obecného vzorce I

$R_1-R_2-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln-R_{17}-$
 $R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{23}-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-$
 $R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44}$

(I)

kde

R_1 znamená Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His nebo D-His, při substituci typu C^{alfa}_{Me} nebo N^{alfa}_{Me} nebo bez substituce,

R_2 znamená Ala nebo D-Ala,

R_3 znamená Asp nebo D-Asp,

R_8 znamená Ser, Asn, D-Ser, nebo D-Asn,

R_{10} znamená Tyr nebo D-Tyr,

R_{12} znamená Arg nebo Lys,

R_{13} znamená Ile nebo Val,

R_{15} znamená Gly nebo D-Alfa,

R_{17} znamená Leu nebo D-Leu,

R_{18} znamená Tyr nebo Ser,

R_{23} znamená Leu nebo D-Leu,

R_{24} znamená His nebo Gln,

R_{25} znamená Glu, Asp, D-Glu nebo D-Asp,

R_{27} znamená Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva nebo Val,

R₂₈ znamená Asn nebo Ser,
R₃₄ znamená Arg nebo Ser,
R₃₈ znamená Gln nebo Arg,
R₃₉ znamená Arg nebo Gly,
R₄₀ znamená Ser nebo Ala,
R₄₂ znamená Phe, Ala nebo Val,
R₄₃ znamená Asn nebo Arg,
R₄₄ znamená Val nebo Leu,
za předpokladu, že buď

- a) R₁ má substituci typu C^{alfa}_{Me}, nebo N^{alfa}_{Me} nebo
 - b) R₁₇ a/nebo R₂₃ znamená D-Leu nebo
 - c) R₂₅ znamená D-Glu nebo D-Asp,
- přičemž navíc je možno vynechat některý ze zbytků

R₄₄,

R₄₃-R₄₄,

R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

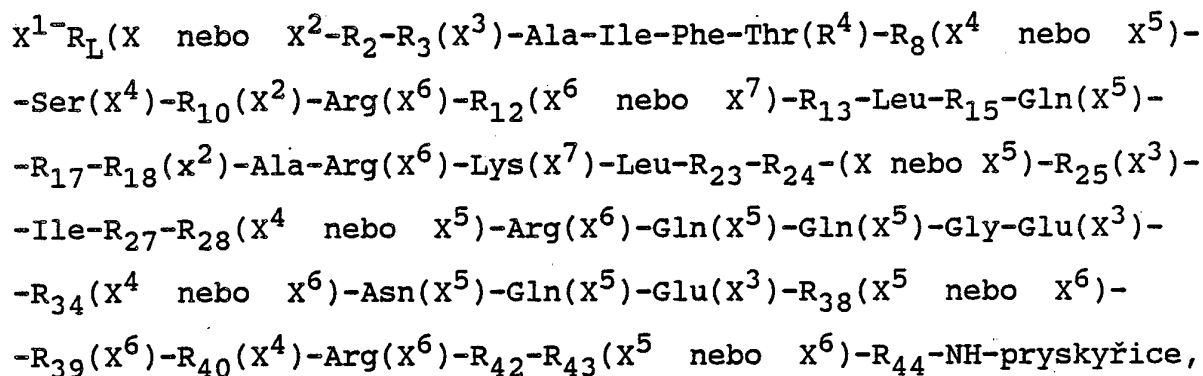
Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄.

Podstatu vynálezu tvoří také způsob výroby těchto peptidů, který spočívá v tom, že se

- i) naváže N-terminální aminokyselina, chráněná terc.butoxykarbonylovou skupinou na -NH- benzhydrylaminové pryskyřici nebo se
- ii) ochranná terc. butoxykarbonylová skupina odštěpí a postupně se naváží jednotlivé aminokyseliny v množství 1 až 2 mmoly aminokyseliny, chráněné terc. butoxykarbonylovou skupinou, na 1 gram pryskyřice v methylenchloridu, dimethylformamidu nebo ve směsi těchto rozpouštědel za vzniku sloučeniny obecného vzorce II s alespoň jednou ochrannou skupinou



(II)

kde

- X^1 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na α -aminoskupině,
- X^2 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na fenolové hydro skupině Tyr,
- X^3 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na karboxylové skupině Asp nebo Glu,
- X^4 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na alkoholové hydro skupině Thr,
- X^5 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na alkoholové hydro skupině Ser,
- X^6 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na guanidinové skupině Arg,
- X^7 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na aminoskupině Lys postranního řetězce,
- X znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na dusíkovém atomu imidazolové skupiny His,

iii) odštěpí se ochranná skupina nebo ochranné skupiny za sloučeniny obecného vzorce II za vzniku peptidu obecného vzorce I nebo jeho biologicky aktivního fragmentu a popřípadě se

iv) převede výsledný peptid na svou netoxickou adiční sůl.

Dále budou probrány možné a výhodné významy jednotlivých ochranných skupin.

X^1 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na α -aminoskupině. Běží o ochranné skupiny, které se běžně užívají při postupné syntéze polypeptidů. Ochranné skupiny ve významu X^1 je možno zařadit do několika skupin, a to

- 1) aromatické ochranné skupiny typu urethanu, například fluorenylmethyloxykarbonyl (Fmoc), benzyloxykarbonyl (Z) a substituované Z, například p-chlorbenzyloxykarbonyl, p-nitrobenzyloxykarbonyl, p-brombenzyloxykarbonyl a p-methoxybenzyloxykarbonyl,
- 2) ochranné skupiny typu alifatického urethanu, například terbutyloxykarbonyl (BOC), diisopropylmethyloxykarbonyl, isopropylloxykarbonyl, ethoxykarbonyl, allyloxykarbonyl a
- 3) ochranné skupiny typu cykloalkylurethanu, například cyklopentyloxykarbonyl, adamantyloxykarbonyl a cyklohexyloxykarbonyl.

Výhodnou ochrannou skupinou na α -aminoskupině je BOC, a to i v případě, že v poloze 1 se užije N^α-Me-substituovaného zbytku.

X² znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu pro imidazolový dusíkový atom aminokyseliny His, například Tos.

X^2 je ochranná skupina pro fenolovou hydroxylovou skupinu Tyr, například tetrahydropyranyl, terc. butyl, trityl, Bzl, CBZ, 4br-CBZ a 2,6-dichlorbenzyl (DCB). Výhodnou ochrannou skupinou je 2,6-dichlorbenzyl, X^2 může také znamenat atom vodíku, což znamená, že se na zbytku aminokyseliny v této poloze nenachází žádná ochranná skupina.

X^3 znamená atom vodíku nebo vhodná ochranná skupina, vytvářející ester s karboxylovou skupinou Asp nebo Glu, například benzyl (OBzl), 2,6-dichlorbenzyl, methyl a ethyl.

X^4 je vhodná ochranná skupina pro hydroxylovou skupinu Thr nebo Ser, například acetyl, benzoyl, terc.butyl, trityl, tetrahydropyranyl, Bzl, 2,6-dichlorbenzyl a CBZ. Výhodnou ochrannou skupinou je Bzl. X^4 může znamenat také atom vodíku, v tomto případě se na hydroxylové skupině nenachází žádná ochranná skupina.

X^5 znamená atom vodíku nebo vhodnou ochrannou skupinu na postranním řetězci amidoskupiny Asn nebo Gln. S výhodou běží o xanthyl (Xan).

X^6 znamená vhodnou ochrannou skupinu pro guanidinovou skupinu Arg, například nitroskupinu, skupinu Tos, CBZ, adamantyloxykarbonyl a BOC, nebo znamená vodík atom vodíku.

X^7 znamená vodík nebo vhodnou ochrannou skupinu pro aminoskupinu Lys. Vhodnou aminoskupinu chránící ochrannou skupinu je například 2-chlorbenzyloxykarbonyl (2-Cl-Z), Tos, t-amyloxykarbonyl a BOC.

X^8 znamená atom vodíku nebo vhodnou ochrannou skupinu na postranním řetězci ve svrchu uvedeném významu.

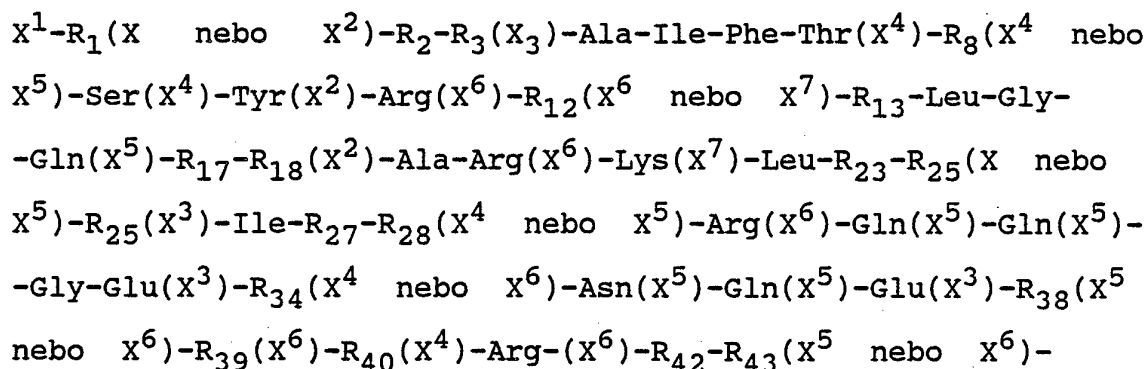
Met může být popřípadě chráněn atomem kyslíku, s výhodou však chráněn není.

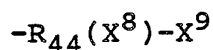
Volba ochranných skupin pro postranní řetězec není kritická až na to, že je zapotřebí volit takovou skupinu, která není odstraněna v průběhu odstraňování ochranné skupiny na α -aminoskupině při syntéze. Pro některé aminokyseliny, například His, není zapotřebí obvykle užít po ukončeném navázání ochrannou skupinu nebo může jít o tutéž ochrannou skupinu.

X^9 znamená vhodnou ochrannou skupinu na C-terminální karboxylové skupině, například skupinu X^3 , tvořící ester nebo běží o zakotvující vazbu při syntéze na pevné fázi, sloužící k vazbě na pryskyřici jako pevnou podložku, nebo běží o des- X^9 , v tomto případě má zbytek na C-terminálním zakončení karboxylovou skupinu Y, jak již bylo uvedeno. V případě, že se užije jako pevná podložka pryskyřice, je i tato pryskyřice v širším smyslu uvažována jako ochranná skupina a vzniká tedy seskupení $-O-CH_2$ -pryskyřice jako podložka, $-NH$ -benzhydrylamin (BHA) pryskyřice jako podložka nebo $-NH$ -paramethylbenzhydrylamin (MBHA)-pryskyřice jako podložka. V případě, že je požadován nesubstituovaný amid, je výhodné použít BHA nebo MBHA pryskyřice, protože odštěpením vzniká přímo amid. V případě, že je požadován N-methylamid, je možno jej získat z N-methyl BHA-pryskyřice. V případě, že jsou požadovány jiné substituované amidy nebo jiné skupiny než volná kyselina na C-terminálním zakončení, může být výhodné syntetizovat peptid klasickým způsobem tak, jak je popsáno v publikaci Houben-Weylové.

Ve vzorci meziprojektu je alespoň jedna skupina X ochranná skupina nebo skupina X^9 zahrnuje pryskyřici jako podložku. Způsobem podle vynálezu je tedy možno získat peptid tak, že se

- a) vytvoří meziprojekt peptidu s alespoň jednou ochrannou skupinou obecného vzorce II:





kde $X, X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7$ a X^8 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu a X^9 znamená ochrannou skupinu nebo zakotvující skupinu pro pryskyřici jako podložku nebo des- X^9 , v tomto případě je zbytkem na C-terminálním zakončení karboxylová skupina Y,

- b) odštěpí se ochranná skupina, ochranné skupiny nebo zakotvující vazba peptidu obecného vzorce II a
- c) popřípadě se převede výsledný peptid na některou ze svých netoxických solí.

Při volbě určité ochranné skupiny na postranním řetězci při syntéze peptidů je zapotřebí zachovávat následující všeobecná pravidla:

- a) ochranná skupina si má uchovávat své ochranné vlastnosti a nemá být odštěpena při vazbě dalšího zbytku,
- b) ochranná skupina má být stálá k užitým reakčním činidlům a s výjimkou Xan s výhodou stálá za reakčních podmínek, zvolených pro odstranění ochranné skupiny na α -aminoskupině v každém stupni postupu a
- c) postranní ochranné skupiny musí být možno odstranit po ukončení postupu za získání výsledného peptidu s obsahem požadovaného sledu aminokyselin tak, že v průběhu odstraňování nedojde k nežádoucím změnám v peptidovém řetězci.

V případě, že se peptidy nepřipravují technologií s použitím rekombinantní DNA, připravují se s výhodou při použití syntézy na pevné fázi, například způsobem podle publikace Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, str. 2149 (1963), přestože je možno užít také dalších ekvivalentních chemických způsobů tak, jak byly svrchu uvedeny.

Syntéza na pevné fázi se začíná od C-terminálního zakončení peptidu tak, že se naváže chráněná α -aminokyselina na vhodnou pryskyřici. Tento výchozí materiál je možno připravit tak, že se spojí chráněná α -aminokyselina esterovou vazbou s chlormethylovanou pryskyřicí nebo hydroxymethylovanou pryskyřicí nebo amidovou vazbou na pryskyřici BHA nebo na pryskyřici MBHA. Výroba hydroxymethylované pryskyřice je popsána v publikaci Bodansky a další, Chem. Ind. (Londýn) 38, 1597-98 (1966). Chlormethylované pryskyřice se běžně dodávají (Bio Rad Laboratories, Richmond, California a Lab. Systems, Inc.). Výroba pryskyřice tohoto typu je popsána v publikaci Stewart a další, "Solid Phase Peptide Synthesis", Freeman a Co., San Francisco 1969, kapitola 1, strany 1 až 6. Pryskyřice BHA a MBHA se také běžně dodávají a obvykle se užívají pouze v tom případě, že požadovaný peptid má být syntetizován jako nesubstituovaný amid na C-terminálním zakončení.

C-terminální aminokyselina, tj. Asn, chráněná BOC a Xan, může být nejprve navázána na chlormethylovanou pryskyřici způsobem podle publikace Chemistry Letters, K. Horiki a další, 165 až 168

(1978), při použití KF v dimethylformamidu při teplotě 60°C po dobu 24 hodin za stálého míchání v případě, že má být získán peptid s 43 zbytky. Po navázání aminokyseliny, chráněné BOC na pryskyřici jako podložku, se odstraní ochranná skupina na α -aminoskupině, například použitím kyseliny trifluoroctové (TFA) v methylenchloridu nebo samotné kyselině trifluoroctové. Odstranění ochranné skupiny se provádí při teplotě místnosti. K odštěpení je možno užít také jiných běžných činidel, například kyseliny chlorvodíkové v dioxanu, užívá se podmínek, specifických pro odstranění jednotlivých ochranných skupin na α -aminoskupině tak, jak byly popsány v publikaci Schroder a Lubke, "The Peptides", 1, str. 72 až 75 (Academic Press 1965).

Po odstranění ochranné skupiny na α -aminoskupině se zbývající aminokyseliny, chráněné na α -aminoskupině a na postranním řetězci postupně navazují v požadovaném sledu za vzniku svrchu uvedeného meziprojektu nebo je také možné postupovat tak, že se některé aminokyseliny naváží navzájem před přidáním celého kratšího řetězce k navázané části na pevné fázi. Volbu příslušného činidla může provést každý odborník. Zvláště vhodným reakčním činidlem pro toto použití je N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCCI).

Aktivační činidlo, užívané při syntéze na pevné fázi, je možno volit z dobře známých činidel v chemii peptidů. Příkladem vhodných aktivizačních reakčních činidel jsou karbodiimidy, například N,N'-diisopropylkarbodiimid a N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid. Je možno užít také další aktivizační reakční činidlo, tato činidla a jejich použití při vazbě peptidů byla popsána v publikaci Schroder a Lubke tak, jak byla svrchu uvedena, kapitola III a v publikaci Kapoor, J. Phar. Sci. 59 strany 1 až 27 (1970).

Každá chráněná aminokyselina nebo sled aminokyselin se provádí k vazbě na pevnou fázi, ve čtyřnásobném nebo ještě větším přebytku, vazbu je možno provést v prostředí směsi dimethylformamidu a methylenchloridu v poměru 1 : 1 nebo v samotném dimethylformamidu nebo methylenchloridu. V případě, že dojde k neúplné vazbě, opakuje se postup před odstraněním ochranné skupiny na α -aminoskupině a před navázáním následující aminoskupiny. Úspěch vazby v každém stupni syntézy, provádí-li se manuálně se s výhodou ověřuje, ninhydrinovou reakcí tak, jak byla popsána v publikaci E. Kaiser a další, Anal. Biochem. 34, 595 (1970). Vazbu je možno také provádět automaticky, například automatickým syntetizátorem (Beckman 990), způsob byl popsán v publikaci Rivier a další, Biopolymery, 1978, 17, strany 1927 až 1938.

Po získání úplného požadovaného sledu aminokyselin je možno peptid, získaný jako meziprojekt, odstranit z pryskyřice jako podložky působením činidla, například kapalného fluorovodíku, který nejen odštěpí peptid z pryskyřice, ale také odštěpí veškeré

zbývající ochranné skupiny na postranním řetězci X , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 a X^8 a X^8 a X^9 jako zakotvující vazbu, jakož i ochrannou skupinu X^1 na α -aminoskupině, v případě, že byla použita, čímž se získá výsledný peptid ve formě volné kyseliny. V případě že ve sledu se vyskytuje Met, odstraní se s výhodou nejprve ochranná

skupina BOC použitím směsi kyseliny trifluoroctové a ethandithiolu před odštěpením peptidu z pryskyřice kyselinou fluorovodíkovou k vyloučení potenciální S-alkylace. V případě, že se k odštěpení užije fluorovodík, doplňuje se reakční směs anisolem a methylethysulfidem jako látkami, které na sebe váží vedlejší produkty.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady, které popisují výhodné způsoby provedení metody na pevné fázi za získání výsledného peptidu. Je samozřejmé, že syntéza odpovídajícího kratšího fragmentu peptidu se provádí stejným způsobem tak, že se prostě vynechají příslušné aminokyseliny, je však pravděpodobné, že biologicky aktivní fragmenty by měly obsahovat svrchu uvedený sled příléhající k N-terminálnímu zakončení.

Příklad 1

Syntéza peptidu vzorce [N^{α} MeHis¹]/rhGRF-(1-43)-OH, podrobněji vysváno :

N^{α} MeHis-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na chlormethylované pryskyřici se substitucí přibližně 0,1 až 0,5 mmol/g pryskyřice. Navázání BOC-Asn(Xan) na pryskyřici se provádí způsobem, popsáným ve svrchu uvedené publikaci Chemistry Letters při použití fluoridu draselného v dimethylformamidu při teplotě přibližně 60 °C po dobu 24 hodin za stálého míchání, výsledkem je substituce přibližně 0,35 mmol Asn na gram pryskyřice.

Po odstranění ochranných skupin a po neutralizaci se postupně buduje na pryskyřici peptidový řetězec. Odstranění ochranných skupin, neutralizace a přidání každé další aminokyseliny se provádí způsobem, který byl podrobně popsán v publikaci Rivier J. J. Amer. Chem. Soc., 96, 2986 až 2992 (1974). Všechna použitá rozpouštědla se pečlivě zbaví plynů promytím inertním plynem, například heliem nebo dusíkem, aby byla jistá nepřítomnost kyslíku, při níž by mohlo dojít k nežádoucí oxidaci síry ve zbytku Met.

Odstranění ochranných skupin se s výhodou provádí podle následujícího schéma A.

S c h é m a A

Reakční činidla	Doba mísení (min.)
1. 60 % kyselina trifluoroctová s 2 % ethandithiolu	10
2. 60 % kyselina trifluoroctová s 2 % ethandithiolu	15
3. IPA s 1 % etandithiolu	0,5
4. 10 % Et ₃ N v methylen dichloridu	0,5

5. methanol	0,5
6. 10 % Et ₃ N v methylenchloridu	0,5
7. methanol (dvakrát)	0,5
8. methylenchlorid (dvakrát)	0,5

Navázání dalších aminokyselin se provádí podle následujícího schématu B:

S c h é m a B

Reakční činidla	Doba mísení (min.)
-----------------	--------------------

9. DCCI	-
10. Boc-aminokyselina	50 až 90
11. methanol (dvakrát)	0,5
12. methylenchlorid (dvakrát)	0,5
13. 3M Ac ₂ O v methylenchloridu	15,0
14. methylenchlorid	0,5
15. methanol	0,5
16. methylenchlorid (dvakrát)	0,5

Užívá se 1 až 2 mmol aminokyseliny, chráněné BOC-v methylenchloridu na 1 g pryskyřice a mimoto 1 ekvivalent 1,0M DCCI v methylenchloridu po dobu 2 hodin. Po navázání BOC-Arg (TOS) se užije směs 50 % dimethylformamidu a 50 % methylenchloridu. Bzl ve formě etheru se užije jako ochranná skupina pro hydroxylovou skupinu postranního řetězce Ser a Thr. Amidoskupina Asn nebo Gln se chrání Xan v případě, že se užije dicyklohexylkarbodiimidu jako činidla pro vazbu. Je také možno užít P-nitrofenylester (ONp) k aktivaci karboxylového zakončení Asn nebo Gln, a například je možno přes noc navázat BOC-Asn (ONp) při použití jednoho ekvivalentu HOBt v 50 % směsi dimethylformamidu a methylenchloridu v tomto případě není zapotřebí přidávat dicyklohexylkarbodiimid. 2-chlorbenzyloxykarbonyl (2Cl-Z) se užije jako ochranná skupina pro postranní řetězec Lys. TOS se užije k ochraně guanidinové skupiny Arg a k ochraně dusíkového atomu imidazolového zbytku His a karboxylová skupina postranního řetězce Glu nebo Asp se chrání OBzl. Fenolová hydroxylová skupina Tyr se chrání 2,6-dichlorbenzylovou skupinou (DCB). Na konci syntézy se získá následující sloučenina:

BOC-N^α MeHis(X)-Ala-Asp(X³)-Ala-Ile-Phe-Thr(X⁴)-Ser(X⁴)-Ser(X⁴)-
 -Tyr(X²)-Arg(X⁶)-Arg(X⁶)-Ile-Leu-Gly-Gln(X⁵)-Leu-Tyr(X²)-Ala-
 -Arg(X⁶)-Lys(X⁷)-Leu-Leu-His(X)-Glu(X³)-Ile-Met-Asn(X⁵)-Arg(X⁶)-

-Gln(X⁵)-Gln(X⁵)-Gly-Glu(X³)-Arg(X⁶)-Asn(X⁵)-Gln(X⁵)-Glu(X³)-
-Gln(X⁵)-Arg(X⁶)-Ser(X⁴)-Arg(X⁶)-Phe-Asn(X⁵)-X⁹

kde

X	znamená Tos,
X ²	znamená DCB
X ³	znamená Obzl,
X ⁴	znamená Bzl,
X ⁵	znamená Xan,
X ⁶	znamená Tos
X ⁷	znamená 2Cl-Z a
X ⁹	znamená -O-CH ₂ -pryskyřice jako podložka.

Xan je možno částečně nebo úplně odstranit působením kyseliny trifluoroctové, která se užije k odstranění ochranné skupiny na α -aminoskupině.

K odštěpení peptidu z pryskyřice a k odstranění ochranných skupin se užije směsi 1,5 ml anisolu, 0,5 ml methylethylsulfidu a 15 ml kyseliny fluorovodíkové na 1 g komplexu peptidu a pryskyřice při teplotě -20 °C po dobu 1/2 hodiny a potom při teplotě 0 °C 1/2 hodiny. Po odstranění fluorovodíku ve vysokém vakuu se zbytek pryskyřice a peptidu promývá střídavě bezvodým diethyletherem a chloroformem a potom se peptid extrahuje 2N vodným roztokem kyseliny octové, zbaveným plynů a oddělí se od pryskyřice filtrací.

Odštěpený peptid, zbavený ochranných skupin se potom rozpustí v 0 až 5 % kyselině octové a čistí se například filtrací na gelu Sephadex G-50.

Potom se peptid dále čistí preparativní nebo semi-preparativní vysokotlakou kapalinovou chromatografií způsobem podle publikace Rivier a další, Peptides: Structure and Biological Function (1979), strany 125 až 128 a Marki a další, J. Am. Chem. Soc. 103, 3178 (1981). Sloupce (Waters Associates prep LC-500) se plní 15 až 20 C₁₈-kysličníkem křemičitým (Vydac 300A). Gradient CH₃CN v TEAP se vytvoří přístrojem (Eldex) tak, jak bylo popsáno v publikaci Rivier J., J. Lig. Chromatography 1, 343-367 (1978). Chromatografické frakce se pečlivě sledují vysokotlakou kapalinovou chromatografií a spojují se pouze frakce s dostatečnou čistotou. Odstranění solí z čištěných frakcí se dosahuje použitím gradientu CH₃CN v 0,1 % kyselině trifluoroctové. Střední část se potom lyofilizuje, čímž se získá požadovaný peptid, jehož čistota může být vyšší než 98 %.

Syntéza se opakuje při použití pryskyřice MBHA, čímž se získá stejný peptid s amidovaným C-terminálním zakončením, postupuje se způsobem, popsaným v publikaci Vale a další, US patentový spis č. 4 292 313, čímž se naváže Asn na pryskyřici MBHA.

Příklad 2

Syntéza peptidů o 40 zbytcích o vzorci $H-C^{\alpha}$ MeHis-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Scer-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidu (Beckman 990) a pryskyřice MBHA způsobem který byl obecně popsán Valem a dalšími v US patentovém spisu č. 4 292 313. Při provádění chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografii bylo prokázáno, že se získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 3

Syntéza analogu rhGRF, to jest:

$[N^{\alpha} \text{ Me-Met}^1, \text{Leu}^{27}]$ -rhGRF(1-43)-OH vzorce

N^{α} MeMet-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) a chlormethylované pryskyřice způsobem, který byl obecně popsán v příkladu 1. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 4

Syntéza fragmentu analogu hpGRF, tj.

$[C^{\alpha} \text{ MePhe}(4C1)^1]$ -hpGRF(1-32)-NH₂ vzorce

$H-C^{\alpha}$ MePhe(4C1)-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie je tento analog v podstatě čistý.

Syntéza se ještě dvakrát opakuje, čímž je možno získat

$[4C1\text{-Phe}^1]$ -hpGRF(1-32)-NH₂ a $[N^{\alpha} \text{ MePhe}^1]$ /hpGRF(1-32)-NH₂.

Příklad 5

Syntéza fragmentu analogu hpGRF, tj.

$[N^{\alpha} \text{ MeTyr}^1]$ -hpGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

N^{α} MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem podle příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 6

Syntéza fragmentu rhGRF, tj.

[N^{α} MePhe¹]-rhGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

N^{α} MePhe-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem podle příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 7

Syntéza [N^{α} MeLeu¹, Ile²⁷]-hpGRF(1-32)-NH₂ vzorce:

N^{α} MeLeu-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) a pryskyřice MBHA způsobem podle příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 8

Syntéza fragmentu analogu rhGRF, tj.

[C^{α} Me(4Cl)¹]-rhGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

H-C ^{α} MePhe(4Cl)-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 9

Syntéza fragmentu analogu rhGRF, tj.

$[N^{\alpha} \text{MeTyr}^1]$ -rhGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

H-N^α MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-
-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) a pryskyřice MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledku chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 10

Syntéza $[C^{\alpha} \text{MeLeu}^1]$ -rhGRF-[Val⁴⁴-NH₂] vzorce:

H-C^α MeLeu-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-
-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-
-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Val-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů na pryskyřici MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 11

Syntéza peptidu $[N^{\alpha} \text{MeTyr}^1, D\text{-Le}^{23}]$ -rGRF(1-43)-OH vzorce:

N^α MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-
-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-
-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na chlormethylované pryskyřici se substitucí přibližně 0,1 až 0,5 mmol/g pryskyřice způsobem, popsáným v příkladu 1.

Na konci syntézy se získá sloučenina vzorce:

BOC-N^α MeTyr(X²)-Ala-Asp(X³)-Ala-Ile-Phe-Thr(X⁴)-Ser(X⁴)-
-Ser(X⁴)-Tyr(X²)-Arg(X⁶)-Arg(X⁶)-Ile-Leu-Gly-Gln(X⁵)-Leu-Tyr(X²)-
-Ala-Arg(X⁶)-Lys(X⁷)-Leu-D-Leu-His(X)-Glu(X³)-Ile-Met-Asn(X⁵)-
-Arg(X⁶)-Gln(X⁵)-Gln(X⁵)-Gly-Glu(X³)-Arg(X⁶)-Asn(X⁵)-Gln(X⁵)-
-Glu(X³)-Gln(X⁵)-Arg(X⁶)-Ser-(X⁴)-Arg(X⁶)-Phe-Asn(X⁵)-X⁹

kde

X² znamená DCB,

X ³	znamená OBzl,
X ⁴	znamená Bzl,
X ⁵	znamená Xan,
X ⁶	znamená Tos,
X ⁷	2Cl-Z a
X ⁹	znamená -O-CH ₂ -pryskyřice jako podložka.

Xan je možno částečně nebo úplně odstranit kyselinou trifluoroctovou, která se užije k odstranění ochranné skupiny z α -aminoskupiny.

Chráněný peptid se odštěpí, zbaví se ochranných skupin a čistí se obdobným způsobem jako v příkladu 1. Z čištěných frakcí je možno odstranit soli použitím gradientu CH₃CN v 0,1 % kyselině trifluoroctové. Střední část se potom lyofilizuje, čímž se získá výsledný peptid, jehož čistota je vyšší než 98 %.

Syntéza se opakuje při použití pryskyřice MBHA, čímž se získá stejný peptid s amidovaným C-terminálním zakončením způsobem, který byl obecně popsán Valem a dalšími v US patentovém spisu 4 292 313 pro navázání Asn na pryskyřici MBHA.

Příklad 12

Syntéza amidového peptidu o 40 zbytcích [C α MeHis¹, D-Leu²³]-hpGRF(1-40)-NH₂ vzorce:

H-C α MeHis-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným Valem a dalšími v US patentovém spisu 4 292 313. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 13

Syntéza [N α Me-Met¹, D-Leu²³, Nle²⁷]-rGRF-(1-43)-OH vzorce:

N α MeMet-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na chlormethylované pryskyřici způsobem, který byl popsán v příkladu 1. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 14

Syntéza fragmentu analogu, tj. $[D\text{-Leu}^{23}]\text{-hpGRF(1-32)-NH}_2$ vzorce:

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý analog.

Uvedený způsob se ještě dvakrát opakuje, čímž se získá $[D\text{-Leu}^{23}, D\text{-Glu}^{25}]\text{-hpGRF(1-32)-NH}_2$ a $[D\text{-Leu}^{23}, \text{Nle}^{27}]\text{-hpGRF(1-32)-NH}_2$.

Příklad 15

Syntéza fragmentu analogu hpGRF, tj.

$[D\text{-Leu}^{23}, D\text{-Asp}^{25}, \text{Nle}^{27}]\text{-hpGRF(1-29)-NH}_2$ vzorce:

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 16

Syntéza $[D\text{-Leu}^{23}, \text{Nle}^{27}]\text{-rGRF(1-29)-NH}_2$ vzorce:

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsaným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Syntéza se opakuje, čímž se získá

$[D\text{-Leu}^{17}, \text{Nle}^{27}]\text{-rGRF(1-29)-NH}_2$.

Příklad 17

Syntéza $[D\text{-Glu}^{25}, \text{Nle}^{27}]\text{-hpGRF(1-29)-NH}_2$ vzorce:

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Glu-Ile-Nle-Ser-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 18

Syntéza [D-Glu²⁵, Nle²⁷]-rGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 19

Syntéza [D-Tyr¹, D-Leu²³]pGRF(1-44)-NH₂ vzorce:

H-D-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, obecně popsáným Valem a dalšími v US patentovém spisu č. 4 292 313. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 20

Syntéza [D-His¹, D-Leu^{17,23}, D-Glu²⁵, Nle²⁷]-rGRF(1-43)-OH vzorce:

H-D-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-The-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-D-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-D-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí (Beckman 990) na chlormethylované pryskyřici způsobem, který byl popsán v příkladu 1. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 21

Syntéza [D-Ala², D-Leu^{17,23}, D-Asp²⁵]-hpGRF(1-32)-NH₂ vzorce:

H-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý analog.

Příklad 22

Syntéza [D-Tyr¹, D-Ala², D-Asp³, D-Asn⁸, D-Tyr¹⁰, D-Ala¹⁵, D-Leu^{17,23}, D-Asp²⁵, D-Met²⁷]-hpGRF-(1-29)-NH₂ vzorce:

H-D-Tyr-D-Ala-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-D-Ala-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-D-Met-Ser-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) a pryskyřice MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle výsledku chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý analog.

Příklad 23

Syntéza [D-His¹, D-Ser⁸, D-Leu²³, Nle²⁷]-rGRF(1-43)-OH vzorce:

H-D-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na chlormethylované pryskyřici způsobem, popsáným v příkladu 1. Podle výsledku chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 24

Syntéza fragmentu analogu rGRF, tj.

[N^α MeTyr¹, D-Glu²⁵-rhGRF(1-29)-NH₂ vzorce:

N^α MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBH způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle chromatografie na tenké vrstvě a vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Příklad 25

Syntéza [C^α MeLeu¹, D-Leu²³, D-Glu²⁵, Nle²⁷]-rGRF-[Val⁴⁴]-NH₂ vzorce:

H-C α MeLeu-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-D-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Val-NH₂

se provádí postupně při použití syntetizátoru peptidů (Beckman 990) na pryskyřici MBHA způsobem, popsáným v příkladu 2. Podle chromatografie na tenké vrstvě a podle vysokotlaké kapalinové chromatografie se tímto způsobem získá v podstatě čistý peptid.

Různé syntetické peptidy připravené způsobem podle jednotlivých příkladů byly srovnány se syntetickým hpGRF (1-40)-OH in vitro a bylo prokázáno, že všechny nely větší schopnost podporovat sekreci růstového hormonu a další podobné účinky.

Aby bylo možno stanovit účinnost některých syntetických peptidů na uvolňování růstového hormonu, byly prováděny pokusy in vitro při použití syntetického hpGRF(1-40)-OH jako standardu a ekvimolárních koncentrací různých jiných analogů a fragmentů. Byly užity kultury kryších hypofyzálních buněk ze žláz, odebraných před 3 až 5 dny. Kultury, které byly pro toto sledování optimální, byly užity pro srovnávací zkoušky způsobem, popsáným v publikaci Vale a další, Endocrinology, 91, 562-572 (1972) a ještě podrobněji v publikaci Vale a další, Endocrinology (1983) v tisku. Inkubace se sledovanými látkami se provádí 3 až 4 hodiny, potom se odeberou podíly živného prostředí a zpracovávají se tak, že se měří obsah imunoreaktivního růstového hormonu (ir GH) běžnou radioimunologickou zkouškou s použitím destiček.

Výsledky tohoto srovnání pro ekvimolární koncentrace jsou uvedeny v následující tabulce I.

Tabulka I

Peptid	srovnání v %
hpGRF(1-40)-OH (standard)	100
[D-Glu ²⁵ , Nle ²⁷]-rGRF(1-29)-NH ₂	125
[D-Leu ²³ , Nle ²⁷]-rGRF(1-29)-NH ₂	160
[D-Leu ¹⁷ , Nle ²⁷]-rGRF(1-29)-NH ₂	138
[N Me Phe ¹ (4Cl)]-hpGRF(1-32)-NH ₂	12
[C Me Phe ¹ (4Cl)]-hpGRF(1-32)-NH ₂	4,7
[4Cl-Phe ¹]hpGRF(1-32)-NH ₂	2

In vitro pokusy s těmito syntetickými peptidy ukazují, že každý z nich má plnou biologickou účinnost hpGRF(1-40)-OH-. Maximální účinná koncentrace pro [D-Leu²³, Nle²⁷]-hpGRF(1-29)-NH₂ je

přibližně 1 nanomol.

Kromě testů in vitro na sekreci růstového hormonu byly prováděny také pokusy in vitro tak, že byly syntetické peptidy podávány injekčně krysím samcům po předběžném ošetření FLA-63, inhibitorem hydroxylózy dopaminu, který potlačuje samovolnou sekreci růstového hormonu, aniž by ovlivňoval odpověď na zevně přiváděný GRF. Krevní vzorky byly odebírány katetrem těsně před injekcí a 5 a 20 minut po injekci. Hladiny růstového hormonu v krvi, měřeno radioimunologicky ukazují, že syntetický [D-Leu²³,Nle²⁷]-rGRF (1-29)-NH₂ další D-Leu¹⁷ a D-Glu²⁵-analogy rGRF a svrchu identifikované N^αMe a C^αMe-analogy hpGRF(1-32)-NH₂ jsou účinnými stimulatory sekrece hypofyzálního růstového hormonu a daleko delší dobu účinku než rGRF(1-29)-NH₂ a hpGRF (1-32)-NH₂. Další známé GRF in vivo, které jsou účinné při sekreci růstového hormonu potvrdily tyto výsledky. Dávky se pohybují v rozmezí 100 nanogramů až 50 mikrogramů peptidu na 1 kg hmotnosti.

Syntetické analogy hpGRF a pravděpodobně také analogy rGRF a pGRF by měly být použitelné v lidské medicíně v případě, že je zapotřebí zvýšit produkci růstového hormonu. Stimulace sekrece růstového hormonu těmito analogy spadá v úvahu zejména u nemocných s úplným chyběním nebo nedostatečnou sekrecí růstového hormonu, a to v důsledku toho, že se tento hormon nevyrábí z toho důvodu, že chybí faktor, který jeho uvolňování podporuje. Mimoto je pravděpodobné, že zvýšená sekrece růstového hormonu a vliv této sekrece na zrychlený růst může příznivě ovlivnit i vývoj lidí nebo zvířat s normálními hladinami růstového hormonu. Mimoto je možné, že by tímto způsobem bylo možno ovlivnit tukové buňky v těle a pozměnit další metabolické, imunologické a vývojové pochody, které závisí na produkci růstového hormonu. Tyto analogy by tedy mohly být použitelné k podpoře anabolických pochodů u lidí například při těžkých popáleninách. Také by mohlo padat v úvahu podávání těchto analogů u hospodářských zvířat, například kuřat, kroců, vepřů, koz, skotu a ovcí, a také u studenokrevních zvířat, například ryb a dalších mořských zvířat, například želv, popřípadě u obojživelníků k urychlení jejich růstu a ke zvýšení poměru bílkovin k tukům, což by současně mělo vést i k dokonalejšímu využití bílkovin, které jsou těmto živočichům zadávány v krmivu.

Při podávání shora uvedených látek lidem by syntetické peptidy měly mít čistotu alespoň 93 %, s výhodou alespoň 98 %. Čistota v tomto případě znamená hmotnostní procento požadovaného peptidu ve směsi ostatních peptidů a jejich fragmentů. Při podávání syntetických peptidů hospodářským zvířatům a jiným zvířatům k urychlení jejich růstu a ke snížení tuku stačí daleko nižší čistota, například pouze 5 %, v některých případech je přípustná čistota 0,01 %.

Syntetické peptidy nebo jejich netoxické soli je možno zpracovávat na farmaceutické prostředky spolu s běžnými nosiči, přijatelnými z farmaceutického nebo veterinárního hlediska. Takto získané prostředky je možno podávat živočichům včetně lidí, obvyklým způsobem podání je podání nitrožilní, podkožní, nitrosvalové, kožní a popřípadě intranasální nebo perorální. K podání peptidů, vyrobených způsobem podle vynálezu, se může rozhodnout lé-

kař v případě, že je zapotřebí zvýšit uvolňování růstového hormonu v zájmu jeho nemocného. Požadovaná dávka peptidu se může měnit podle podmínek, a to zejména v nezávislosti na závažnosti stavu nemocného a na požadované době léčení.

Peptidy, vyrobené způsobem podle vynálezu, je často možno podávat ve formě jejich netoxických solí, například adičních solí s kyselinami nebo ve formě jejich komplexů s kovy, například zinkem, železem a podobně. Tyto komplexy se považují s hlediska přihlášky pro jednoduchost také za soli. Jako příklad vhodných adičních solí s kyselinami je možno uvést hydrochloridy, hydrobromidy, sírany, fosforečnany, maleáty, citronany, octany, jantary, jablečnany, benzoáty, soli kyseliny askorbové, kyseliny vinné a podobně. V případě, že účinná látka má být podávána perorálně ve formě tablet, může tableta obsahovat také pojivo, například tragakant, kukuřičný škrob nebo želatinu, dále plnidlo, které napomáhá rozpadu tablety, například kyselinu alginovou, kluznou látku, například stearan hořečnatý a podobně. V případě, že se požaduje podání v kapalně formě, může prostředek obsahovat sladidlo a/nebo chuťovou látku, při nitrožilním podání bude prostředek obsahovat zejména isotonický roztok chloridu sodného, fosfátový pufr a podobně.

Peptidy, vyrobené způsobem podle vynálezu, je zapotřebí podávat lidem pod dohledem lékaře, farmaceutické prostředky budou obvykle obsahovat příslušný peptid spolu s běžným pevným nebo kapalným nosičem, přijatelným z farmaceutického hlediska. Při parenterálním podání se bude účinná látka pohybovat obvykle v rozmezí 100 nanogramů až 50 mikrogramů peptidu na 1 kg tělesné hmotnosti.

Přestože vynález byl popsán v souvislosti s některými výhodnými provedeními, která představují v současné době nejlepší způsob provedení, který je znám, je samozřejmé, že bude možno provádět různé změny a modifikace, které může běžně provést každý odborník, aniž by přitom došlo k odchylkám od předmětu vynálezu. Je například možno provádět nejružnější modifikace v základním peptidovém řetězci, a to zejména vynechat některé zbytky nebo skupiny zbytků od C-terminálního zakončení peptidového řetězce v souladu s běžnými způsoby, které se v současné době používají k získávání peptidů nebo peptidových fragmentů, které si uchovávají veškerou účinnost původní látky nebo podstatnou část biologické účinnosti základního peptidu. Všechny takto získané látky také spadají do oboru vynálezu. Mimoto je možno na obou koncích peptidu nebo na některém z těchto konců zbytky přidat a/nebo je možno užít místo přírodně se vyskytujících zbytků zbytky, které se obvykle pokládají za zbytky ekvivalentní tak, jak je to známo v chemii peptidů za vzniku analogů, které mají alespoň podstatnou část biologické účinnosti polypeptidů, aniž by přitom došlo k odchýlení od oboru vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Peptidy obecného vzorce

$R_1-R_2-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-Leu-R_{15}-$
 $Gln-R_{17}-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{23}-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-Arg-Gln-$
 $Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44},$ (I)

kde

R_1 znamená Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe-Leu-His.
nebo D-His, při substituci typu C^{alfa}_{Me} nebo N^{alfa}_{Me}
nebo bez substituce,

R_2 znamená Ala nebo D-Ala,

R_3 znamená Asp nebo D-Asp,

R_8 znamená Ser, Asn, D-Ser nebo D-Asn,

R_{10} znamená Tyr nebo D-Tyr,

R_{12} znamená Arg nebo Lys,

R_{13} znamená Ile nebo Val,

R_{15} znamená Gly nebo D-Ala,

R_{17} znamená Leu nebo D-Leu,

R_{18} znamená Tyr nebo Ser,

R_{23} znamená Leu nebo D-Leu,

R_{24} znamená His nebo Gln,

R_{25} znamená Glu, Asp, D-Glu nebo D-Asp,

R_{27} znamená Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva nebo Val,

R_{28} znamená Asn nebo Ser,

R_{34} znamená Arg nebo Ser,

R_{38} znamená Gln nebo Arg,

R_{39} znamená Arg nebo Gly,

R_{40} znamená Ser nebo Ala,

R_{42} znamená Phe, Ala nebo Val,

R₄₃ znamená Asn nebo Arg,

R₄₄ znamená Val nebo Leu,

za předpokladu, že buď

a) R₁ má substituci typu C^{alfa}_{Me}, nebo N^{alfa}_{Me} nebo

b) R₁₇ a/nebo R₂₃ znamená D-Leu nebo

c) R₂₅ znamená D-Glu nebo D-Asp,

přičemž navíc je možno vynechat některý zbytků

R₄₄,

R₄₃-R₄₄,

R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₁₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄,

Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄.

2. Způsob výroby peptidů obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačující se tím, že se

i) naváže N-terminální aminokyselina, chráněná terc. butoxykarbonylovou skupinou na -NH- benzhydrylaminové pryskyřici nebo se

ii) ochranná terc.butoxykarbonylová skupina odštěpí a postupně se naváží jednotlivé aminokyseliny v množství 1 až 2 mmoly aminokyseliny, chráněné terc. butoxykarbonylovou skupinou, na 1 gram pryskyřice v methylenchloridu, dimethylformamidu nebo ve směsi těchto rozpouštědel za vzniku sloučeniny obecného vzorce II s alespoň jednou ochrannou skupinou

X^1-R_1 (X nebo $X^2-R_2-R_3-(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-R_8(X^4$ nebo $X^5)-Ser(X^4)-R_{10}(X^2)-Arg(X^6)-R_{12}(X^6$ nebo $X^7)-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln(X^5)-R_{17}-R_{18}(X^2)Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-R_{23}-R_{24}(X$ nebo $X^5)-R_{25}(X^3)-Ile-R_{27}-R_{28}(X^4$ nebo $X^5)-Arg(X^6)-Gln(X^5)-Gln-(X_5)-Gly-Glu(X^3)-R_{34}(X^4$ nebo $X^6)-Asn(X^5)-Gln(X^5)-Glu(X^3)-R_{38}(X^5$ nebo $X^6)-R_{39}(X^6)-R_{40}(X^4)-Arg(X^6)-R_{42}-R_{43}(X^5$ nebo $X^6)-R_{44}-NH-pryskyřice,$ (II)

kde

- X^1 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na alfa-aminoskupině,
- X^2 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na fenolové hydroskupině Tyr,
- X^3 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na karboxylové skupině Asp nebo Glu,
- X^4 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na alkoholové hydroskupině Thr,
- X^5 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na alkoholové hydroxyskupině Ser,
- X^6 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na guanidinové skupině Arg,
- X^7 znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na aminoskupině Lys postranního řetězce,
- X znamená atom vodíku nebo ochrannou skupinu na dusíkovém atomu imidazolové skupiny His,

iii) odštěpí se ochranná skupina nebo ochranné skupiny z sloučeniny obecného vzorce II za vzniku peptidu obecného vzorce I nebo jeho biologicky aktivního fragmentu a popřípadě se

iv) převede výsledný peptid na svou netoxickou adiční sůl.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se na místě R_{25} naváže D-Glu.
4. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se na místě R_{25} naváže D-Asp.
5. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se na místě R_{23} naváže D-Leu.

6. Způsob podle bodů 2 až 5, vyznačující se tím, že se na místě R_{17} naváže D-Leu.
7. Způsob podle bodů 2 až 6, vyznačující se tím, že se na místě R_{27} naváže Nle.
8. Způsob podle bodů 2 až 7, vyznačující se tím, že se na místě R^1 naváže C^{α}_{Me} nebo N^{α}_{Me} .
9. Způsob podle bodu 7, vyznačující se tím, že se jako ochranné skupiny X' zavede terc. butoxykarbonyl, jako X^2 se zavede 2,6-dichlorbenzyl, jako X^3 se zavede benzyl, jako X^6 se zavede tosyl a jako X^7 2-chlorbenzyloxykarbonylová skupina.
10. Farmaceutický prostředek pro stimulaci uvolňování růstového hormonu u živočichů, vyznačující se tím, že jako svou účinnou složku obsahuje peptid obecného vzorce I podle bodu 1 nebo jeho netoxickou sůl a nosič, přijatelný z farmaceutického hlediska.

Konec dokumentu
