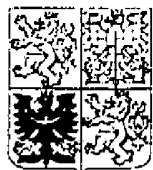


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 04. 90**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.04.89**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **89/346181**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/435

C 07 K 2/00

A 61 K 38/17

(71) Přihlášovatel:

PFIZER INC., New York, NY, US;
NATURAL PRODUCT SCIENCES, INC., Salt
Lake City, UT, US;

(72) Původce:

Saccomano Nicholas Alex, Ledyard, CT, US;
Volkman Robert Alfred, Mystic, CT, US;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Čištěná polypeptidová sloučenina, postup
její přípravy a farmaceutický prostředek
obsahující tuto sloučeninu**

(57) Anotace:

Čištěné polypeptidové sloučeniny, vyskytující se v jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, které jsou vhodné jako antagonisté excitačních aminokyselinových neurotransmiterů a/nebo jako blokovací činidla vápníkových kanálků. Do rozsahu řešení rovněž náleží postup přípravy těchto čištěných polypeptidových sloučenin a farmaceutické prostředky obsahující tyto polypeptidové sloučeniny.

Čištěná polypeptidová sloučenina, postup její přípravy
a farmaceutický prostředek obsahující tuto sloučeninu.

Oblast vynálezu

Vynález se týká čištěných polypeptidových sloučenin, vyskytujících se v jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, které jsou vhodné jako antagonisté excitačních aminokyselinových neurotransmiterů a/nebo jako blokovacích činidel vápníkových kanálků. Vynález se rovněž týká postupu přípravy těchto čištěných polypeptidových sloučenin a farmaceutických prostředků obsahujících tyto polypeptidové sloučeniny.

Dosavadní stav techniky

Podle dosavadního stavu techniky bylo zjištěno, že jed pavouka *Agelenopsis aperta* obsahuje přinejmenším dva toxiny, které působí na průchod vápníku, viz. publikace Jackson, H. a kol., *Soc. Neu. Sci. Abstr.* 12:1078 (1987). Podle této publikace byl objeven toxin, označený jako AG2, který má molekulovou hmotnost menší než 1 000, přičemž se předpokládá, že tento toxin potlačuje průchod vápníku v mnoha tkáních. Kromě toho se v publikaci : Jackson, H., a kol., *Soc. Neu. Sci. Abstr.* 12:730 (1986), uvádí další toxin pavouka *Agelenopsis aperta* představující složku s molekulovou hmotností asi 6 000. Tento toxin způsobuje presynaptickou blokádu transmise a předpokládá se, že tento toxin blokuje vápníkové kanálky souvisící s uvolňováním neurotransmiterů.

Sloučeniny, které jsou antagonisty excitačních aminokyselinových neurotransmiterů, mají celou řadu použití.

Antagonisté excitačních aminokyselinových neurotransmiterů nacházejí klinické použití při léčení takových stavů, jako jsou záchvaty, mrtvice, mozková ischemie, nervové degenerativní poruchy, jako je Alzheimerova choroba a epilepsie, a jako psychoterapeutika, viz. publikace : *Excitatory Amino Acids in Health and Disease*, D. Lodge, Ed., John Wiley and Sons Ltd., New York, NY 1988. Tyto sloučeniny jsou dále užitečné při studiu fyziologie buněk, například nervových buněk a při hubení bezobratlých škůdců a hmyzu.

Sloučeniny, které působí jako antagonisté vápníku, mají celou řadu použití. Například mohou antagonisté vápníku nalézat klinické využití při léčení angíny, hypertenze, kardiomyopatie, supraventrikulární arytmie, ezofageální achalasia, předčasný začátek porodu, Raynaudovy choroby a dalších nemocí; viz. W.G. Nayler, *Calcium Antagonists*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, New York, NY 1988, které zde slouží jako odkazový materiál. Kromě toho jsou tyto sloučeniny vhodné pro studium fyziologických procesů v buňkách, například v nervových a svalových buňkách a pro hubení bezobratlého hmyzu.

Podstata vynálezu

Podstatu předmětného vynálezu představuje čištěná polypeptidová sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující :

polypeptid (I), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému

s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % B, 95 % ———> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 38 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 10 mililitrů za minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 30 % B, 80 % ———> 70 % A v průběhu 0 až 40 minut, Watersova křivka 6, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 22 minutách;

(c) sekvence aminokyselin s koncovou aminoskupinou je následující:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-asn-glu-trp-leu-ser-;

(d) FAB MS: 7267;

a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost týkající se blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (I),

polypeptid-(II)-vzorce:

asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-cys-ala-
asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-asp-gly-tyr-
tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-phe-pro-lys-cys-ile-cys-
val-asn-asn-asn-CONH₂

a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost týkající se blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (II).

polypeptid (III), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtokového množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1 % \updownarrow na vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 39 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané výše v odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 25 % B, 80 % \longrightarrow 75 % A v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 25 % \longrightarrow 50 % B, 75 % \longrightarrow 50 % A v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11; kde A je 0,1 % \updownarrow na vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 36 minutách, a

(c) sekvence aminokyselin s koncovou aminoskupinou je následující:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly-met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his-cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

(d) ion-spray MS: 7793 ;

a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost při blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (III),

polypeptid (IV) vzorce:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂.

a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost při blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (IV),

polypeptid (V), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

$3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 43 minutách:

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 10 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

$3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $5 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 3,5 mililitru/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 25 % \longrightarrow 40 % B, 75 % \longrightarrow 60 % A v průběhu 0 až 30 minut, kde A je 0,1% vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 20,25 minuty;

(c) sekvence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-gly-asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-glu-glu-lys-asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp-;

a

(d) molekulová hmotnost je asi 20 000; a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost při blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (V),

polypeptid (VI), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

$3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% HCl vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 48,3 minuty;

(b) sekvence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou je následující:

H_2N -glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-ser-
asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro- ;

(c) molekulová hmotnost asi 80 000 a polypeptid, který má v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejnou účinnost při blokování vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (VI),

a farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin.

Ve výhodném provedení podle vynálezu je tato čištěná polypeptidová sloučenina vybrána ze skupiny zahrnující

polypeptid (I), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka Agelenopsis aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom

20 % ———> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 38 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 30 % B, 80 % ———> 70 % A v průběhu 0 až 40 minut, Watersova křivka 6, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 22 minutách;

(c) sekvence aminokyselin a koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-asn-glu-trp-leu-ser-;

a

(d) FAB MS: 7267;

polypeptid (II) vzorce:

asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-cys-ala-asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-asp-gly-tyr-tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-phe-pro-lys-cys-ile-cys-val-asn-asn-asn-CONH₂,

polypeptid (III), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% \updownarrow ~~ni~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 39 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 25 % B, 80 % \longrightarrow 75 % A v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, a potom 25 % \longrightarrow 50 % B, 75 % \longrightarrow 50 % A v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11, kde A je 0,1% \updownarrow ~~ni~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 36 minutách, a

(c) sekvence aminokyselin a koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly-met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his-cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

a

(d) ion-spray MS: 7793,

polypeptid (IV) vzorce:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-
cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂,

polypeptid (V), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μm, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % B, 95 % ———> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 43 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 10 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 5 μm, za použití průtočného množství 3,5 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 25 % ———> 40 % B, 75 % ———> 60 % A v průběhu 0 až 30 minut, kde A je 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 20,25 minuty;

(c) sekvence aminokyselin a koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-gly-
asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-glu-glu-lys-
asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp- ;

a

(d) molekulová hmotnost je asi 20 000,

polypeptid (VI), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1 % \uparrow na vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 48,3 minuty;

(b) sekvence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-ser-
asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro- ;

a

(c) molekulová hmotnost je asi 80 000,

a farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto látek.

Do rozsahu předmětného vynález urovněň náleží farmaceutický prostředek pro blokování vápníkových kanálků v buňkách savců, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje některou z čištěných polypeptidových sloučenin nebo farmaceuticky přijatelných solí odvozených od těchto sloučenin v množství blokujícím vápníkové kanálky

a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosičovou látku.

Podstata postupu přípravy čištěné polypeptidové sloučeniny vybrané ze skupiny zahrnující polypeptidy (I), (II), (III), (IV), (V) a (VI) a farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin, podle uvedeného vynálezu spočívá v tom, že

(a) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (I), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem

5 % —————> 20 % acetonitril, 95 % —————> 80 % 0,1 %-ní vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % —————> 70 % acetonitril,

80 % —————> 30 % 0,1 %-ní vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 38 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů

x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, a eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % —————> 30 % acetonitril,

80 % —————> 70 % 0,1 %-ní vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 40 minut, Watersova křivka 6, při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 22 minutách, se jímá a potom se případně lyofilizuje, opětně se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(b) v případě, že je požadován čištěný polypeptid

(II), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % acetonitril, 95 % \longrightarrow 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctvé kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctvé kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 40 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-4 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, přičemž eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 30 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 70 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctvé v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 30 % \longrightarrow 50 % acetonitril, 70 % \longrightarrow 50 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctvé v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 22 minutách, se jímá a potom se případně lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(c) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (III), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % acetonitril, 95 % \longrightarrow 80 %

0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 30 % 0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 39 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, a eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 25 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 75 % 0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 25 % \longrightarrow 50 % acetonitril, 75 % \longrightarrow 50 % 0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 36 minutách se jímá a potom se případně lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(d) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (IV), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % acetonitril, 95 % \longrightarrow 80 % 0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 30 % 0,1% \uparrow ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 40 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-4 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250

milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, přičemž eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 30 % acetonitril, 80 % ———> 70 % 0,1% ~~trifluor~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 30 % ———> 50 % acetonitril, 70 % ———> 50 % 0,1% ~~trifluor~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 27,5 minuty se jímá a popřípadě lyofilizuje, opětně se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(e) v případě, že je požadován v podstatě čistý polypeptid (V), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$ za použití průtokového množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % acetonitril, 95 % ———> 80 % 0,1% ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % acetonitril, 80 % ———> 30 % 0,1% ~~trifluor~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 43 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 10 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $5 \mu\text{m}$, a eluování se provádí za použití průtokového množství 3,5 mililitru/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 25 % ———> 40 % acetonitril, 75 % ———> 60 % 0,1% ~~trifluor~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut

a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 20,25 minuty se jímá a potom případně lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(f) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (VI), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % —————> 20 % acetonitril, 95 % —————> 80 % 0,1% HNO_3 vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % —————> 70 % acetonitril, 80 % —————> 30 % 0,1% HNO_3 vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut; při monochromatické detekci píku v rozsahu od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 48,3 minuty se jímá a potom se popřípadě lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

nebo v alternativním provedení se kterýkoliv z výše uvedených polypeptidů synteticky připraví metodami samy o sobě známými;

a v případě, kdy jsou požadovány polypeptidy, které mají v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin jako libovolný z výše uvedených polypeptidů, potom se tento polypeptid nebo polypeptidy synteticky připraví metodami samy o sobě známými;

a případně se převedou výše uvedené polypeptidy na farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin metodami samy o sobě známými.

Obecně je vynález zaměřen na určité polyaminy a polypeptidy, vyskytující se v jedu pavouka *Agelenopsis*

aperta. Tyto polyaminy a jejich farmaceuticky přijatelné soli antagonizují excitační aminokyselinové neurotransmitery, které působí na buňky, včetně nervových buněk, řady různých organismů, včetně bezobratlých a obratlovců. Uvedené polypeptidy a jeden z uvedených polyaminů a jejich farmaceuticky přijatelné soli blokuje vápníkové kanálky v buňkách, včetně nervových a svalových buněk různých organismů, včetně bezobratlých a obratlovců. Vynález je rovněž zaměřen na použití těchto polyaminů a jejich solí pro antagonistické působení na excitační aminokyselinové neurotransmitery, přičemž tyto aminokyselinové neurotransmitery působí na buňky nervového systému organismu, pro léčení chorob a stavů zprostředkovaných excitačními aminokyselinovými neurotransmitery u savců a k hubení bezobratlého hmyzu a škůdců. Vynález je rovněž zaměřen na prostředky obsahujících uvedené polyaminy a jejich soli. Dále je vynález zaměřen na použití uvedených polypeptidů a jednoho z uvedených polyaminů a jejich solí k blokování vápníkových kanálků v buňkách nervového a svalového systému organismu pro léčení chorob a stavů zprostředkovaných vápníkovými kanálky u savců a při hubení bezobratlých škůdců a hmyzu a prostředků obsahujících uvedené polypeptidy, polyamin a jejich soli.

Jak již bylo uvedeno je vynález zaměřen na určité polyaminy a polypeptidy, přítomné v jedu pavouka *Agelenopsis aperta*. Polyaminy a frakce ve kterých jsou přítomny podle vynálezu jsou tyto:

Polypeptidy podle vynálezu a frakce ve kterých jsou podle vynálezu přítomny, jsou tyto:

Frakce G:

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-asn-glu-trp-leu-ser-;

molekulová hmotnost celého peptidu podle FAB MS: 7267.

Frakce H₂ :

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly-met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his-cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

molekulová hmotnost celého peptidu podle zjištěná metodou Ion-Spray MS : 7793.

Frakce I:

H₂N-asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-
cys-ala-asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-
asp-gly-tyr-tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-
phe-pro-lys-cys-ile-cys-val-asn-asn-asn-CONH₂;

FAB MS: 4158.

Frakce J:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-
cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂;

molekulová hmotnost celého peptidu metodou FAB MS: 5506.

Frakce L₁ :

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-
gly-asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-
gln-gln-lys-asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp-;

přibližná molekulová hmotnost celého polypeptidu je asi
20 000.

Frakce L₂ :

Polypeptid získaný postupem podle příkladu 9.

Frakce M:

Koncový amin aminokyselinové. sekvence obsahuje:

H₂N-glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-
ser-asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro-;

přibližná molekulová hmotnost celého polypeptidu je asi
80 000.

Tyto polyaminy a jejich farmaceuticky přijatelné soli antagonizují excitační aminokyselinové neurotransmitery, přičemž tyto neurotransmitery působí na buňky. To znamená, že uvedené polyaminy jsou sami o sobě vhodné k antagonizování neurotransmiterů. Tyto polyaminy jsou rovněž vhodné k hubení bezobratlých škůdců a hmyzu a k léčení chorob a stavů u savců zprostředkovaných excitačními aminokyselinovými neurotransmitery. Uvedené polyaminy jsou také vhodné jako psychoterapeuticky účinné látky pro savce.

Polyamin B₁, uvedený výše, a polypeptidy podle vynálezu blokují vápníkové kanálky v buňkách. To znamená, že uvedený polyamin B₁ a polypeptidy jsou vhodné k blokování vápníkových kanálků v buňkách. Polyamin B₁ a uvedené polypeptidy jsou dále vhodné k hubení bezobratlých škůdců a hmyzu a k léčení chorob a stavů u savců zprostředkovaných funkcí vápníkového kanálku v buňkách.

Do rozsahu vynálezu náleží rovněž polypeptidy, které mají stejnou aminokyselinovou sekvenci a v podstatě stejný blokující účinek na vápníkový kanálek jako výše uvedené polypeptidy.

Vynález je rovněž zaměřen na farmaceutické prostředky obsahujících uvedené polyaminy a polypeptidy.

Jed pavouka *Agelenopsis aperta* se získává o sobě známým způsobem běžně známým a používaným z dosavadního stavu techniky vylučováním elektrickou stimulací. Je vhodné, aby se při použitém postupu získávání jedu zabránilo kontaminaci jedu obsahem žaludku nebo hemolymfou. Takové způsoby jsou odborníkům z dosavadního stavu techniky dobře známe. Získaný jed se skladuje ve zmrazeném stavu při teplotě přibližně -78°C . Následně se před použitím jed vyčistí postupem, popsáním v dalším popisu.

Čištění jedu se provádí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s reverzní fází na různých preparativních nebo semipreparativních kolonách, jako jsou kolony C-4 a C-18 Vydac (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801). Stanovení píku se provádí monochromaticky při 220-230 nm. Další analýza frakcí se může provádět například pomocí polychromomatických hodnot UV, stanovených diodovým detektorem Waters 990 (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757). Jednotlivé frakce ze sloupců se jímají známými postupy, například za pomoci frakčního kolektoru ISCO "FOXY" a píkového detektoru ISCO 2159 (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504). Frakce se jímají do nádoby o vhodném objemu, například do nádob ze sterilního polyethylenu. Zahuštění frakcí se následně provádí lyofilizací eluovaného podílu, přičemž potom následuje lyofilizace z vody. Čistota výsledných frakcí se stanoví chromatografickou analýzou na analytické koloně s gradientovým systémem, který je isokratičtější než systém, používaný k finálnímu čištění frakcí.

Struktury odpovídajících frakcí se stanoví známými analytickými postupy, například hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou resonancí. Polypeptidy podle vynálezu se sekvenují běžnými postupy známými z dosavadního stavu techniky. Například S-pyridyl-ethylace cystinového zbytku polypeptidu může probíhat v roztoku, načež se provede sekvenování aminokyselin polypeptidu. Příkladem takové S-pyridylethylace může být tento postup. Asi 1 až 10 μg polypeptidu se rozpustí nebo zředí v až 50 μl pufru, který se připraví smíšením 1 dílu 1M TrisHCl, pH 8,5, obsahující 4 mM EDTA a 3 dílů 8 M guanidin.HCl. Následně se přidá 2,5 μl 10% vodného roztoku 2-merkaptoethanolu a směs se inkubuje při teplotě místnosti ve tmě a pod argonem dvě hodiny. Po inkubaci se přidají 2 μl 4-vinylpyridinu (čerstvé látky, uchovávané pod argonem při teplot $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), a směs se inkubuje další dvě hodiny při teplotě místnosti ve tmě a pod atmosférou argonu. Následně se směs odsolí, výhodně chromatografickým zpracováním na krátkém koloně s reverzní fází. Regenerovaný alkylovaný polypeptid se potom sekvenuje o sobě známým způsobem.

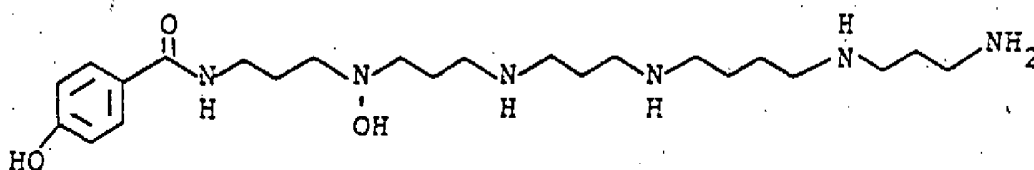
Při provádění postupu podle vynálezu výše popsaným obecným způsobem se zjistilo, že vhodnou náplní kolony pro počáteční frakcionování jedu je náplň kolony C-18 Vydac 22 mm x 250 mm, o velikosti pórů 30 nm (300 Å) a o velikosti částic 10 μm . Tato kolona se eluuje rychlostí vymývání 15 mililitrů/minutu při použití lineárního gradientového programu 95 % \longrightarrow 80 % A, 5 % \longrightarrow 20 % B [0 \longrightarrow minut] a dále 80 % \longrightarrow 30 % A, 20 % \longrightarrow 70 % B [0 \longrightarrow minut] kde A je 0,1% vodný roztok kyseliny trifluoroctové (TFA) a B je acetonitril. Tyto frakce byly shromážděny postupem uvedeným výše. Tímto způsobem bylo získáno 10 frakcí označených A, B,

E, G, H, I, J, K, L a M, které byly vybrány pro další analýzu a/nebo vyčištění. Kromě toho bylo zjištěno, že frakcionace celého podílu jedu při použití kolony C-18 Vydac 22 mm x 250 mm o velikosti pórů 30 nm (300 Å) a velikosti částic 10. μm, při eluování rychlostí 15 mililitrů/minutu a při použití lineárního gradientového programu :
 5 % → 10 % B, 95 % → 90 % A [0 → 30 minut],
 A a B mají výše uvedený význam, poskytla mimo jiné frakci označovanou v tomto popisu A'. Vymývací doby frakcí jsou uvedeny v příkladech 1 a 2.

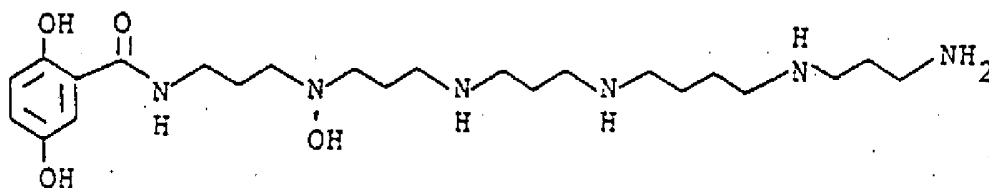
Frakce A, B, G, H, I/J a L byly potom podrobeny čištění za použití různých kolon s různým gradientovým programem. Podrobné údaje pro každou subfrakcionaci a získané výsledky jsou uvedeny v příkladech 3, 4, 6, 7, 8 a 10.

Jak je uvedeno v následujících příkladech, frakce A', A₁, A₂, B₁, B₂ a E obsahují polyaminové sloučeniny. Tyto sloučeniny a frakce ve kterých jsou obsaženy, jsou charakterizovány následujícím způsobem :

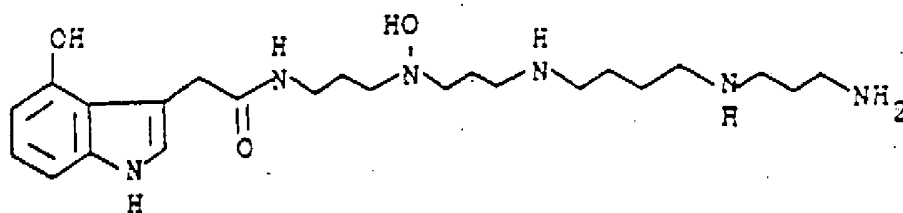
Frakce A' (AGEL 452):



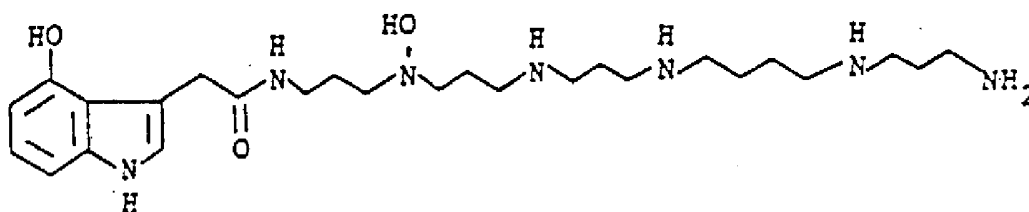
Frakce A₁ (AGEL 468):



Frakce A₂ (AGEL 448):



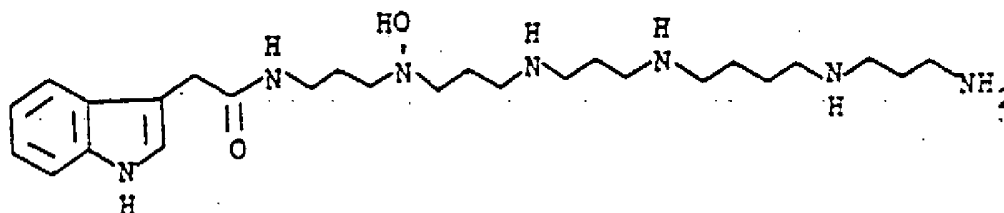
Frakce B₁ (AGEL 505):



Frakce B₂ (AGEL 504):

FAB MS: s vysokou rozlišovací schopností: 505,3861
vypočteno pro C₂₇H₄₈N₆O₃.

Frakce E /AGEL 489/:



Jak je uvedeno v následujících příkladech, frakce G, H₂, I, J, L₁, L₂ a M obsahují polypeptidy. Tyto polypeptidy a frakce ve kterých se vyskytují, jsou charakterizovány následujícím způsobem :

Frakce G:

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-
gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-
ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-
gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-
lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-
asn-glu-trp-leu-ser-;

molekulová hmotnost celého peptidu podle FAB MS: 7267.

Frakce H₂:

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-
val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-
cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys-
arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-
gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly-
met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his-
cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

molekulová hmotnost celého peptidu podle zjištěná metodou
Ion-Spray MS : 7793.

Frakce I:

H₂N-asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-
cys-ala-asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-
asp-gly-tyr-tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-
phe-pro-lys-cys-ile-cys-val-asn-asn-asn-CONH₂;

FAB MS: 4158.

Frakce J:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-
cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂;

molekulová hmotnost celého peptidu metodou FAB MS: 5506.

Frakce L₁ :

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-
gly-asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-
gln-gln-lys-asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp-;

přibližná molekulová hmotnost celého polypeptidu je asi
20 000.

Frakce L₂ :

Polypeptid získaný postupem podle příkladu 9.

Frakce M:

Koncový amin aminokyselinové sekvence obsahuje:

H₂N=glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-
ser-asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro-;

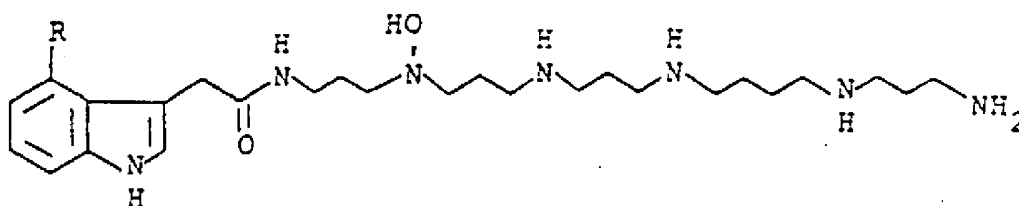
přibližná molekulová hmotnost celého polypeptidu je asi
80 000.

Podle předmětného vynálezu, na základě výše uvedeného popisu a analyzovaných sloučenin přítomných ve frakcích jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, je nyní možné získat tyto sloučeniny rovněž jinými postupy než izolací/vyčištěním ze surového jedu. Všechny takové postupy náleží do rozsahu předmětného vynálezu. Například polyaminy, obsažené ve frakcích A, A₁, A₂, B₁, B₂ a E, je možno připravit přímo syntetickými postupy. Polypeptidy, obsažené ve frakcích G, H₂, I, J, L₁, L₂ a M a u kterých je popsána celá sekvence aminokyselin, mohou být připraveny synteticky *in vitro* o sobě známými postupy. Tyto polypeptidy mohou být připraveny například v peptidovém syntetizátoru na pevné fázi ABI 430A (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404) při použití standardního postupu podle Merrifielda nebo jiných běžně známých postupů z dosavadního stavu techniky prováděných s pevnou fází. Polypeptidy je možno připravit rovněž pomocí rekombinantních DNA postupů klonováním kódovaných sekvencí pro polypeptidy nebo jejich částí. Takové polypeptidy, u kterých je známa pouze část aminokyselinové sekvence, mohou být klonovány například hybridizačními sondami využívajícími informaci známé aminokyselinové sekvence. K výrobě polypeptidů podle vynálezu je možno použít kombinaci DNA postupů a syntézy proteinu *in vitro*.

Z dosavadního stavu techniky je známo, že určité aminokyselinové substituce je možno v polypeptidech provádět tak, aby neovlivňovaly, nebo v podstatě neovlivňovaly funkci těchto polypeptidů. Přesné provedení těchto substitucí se mění v závislosti na určitém polypeptidu. Určení možnosti provedení takovýchto substitucí se provádí o sobě známými postupy. Do rozsahu předmětného vynálezu tedy náleží všechny

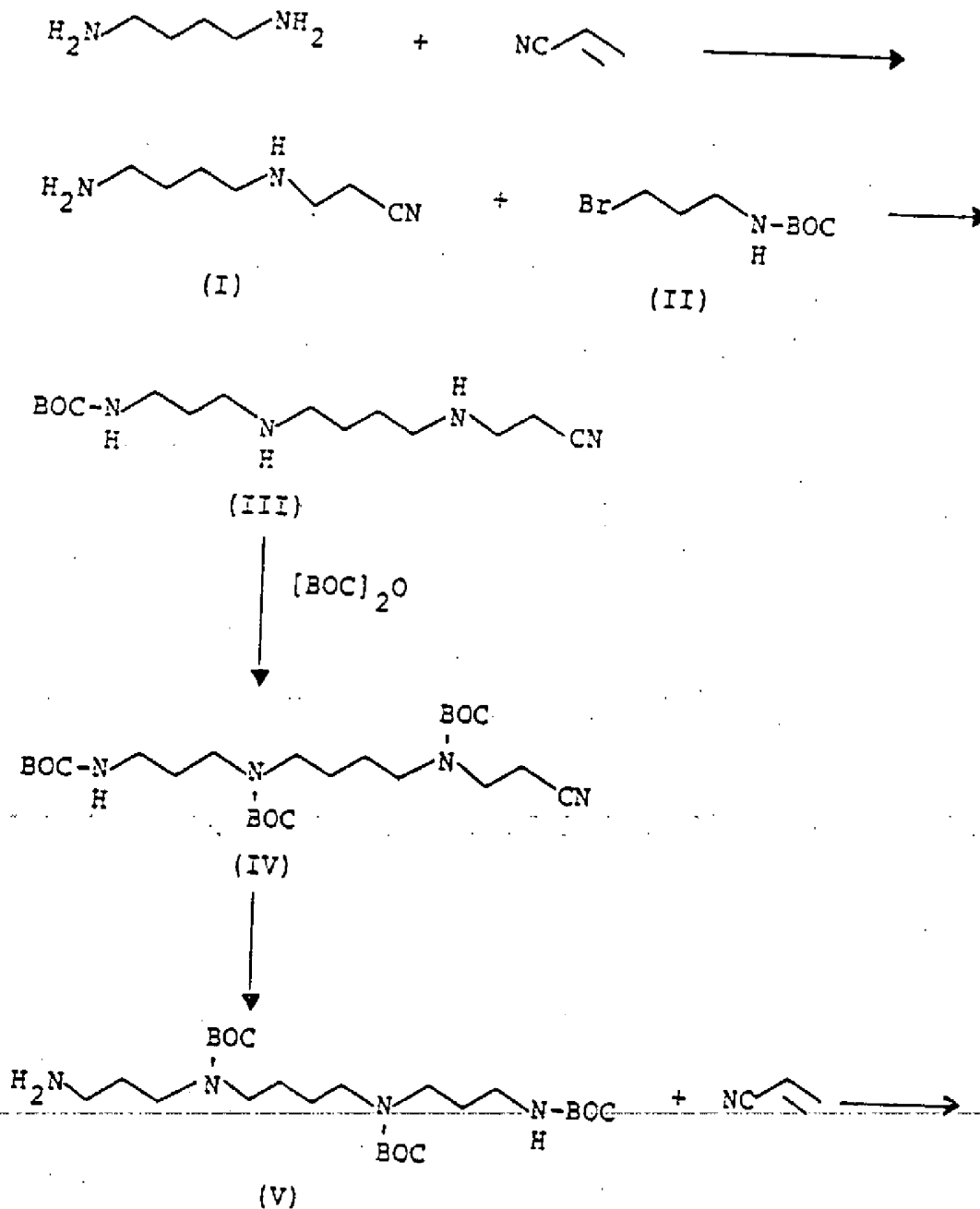
polypeptidy, které mají v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin a v podstatě stejné vlastnosti týkající se blokování vápníkového kanálku.

V následujícím popisu je uvedeno schema syntetického postupu přípravy určitých výše uvedených polyaminů obecného vzorce :

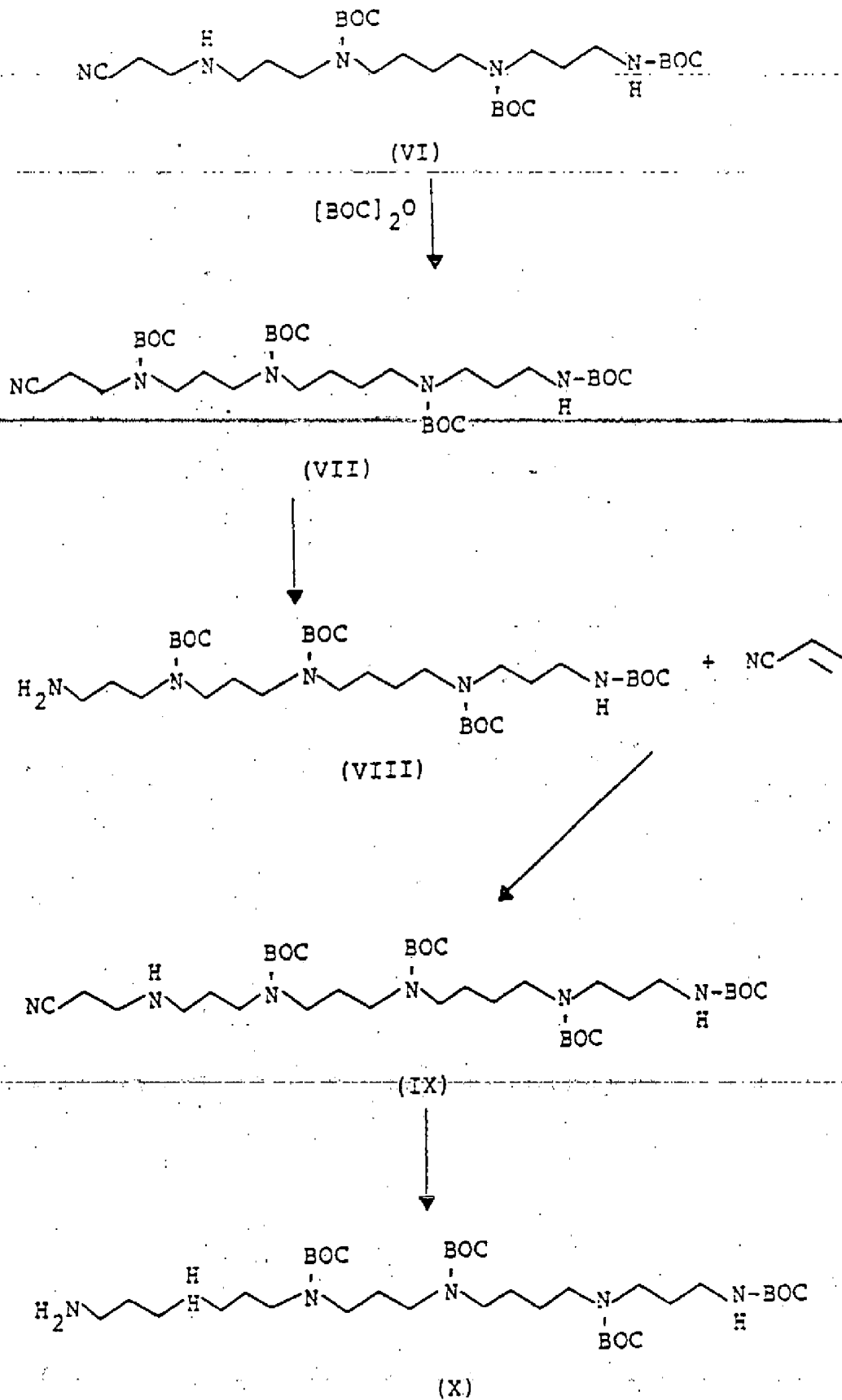


ve kterém R značí vodík nebo skupinu OH. Jednotlivé stupně tohoto reakčního schématu jsou označeny písmeny A až D.

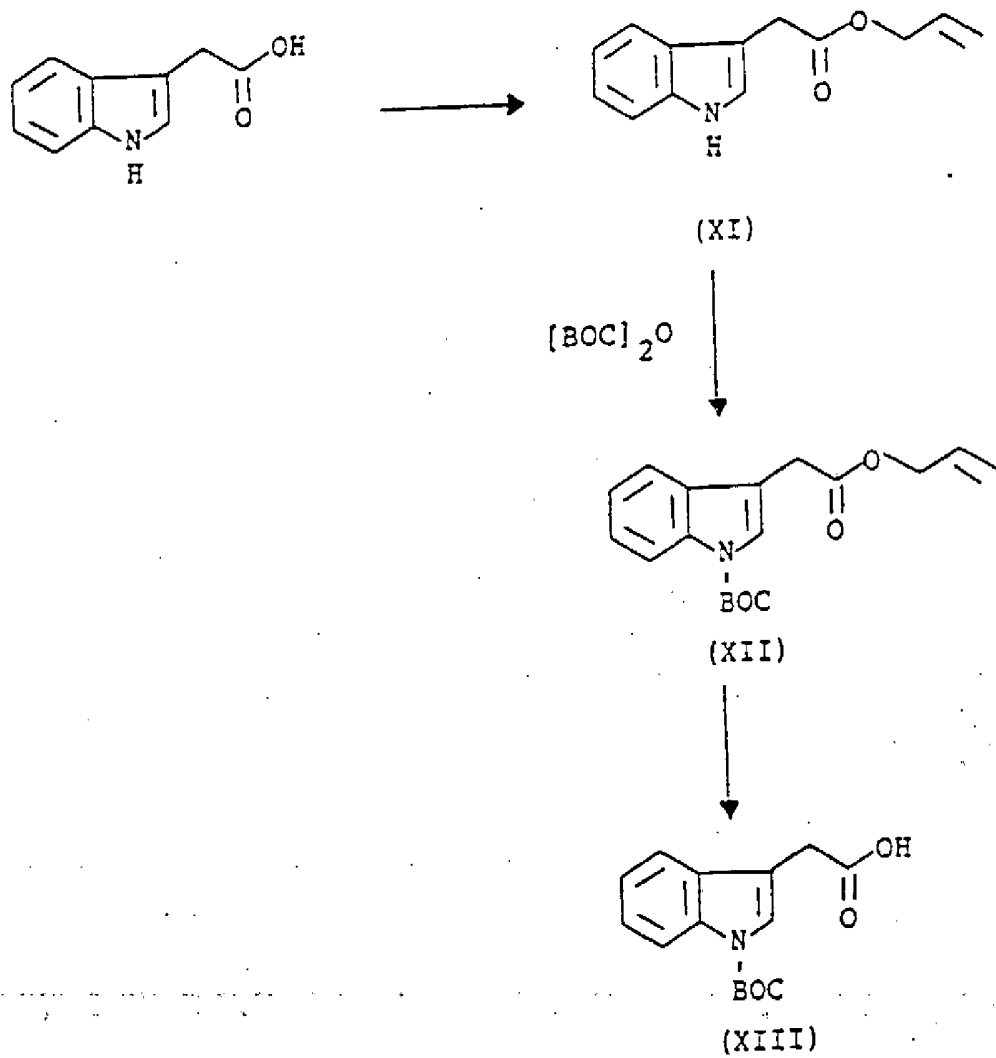
REAKČNÍ SCHEMA A



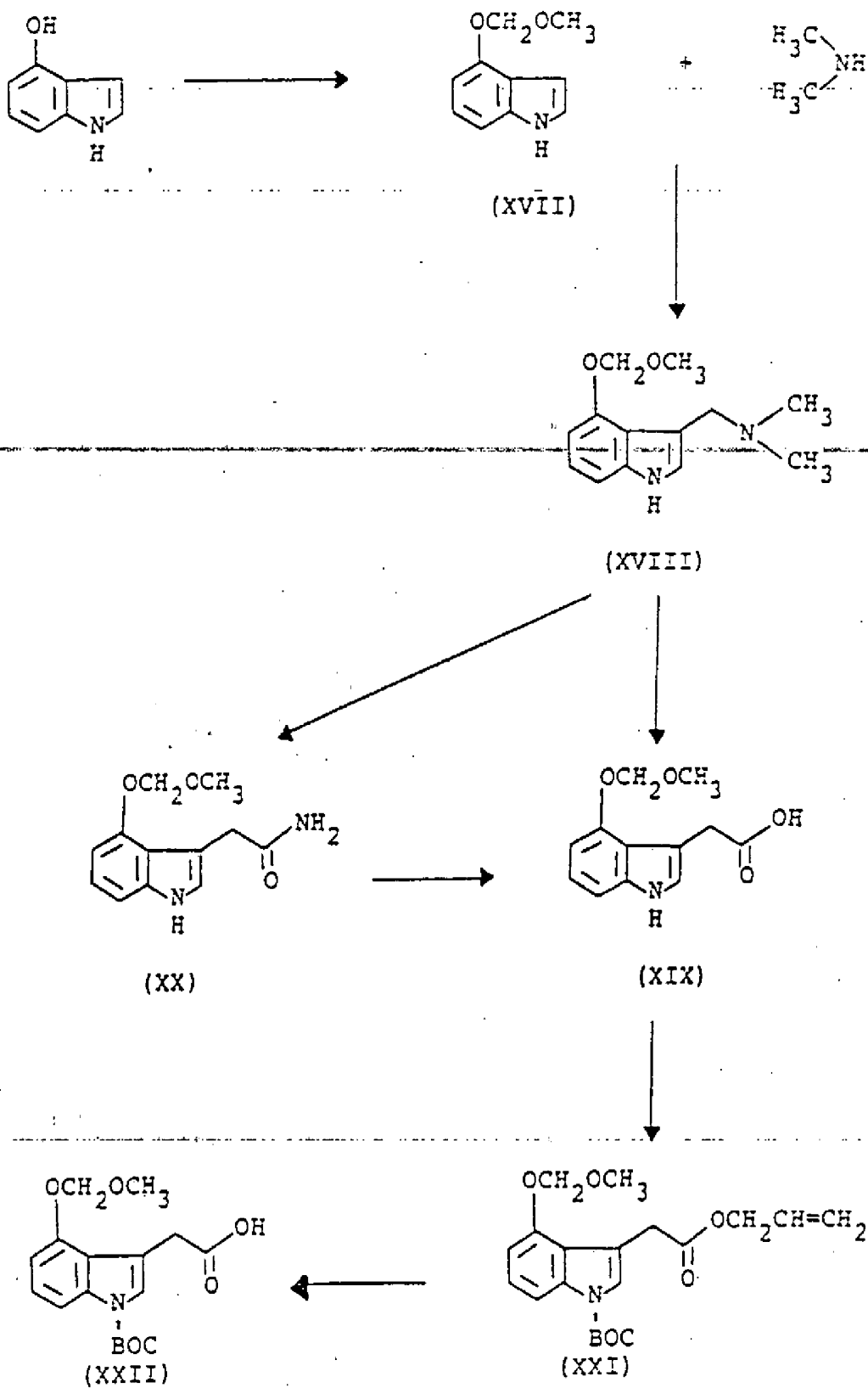
REAKČNÍ SCHEMA A (pokračování)



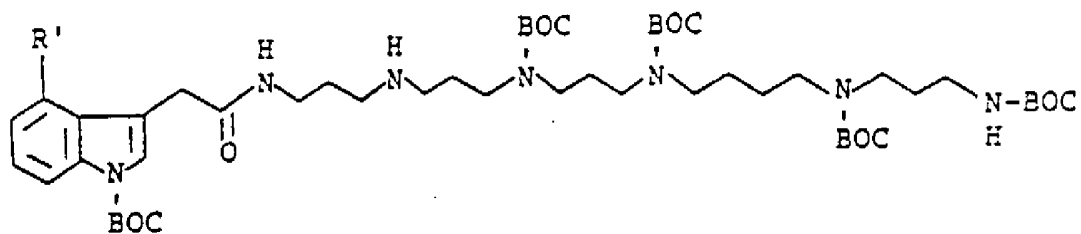
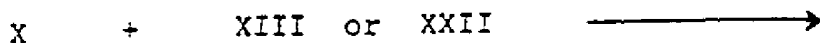
REAKČNÍ SCHEMA B



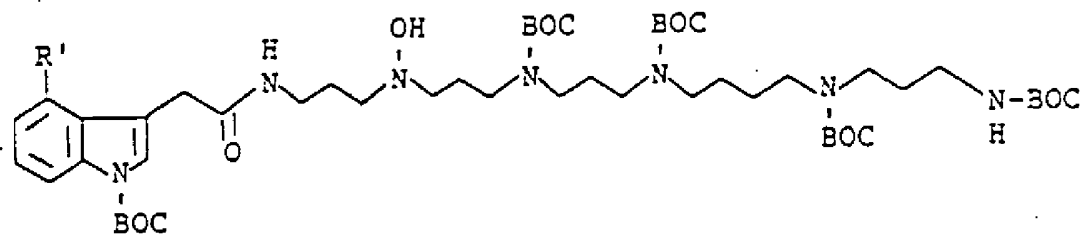
REAKČNÍ SCHEMA C



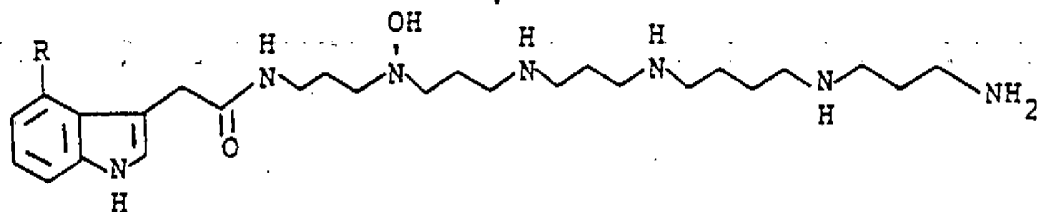
REAKČNÍ SCHEMA D



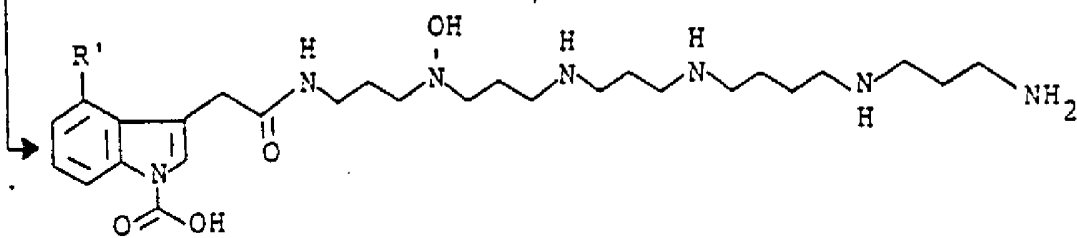
[R' = H (XIV), R' = OCH₂OCH₃ (XXIII)]



[R' = H (XV), R' = OCH₂OCH₃ (XXIV)]

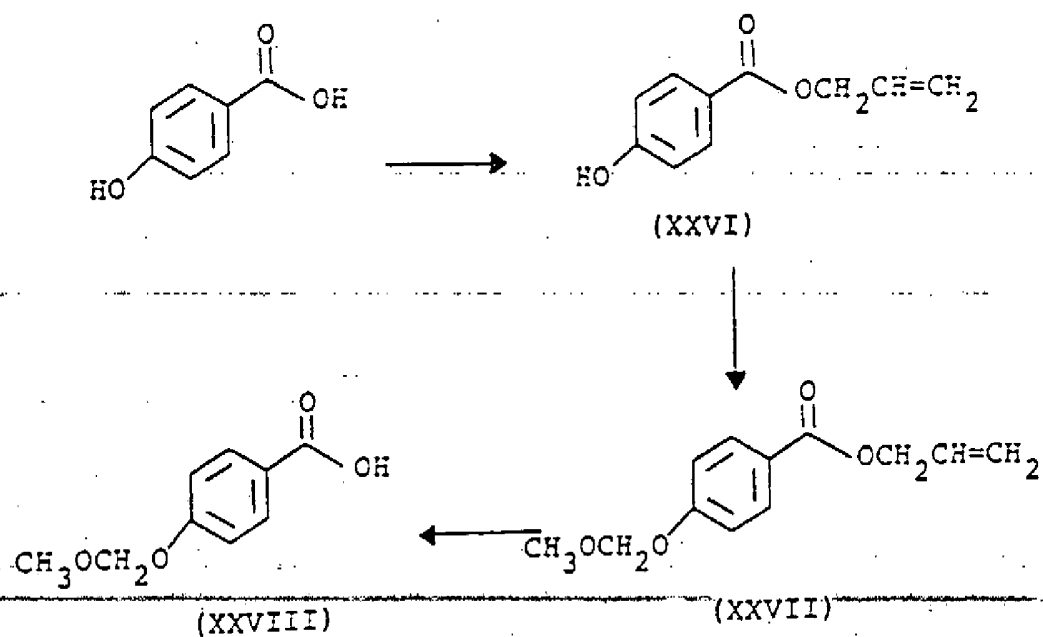


[R = H (XVI), R = OH (XXV)]

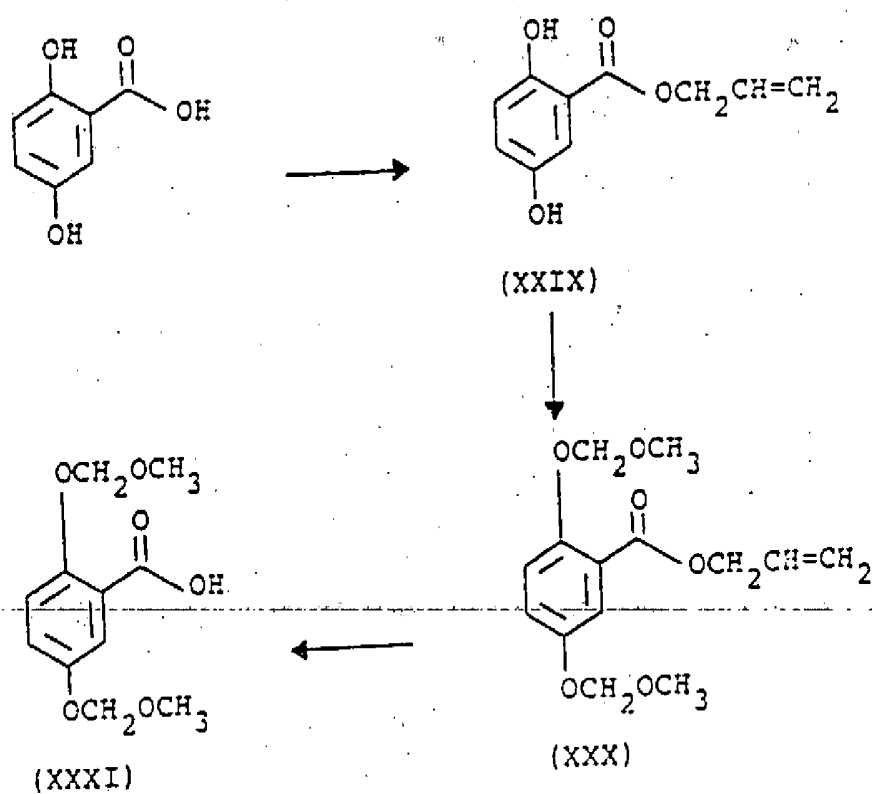


(XXIV')

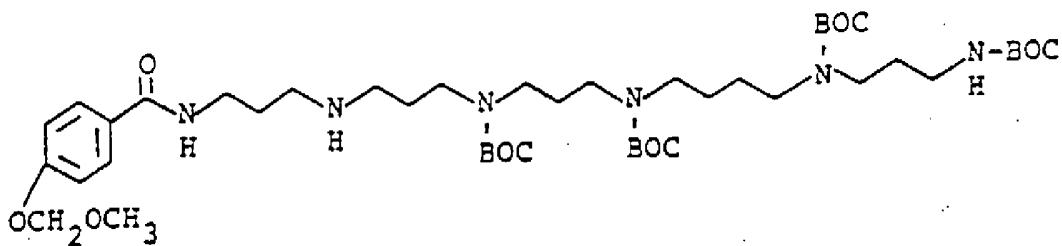
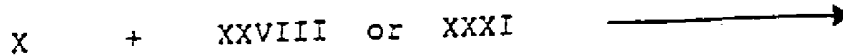
REAKČNÍ SCHEMA E



REAKČNÍ SCHEMA F

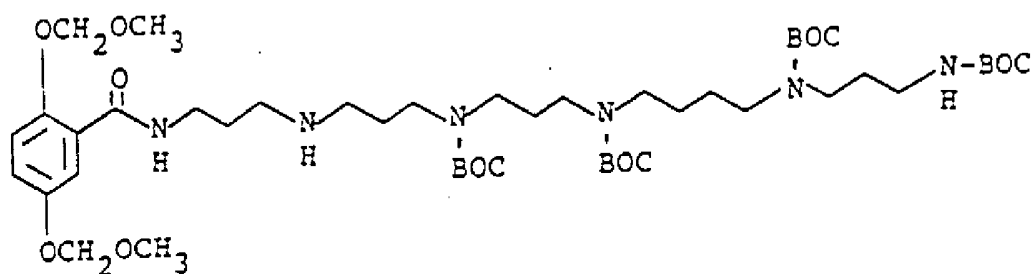


REAKČNÍ SCHEMA G

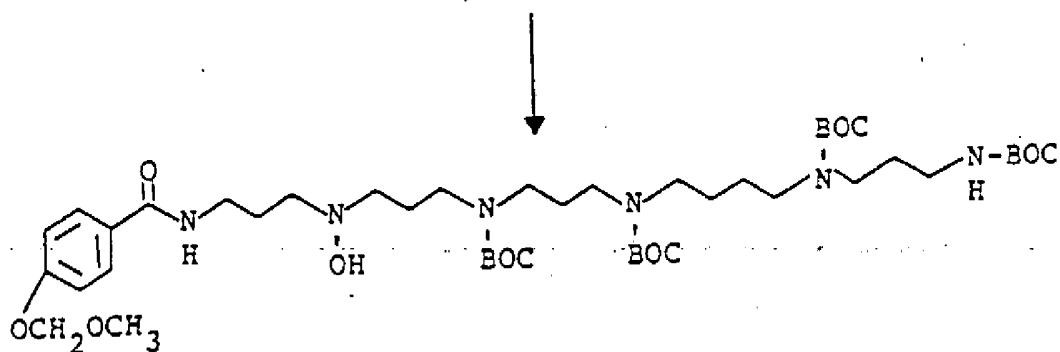


(XXXII)

or

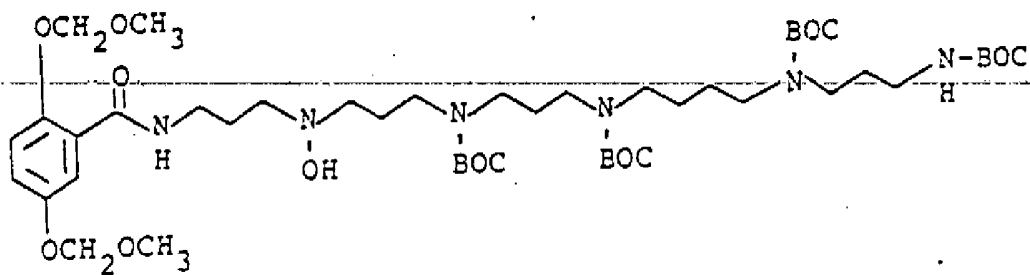


(XXXIII)



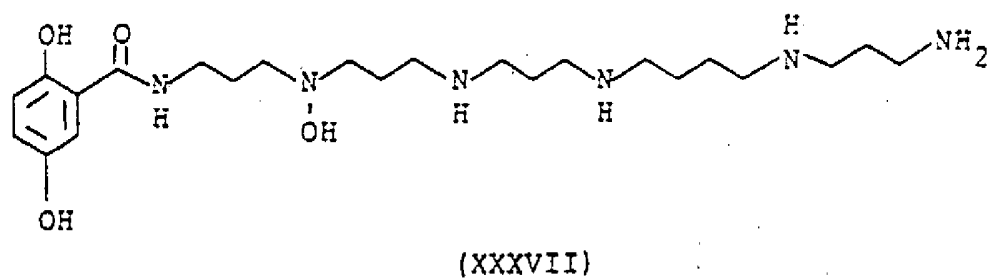
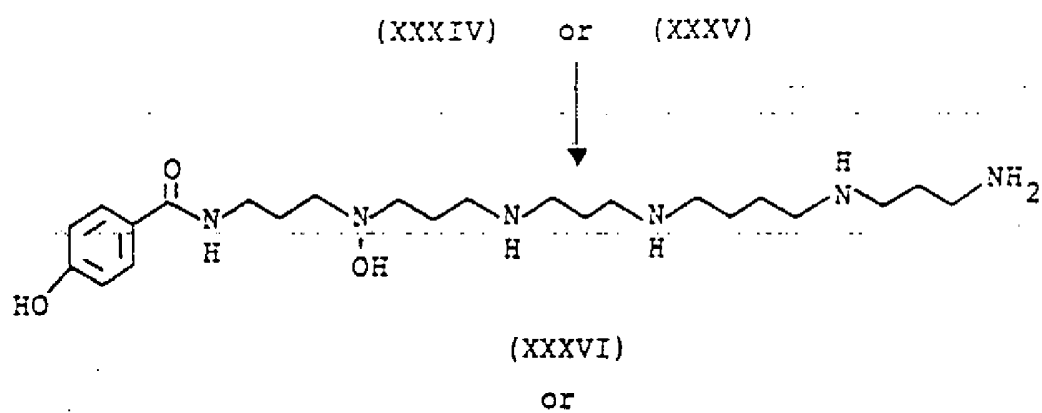
(XXXIV)

or



(XXXV)

REAKČNÍ SCHEMA G (pokračování)



Podle reakčního schématu A se sloučenina polyaminového meziprojektu vzorce X připraví řadou kroků, začínající diaminobutanem. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu tohoto meziprojektu vzorce X podle reakčního schématu A jsou uvedeny v částech A až I příkladu 11. V reakčním schématu B je ilustrován postup přípravy meziprojektu vzorce XIII. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu tohoto meziprojektu podle reakčního schématu B jsou uvedeny v příkladu 11, částech J až L. Postup přípravy meziprojektu vzorce XXI je uveden v reakčním schématu C. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu sloučeniny vzorce XXI podle reakčního schématu C jsou uvedeny v částech A až F příkladu 12. Postup přípravy polyaminových sloučenin podle vynálezu vzorců XVI a XXV jsou uvedeny v reakčním schématu D. Reakční podmínky, vhodné pro vzájemné adování meziprojektů vzorce X a XIII nebo X a XXI a pro následující postup přípravy sloučenin vzorce XVI a XXV jsou uvedeny v příkladu 11, části M až O a příkladu 12, části G až I.

V reakčních schématech E a F jsou ilustrovány postupy přípravy meziprojektů XXVIII a XXXI. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu meziprojektu podle reakčního schématu E jsou uvedeny v částech A až C příkladu 13. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu meziprojektu podle reakčního schématu F jsou uvedeny v příkladu 14, částech A až C. Postup přípravy polyaminových sloučenin podle vynálezu vzorce XXXVI a XXXVII jsou uvedeny v reakčním schématu G. Reakční podmínky, vhodné pro vzájemné adování meziprojektů vzorce X a XXVIII nebo X a XXXI a následnou přípravu sloučenin vzorce XXXVI a XXXVII jsou uvedeny v příkladu 13, částech D až F a v příkladu 14, částech D až F.

V reakčním schematu H je ilustrován postup přípravy polyaminové sloučeniny podle vynálezu vzorce XLI. Reakční podmínky, vhodné pro přípravu meziprojektu vzorce XXXVIII, adování této sloučeniny na meziprojekt vzorce XXII a následná příprava polyaminové sloučeniny podle vynálezu vzorce XLI jsou uvedeny v příkladu 15.

Jak již bylo uvedeno uvedené polyaminy antagonizují vratným způsobem excitační aminokyselinové neurotransmitery, které působí na buňky, například na buňky nervového systému řady organismů, včetně bezobratlých a obratlovců. Termín obratlovci zahrnuje savce. Termín bezobratlí zahrnuje v daném případě například hmyz, ektoparazity a endoparazity. Polyaminy výše uvedené frakce B₁ rovněž vratným způsobem blokují vápníkové kanálky, přítomné v řadě buněk, například v buňkách nervového systému a ve svalech, včetně kardiiovaskulárního systému bezobratlých a obratlovců.

Schopnost těchto polyaminů antagonizovat excitační aminokyselinové neurotransmitery je prokázána jejich schopností blokovat zvyšování obsahu cGMP vyvolané kyselinou N-methyl-D-asparagovou v malém mozku neonatálních kryš podle následujícího postupu. Malé mozky 8-14 dní starých kryš Vistar se rychle vyjmou a umístí při teplotě 4 °C v pufru, tvořeném Krebsovým roztokem a hydrogenuhličitanem sodným o pH 7,4 a následně se rozřežou na segmenty 0,5 mm x 0,5 mm pomocí přístroje McIlwain na řezání tkání (The Nickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, Anglie). Segmenty malého mozku se vloží do Krebs/hydrogen-uhličitanového pufru při teplotě 37 °C. Pufr se kontinuálně udržuje v rovnováze směsi O₂/CO₂ v poměru 95 : 5. Segmenty malého mozku se popsaným způsobem inkubují po dobu devadesáti minut při třech výměnách pufru. Závěrem se pufr

dekanuje, tkáň se odstředí (1 minutu při 3200 otáčkách za minutu), načež se tato tkáň opětně suspenduje ve 20 mililitrech Krebs/hydrogenuhlíčitánového pufru. Následně se alikvotní podíl 250 μ l (přibližně 2 mg) vyjme a umístí do 1,5 mililitrových mikrozkušavek. Přidá se 10 μ l testované sloučeniny ze zásobního roztoku a potom 10 μ l 2,5 mM roztoku NMDA k zahájení reakce. Finální koncentrace NMDA je 100 μ M. Do kontrolních směsí se nepřidává NMDA. Zkušavky se inkubují jednu minutu při teplotě 37 °C na protřepávané vodní lázni a následně se k ukončení reakce přidá 750 μ l 50 mM roztoku Tris-Cl, 5 mM EDTA. Zkušavky se okamžitě ponoří na pět minut do vroucí vodní lázně. Obsahy každé zkušavky se následně zpracovávají ultrazvukem 15 sekund pomocí ultrazvukové sondy nastavené na výkonový stupeň tři. Dále se odebere deset mikrolitrů a obsah proteinu se stanoví postupem podle Lowryho, viz. *Anal. Biochem.* 100:201-220 (1979). Zkušavky se potom podrobí odstřeďování (po dobu 5 minut při 10 000 x g), 100 μ l supernatantu se odstraní a obsah cyklického CMP (cGMP) se stanoví postupem podle testu *New England Nuclear cGMP RIA-test (Boston, Massachusetts)*. Získané údaje jsou se uvedou v pmol cGMP, generované jedním mg proteinu.

Polypeptidy podle vynálezu nevratně blokují vápníkové kanálky, přítomné v různých buňkách, například v buňkách nervového a svalového systému bezobratlých a obratlovců.

Farmakologické testy :

Schopnost polyaminu-frakce B₁ a polypeptidů frakcí G, H₁, H₂, I, J, K, L₁, L₂ a M blokovat vápníkové kanálky, se stanoví následujícím postupem. Disociované krysy neokortikální neurony se suspendují v Krebsově hydrogenuhlíčitánovém pufru o pH 7,4, obsahujícím 2 mM

CaCl₂ a 1 % bovinního sérového albuminu (BSA). Neurony se odstředěním usadí a potom se opětně suspendují ve stejném pufru, který dále obsahuje 1 μM fura2/AM (Sigma Chem. Co., P.O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178). Buňky se inkubují po dobu dalších 15 minut ve stejném pufru ale bez fura2/AM. Následně se buňky promyjí v uvedeném pufru, ale tentokrát s obsahem 1,5 mM CaCl₂ a udržují v rovnováze při teplotě místnosti ve formě koncentrované buněčné suspenze 5 až 10 minut. Do kyvety z křemenného skla se nalije 1,2 ml přehřátého (37 °C) pufru prostého BSA obsahujícího 1,5 mM CaCl₂ a 10 mM glukózy a potom 0,3 ml koncentrované buněčné suspenze, připravené výše uvedeným postupem. Tato kyveta se umístí do termostatované (37 °C) jednotky opatřené magnetickým míchadlem a fluorescence se změří fluorescenčním spektrofotometrem, například Perkin Elmer 650-40 (Perkin Elmer, Wilton, Connecticut 06897). Fluorescenční signál se ponechá stabilizovat po dobu asi jedné minuty. Následně se do kyvety přidají 1 až 4 μl zásobního roztoku testované sloučeniny v Krebsově hydrogenuhličitanovém pufru o vhodné koncentraci. Kalibrace fluorescenčních signálů a korekce rozptylu fura-2 se provedou postupem podle Nemetha a kol., viz. *J. Biol. Chem.* 262:5188 (1987). Po ukončení každého testu se stanoví maximální hodnota fluorescence (F_{max}) přidavkem ionomycinu a minimální hodnota fluorescence (F_{min}) se stanoví následným přidavkem 5 mM EGTA k chelataci vápníku. Při použití popsaného postupu se blokování vápníkového kanálku účinkem testované sloučeniny projeví snížením fluorescence po přidavku testované sloučeniny.

Výsledky :

Při provádění těchto testů za použití polypeptidových sloučenin podle předmětného vynálezu bylo zjištěno, že tyto

polypeptidy vykazují hodnotu IC_{50} v rozmezí od 100 nm do 10 μ m.

Do rozsahu daného vynálezu náleží rovněž polypeptidy, mající v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin jako polypeptidy frakcí G, H₁, I, J, L₁, L₂ a M a které mají stejný blokující účinek na vápníkové kanálky jako uvedené polypeptidy.

Uvedené polyaminy působí antagonicky na excitační aminokyselinové neurotransmitery. Proto jsou tyto polyaminy vhodné k hubení bezobratlého hmyzu a k léčení chorob a stavů zprostředkovaných excitačními aminokyselinovými neurotransmitery u savců, jako je mrtvice, záchvaty, mozková ischemie, nervové degenerační poruchy, například Alzheimerova choroba a epilepsie. Uvedené polyaminy je možno rovněž použít jako vhodná psychoterapeutická činidla u savců, Uvedené polyaminy jsou rovněž vhodné ke studiu fyziologie buněk, například buněk nervového systému, čímž ovšem není tento výčet nijak omezován.

Polyaminy frakce B₁ a polypeptidy podle vynálezu jsou vhodné k blokování vápníkových kanálků a proto nacházejí uplatnění při hubení bezobratlého hmyzu a k léčení chorob a stavů zprostředkovaných funkcí vápníkových kanálků u savců, jako je angína, hypertenze, kardiomyopatie, supraventrikulární arytmie, ezofageální achalasia, předčasný porod a Raynaudova choroba. Kromě toho jsou tyto sloučeniny vhodné při studiu fyziologie buněk, včetně buněk nervového a svalového systému.

Do rozsahu předkládaného řešení náleží rovněž farmaceuticky přijatelné soli polyaminů a polypeptidů podle

předmětného vynálezu. Tyto soli se připravují o sobě známými postupy. Běžnými metodami známými z dosavadního stavu techniky mohou být například tímto způsobem připraveny adiční soli s kyselinami odvozené od polyaminů podle vynálezu a bazické soli odvozené od polypeptidů podle vynálezu.

Polyamin nebo polypeptid podle vynálezu může být savcům podáván jako samotný nebo ve směsi s farmaceuticky přijatelnou nosičovou látkou nebo ředidlem ve formě farmaceutických prostředků běžně používaných pro daný účel. Polyaminy a polypeptidy mohou být podávány perorálně nebo parenterálně, přičemž v případě polypeptidů je dáována přednost parenterálnímu způsobu podávání. Parenterální podávání zahrnuje intravenózní, intramuskulární, intraperitoneální, subkutánní a topické podávání.

Při perorálním způsobu podávání polyaminu nebo polypeptidu podle vynálezu mohou být uvedené sloučeniny například obsaženy v tabletách nebo kapslích nebo ve vodných roztocích nebo suspenzích. V případě tablet pro perorální aplikaci se běžně používají nosiče, jako je například laktóza a kukuřičný škrob a maziva, jako je například stearát hořečnatý. Pro perorální aplikaci v podobě kapslí jsou vhodnými ředidly laktóza a sušený kukuřičný škrob. Ve vodných suspenzích je účinná složka smíšena s emulgačním prostředkem nebo suspenzačním činidlem. Do výsledného přípravku je možno přidávat v případě potřeby sladidla a/nebo příchutě

Pro intramuskulární, intraperitoneální, subkutánní a intravenózní použití se připraví sterilní roztoky účinné složky a pH roztoků se upraví puforem. Pro intravenózní

použití je nutno zajistit, aby byl roztok isotonický.

Při použití polyaminu nebo polypeptidu nebo jejich solí podle vynálezu v humánní medicíně určí denní dávku ošetřující lékař. Dávka se bude měnit v závislosti na věku, hmotnosti a individuální odezvě každého pacienta, stejně jako v závislosti na symptomech pacienta a účinnosti konkrétního přípravku.

Při použití polyaminu nebo polypeptidu nebo jejich solí podle vynálezu k hubení bezobratlého hmyzu se uvedená sloučenina aplikuje přímo na hmyz nebo se umístí v prostředí výskytu tohoto bezobratlého hmyzu. Například může být sloučenina podle vynálezu nastříkána na hmyz ve formě roztoku. Množství sloučeniny, nezbytné k hubení bezobratlého hmyzu se bude měnit v závislosti na konkrétním typu bezobratlého organismu a okolních podmínkách, přičemž toto aplikované množství musí být určeno osobou odpovídající za aplikaci této sloučeniny.

Při použití polyaminu nebo polypeptidu nebo jejich solí podle vynálezu ke studiu fyziologie buněk se uvedené sloučeniny aplikují na buňky o sobě známými postupy. Například mohou být uvedené sloučeniny aplikovány ve vhodném fyziologickém pufru. Vhodná koncentrace sloučenin podle vynálezu pro taková studia je 100 μM . Koncentrace těchto látek však může být vyšší nebo naopak mnohem nižší než uvedených 100 μM . Konkrétní množství použité sloučeniny se pro daný účel stanoví individuálně.

Příklady provedení vynálezu

Čištěné polyaminy a polyamidy podle předmětného vynálezu a postupy jejich přípravy budou v dalším blíže popsány a vysvětleny pomocí následujících příkladů provedení, které jsou ovšem pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah předmětného vynálezu.

P ř í k l a d 1

Počáteční frakcionace surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*.

Surový jed pavouka *Agelenopsis aperta*, získaný od firmy Natural Product Sciences Inc., Salt Lake City, Utah 84108 a uchovávaný ve zmrazeném stavu při teplotě asi -78°C byl rozmražen a podíly 10 až 60 μl tohoto jedu, zředěné na 200 μl , byly vloženy na kolonu C-18 Vydac (22 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikosti částic 10 μm), přičemž eluování bylo prováděno při průtočném množství 15 mililitrů/minutu a za použití rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5% \rightarrow 20% B, 95% \rightarrow 80% A (v průběhu 0 \rightarrow 30 minut) a následně 20% \rightarrow 70% B, 80% \rightarrow 30% A (v průběhu 30 \rightarrow 55 minut) kde A značí 0,1% na vodný roztok TFA a B značí acetonitril. Stanovení píku bylo prováděno monochromaticky při 220-230 nm a frakce byly jímány ve sběrači frakcí ISCO/"FOXY" a detektoru píku ISCO 2159. Frakce byly jímány 20 až 60 minut. V závislosti na detekci píku byly jímány následující frakce:

Frakce	Doba eluování
A	asi 21 minut
B	asi 22,75 minut
E	asi 27,5 minut
G	asi 38 minut
H	asi 39 minut
I	asi 40 minut
J	asi 40 minut
L	asi 43 minut
M	asi 48,3 minut

Příklad 2

Frakcionace surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*.

Celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, získaný stejným způsobem jako v příkladu 1, byl vložen na kolonu C-18 Vydac stejného typu jako v příkladu 1, přičemž eluování bylo prováděno při průtočném množství 15 mililitrů/minutu a za použití rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem $3\% \longrightarrow 10\% \text{ B, } 95\% \longrightarrow 90\% \text{ A}$ (v průběhu $0 \longrightarrow 30$ minut) kde A značí 0,1% vodný roztok TFA a B značí acetonitril. Detekce píku a jímání frakcí bylo provedeno stejným způsobem jako v příkladu 1. Získána byla frakce A', která byla eluována asi 12,5 minuty. Tato frakce A' byla potom připravena pro spektrální analýzu, přičemž byla lyofilizována z eluentu, načež následovala lyofilizace z destilované vody, což bylo provedeno standardními metodami.

Struktura této sloučeniny, která byla obsažena ve frakci A', byla potom určena za použití metody hmotové

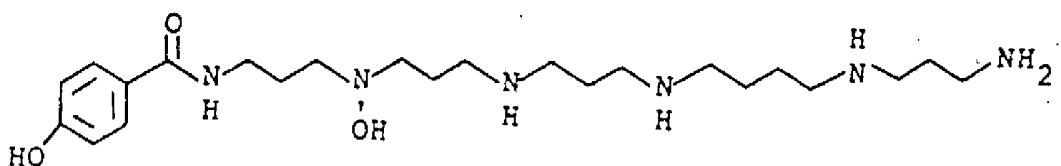
~~1992~~

spektroskopie s rychlými atomy FAB MS. Data takto získaná a odvozená struktura jsou následující :

A' :

FAB MA : M/Z 453 (M+1)

Struktura : N-(2-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-4-hydroxy-benzamid.



P ř í k l a d . 3

Subfrakcionace frakce A a stanovení její struktury.

Frakce A, získaná stejným způsobem jako v příkladu 1 byla vložena na kolonu C-4 Vydac (10 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikost částic 5 μ m) a eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 4,0 mililitry/minutu rozpouštědlovým systémem s lineárním gradientovým programem 0% \longrightarrow 10% B, 100% \longrightarrow 90% A [v intervalu 0 \longrightarrow 30 minut], kde A značí 0,1%~~ná~~ vodný roztok TFA a B značí acetonitril. Stanovení píku bylo provedeno při použití diodového detektoru Waters 990 a jímání frakcí bylo prováděno stejným způsobem jako v příkladu 1. Tímto způsobem byly získány dvě frakce, které vykazovaly následující charakteristiky:

Frakce	Doba eluování
A ₁	asi 7 minut
A ₂	asi 9 minut

Frakce A₁ a A₂ byly následně upraveny pro spektrální analýzu, přičemž byly lyofilizovány z eluentu a potom z vody podle standardních metod.

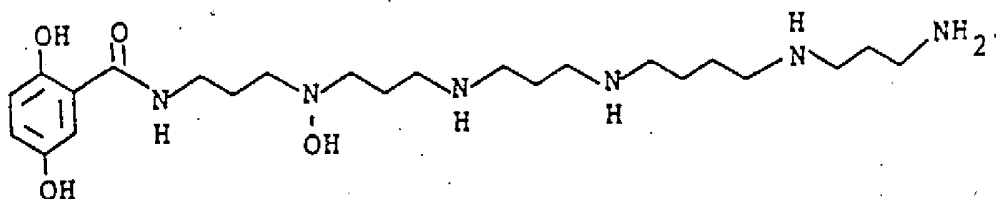
Struktura sloučenin, obsažených ve frakcích A₁ a A₂ byla následně určena pomocí FAB MS. Získané hodnoty jsou následující:

A₁:

FAB MS : M/Z 469 (M+1), vysoké rozlišení: 469.3863

vypočteno pro C₂₃H₄₅N₆O s chybou 2,0 mmu;

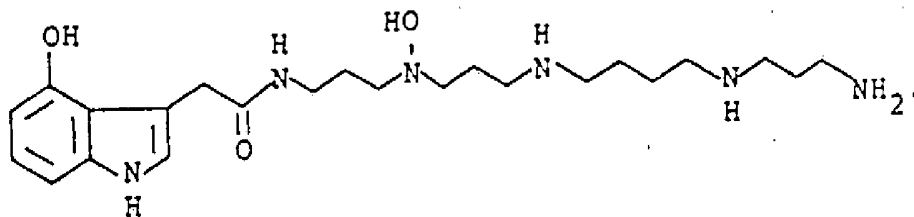
Struktura: N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazekos-1-yl)-2,5-dihydroxy-benzamid;



A₂:

FAB MS : M/Z 449 (M+1), 433, 376, 260, 203;

Struktura: N-(16-amino-4-hydroxy-4,8,13-triazahexadec-1-yl)-4-hydroxy-1H-indol-3-acetamid



P ř í k l a d 4

Subfrakcionace frakce B a stanovení její struktury.

Frakce B, získaná stejným způsobem jako v příkladu 1 byla vložena na kolonu C-4 Vydac (22 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikosti částic 10 μ m), přičemž eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu rozpouštědlovým systémem s nelineárním gradientovým programem 0% $\xrightarrow{\text{A}}$ 0% B, 100% $\xrightarrow{\text{A}}$ 100% A [v intervalu 0 $\xrightarrow{\text{A}}$ 5 minut], potom 0% $\xrightarrow{\text{B}}$ 10% B, 100% $\xrightarrow{\text{B}}$ 90% A [v intervalu 5 $\xrightarrow{\text{B}}$ 20 minut] (Watersova křivka 1), potom 10% $\xrightarrow{\text{B}}$ 20% B, 90% $\xrightarrow{\text{B}}$ 80% A [v intervalu 20 $\xrightarrow{\text{B}}$ 30 minut] (Watersova křivka 6), a potom 20% $\xrightarrow{\text{B}}$ 50% B, 80% $\xrightarrow{\text{B}}$ 50% A [v intervalu 30 $\xrightarrow{\text{B}}$ 40 minut] (Watersova křivka 11), kde A znamená 0,1% vodný roztok TFA a B je acetonitril. Stanovení píku bylo provedeno při použití diodového detektoru Waters 990 a jímání frakcí bylo prováděno stejným způsobem jako v příkladu 1. Tímto způsobem byly získány dvě frakce, které vykazovaly následující charakteristiky:

Frakce	Doba eluování
B ₁	asi 18,5 minuty
B ₂	asi 21,5 minuty

Tyto frakce byly následně upraveny pro spektrální analýzu, přičemž byly lyofilizovány z eluentu a potom z vody podle standardních metod.

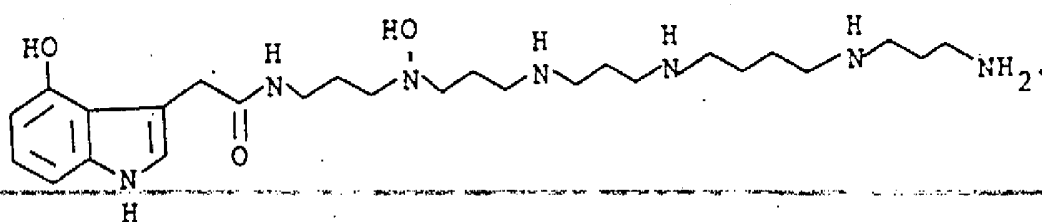
Struktura sloučeniny, která byla obsažena ve frakci B₁ byla určena pomocí metody FAB MS. Získané hodnoty jsou

následující:

FAB MS : M/Z 506 (M+1) : 489, 461, 433, 378, 333,
260, 231, 215, 203, 155, 119

vysoká rozlišovací schopnost : 506,3810 vypočteno pro
 $C_{26}H_{48}N_7O_3$,

Struktura: N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-
tetraazeikos-1-yl)-4-hydroxy-1H-indol-3-acetamid



Molekulová hmotnost sloučeniny, obsažené ve frakci B₂
byla stanovena pomocí metody FAB MS, přičemž byly získány
následující výsledky:

FAB MS: vysoké rozlišení: 505,3861 vypočteno pro
 $C_{27}H_{48}N_6O_3$.

P ř í k l a d 5

Struktura sloučenina obsažené ve frakci E.

Frakce E, získaná postupem podle příkladu 1, byla
upravena pro spektrální analýzu lyofilizací z eluentu
a následně lyofilizací z vody, přičemž bylo použito
standardních postupů. Struktura sloučeniny, obsažené ve
frakci E byla stanovena pomocí metody FAB MS, ¹H-NMR
a ¹³C-NMR. Získané hodnoty a odvozená struktura jsou
následující :

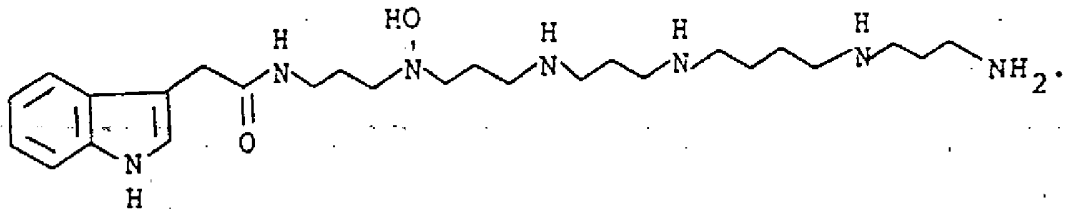
FAB MS : M/Z 490 (M+1), 472, 433, 362, 333, 260, 215, 203, 177, 155, 119,

vysoké rozlišení: 490,3860 vypočteno pro C₂₆H₄₈N₇O₂, s chybou 0,6 mmu

¹H-NMR (500 MHz, d6-DMSO); 10,89 (s, 1H), 8,90-7,85 (m, 6H), 7,55 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,34 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,08 (dd, J=8,0 Hz, J=8,0 Hz, 1H), 6,98 (dd, J=8,0 Hz, J=8,0 Hz, 1H), 3,50 (s, 2H), 3,13 (m, 2H), 3,03-2,82 (m, 18H), 1,88 (m, 6H), 1,78 (m, 2H), 1,62 (m, 4H).

¹³C-NMR (125,76 MHz, d6-DMSO): 170,94, 136,10, 127,17, 123,75, 120,92, 118,67, 118,26, 111,33, 108,97, 57,39, 57,07, 46,12, 46,12, 44,06, 43,89, 43,89, 36,52, 36,22, 32,78, 26,71, 23,79, 23,06, 22,65, 22,65, 22,45.

Struktura: N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-1H-indol-3-acetamid



Alternativně, a podle výhodného provedení, byl surový jed frakcionován stejným způsobem postupem jako je uvedeno v příkladu 1 s tou výjimkou, že bylo použito

rozpuštědlového systému s lineárním gradientovým programem 0% —> 20% B, 100% —> 80% A [v intervalu 0 —> 30 minut] a s detekcí píku při 220 nm. Frakce, která byla eluována přibližně během 26,0 minut, byla vložena na kolonu

Dynamax Fenyl (4,6 mm x 250 mm, s velikostí pórů $6 \cdot 10^{-7}$ cm a velikostí částic 8 μ m) a eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 1 ml/minutu a při isokratických podmínkách 10% B, 90% A, kde A a B mají stejný význam, jako v příkladu 1. Stanovení píku bylo provedeno pomocí diodového detektoru Waters 990 ($\lambda = 220$ nm) a frakce byly jímány stejným způsobem jako v příkladu 1. Frakce, které byla eluována přibližně během 55,27 minuty byla lyofilizována z vymývacího roztoku a potom z vody, přičemž bylo použito běžných standardních postupů, čímž byla získána požadovaná sloučenina podle tohoto příkladu.

Příklad 6

Subfrakcionace frakce G.

Frakce G, získaná stejným způsobem jako v příkladu 1 byla vložena na kolonu C-18 Vydac (22 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikost částic 10 μ m) a eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 10,0 mililitrů/minutu rozpouštědlovým systémem s nelineárním gradientovým programem 20% B \longrightarrow 30% B, 80% B \longrightarrow 70% A [v intervalu 0 \longrightarrow 40 minut] (Watersova křivka 6), přičemž bylo použito diodového detektoru Waters 990 a jímání frakcí bylo prováděno stejným způsobem jako v příkladu 1. Frakce G, která byla podrobena subfrakcionaci uvedené výše, byla potom eluována na uvedené koloně po dobu asi 22 minut. Tato frakce, která obsahovala polypeptid, byla potom připravena pro sekvenování lyofilizací z eluentu, přičemž následovala lyofilizace z vody, což bylo provedeno pomocí běžně známých postupů.

Analýza aminokyselin alkylovaného polypeptidu v této frakci byla provedena metodou Waters Pico-Tag, přičemž bylo

použito instruktážního manuálu dodávaného s touto metodou. Sekvenční hodnoty byly stanoveny sekvencerem Protein/Peptid model 470A (výrobce Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404) s konverzí vodným roztokem TFA. Analýza výsledných fenylthiohydantoinových aminokyselin byla provedena on line s analyzátozem model 120A PTH, výrobce Applied Biosystems, nebo off line na koloně DuPont Zorbax PTH (Biomedical Product Department, Chromatography Products, E. I. duPont de Nemours and Co., Inc., 1007 Market Street, Wilmington, Delaware 19898/.

Analýza aminokyselin metodou FAB MS celého polypeptidu prokázaly následující strukturu koncového aminu aminokyselinové sekvence části polypeptidu, obsaženého ve frakci G:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-gl--arg-gly-leu-lys-lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-asn-glu-trp-leu-ser-;

a FAB MS: 7267.

P ř í k l a d 7

Subfracionace frakce H a stanovení její struktury.

Frakce H, získaná stejným způsobem jako v příkladu 1 byla vložena na kolonu C-18 Vydac (22 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikosti částic 10 μ m), přičemž eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 10

mililitrů/minutu rozpouštědlovým systémem s nelineárním gradientovým programem 20% $\xrightarrow{\vee}$ 25% B, 80% $\xrightarrow{\vee}$ 75% A [v intervalu 0 $\xrightarrow{\vee}$ 30 minut] (Watersova křivka 6), a potom 25% $\xrightarrow{\vee}$ 50% B, 75% $\xrightarrow{\vee}$ 50% A [v intervalu 30 $\xrightarrow{\vee}$ 45 minut] (Watersova křivka-11), kde A znamená 0,1% vodný roztok TFA a B je acetonitril, přičemž stanovení píku bylo provedeno při použití diodového detektoru Waters 990 a jímání frakcí bylo prováděno stejným způsobem jako v příkladu 1. Z jímaných frakcí jsou důležité tyto:

Frakce	Doba eluování
H ₂	asi 36 minut
H ₃	asi 41 minut

Frakce H₂ a H₃, obsahující polypeptidy, byly následně upraveny pro sekvenování, přičemž toto sekvenování bylo provedeno postupem popsaným v příkladu 6. Aminová koncová část aminokyselinové sekvence části polypeptidu, obsažené ve frakci H₂, byla stanovena takto:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser
 val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys
 cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys
 arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-
 gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly
 met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his
 cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

a molekulová hmotnost celého polypeptidu byla stanovena pomocí metody Ion-Spray MS, přičemž bylo zjištěno, že tato molekulová hmotnost je 7793.

Příklad 8

Subfrakcionace frakcí I a J a stanovení jejich struktur:

Frakce I a J, získané postupem podle příkladu 1, které nebyly dostatečně odděleny v důsledku podobných vymývacích intervalů, jak je uvedeno v příkladu 1, byly společně umístěny na sloupec kolony C-4 Vydac (22 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikost částic 10 μm) a tato kolona byla potom eluována za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu rozpouštědlovým systémem s nelineárním gradientovým programem 20% $\xrightarrow{\text{A}}$ 30% B, 80 $\xrightarrow{\text{A}}$ 70% A [v intervalu 0 $\xrightarrow{\text{A}}$ 30 minut] (Watersova křivka 6) a dále 30% $\xrightarrow{\text{A}}$ 50% B, 70% $\xrightarrow{\text{A}}$ 50% A [v intervalu 0 $\xrightarrow{\text{A}}$ 45 minut] (Watersova křivka 11), kde A značí 0,1% ~~na~~ vodný roztok TFA a B je acetonitril. Stanovení píku a jímání frakcí bylo provedeno stejným postupem, jako je uvedeno v příkladu 6. Z jímaných frakcí byly zajímavé tyto:

Frakce	Doba eluování
I	asi 22 minut
J	asi 27,5 minuty

Frakce I a J, které obsahovaly polypeptidy, byly připraveny pro sekvenování, přičemž toto sekvenování bylo provedeno stejným postupem jako v příkladu 6.

Aminokyselinová sekvence a hodnoty FAB MS polypeptidu, obsaženého ve frakci I, byly stanoveny takto:

- 04 -

H₂N-asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-
cys-ala-asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-
asp-gly-tyr-tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-
phe-pro-lys-cys-ile-cys-val-asn-asn-asn-CONH₂

a FAB MS: 4158.

Koncový amin aminokyselinové sekvence části polypeptidu a hodnota FAB MS celého polypeptidu, obsaženého ve frakci J byly stanoveny takto:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pre-tyr-
cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂;

a FAB MS: 5506.

P ř í k l a d 9

Subfrakcionace frakce L a stanovení její struktury.

Frakce L, získaná stejným způsobem jako v příkladu 1 byla vložena na kolonu C-18 Vydac (10 mm x 250 mm, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm a velikosti částic 5 μ m), přičemž eluování bylo prováděno za použití průtočného množství 3,5 mililitru/minutu rozpouštědlovým systémem s lineárním gradientovým programem $25\% \xrightarrow{\quad} 40\% \text{ B}$, $75\% \xrightarrow{\quad} 60\% \text{ A}$ [v intervalu 0 $\xrightarrow{\quad}$ 30 minut], kde A znamená 0,1% vodný roztok TFA a B je acetonitril. Stanovení píku a jímání frakcí bylo prováděno stejným způsobem jako v příkladu 6. Z jímáných frakcí jsou důležité tyto:

Frakce	Doba vymývání
L ₁	asi 20,25 minuty
L ₂	asi 22,5 minuty

Frakce L₁ a L₂, obsahující polypeptidy, byly následně upraveny pro sekvenování, přičemž toto sekvenování bylo provedeno postupem popsáním v příkladu 6.

Aminová koncová část aminokyselinové sekvence části polypeptidu, obsažené ve frakci L₁, byla stanovena takto:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-
gly-asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-
gln-gln-lys-asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp

Molekulová hmotnost celého polypeptidu byla stanovena gelovou elektroforézou, přičemž bylo použité běžné metody, a tato hodnota činila 20 000.

P ř í k l a d 10

Stanovení struktury sloučeniny obsažené ve frakci M.

Frakce M, získaná postupem podle příkladu 1 a obsahující polypeptid, byla připravena pro sekvenování, přičemž toto sekvenování bylo provedeno stejným způsobem jako v příkladu 6.

Koncový amin aminokyselinové sekvence části polypeptidu, obsaženého ve frakci M, byl stanoven takto:

H₂N-glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-
ser-asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro

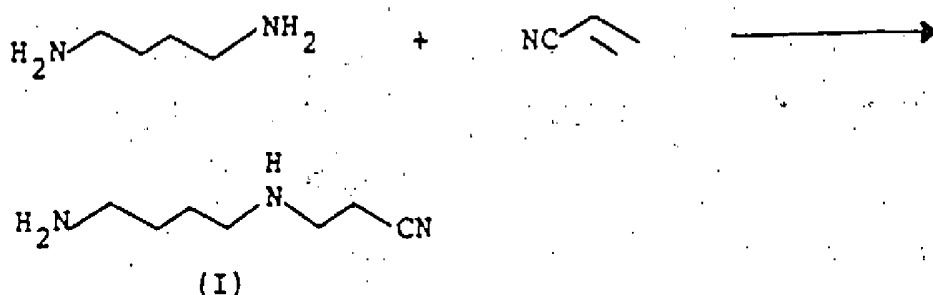
a molekulová hmotnost, stanovená běžně známým postupem
gelovou elektroforézou, byla asi 80 000.

Příklad 11

N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-1H-
indol-3-acetamid.

Syntetický postup přípravy této sloučeniny uvedené
v záhlaví, o které bylo předpokládáno, že je obsažena ve
frakci E popsané v příkladu 4, byl proveden následujícím
způsobem.

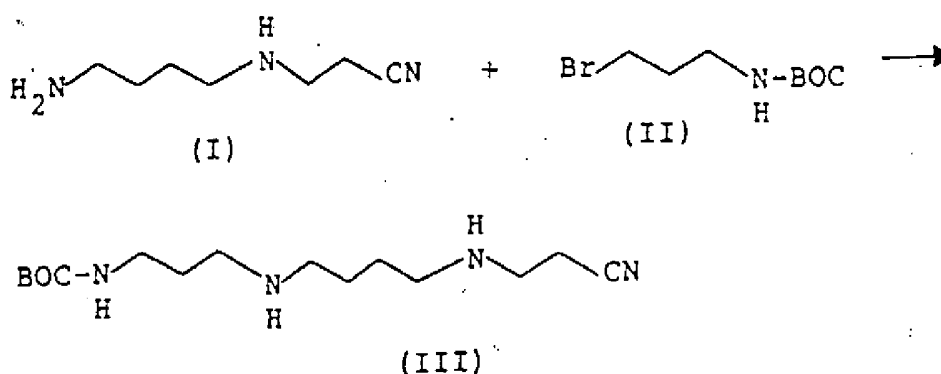
Postup A :



V atmosféře dusíku bylo promícháváno 13,22 gramu
(0,15 mol) diaminobutanu a 3,5 ml methanolu, přičemž potom
bylo přidáno 9,94 mililitru (0,15 mol) akrylonitrilu
prostřednictvím injekční stříkačky; což bylo prováděno po
dobu dvou hodin a při chlazení na 0 - 5 °C. Asi po 18
hodinách byla takto získaná reakční směs podrobena
chromatografickému zpracování na 600 gramech silikagelu za
použití systému rozpouštědel CH₂Cl₂/MeOH v poměru 3 : 1
(2 litry) a následně směsi CH₂Cl₂/MeOH s obsahem 5

objemových procent isopropylaminu (2 litry). Frakce obsahující adovaný produkt byly zkoncentrovány odpařením ve vakuu za vzniku viskózního oleje. NMR analýza potvrdila, že získaným produktem byl adiční produkt obecného vzorce I, uvedený dále :

Postup B :

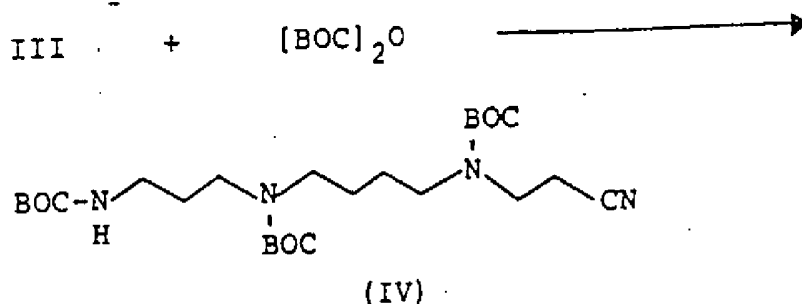


Pod atmosférou dusíku bylo přidáno 5,78 g (0,041 mol) sloučeniny vzorce I, připravené postupem A, viz: výše, k 75 mililitrům CH_3CN a 11,48 g KF Celitu a reakční směs byla promíchána. K takto promíchané směsi byl potom přidán roztok obsahující 9,75 g (0,041 mol) sloučeniny vzorce II, která byla připravena postupem uvedeným v části A, ve 25 mililitrech CH_3CN . Takto získaná reakční směs byla potom zahřívána při teplotě varu pod zpětným chladičem, přičemž monitorování reakčního průběhu bylo provedeno metodou TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ v poměru 3 : 1). Po třech hodinách byla ponechána reakční směs ochladit a stát při teplotě místnosti. Následně byl Celit ofiltrován a filtrační koláč byl dobře promyt dichlormethanem. Filtrát byl zkoncentrován ve vakuu. Surový produkt, obsažený ve zkoncentrovaném filtrátu byl podroben chromatografickému zpracování na silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito 2 litrů směsi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ v poměru 3 : 1, potom 2 litrů směsi

- 90 -

CH₂Cl₂/MeOH v poměru 3 : 1 obsahující 10 mililitrů isopropylaminu a následně 2 litrů směsi obsahující CH₂Cl₂/MeOH v poměru 3 : 1 a obsahující 30 mililitrů isopropylaminu. Produkt, byl eluován z této kolony poté, co byla kolona nasycena isopropylaminem, ovšem tento produkt nebyl stále čistý. Všechny frakce obsahující produkt byly spojeny a zkoncentrovány. Silikagel byl připraven tak, že bylo 500 gramů silikagelu suspendováno v CH₂Cl₂ a 125 mililitrech isopropylaminu a potom byl tento produkt použit jako náplň kolony, což bylo provedeno běžně známým způsobem. Surový produkt byl nanesen na kolonu pomocí dichlormethanu. Následně byla kolona eluována 500 mililitry dichlormethanu a potom jedním litrem směsi CH₂Cl₂/MeOH v poměru 3 : 1. Frakce obsahující produkt byly spojeny a zahuštěny ve vakuu, čímž bylo získáno 1,5 gramu produktu vzorce III. Další 2 gramy produktu vzorce III byly eluovány z kolony jedním litrem CH₂Cl₂/MeOH v poměru 3 : 1 a 30 mililitrů isopropylaminu.

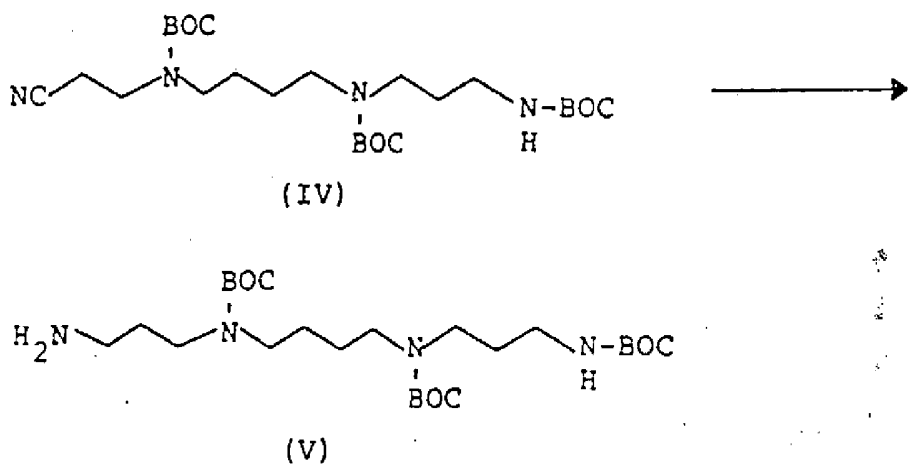
Postup C :



Pod atmosférou dusíku byla potom promíchávána směs obsahující 3,5 gramu (11,8 mmol) sloučeniny vzorce III, která byla připravena podle postupu B, viz. výše, a 150 ml dichlormethanu, načež bylo přidáno 5,2 gramu (23,6 mmol) di-t-butyldiuhličitanu. Takto získaná směs byla potom

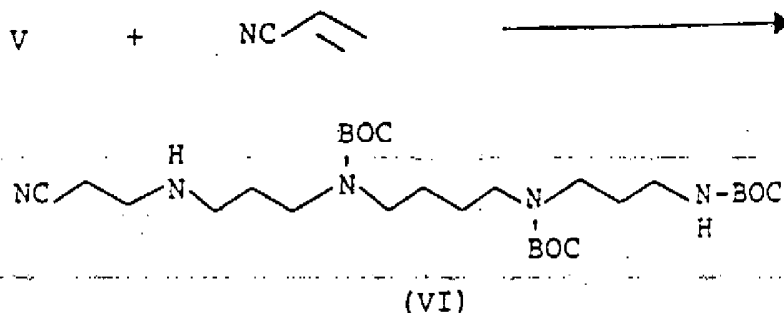
promíchávána po dobu přibližně 68 hodin při teplotě místnosti. V dalším postupu byla tato směs zkoncentrována ve vakuu a podrobena chromatografickému zpracování za použití 400 gramů silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi hexan/ethylacetát v poměru 60 : 40, a tímto způsobem bylo připraveno 5,62 gramu sloučeniny vzorce IV v podobě oleje.

Postup D :



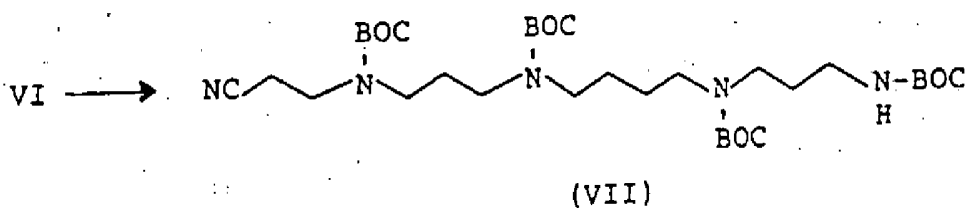
Pod atmosférou dusíku byly rozpuštěny 3,0 gramy sloučeniny vzorce IV, která byla připravena postupem C, viz. výše, ve 30 mililitrech kyseliny octové ve 250-ti mililitrové Parrově baňce. K roztoku byly potom přidány 3,0 gramy Pd(OH)₂/uhlíku a tato směs byla hydrogenována při tlaku 345 kPa vodíku po dobu dvou hodin. Následně byl katalyzátor odstraněn odfiltrováním a filtrační koláč byl dobře promyt kyselinou octovou. Takto získaný filtrát byl zkoncentrován, vložen do 75 mililitrů dichlormethanu, promyt dvakrát 75 mililitry 1N NaOH a vysušen pomocí uhličitanu draselného K₂CO₃. Roztok byl zkoncentrován ve vakuu za vzniku 2,86 gramu produktu vzorce V, viz výše.

Postup E :



Pod atmosférou dusíku bylo rozpuštěno 2,86 gramu (5,7 mmol) sloučeniny vzorce V, která byla připravena postupem D, viz výše, v 75 mililitrech methanolu. Za míchání bylo potom přidáno 0,41 mililitru (6,3 mmol) akrylonitrilu a takto získaná reakční směs byla potom promíchávána po dobu přes noc. V dalším postupu byla tato reakční směs zkoncentrována, opětně koncentrována třikrát ze 30 mililitrů dichlormethanu a podrobena stripování rozpouštědla ve vakuu, přičemž tímto postupem bylo získáno 3,18 gramu sloučeniny vzorce VI v podobě oleje.

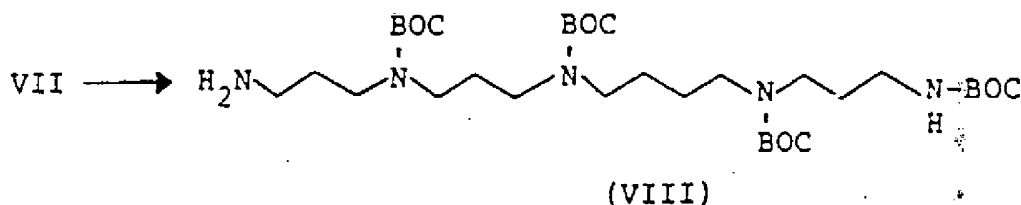
Postup F :



Pod atmosférou dusíku bylo smícháno 3,18 gramu (5,7 mmol) sloučeniny vzorce VI, připravené výše uvedeným postupem E, se 100 mililitry dichlormethanu a takto získaná reakční směs byla promíchávána až do rozpuštění. K takto získanému roztoku bylo potom přidáno 1,37 gramu (6,3 mmol)

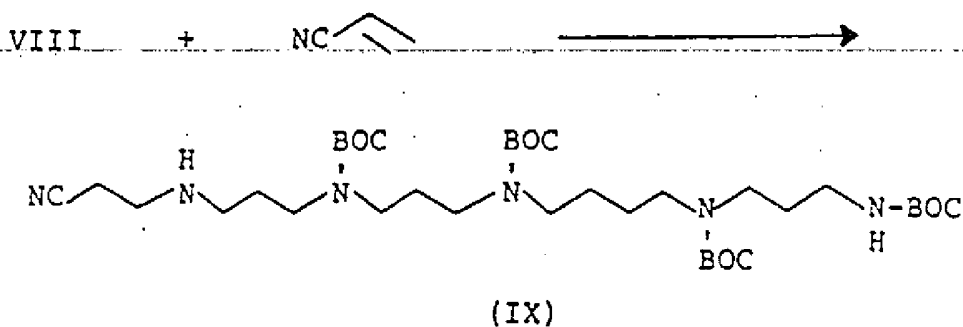
di-*t*-butyldiuhličitanu a takto získaná reakční směs byla promíchávána 90 minut při teplotě místnosti. Následně byla tato reakční směs zkoncentrována a podrobena chromatografickému zpracování na 300 gramech silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi hexan/ethylacetát v poměru 60 : 40. Frakce obsahující produkt byly spojeny, zkoncentrovány, extrahovány třemi podíly dichlormethanu po 20 mililitrech a rozpouštědlo bylo odstraněno stripováním ve vakuu, přičemž tímto způsobem bylo získáno 3,12 gramu produktu vzorce VII.

Postup G :



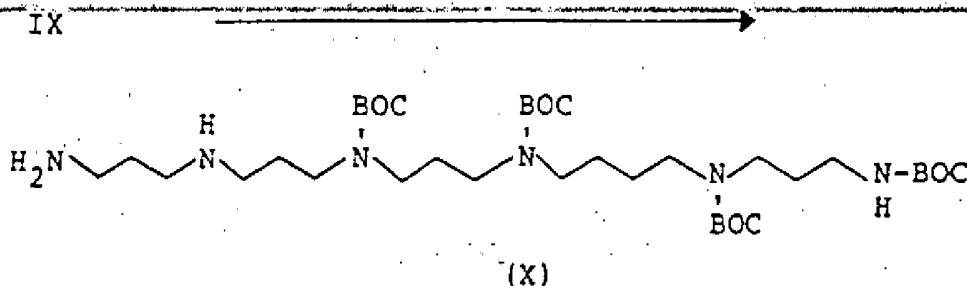
Postupem podle schematu D bylo rozpuštěno 3,12 gramu (4,76 mmol) sloučeniny vzorce VII, připravené postupem F ve 30 mililitrech kyseliny octové a tato reakční směs byla hydrogenována při tlaku vodíku 380 kPa po dobu 2 hodin v přítomnosti 3,0 gramů Pd(OH)₂/uhlíku, přičemž tímto postupem bylo získáno 3,02 gramu produktu vzorce VIII v podobě oleje.

Postup H :



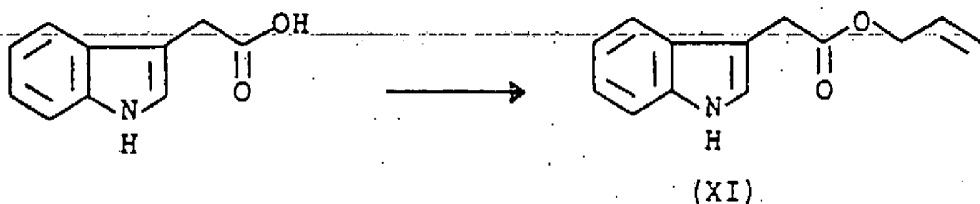
Pod atmosférou dusíku byl rozpuštěn 1,0 gram (1,5 mmol) sloučeniny vzorce VIII, která byla připravena postupem podle postupu G, v 10 mililitrech methanolu. K tomuto roztoku bylo potom přidáno 0,1 mililitrů (1,67 mmol) akrylonitrilu a takto získaná reakční směs byla promíchávána po dobu přes noc. V dalším postupu byla tato reakční směs zkoncentrována, opětně rozředěna a koncentrována třikrát za pomoci 20 mililitrů dichlormethanu, přičemž použité rozpouštědlo bylo odstraněno stripováním ve vakuu a tímto postupem bylo připraveno 1,0 gramu produktu vzorce IX.

Postup I :



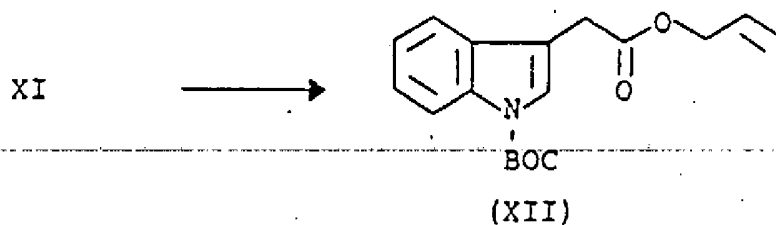
Stejným způsobem jako je uvedeno v postupu D byl rozpuštěn 1,0 gram (1,4 mmol) sloučeniny vzorce IX, která byla připravena postupem H, ve 30 mililitrech kyseliny octové a takto získaný reakční směs byla potom hydrogenována po dobu 2,5 hodiny při tlaku vodíku 345 kPa za vzniku 0,85 gramu produktu vzorce X, viz výše.

Postup J :



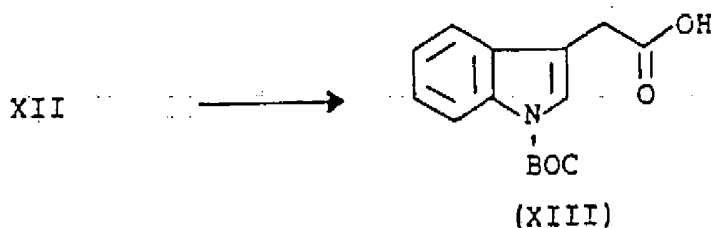
Podle tohoto provedení byl připraven roztok, který obsahoval 6,78 gramu (20 mmol) tetrabutylammonium-hydrogensíranu a 75 mililitrech vody, načež bylo přidáno 3,36 gramu (40 mmol) hydrogenuhličitanu sodného NaHCO_3 a tato reakční směs byla ponechána napěnit. V dalším postupu bylo přidáno 3,5 gramu (20 mmol) kyseliny indolctové, získaná reakční směs byla promíchávána po dobu 5 minut a potom bylo přidáno s 75 mililitrů CHCl_3 . Tato reakční směs byla promíchávána po dobu dalších 5 minut a dvě spodní vrstvy byly odděleny. Vodní vrstva se byla vysolena síranem sodným Na_2SO_4 a extrahována trichlormethanem CHCl_3 . Všechny trichlormethanové extrakty byly spojeny a vysušeny za pomoci síranu sodného Na_2SO_4 . Výsledný čirý jantarově zbarvený roztok byl zkoncentrován, zpracován třemi podíly acetonu po 75 mililitrech a nakonec byl tento podíl rozpuštěn v 75 mililitrech acetonu. Následně bylo přidáno 1,9 mililitru (22 mmol) allylbromidu a tato reakční směs byla ponechána stát po dobu 30 minut. Takto získaná reakční směs byla zkoncentrována a zpracována chromatografickou metodou na silikagelu, přičemž eluování bylo prováděno směsí hexan/ethylacetát v poměru 3 : 1, přičemž tímto způsobem bylo získáno 3,57 gramu produktu vzorce XI, viz výše, ve formě světle žlutého oleje.

Postup K :



Podle tohoto postupu bylo postupem popsáným v publikaci : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23:298 (1984) smícháno 2,15 gramu (10 mmol) sloučeniny vzorce XI, která byla připravena postupem podle postupu J, viz výše, s 20 mililitry acetonitrilu a k takto získané směsi bylo potom přidáno 2,61 gramu (12 mmol) di-t-butyldiuhličitanu. V dalším postupu bylo přidáno 0,122 g (1 mmol) 4-(N,N-dimethylamino)pyridinu a reakce byla ponechána probíhat po dobu 15 minut. V další fázi tohoto postupu byla tato reakční směs zředěna na objem 125 mililitrů ethylacetátem, promyta dvakrát zředěnou kyselinou chlorovodíkovou HCl, třemi podíly vody po 25 mililitrech, jednou solankou a potom byla usušena a zkoncentrována. Získaný produkt byl potom vyčištěn chromatografickou metodou na silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 14,5 : 1 za vzniku 2,87 gramu sloučeniny vzorce XII, viz výše, v podobě bezbarvého oleje.

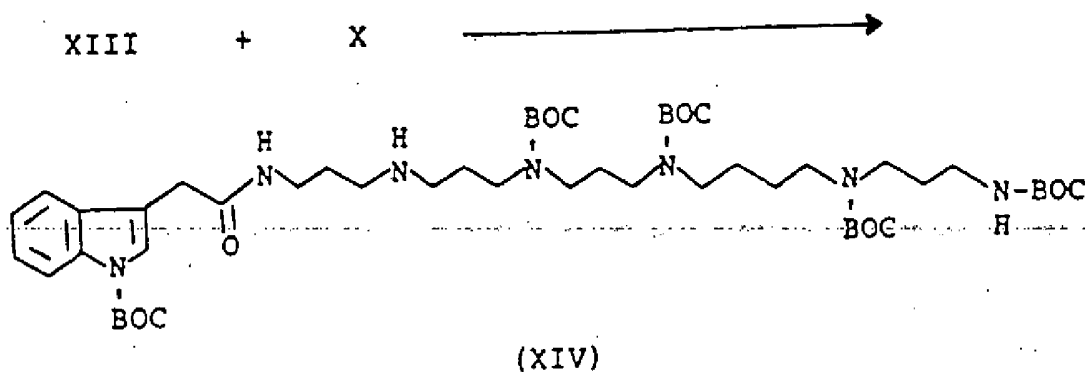
Postup L :



Podle tohoto postupu bylo ke 3,27 gramu (10,4 mmol) sloučeniny vzorce XII, která byla připravena postupem K, ve 20 mililitrech dichlormethanu přidáno 7,4 mililitru 2-ethylhexanoátu sodného v ethylacetátu (0,231 gramu/mililitr). V dalším postupu bylo přidáno 0,5 gramu

ϕ_3P a 0,5 gramu $(\phi_3P)_4Pd$ a takto získaná reakční směs byla potom promíchávána po dobu 60 minut. Tato reakční směs byla potom zkoncentrována, vložena do 150 mililitrů ethylacetátu a promyta pěti podíly 25 mililitrů vody. Vodné extrakty byly potom spojeny a tento spojený podíl byl potom znovu extrahován jedním podílem 25 mililitrů ethylacetátu a jedním podílem 25 mililitru diethyletheru. K vodné vrstvě bylo potom přidáno 75 mililitrů čerstvého ethylacetátu a tato směs byla potom okyselena na hodnotu pH 3. Ethylacetátová vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla extrahována jedním podílem 50 mililitrů čerstvého ethylacetátu. Takto získané dva ethylacetátové extrakty byly spojeny a tento spojený podíl byl potom promyt dvěma podíly 20 mililitrů vody, potom jedním podílem 20 mililitrů solanky, vysušen, zkoncentrován a promyt třemi podíly 30 mililitrů hexanu, přičemž se během druhého promytí vytvořily krystaly. Tato reakční směs byla potom zředěna 75 mililitry hexanu. Podíly pevných látek byly zfiltrány, dobře promyty hexanem a vysušeny na vzduchu, čímž bylo získáno 1,37 gramu bílé pevné látky. NMR analýzou byla potvrzena struktura sloučeniny uvedené v záhlaví, τ zn. sloučenina XIII.

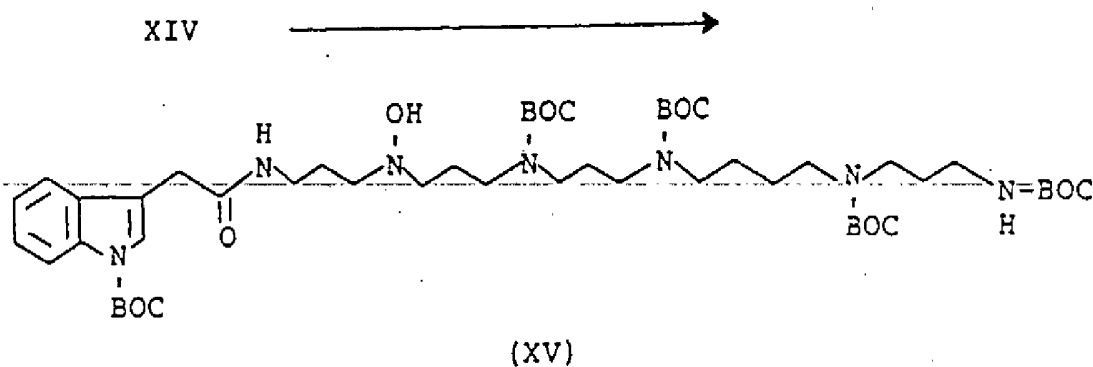
Postup M :



- 10 -

Podle tohoto postupu bylo pod atmosférou dusíku smícháno 200 miligramů (0,73 mmol) sloučeniny vzorce XIII s 25 mililitry dichlormethanu, 84 miligramy (0,73 mmol) N-hydroxysukcinimidu a 150 miligramy (0,73 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu, načež se vytvořila téměř okamžitě sraženina. Takto získaná reakční směs byla potom promíchávána po dobu 3 hodin. V dalším postupu byla odfiltrována dicyklohexylmočovina a k získanému filtrátu bylo potom přikapáváno 40 mililitrů roztoku sloučeniny vzorce X, připravené postupem podle příkladu 11, postupy A-I, v dichlormethanu. Tato reakční směs byla promíchávána po dobu 12 hodin a následně byla promyta 0,1 N roztokem hydroxidu sodného NaOH a usušena za pomoci uhličitanu draselného K_2CO_3 , potom zkoncentrována a zpracována chromatografickým postupem za účelem odstranění nečistot na 150 g silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi dichlormethanu a methanolu (0,5 litru) v poměru 9 : 1. a potom za použití směsi dichlormethanu, methanolu a isopropylaminu (2 litry) v poměru 9 : 1 : 0,1. Získaný produkt byl potom v následujícím postupu zkoncentrován, promyt dichlormethanem a opět zkoncentrován, čímž bylo získáno 400 miligramů sloučeniny vzorce XV, což bylo potvrzeno analýzou NMR 300 MHz.

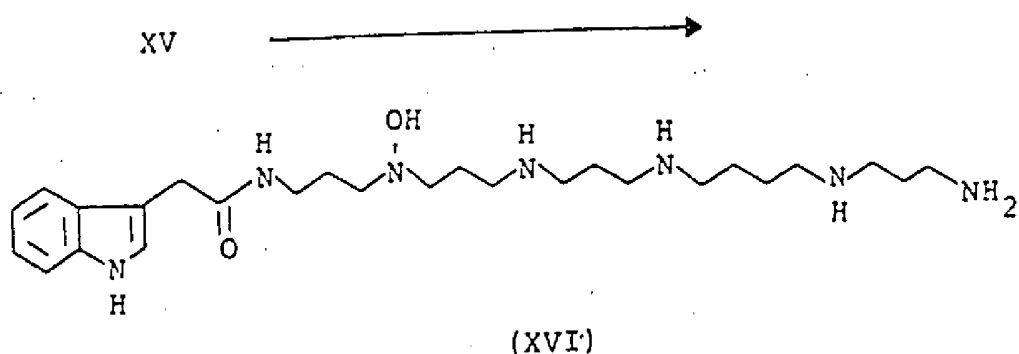
Postup N :



Podle tohoto provedení bylo pod atmosférou dusíku smícháno 0,34 gramu (0,35 mmol) sloučeniny vzorce XIV, která byla připravena postupem podle výše uvedeného schématu, se 30 mililitry acetonu, tato směs byla promíchána až do vzniku roztoku a ochlazena na teplotu asi 0 °C za použití lázně ledu a acetonu. V dalším postupu bylo po dobu 8 až 10 minut přikapáváno 0,212 gramu (1,05 mmol) 85 % kyseliny 3-chlorperoxybenzoové ve 20 mililitrech acetonu. Tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu asi 30 minut a následně zředěna na objem 150 mililitrů diethyletherem a potom promyta dvěma podíly 10% ~~ního~~ roztoku uhličitane draselného K_2CO_3 o objemu 25 mililitrů, dvěma podíly vody po 25 mililitrech a potom opět dvěma podíly 10% ~~ního~~ roztoku uhličitane draselného o objemu 25 mililitrů, načež byla vysušena uhličitane draselným. Takto získaná reakční směs byla potom zkoncentrována, promyta dvěma podíly dichlormethanu po 30 mililitrech a zkoncentrována za použití vakua na stálou hmotnost 0,33 gramu. NMR analýza prokázala, že produkt byl směsí požadovaného produktu vzorce XV, výchozího materiálu a vedlejšího produktu. Tato směs obsahující produkt byla potom přidána ke 3 mililitrům kyseliny octové, načež bylo přidáno 20 miligramů $NaCNBH_3$. Tato směs byla potom promíchávána po dobu přes noc, načež byla kyselina octová odstraněna stripováním ve vakuu a tato směs byla rozpuštěna v 50 mililitrech dichlormethanu a promyta jedním podílem vodného pufru po 75 mililitrech o hodnotě pH 7. V případě potřeby byla hodnota pH upravena na hodnotu 7 přidavkem 1 N roztoku hydroxidu sodného NaOH, přičemž dichlormethanová vrstva byla oddělena a promyta jedním podílem vodného pufru po 50 mililitrech o hodnotě pH 7 a jedním podílem 25 mililitrů solanky, přičemž tento produkt byl potom vysušen za pomoci síranu sodného Na_2SO_4 a zkoncentrován za použití vakua až do získání konstantní

hmotností 0,31 gramu. Takto získaný produkt byl potom zpracován chromatografickou metodou za použití 100 gramů silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi ethylacetátu a methanolu v poměru 95 : 5, a eluovány a jímány frakce o objemu 25 mililitrů. Vyčištěný produkt vzorce XV byl přítomen v jímáných frakcích 18-25. Tyto frakce byly spojeny, přičemž spojený podíl byl zkoncentrován, promyt dvěma podíly dichlormethanu po 25 mililitrech a zkoncentrován ve vakuu, čímž bylo získáno 68 miligramů bílého pěnového produktu, který byl uchováván při teplotě -80 °C. Frakce 26-40, které rovněž obsahovaly požadovaný produkt, obsahovaly také určité nečistoty. Frakce 26-40 byly spojeny, zkoncentrovány, promyty dichlormethanem a zkoncentrovány za použití vakua do konstantní hmotnosti 66 miligramů. Takto získaný produkt byl potom spojen s předchozím produktem (6 miligramů), který byl použit pro NMR analýzu, a se směsí, připravenou výše uvedeným postupem. Výsledná směs byla zpracována chromatografickou metodou na 75 gramech silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi ethylacetátu a methanolu v poměru 9 : 5 k eluování a zachycení frakcí o objemu 25 mililitrů. Vyčištěný produkt vzorce XV byl přítomen v frakcích 16-21. Tyto frakce byly spojeny, zkoncentrovány a promyty dvěma podíly dichlormethanu po 5 mililitrech a potom byl tento produkt znovu zkoncentrován ve vakuu do konstantní hmotnosti 46 miligramů. Takto získaný produkt byl potom uchováván při teplotě -80 °C.

Postup O :



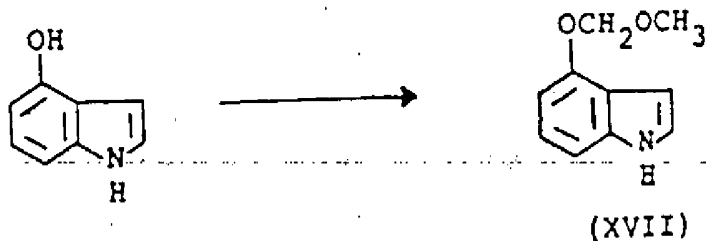
Podle tohoto postupu bylo pod atmosférou dusíku rozpuštěno 108 miligramů (0,109 mmol) sloučeniny vzorce XV, připravené výše uvedeným postupem, v 1,5 mililitru dichlormethanu. V dalším postupu byly přidány 2 mililitry kyseliny trifluoroctové a tato reakční směs byla promíchávána po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Takto získaná reakční směs byla potom zkoncentrována do formy filmu a dále bylo přidáno 15 mililitrů diethyletheru. Tento film byl potom převeden na pevnou látku a po 30 minutách míchání vznikl bílý prášek. Tento prášek byl potom zfiltrován, dobře promyt diethyletherem, vysušen pod atmosférou dusíku a následně odplyněn ve vakuu do konstantní hmotnosti 109 miligramů, čímž byla získána sloučenina uvedená v záhlaví tohoto příkladu.

P ř í k l a d 12

N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-4-hydroxy-1H-indol-3-acetamidu.

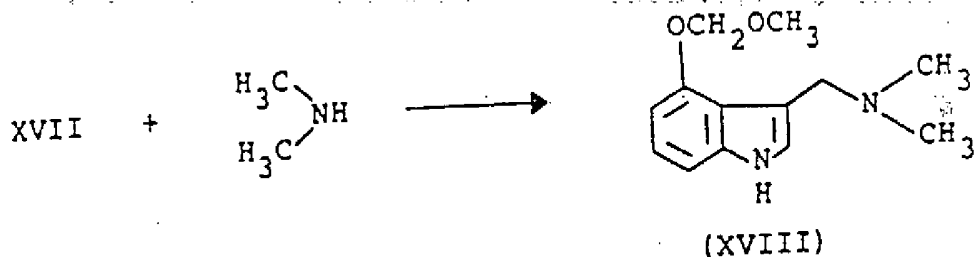
Postup přípravy této sloučeniny uvedené v záhlaví, jejíž přítomnost byla předpokládána ve frakci B₁, viz postup podle příkladu 3, byl proveden podle následujícího reakčního schématu :

Postup A :



Podle tohoto postupu byly pod dusíkovou atmosférou ve skleněné aparatuře, vysušené plamenem, smíchány 4,0 gramy (30 mmol) 4-hydroxyindolu s 25 mililitry Aldrichova bezvodého DMF a tato směs byla míchána za vzniku roztoku. Potom bylo přidáno 1,44 gramu (30 mmol) hydridu sodného NaH ve formě 50% ~~roztoku~~ disperze v oleji. Po ukončení pění bylo přidáno 2,5 mililitru chlormethylmethyletheru (Aldrich) a výsledný tmavo-zelený roztok byl promícháván po dobu přes noc. Potom byl tento roztok zředěn na objem 125 mililitrů ethylacetátem, promyt pěti podíly vody po 25 mililitrech a jedním podílem solanky o objemu 25 mililitrů, načež byl usušen síranem sodným Na₂SO₄ a zpracován chromatografickým postupem za použití směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 4 : 1 jako elučního činidla. Frakce obsahující produkt byly spojeny a zkoncentrovány, čímž bylo získáno 2,70 gramu sloučeniny XVII ve formě oleje.

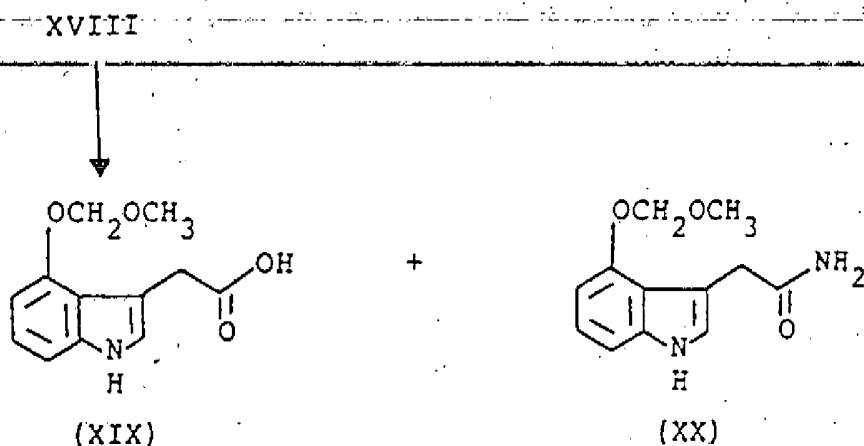
Postup B :



Podle tohoto provedení bylo v 50 mililitrové, tříhrdlové nádobě s kulatým dnem, která byla vybavena mechanickým míchadlem, chlazeno 1,3 gramu vodného roztoku formaldehydu (37 %) a 2,28 gramu kyseliny octové. Potom bylo přidáno 3,23 mililitru chladného dimethylaminu (25% ~~roztoku~~ roztok ve vodě). K tomuto výslednému ochlazenému roztoku bylo přidáno 2,7 gramu (15,2 mmol) sloučeniny vzorce XVII.

přičemž bylo použito 1,5 až 2,0 mililitrů tetrahydrofuranu jako rozpouštědla pro převedení požadované látky. Tato reakční směs byla potom zahřívána při teplotě místnosti a promíchávána po dobu přes noc. Potom bylo přidáno 40 mililitrů 10% roztoku hydroxidu sodného NaOH, čímž bylo dosaženo vzniku sraženiny. Po promíchání byla tato sraženina odfiltrována, promyta vodou a usušena na vzduchu, přičemž tímto postupem bylo získáno 3,26 gramu sloučeniny vzorce XVIII.

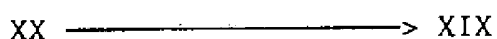
Postup C :



Podle tohoto provedení bylo pod atmosférou dusíku smícháno 4,62 gramu KCN s 10 mililitry vody a tato směs byla promíchávána za vzniku roztoku. Potom bylo přidáno 30 mililitrů ethanolu a 3,26 gramu (14 mmol) sloučeniny vzorce XVIII a tato reakční směs byla promíchávána a zahřívána při teplotě varu pod zpětným chladičem po dobu asi 65 hodin. Získaná reakční směs byla potom ochlázena a zkoncentrována. Výsledná sraženina obsahující sloučeninu XX byla zfiltrována, promyta vodou a usušena na vzduchu. Vodná vrstva byla extrahována 4 podíly dichlormethanu po 15 mililitrech, přičemž byly uchovány organické extrakty. Vodná

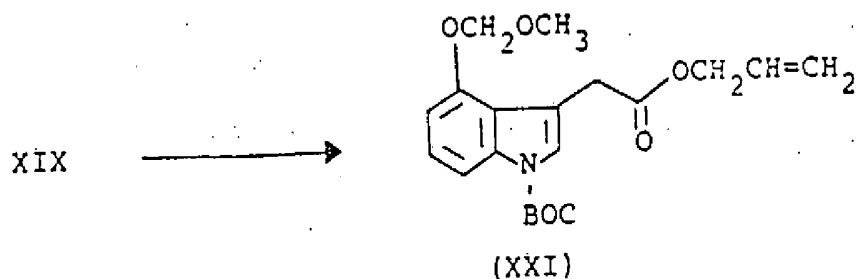
vrstva byla potom překryta 50 mililitry ethylacetátu a okyselena na pH 2. Ethylacetátová vrstva byla potom oddělena, odplyněna probubláváním dusíkem touto ethylacetátovou vrstvou, potom sušena a zkoncentrována, čímž byla získána pevná látka, která byla triturována diisopropyletherem, a tímto způsobem bylo získáno 1,03 gramu sloučeniny XIX ve formě šedavě bílé pevné látky. Potom byly všechny extrakty ze základní vodné vrstvy spojeny a tento spojený podíl byl usušen, spojen s výše uvedeným filtrátem a zkoncentrován, čímž bylo získáno 0,4 gramu sloučeniny XX ve formě pevné látky.

Postup D :



Podle tohoto provedení bylo pod atmosférou dusíku 1,6 gramu sloučeniny vzorce XX spojeno se 7,5 mililitru ethanolu, 30 mililitry vody a 1,3 gramu hydroxidu draselného. Tato směs byla potom zahřívána při teplotě varu pod zpětným chladičem a potom promíchávána po dobu přes noc. V další fázi byla potom tato reakční směs ochlazená, extrahována dvěma podíly ethylacetátu po 15 mililitrech, převrstvena čerstvým ethylacetátem a okyselena na hodnotu pH 2. Spojené ethylacetátové vrstvy byly usušeny a zkoncentrovány. Tímto způsobem byla získána pevná látka, která byla potom triturována IPE, čímž bylo získáno 1,1 gramu sloučeniny XIX.

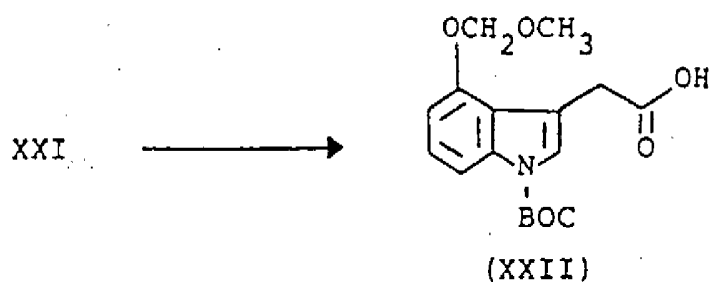
Postup E :



- 80 -

Podle tohoto provedení bylo v 10 mililitrech vody rozpuštěno 1,44 gramu (4,25 mmol) TBAHSO₄. Potom bylo přidáno 714 miligramů (8,5 mmol) hydrogenuhličitanu sodného NaHCO₃. Poté co ustalo pění byl přidán k této reakční směsi 1,0 gram (4,25 mmol) sloučeniny XIX a tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu jedné minuty, načež bylo přidáno 40 mililitrů chloroformu. Tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu 5 minut, chloroformová vrstva byla oddělena a potom byla tato vodná směs extrahována jedním podílem chloroformu po 15 mililitrech. Chloroformové extrakty byly spojeny a tento spojený podíl byl usušen, zkoncentrován a zpracován dvěma podíly acetonu po 30 mililitrech. Potom byl takto získaný produkt opět rozpuštěn ve 30 mililitrech acetonu, což bylo provedeno pod atmosférou dusíku, a potom bylo přidáno 0,37 mililitrů (4,25 mmol) allylbromidu a tato reakční směs byla zkoncentrována a zpracována chromatografickým způsobem za použití ethylacetátu jako elučního činidla. Získaný produkt byl potom spojen s 25 mililitry dichlormethanu a potom bylo přidáno 0,98 gramu (4,5 mmol) di-*t*-butyldiuhličitanu a 51 miligramů (0,425 mmolu) 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridinu. Tato reakční směs byla potom zkoncentrována a zpracována chromatografickou metodou za použití směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 9 : 1 jako elučního činidla, přičemž po zkoncentrování bylo získáno 1,33 gramu požadované sloučeniny vzorce XXI ve formě viskózního oleje.

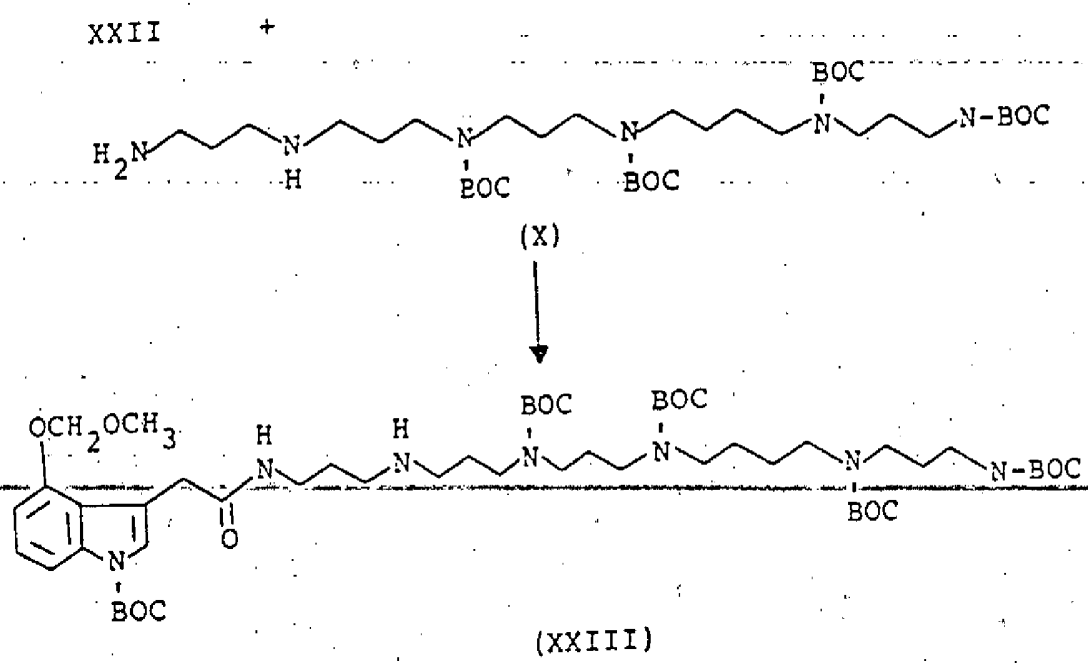
Postup F :



Podle tohoto postupu bylo ve 2 mililitrech methanolu rozpuštěno 64 miligramů (0,17 mmol) sloučeniny vzorce XXI. K takto získanému roztoku bylo potom přidáno 1,7 mililitru 0,1 N roztoku hydroxidu sodného NaOH a výsledná reakční směs byla promíchávána po dobu přes noc. Tato reakční směs byla potom okyselena, usušena, extrahována ethylacetátem a zkoncentrována. Analýzou metodou NMR bylo zjištěno, že veškerý allylester sloučeniny vzorce XXI vymizel, přičemž ovšem došlo do určité míry k transesterifikaci a určitý podíl methylesteru byl stále přítomen. Z tohoto důvodu byl tento produkt spojen se zbývajícím podílem sloučeniny vzorce XXI (přibližně 1,26 gramu), tento podíl byl rozpuštěn v 5 mililitrech tetrahydrofuranu a ochlazen na teplotu 0 °C. Potom bylo přidáno 3,8 mililitru 1 N roztoku hydroxidu sodného a tato reakční směs byla promíchávána po dobu 5 minut při teplotě 0 °C, načež byla ohřáta na teplotu místnosti. Po provedené reakci vznikly dvě fáze, přičemž k jejich eliminování bylo nutno přidat 5 mililitrů methanolu. Tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu přes noc. Potom byly tetrahydrofuran a methanol odstraněny stripováním a zbývajícím vodným roztok byl převrstven 50 mililitry ethylacetátu a okyselen na pH 2. Ethylacetátová vrstva byla potom oddělena, promyta jedním podílem 20 mililitrů vody, jednou solankou, a potom byl tento produkt usušen síranem sodným, zfiltrován a zkoncentrován na gumovitý produkt, který vykristaloval po trituraci s hexanem, přičemž podle tohoto postupu bylo získáno 1,08 gramu bílé pevné látky. Tato pevná látka byla potom zpracována chromatograficky, kdy jako elučního činidla bylo použito směsi ethylacetátu a hexanu v poměru 70 : 30, načež frakce obsahující čistý produkt byly spojeny a tento spojený podíl byl zkoncentrován a vykristalován ze směsi ethylacetátu a hexanu, a tímto shora uvedeným postupem bylo

získáno 0,884 gramu sloučeniny vzorce XXII.

Postup G :

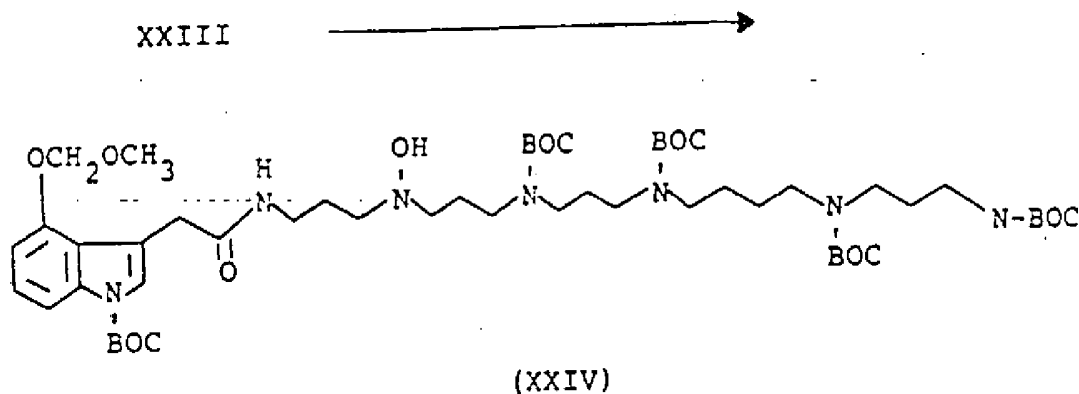


Podle tohoto provedení bylo pod atmosférou dusíku rozpuštěno 271 miligramu (0,81 mmol) sloučeniny vzorce XXII za současného promíchávání ve 4 mililitrech bezvodého tetrahydrofuranu. Potom bylo přidáno 93 miligramů (0,81 mmol) N-hydroxysukcinimidu a 167 miligramů (0,81 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu a tato reakční směs byla potom promíchávána. Po asi jedné hodině a padesáti minutách bylo přidáno 0,58 gramu (0,8 mmol) sloučeniny vzorce X, která byla připravena postupem popsáním v příkladu 11, ve 30 mililitrech dichlormethanu a tato reakční směs byla potom promíchávána přes víkend. V dalším postupu byla odfiltrována dicyklohexylmočovina a vzniklá směs byla extrahována dvěma podíly 1 N roztoku hydroxidu sodného NaOH po 3 mililitrech, potom byla sušena uhličitanem draselným K_2CO_3 a zkoncentrována. Získaný produkt byl potom zpracován chromatografickým postupem na 100 gramech silikagelu,

příčemž jako elučního činidla bylo použito směsi dichlormethanu a methanolu v poměru 9 : 1 k vymytí všech složek kromě požadovaného produktu. načež byla provedena eluce směsí obsahující dichlormethan, methanol a isopropylamin v poměru 90 : 10 : 1 za účelem eluování produktu. Frakce obsahující produkt byly potom zkoncentrovány, zpracovány několikrát dichlormethanem, přičemž rozpouštědlo bylo odstraněno stripováním, a tímto shora uvedeným postupem bylo získáno 349 miligramů sloučeniny vzorce XXIII ve formě bílé pěny.

V alternativním provedení, představujícím výhodné provedení, bylo 50 mililitrů roztoku obsahujícího 0,480 gramu (což je 1,43 mmol) sloučeniny vzorce XXII v dichlormethanu zpracováno 0,165 gramu (1,43 mmol) N-hydroxysukcinimidu, načež následovalo přidání 0,294 gramu (1,43 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu a tato reakční směs byla potom ponechána míchat po dobu 5 hodin. Tato reakční směs byla zfiltrována a filtrát obsahující surový hydroxysukcinimid byl potom přidáván pomalu po kapkách během intervalu 20 minut do 100 mililitrů roztoku obsahujícího 1,03 gramu (1,43 mmol) sloučeniny vzorce X, která byla připravena postupem podle příkladu 11, v dichlormethanu. Tato reakční směs byla promíchávána po dobu 72 hodin. Potom byla tato surová reakční směs promyta dvakrát 20 mililitry 1 N roztoku hydroxidu sodného NaOH, načež byla usušena uhličitanem draselným K₂CO₃, zfiltrována a zkoncentrována. Získaný produkt byl zpracován chromatografickou metodou na silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi dichlormethanu a methanolu v poměru 4 : 1 a potom směsi dichlormethanu, methanolu a diisopropylaminu v poměru 9 : 1 : 1, čímž bylo získáno 912 miligramů sloučeniny vzorce XXIII.

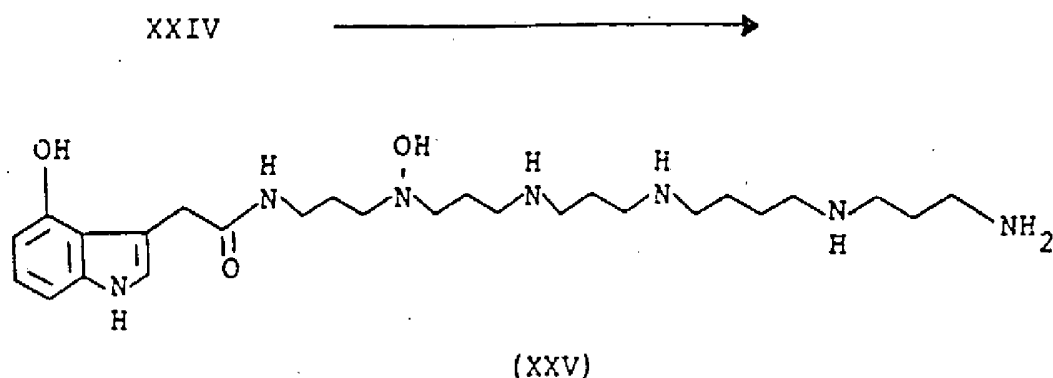
Postup H :



Při provádění tohoto postupu byl pod atmosférou dusíku rozpuštěn indolacetamid vzorce XXIII (900 miligramů, 0,87 mmol) ve 40 mililitrech dichlormethanu. K tomuto roztoku byl potom přidán 2-(fenylsulfonyl)-3-fenyloxaziridin (500 miligramů, což je 1,92 mmol). Reakční průběh byl monitorován chromatografickou metodou v tenké vrstvě. Po 1 hodině byla tato reakční směs zkoncentrována ve vakuu, přičemž tímto způsobem byl získán hlavně převažující nitron, který byl potom rozpuštěn ve 35 mililitrech kyseliny octové. K této reakční směsi byl přidán velký přebytek kyanoborohydridu sodného (1,00 gram, což je 15,9 mmol) a tato reakční směs byla promíchávána po dobu asi 2 hodin. Získaná reakční směs byla potom zkoncentrována ve vakuu, potom byla vložena do dichlormethanu (50 mililitrů), promyta puřrem o pH 7 (jeden podíl po 50 mililitrech) a hodnota pH byla potom upravena na 7 za pomoci 1 N roztoku hydroxidu sodného NaOH. Organická vrstva byla potom promyta znovu puřrem o pH 7 (jeden podíl po 50 mililitrech), usuřena uhliřitanem draselným a zkoncentrována ve vakuu, čímž byl získán surový produkt, který byl zpracován chromatografickou metodou na silikagelu, při které bylo jako elučního řinidla použito směsi

ethylacetátu a methanolu v poměru 95 : 5, a tímto shora uvedeným postupem bylo připraveno 612 gramů (výtěžek 67 %) sloučeniny XXIV ve formě bílé pěny.

Postup I :



Při provádění alternativního postupu byly při udržování vakua a trojím promytí argonem odplyněny 3 mililitry kyseliny trifluorooctové. Potom byla použitá nádobka obalena hliníkovou fólií a přidáno bylo 98 miligramů sloučeniny vzorce XXIV za použití asi 2,5 mililitru dichlormethanu jako převáděcího činidla. Po 45 minutách byla tato reakční směs zkoncentrována, čímž byl získán olejový produkt, ze kterého bylo po triturování diethyletherem získáno 88 miligramů sloučeniny vzorce XXV ve formě bílé pevné látky, která byla uchovávána při teplotě -80 °C.

V alternativním provedení, které představovalo výhodné provedení, bylo k roztoku obsahujícímu 100 mililitrů dioxanu nasyceného chlorovodíkem, který byl vyčištěn argonem, přidáno během intervalu 1,5 minuty 0,520 gramu (což představuje 0,495 mmolu) sloučeniny vzorce XXIV, která byla připravena metodou podle postupu H, viz výše, v 10 mililitrech dioxanu. Po tomto přidavku se okamžitě vytvořila sraženina a tato reakční směs byla potom promíchávána po

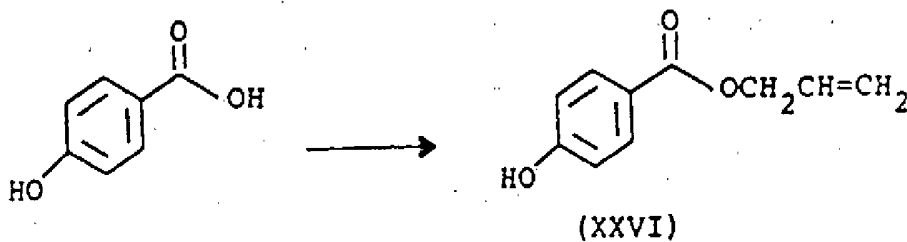
dobu 1 hodiny. V dalším postupu byl přidán diethylether a po 5 minutách byl tento roztok zfiltrován. Tímto způsobem byla získána pevná látka, která byla promyta diethyletherem, usušena pod atmosférou dusíku a potom za sníženého tlaku, čímž bylo získáno 345 miligramu kyseliny vzorce XXIV', která byla uchovávána při teplotě -78 °C. V dalším postupu bylo k vodnému roztoku, který byl čištěn argonem, přidáno 150 miligramů (což je 0,205 mmolu) této kyseliny vzorce XXIV'. Reakční průběh byl monitorován metodou kapalinové chromatografie za vysokého tlaku HPLC. Po dokončení reakce po asi 7 hodinách byla tato reakční směs sušena vymražením, přičemž tímto způsobem bylo získáno 103 miligramu sloučeniny vzorce XXV ve formě hydrochloridové soli.

P ř í k l a d 13.

N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-4-hydroxy-benzamid.

Postup přípravy této sloučeniny uvedené v záhlaví, o které bylo předpokládáno, že je přítomna ve frakci A' jak je uvedeno v příkladu 2, byl proveden následujícím způsobem.

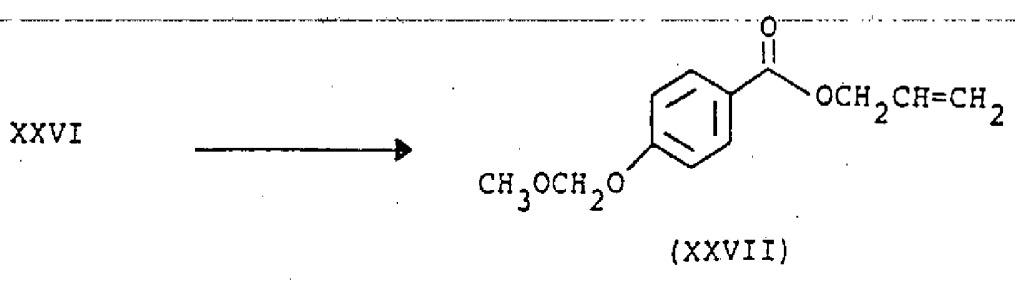
Postup A :



Podle tohoto provedení bylo ve 400 mililitrové baňce spojeno 6,78 gramu (20 mmolů) hydrogensíranu

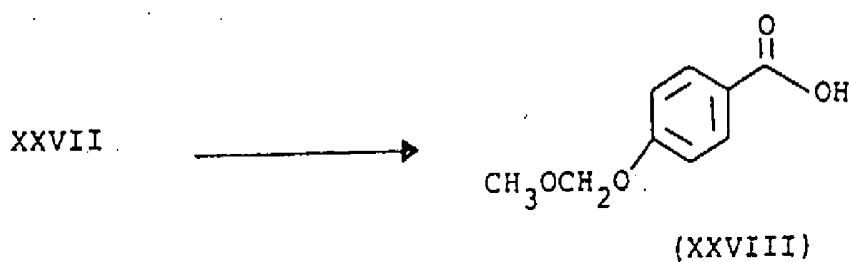
tetrabutylamonného se 60 mililitry vody a tato směs byla promíchávána za vzniku roztoku. Potom bylo přidáno 3,36 gramu (40 mmol) hydrogenuhličitanu sodného NaHCO_3 a jakmile to umožnilo pění bylo dále přidáno 40 mililitrů roztoku obsahujícího 2,76 gramu (20 mmolů) p-hydroxybenzoové kyseliny, 0,8 gramu hydroxidu sodného NaOH a 40 mililitrů vody. Takto získaná reakční směs byla potom promíchávána po dobu 5 minut a potom bylo přidáno 200 mililitrů dichlormethanu. Výsledná směs byla promíchávána po dobu dalších 5 minut, přičemž vzniklé vrstvy byly ponechány oddělit. Vodná vrstva byla extrahována dvakrát 50 mililitry dichlormethanu. Spojený podíl dichlormethanových extraktů byl potom usušen síranem sodným Na_2SO_4 , zkoncentrován a zpracován dvakrát 75 mililitry acetonu a tento podíl byl potom opět rozpuštěn v 50 mililitrech acetonu. Potom bylo přidáno 1,9 mililitru (22 mmolů) allylbromidu a tato směs byla promíchána. Získaná reakční směs byla zkoncentrována, vložena do 100 mililitrů ethylacetátu, promyta dvakrát 30 mililitry vody, jednou 50 mililitry nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu, jednou 30 mililitry vody, jednou solankou, jednou vodou a jednou solankou. Výsledný produkt byl usušen a zkoncentrován za vzniku oleje. Tento olej byl potom triturován 50 mililitry petroletheru po dobu jedné hodiny. Potom byla tato reakční směs zfiltrována, dobře promyta petroletherem a usušena na vzduchu, čímž bylo získáno 1,7 gramu sloučeniny vzorce XXVI, viz výše.

Postup B :



Podle tohoto postupu bylo pod atmosférou dusíku 1,7 gramu (9,55 mmolu) sloučeniny vzorce XXVI, která byla připravena podle postupu A, viz výše, spojeno s 50 mililitry Aldrichova vysušeného DMF a tato směs byla promíchávána až do vzniku roztoku. Potom bylo přidáno 0,38 gramu (9,55 mmolu) hydridu sodného NaH ve formě 60% disperze v oleji a tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu přes noc. V dalším postupu bylo přidáno 0,76 mililitru chlormethylmethyletheru (Aldrich), přičemž po tomto přidavku se okamžitě vytvořila sraženina. Získaná reakční směs byla promíchávána po dobu 18 hodin. Potom byla tato reakční směs zpracována 200 mililitry ethylacetátu ve 100 mililitrech vody. Ethylacetátová vrstva byla oddělena, promyta třikrát 50 mililitry vody, jednou 50 mililitry 1 N roztoku hydroxidu sodného, jednou 50 mililitry vody a jednou solankou. Výsledný roztok byl usušen, zkoncentrován a zpracován chromatografickou metodou na silikagelu, přičemž jako elučního činidla bylo použito směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 4 : 1, přičemž tímto shora uvedeným postupem bylo získáno 1,63 gramu sloučeniny vzorce XXVII, viz výše.

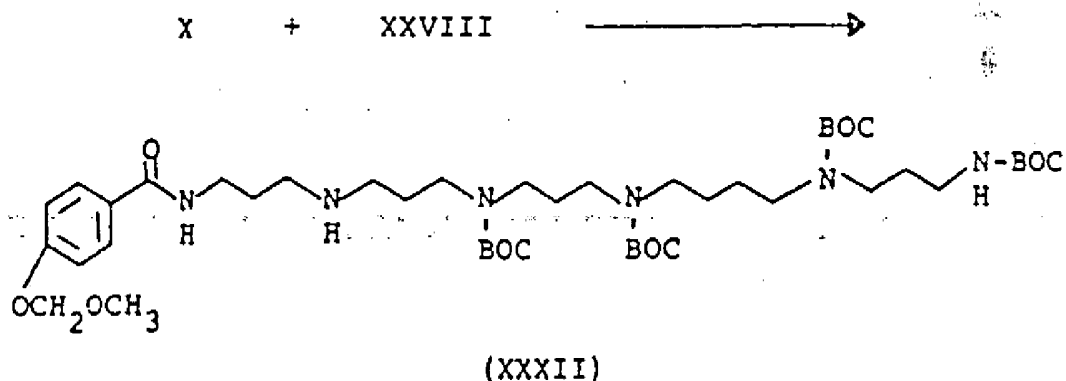
Postup C :



Při provádění tohoto postupu bylo v 75 mililitrech tetrahydrofuranu rozpuštěno 1,62 gramu (což je 7,3 mmolu) sloučeniny vzorce XXVII, která byla připravena metodou podle

postupu B, viz výše. Potom byl k této směsi přidán roztok obsahující 0,4 gramu (10 mmolů) hydroxidu sodného NaOH v 15 mililitrech vody, což se projevilo ve vytvoření dvou vrstev. Potom byl přidáván methanol tak dlouho, dokud nebyla získána homogenní směs. Tato reakční směs byla potom promíchávána po dobu přes noc. Tetrahydrofuran a methanol byly potom odstraněny stripováním ve vakuu a zbývající vodný roztok byl extrahován dvakrát 15 mililitry ethylacetátu. Potom byla vodná vrstva převrstvena 50 mililitry čerstvého ethylacetátu a okyselena na pH 2,5 pomocí 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Ethylacetátová vrstva byla potom oddělena, promyta jednou 10 mililitry vody a jednou 25 mililitry solanky. Získaný roztok byl zkoncentrován, čímž byl získán podíl pevných látek, který byl triturován hexanem, zfiltrován a usušen na vzduchu, přičemž tímto postupem bylo připraveno 1,2 gramu sloučeniny vzorce XXVIII, viz výše.

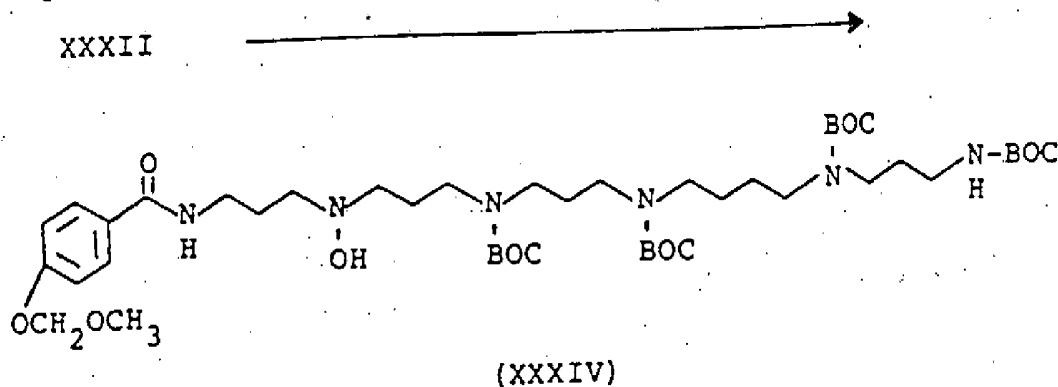
Postup D :



Podle tohoto postupu bylo 20 mililitrů dichlormethanového roztoku, který obsahoval 0,127 gramu (0,7 mmolu) sloučeniny vzorce XXVIII, připravené postupem C, viz výše, zpracováváno 0,081 gramu (0,7 mmolu) N-hydroxysukcinimidu, načež následoval přídavek 0,144 gramu

(0,7 mmolu) dicyklohexylkarbodiimidu a tato reakční směs byla promíchávána po dobu 4 hodin. Potom byla tato reakční směs zfiltrována a filtrát obsahující surový hydroxysukcinimid byl přidáván pomalu po kapkách během intervalu 20 minut do 80 mililitrů dichlormethanového roztoku obsahujícího 0,50 gramu (0,7 mmolu) sloučeniny vzorce X, připravené postupem podle shora uvedeného příkladu 11, postupy A-I. Tato reakční směs byla potom promíchána. Získaná reakční směs byla promyta 1 N roztokem hydroxidu sodného NaOH (dva podíly po 20 mililitrech), usušena za pomoci uhličitanu draselného, zfiltrována a zkoncentrována. Vzniklý koncentrát byl zpracován chromatografickou metodou na silikagelu za použití směsi dichlormethanu a methanolu v poměru 9 : 1 jako elučního činidla, přičemž následovalo eluování směsi dichlormethanu, methanolu a diisopropylaminu v poměru 9 : 1 : 0,25 a tímto postupem bylo připraveno 370 miligramu sloučeniny XXXII, viz výše.

Postup E :



Při tomto postupu bylo pod atmosférou dusíku 0,335 gramu (0,38 mmolu) sloučeniny vzorce XXXII, která byla připravena shora ilustrovaným postupem D, rozpuštěno ve 30 mililitrech dichlormethanu. K tomuto roztoku bylo potom přidáno 0,230 gramu (0,88 mmolu) 2-(sulfonylfenyl)-3-fenyl-

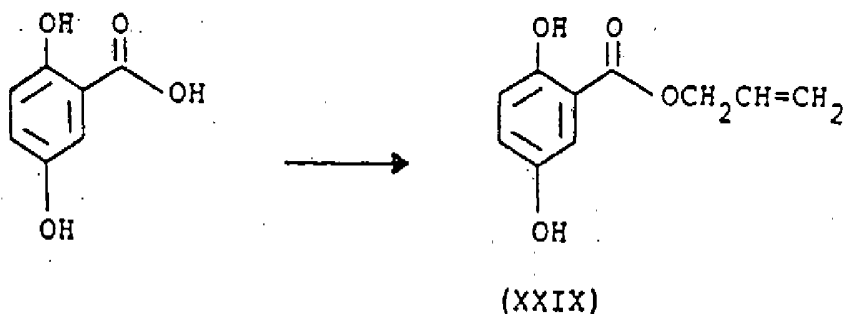
reakční směsi byly přidány další 2 mililitry kyseliny trifluoroctové k omytí stěn této nádoby. Potom byla ponechána probíhat reakce po dobu 1,5 hodiny. V dalším postupu byla tato reakční směs zkoncentrována ve vakuu, triturována ethyletherem, zfiltrována a usušena pod atmosférou dusíku, přičemž tímto postupem bylo připraveno 218 miligramů sloučeniny vzorce XXXIV, což je sloučenina uvedená v záhlaví tohoto příkladu.

P ř í k l a d 14

N-(20-amino-4-hydroxy-4,8,12,17-tetraazeikos-1-yl)-2,5-dihydroxy-benzamid.

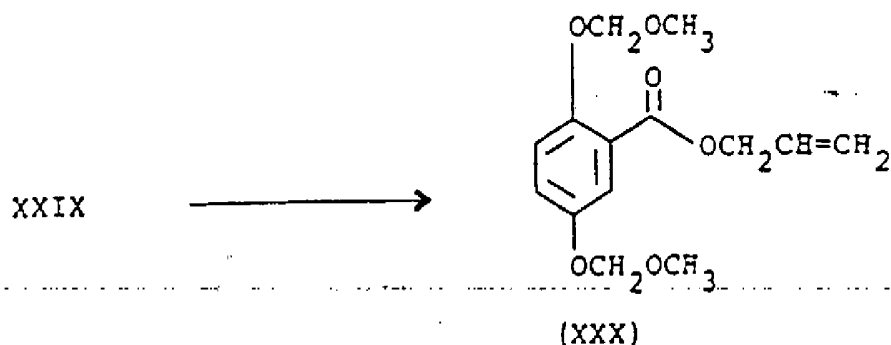
Postup přípravy této sloučeniny uvedené v záhlaví, o které bylo předpokládáno, že je obsažena ve frakci A₁ získané postupem podle příkladu 3, byl proveden následujícím způsobem.

Postup A :



V tomto příkladu bylo použito stejného postupu jako v příkladu 12, postup A, přičemž se ovšem vycházelo ze 3,08 gramu (20 mmolů) 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny a získány byly 3,0 gramy sloučeniny vzorce XXIX, viz výše.

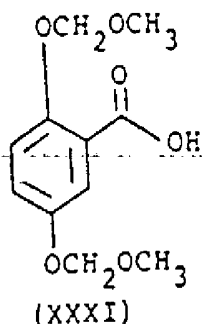
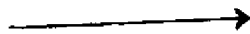
Postup B :



Podle tohoto postupu byly pod atmosférou dusíku spojeny 3,0 gramy (15,5 mmolu) sloučeniny vzorce XXIX s 50 mililitry Aldrichova suchého DMF a tato směs byla potom promíchávána tak dlouho, dokud nevznikl roztok. V dalším postupu bylo přidáno 1,24 gramu (31 mmolů) hydridu sodného NaH ve formě 60% ~~disp~~ disperze v oleji a tato směs byla promíchána. Po 3 hodinách bylo přidáno 2,5 mililitru (33 mmolů) chlormethylmethyletheru a tato reakční směs byla promíchávána po dobu 18 hodin. Získaná reakční směs byla potom přidána do 300 mililitrů ethylacetátu a 100 mililitrů vody. Vzniklá ethylacetátová vrstva byla potom oddělena a promyta třikrát 75 mililitry vody, dvakrát 75 mililitry 1 N roztokem hydroxidu sodného, dvakrát 50 mililitry vody a jednou solankou. Výsledný roztok byl potom usušen a zkoncentrován, čímž bylo získáno 2,9 gramu oleje, který byl zpracován chromatografickým postupem na silikagelu za použití směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 4 : 1 jako elučního činidla, čímž byly získány dvě frakce, přičemž druhá frakce obsahovala 1,16 gramu sloučeniny obecného vzorce XXX, viz výše.

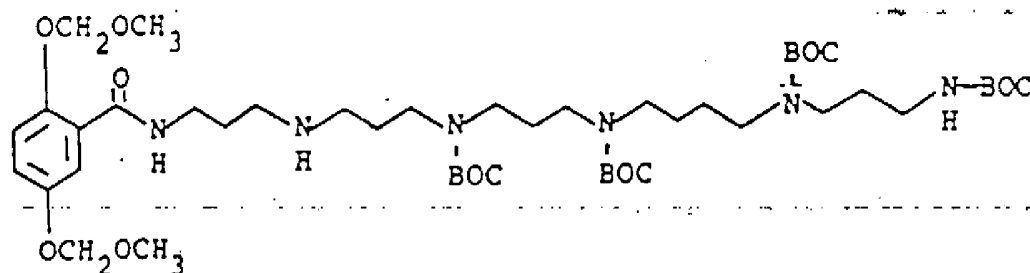
Postup C :

XXX



Podle tohoto postupu bylo do 10 mililitrů tetrahydrofuranu přidáno 1,16 gramu (což je 4,1 mmolu) sloučeniny vzorce XX, viz výše. Potom bylo přidáno 0,24 gramu (což je 6 mmolů) hydroxidu sodného NaOH v 10 mililitrech vody, přičemž po tomto přidavku vznikly dvě fáze. V dalším postupu byl do této reakční směsi přidáván methanol tak dlouho, dokud se nevytvořila jedna fáze, načež byla tato směs promíchávána po dobu 18 hodin. Použitá rozpouštědla byla potom odstraněna a zbývající vodný roztok byl extrahován dvakrát za pomoci 15 mililitrů ethylacetátu. Vodná vrstva byla potom převrstvena 35 mililitry čerstvého ethylacetátu a hodnota pH byla upravena na 2,5 přidavkem 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Ethylacetátová vrstva byla potom oddělena, promyta jednou 10 mililitry vody a jednou solankou, usušena a zkoncentrována, přičemž tímto shora uvedeným postupem byl připraven 1,0 gram sloučeniny vzorce XXXI, ve formě oleje.

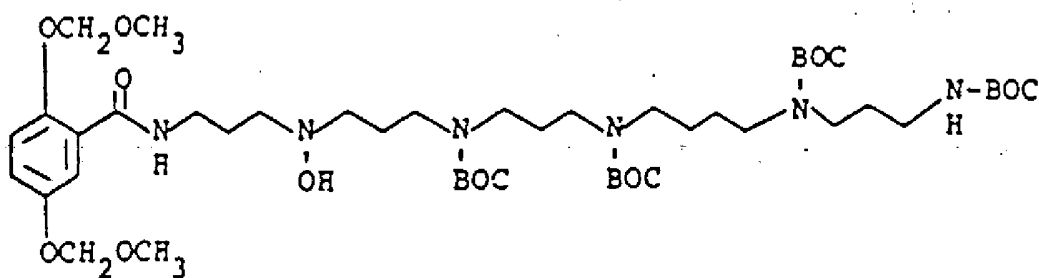
Postup D :



(XXXIII)

V tomto provedení bylo využito stejného postupu jako v příkladu 13, postup D, přičemž bylo použito 0,17 gramu (0,7 mmolu) sloučeniny vzorce XXXI, která byla připravena postupem C uvedeným výše, 0,081 gramu (což je 0,7 mmolu) N-hydroxysukcinimidu, 0,144 gramu (0,7 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu a 0,50 gramu (0,7 mmol) sloučeniny vzorce X, která byla připravena postupem popsáním v příkladu 11, postupy A-I, přičemž tímto způsobem bylo po chromatografickém zpracování získáno 370 miligramů sloučeniny vzorce XXXIII, viz výše.

Postup E :

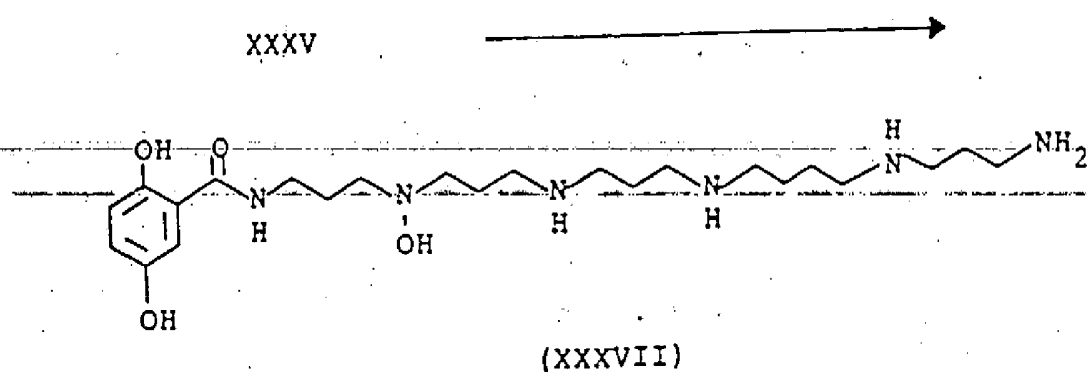


(XXXV)

V tomto provedení bylo využito stejného postupu jako v příkladu 13, postup E, přičemž bylo použito 0,308 gramu

(0,33 mmol) sloučeniny vzorce XXXIII, která byla připravena postupem popsaným v postupu D, viz výše, a 0,250 gramu (0,96 mmol) 2-(sulfonylfenyl)-3-fenyl-oxaziridinu a po chromatografickém zpracování na silikagelu, při kterém bylo použito jako elučního činidla nejdříve ethylacetátu a potom směsi acetonu a hexanu v poměru 50 : 50, bylo získáno 210 miligramů sloučeniny vzorce XXXV, viz výše.

Postup F :



Podle tohoto provedení bylo použito stejného postupu, který je popsán v příkladu 13, postup F, přičemž při tomto provedení bylo použito 0,100 gramu (0,104 mmol) sloučeniny vzorce XXXV, která byla připravena postupem E, viz výše, a tímto postupem bylo připraveno 108 miligramů sloučeniny vzorce XXXVII, což je požadovaná výsledná sloučenina uvedená v záhlaví tohoto příkladu.

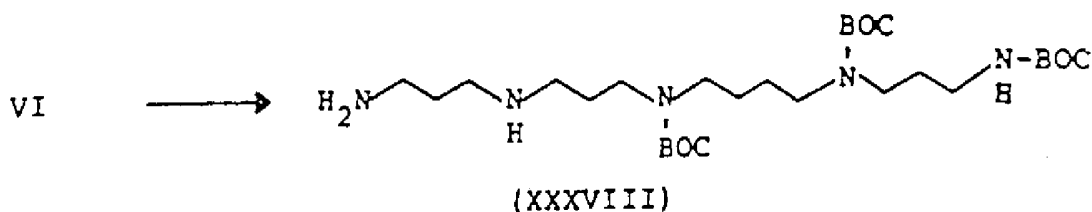
P ř í k l a d 15

N-(16-amino-4-hydroxy-4,8,13-triazahexadec-1-yl)-4-hydroxy-1H-indol-3-acetamid.

Postup přípravy této sloučeniny uvedené v záhlaví, o které bylo předpokládáno, že je obsažena ve frakci A₂ získané postupem podle příkladu 3, byl proveden následujícím

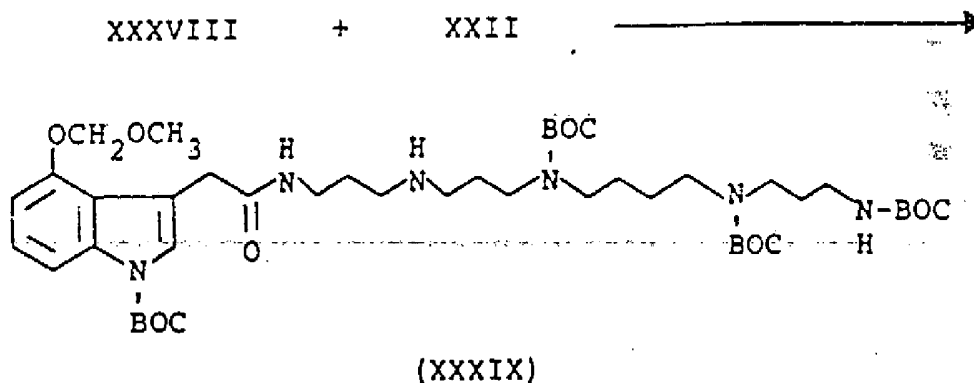
způsobem.

Postup A :

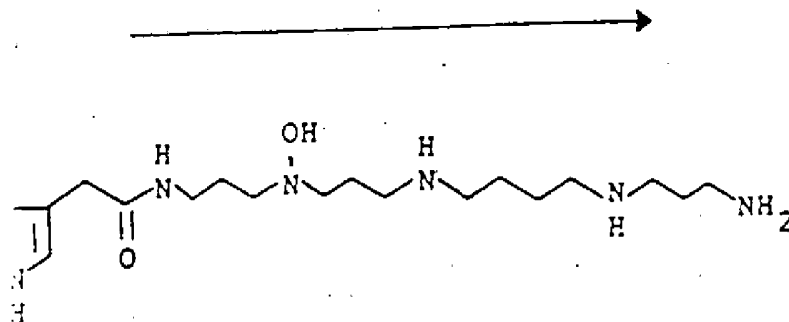


Při tomto postupu bylo použito stejného postupu jako v příkladu 11, postup D, přičemž se ovšem vycházelo ze 1,15 gramu (což je 2,07 mmolu) sloučeniny vzorce VI, která byla připravena postupem podle příkladu 11, viz postupy A-E, přičemž tímto způsobem bylo získáno 1,10 gramu surové sloučeniny vzorce XXXVIII, viz výše.

Postup B :

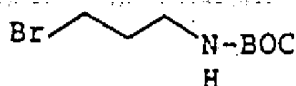


Podle tohoto provedení bylo použito alternativního provedení postupu podle příkladu 12, viz postup G, přičemž ale byl použit dichlormethanový roztok (15 mililitrů) obsahující 0,228 gramu (6,8 mmol) sloučeniny vzorce XXII, která byla připravena postupem podle příkladu 12, viz postupy A až F, dále 0,380 gramu (6,8 mmol) sloučeniny



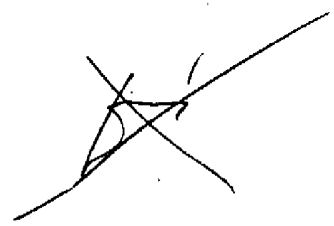
tohoto provedení bylo použito alternativního je postup uvedený v příkladu 12, postup I. vycházelo z 0,166 gramu (0,186 mmol) sloučeniny která byla připravena postupem C, viz výše, a po měsí dioxan/HCl byla získána surová kyselina, a vzorce XL' byla potom rozpuštěna ve vodě, rozpouštění trvalo 8 hodiny, načež byla sušena, čímž bylo získáno 88 miligramů sloučeniny

v a A



tohoto provedení bylo pod atmosférou dusíku, 5 gramu (157,6 mmol) hydrobromidové soli enamínu, t. zn. 3-brompropylenamin.HBr, v 600 N,N-dimethylformamidu. Do tohoto roztoku bylo o 34,4 gramu (157,6 mmol) uhličitanu, načež následoval přídavek 32,3 36 mmolů) triethylaminu. Tímto způsobem se

vytvořila sraženina. Tato reakční směs byla potom
na po dobu přes noc. V dalším postupu byla tato
směs zředěna na objem 1,5 litru ethylacetátem, potom
dodanou 500 mililitry 1 N roztoku kyseliny
kové, třikrát 500 mililitry vody, jednou solankou
byla usušena za pomoci síranu sodného Na_2SO_4 . Po
odstředění byl získaný produkt zpracován
vacuumovou metodou na 800 gramech silikagelu, přičemž
jako činidlo bylo použito směsi hexanu
a dietylénu v poměru 4 : 1, a frakce byly monitorovány
vacuumovou analýzou v tenké vrstvě (KMNO_4/I_2). Frakce
získané produkty byly potom spojeny, tento spojený podíl
byl oddestilován ve vakuu, zpracován dvakrát 50 mililitry
dietylénu a přečištěn ve vysokém vakuu, přičemž tímto
způsobem bylo připraveno 25,8 gramu produktu.



- 17 -

P A T E N T O V É N A R O K Y

těná polypeptidová sloučenina vybraná ze skupiny

ptid (I), který má následující identifikační
iky:

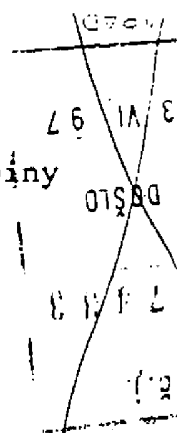
přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka
aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac,
ilimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

velikost částic 10 μm , za použití průtočného
mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému
gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B,
> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom
> 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až
e A je 0,1 ~~%~~ ¹ vodný roztok kyseliny
vé a B je acetonitril, při asi 38 minutách;

přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše
tavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac
ilimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

velikost částic 10 μm , za použití průtočného
mililitrů za minutu a rozpouštědlového systému
gradientovým programem 20 % \longrightarrow 30 % B,
> 70 % A v průběhu 0 až 40 minut, Watersova
e A je 0,1 ~~%~~ ¹ vodný roztok kyseliny
vé a B je acetonitril, při asi 22 minutách;

kvence aminokyselin s koncovou aminoskupinou je



glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-
asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-
lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-
glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-
thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-
glu-trp-leu-ser-;

FAB MS: 7267;

id, který má v podstatě stejnou sekvenci
in a v podstatě stejnou účinnost týkající se
vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (I),

peptid (II) vzorce:

cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-cys-ala-
trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-asp-gly-tyr-
cys-thr-cys-arg-tyr-phe-pro-lys-cys-ile-cys-
asn-asn-asn-CONH₂

id, který má v podstatě stejnou sekvenci
in a v podstatě stejnou účinnost týkající se
vápníkových kanálků jako uvedený polypeptid (II),

peptid (III), který má následující identifikační
stiky:

je přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka
s aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac,
milimetrů x 250 milimetrů; velikost pórů
m, velikost částic 10 μm, za použití průtokového
5 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému
m gradientovým programem 5 % ———> 20 % B,

> 70 % B, 80 % —————> 30 % A v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11, kde A je 0,1 % a B je 0,1 % vodný roztok kyseliny acetonitrilové a B je acetonitril, při asi 39 minutách;

přítomen ve frakci z frakce popsané výše a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost 10 μ m, za použití průtočného množství 10 ml roztoku a rozpouštědlového systému s nelineárním programem 20 % —————> 25 % B, > 75 % A v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 11, kde A je 0,1 % a B je 0,1 % vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 36 minutách, a

kvence aminokyselin s koncovou aminoskupinou je

a-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-val-cys-
y-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-tyr-
s-trp-his-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-
s-phe-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-
s-gly-met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-
s-cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-
p-;

spray MS: 7793 ;

, který má v podstatě stejnou sekvenci
a v podstatě stejnou účinnost při blokování
kanálků jako uvedený polypeptid (III),

olypeptid (IV) vzorce:

asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-
cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂.

id, který má v podstatě stejnou sekvenci
in a v podstatě stejnou účinnost při blokování
h kanálků jako uvedený polypeptid (IV),

peptid-(V), který má následující identifikační
stiky:

přítomen ve frakci ze surového jedu pavouka
s aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac,
milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů
m, velikost částic 10 μm, za použití průtočného
5 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému
m gradientovým programem 5 % ———> 20 % B,
——> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom
——> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až
kde A je 0,1% ¹ vodný roztok kyseliny
stové a B je acetonitril, při asi 43 minutách;

je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše
dstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac
milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů
m, velikost částic 5 μm, za použití průtočného
,5 mililitru/minutu a rozpouštědlového systému
m gradientovým programem 25 % ———> 40 % B,

60 % A v průběhu 0 až 30 minut, kde A je roztok trifluoroctové kyseliny a B je při asi 20,25 minuty;

ence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou
ní:

val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-gly-
pro-trp-met-val-ser-ile-glu-glu-lys-
lys-gly-gly-phe-asp- ;

lekulová hmotnost je asi 20 000;

, který má v podstatě stejnou sekvenci
a v podstatě stejnou účinnost při blokování
kanálek jako uvedený polypeptid (V).

ptid (VI), který má následující identifikační
ky:

řítomen ve frakci surového jedu pavouka
aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac,
milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů
velikost částic 10 μm, za použití průtočného
mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému
gradientovým programem 5 % ———> 20 % B,
> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom
> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až
e A je 0,1% ~~ni~~ vodný roztok kyseliny
vé a B je acetonitril, při asi 48,3 minuty;

ence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou

ci:

lu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-ser-
eu-asp-glu-thr-val-asp-pro- ;

ekulová hmotnost asi 80 000

d, který má v podstatě stejnou sekvenci
n a v podstatě stejnou účinnost při blokování
kanálků jako uvedený polypeptid (VI),

icky přijatelné soli odvozené od těchto

štěná polypeptidová sloučenina podle nároku 1,
brána ze skupiny zahrnující

eptid (I), který má následující identifikační
tíky:

e přítomen ve frakci surového jedu pavouka
aperta, která se eluuje na koloně C-18 Vydac,
milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů
, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného
mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému
gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B,
-> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom
-> 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až
de A je 0,1% \uparrow na vodný roztok kyseliny
ové a B je acetonitril, při asi 38 minutách;

e přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše
stavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac

rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 30 % B, 80 % \longrightarrow 70 % A v průběhu 0 až 40 minut, Watersova křivka 6, kde A je 0,1% \updownarrow ~~ni~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 22 minutách;

(c) sekvence aminokyselin ~~A~~ koncovou aminovou \updownarrow skupinou je následující:

H₂N-glu-lys-gly-leu-pro-glu-gly-ala-glu-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-ala-gly-gln-trp-ile-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-ile-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-arg-gly-leu-lys-lys-thr-cys-ile-ser-lys-leu-ser-asp-pro-asn-arg-asn-glu-trp-leu-ser-;

a

(d) FAB MS: 7267;

polypeptid (II) vzorce:

asp-cys-val-gly-glu-ser-gln-gln-cys-ala-asp-trp-ala-gly-pro-his-cys-cys-asp-gly-tyr-tyr-cys-thr-cys-arg-tyr-phe-pro-lys-cys-ile-cys-val-asn-asn-asn-CONH₂.

polypeptid (III), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů

$3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % B, 95 % \longrightarrow 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % B, 80 % \longrightarrow 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% \uparrow ~~ni~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 39 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, za použití průtočného množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 25 % B, 80 % \longrightarrow 75 % A v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, a potom 25 % \longrightarrow 50 % B, 75 % \longrightarrow 50 % A v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11, kde A je 0,1% \uparrow ~~ni~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 36 minutách, a

(c) sekvence aminokyselin ^A ~~z~~ koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-ala-lys-ala-leu-pro-pro-gly-ser-val-cys-asp-gly-asn-glu-ser-asp-cys-lys-cys-tyr-gly-lys-trp-his-lys-cys-arg-cys-pro-trp-lys-trp-his-phe-thr-gly-glu-gly-pro-cys-thr-cys-glu-lys-gly-met-lys-his-thr-cys-ile-thr-lys-leu-his-cys-pro-asn-lys-ala-glu-trp-gly-leu-asp-trp-;

a

(d) ion-spray MS: 7793,

polypeptid (IV) vzorce:

H₂N-asp-glu-pro-cys-ile-pro-leu-gly-lys-
ser-cys-ser-trp-lys-ile-gly-thr-pro-tyr-
cys-cys-pro-his-pro-asp-asp-ala-gly-arg-
arg-thr-trp-cys-leu-val-asp-tyr-ser-arg-
phe-val-thr-ile-cys-ser-gly-arg-lys-tyr-CONH₂.

polypeptid (V), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μm, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % B, 95 % ———> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% ¹ vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 43 minutách;

(b) je přítomen ve frakci z frakce popsané ve výše uvedeném odstavci (a), která se eluuje na koloně C-18 Vydac rozměry 10 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 5 μm, za použití průtočného množství 3,5 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 25 % ———> 40 % B, 75 % ———> 60 % A v průběhu 0 až 30 minut, kde A je 0,1% ¹ vodný roztok trifluoroctové kyseliny a B je acetonitril, při asi 20,25 minuty;

(c) sekvence aminokyselin ^A koncovou aminovou skupinou

je následující:

H₂N-ile-val-gly-gly-lys-thr-ala-lys-phe-gly-asp-tyr-pro-trp-met-val-ser-ile-glu-glu-lys-asn-lys-lys-gly-gly-phe-asp- ;

a

(d) molekulová hmotnost je asi 20 000,

polypeptid (VI), který má následující identifikační charakteristiky:

(a) je přítomen ve frakci surového jedu pavouka *Agelenopsis aperta*, která se eluuje na koloně C-18 Vydac, rozměry 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost porů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μm, za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % B, 95 % ———> 80 % A v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % B, 80 % ———> 30 % A v průběhu 30 až 55 minut, kde A je 0,1% ^{Na} vodný roztok kyseliny trifluoroctové a B je acetonitril, při asi 48,3 minuty;

(b) sekvence aminokyselin s koncovou aminovou skupinou je následující:

H₂N-glu-ala-thr-glu-ala-ala-lys-val-leu-ser-asn-leu-asp-glu-thr-val-asp-pro- ;

a

(c) molekulová hmotnost je asi 80 000,

a farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto látek.

3. Farmaceutický prostředek pro blokování vápníkových kanálků v buňkách savců, vyznačující se tím, že obsahuje čištěnou polypeptidovou sloučeninu podle nároku 1 nebo farmaceuticky přijatelnou sůl odvozenou od této sloučeniny v množství blokujícím vápníkové kanálky a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosičovou látku.

4. Farmaceutický prostředek pro blokování vápníkových kanálků v buňkách savců, vyznačující se tím, že obsahuje čištěnou polypeptidovou sloučeninu podle nároku 2 nebo farmaceuticky přijatelnou sůl odvozenou od této sloučeniny v množství blokujícím vápníkové kanálky a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosičovou látku.

5. Způsob přípravy čištěné polypeptidové sloučeniny vybrané ze skupiny zahrnující polypeptidy (I), (II), (III), (IV), (V) a (VI) a farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin, podle nároku 1, vyznačující se tím, že

(a) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (I), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem
5 % —————> 20 % acetonitril, 95 % —————> 80 % 0,1 %-ní vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % —————> 70 % acetonitril, 80 % —————> 30 % 0,1 % ¹ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 38 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů

x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, a eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 30 % acetonitril, 80 % ———> 70 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 40 minut, Watersova křivka 6, při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 22 minutách, se jímá a potom se případně lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(b) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (II), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$ za použití průtokového množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % acetonitril, 95 % ———> 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % acetonitril, 80 % ———> 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 40 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-4 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, přičemž eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 30 % acetonitril, 80 % ———> 70 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 30 % ———> 50 % acetonitril, 70 % ———> 50 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny

trifluoroctové v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 22 minutách, se jímá a potom se případně lyofilizuje, opětně se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(c) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (III), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % acetonitril, 95 % ———> 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % acetonitril, 80 % ———> 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 39 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m, a eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % ———> 25 % acetonitril, 80 % ———> 75 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 25 % ———> 50 % acetonitril, 75 % ———> 50 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 36 minutách se jímá a potom se případně lyofilizuje, opětně se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(d) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (IV), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$ za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % \longrightarrow 20 % acetonitril, 95 % \longrightarrow 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % \longrightarrow 70 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 40 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-4 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$, přičemž eluování se provádí za použití průtokového množství 10 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s nelineárním gradientovým programem 20 % \longrightarrow 30 % acetonitril, 80 % \longrightarrow 70 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut, Watersova křivka 6, potom 30 % \longrightarrow 50 % acetonitril, 70 % \longrightarrow 50 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 30 až 45 minut, Watersova křivka 11 a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 27,5 minuty se jímá a popřípadě lyofilizuje, opět se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(e) v případě, že je požadován v podstatě čistý polypeptid (V), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic $10 \mu\text{m}$ za použití průtočného množství

15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % acetonitril, 95 % ———> 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % acetonitril, 80 % ———> 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozmezí od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 43 minutách se jímá a potom se vloží na kolonu C-18 Vydac o rozměrech 10 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 5 μ m, a eluování se provádí za použití průtokového množství 3,5 mililitru/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 25 % ———> 40 % acetonitril, 75 % ———> 60 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok kyseliny trifluoroctové v průběhu 0 až 30 minut a při detekci píku v rozsahu 220 až 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 20,25 minuty se jímá a potom případně lyofilizuje, opětně se suspenduje ve vodě a lyofilizuje;

(f) v případě, že je požadován čištěný polypeptid (VI), se celý podíl jedu pavouka *Agelenopsis aperta* eluuje na koloně C-18 Vydac o rozměrech 22 milimetrů x 250 milimetrů, velikost pórů $3 \cdot 10^{-6}$ cm, velikost částic 10 μ m za použití průtočného množství 15 mililitrů/minutu a rozpouštědlového systému s lineárním gradientovým programem 5 % ———> 20 % acetonitril, 95 % ———> 80 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 0 až 30 minut, potom 20 % ———> 70 % acetonitril, 80 % ———> 30 % 0,1% ~~na~~ vodný roztok trifluoroctové kyseliny v průběhu 30 až 55 minut, při monochromatické detekci píku v rozsahu od 220 do 230 nm, přičemž frakce, která se eluuje při asi 48,3 minuty se jímá a potom se

popřípadě lyofilizuje, opětně suspenduje ve vodě
a lyofilizuje;

nebo v alternativním provedení se kterýkoliv z výše
uvedených polypeptidů synteticky připraví metodami samy
o sobě známými;

a v případě, kdy jsou požadovány polypeptidy, které mají
v podstatě stejnou sekvenci aminokyselin jako libovolný
z výše uvedených polypeptidů, potom se tento polypeptid nebo
polypeptidy synteticky připraví metodami samy o sobě
známými;

a případně se převedou výše uvedené polypeptidy na
farmaceuticky přijatelné soli odvozené od těchto sloučenin
metodami samy o sobě známými.

~~Zastupuje:~~

~~JUDr. Pavel Zelený~~