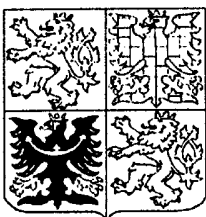


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 27.10.94
(32) 28.10.93
(31) 93/4336758
(33) DE
(40) 12.07.95

(21) 2655-94

(13) A3

6(51)

C 07 K 5/062
C 07 K 5/072
C 07 K 5/083
C 07 K 5/093
C 07 K 5/103
C 07 K 5/113
C 07 K 7/06
C 07 K 7/08
C 07 K 14/00
A 61 K 38/05
A 61 K 38/06
A 61 K 38/07
A 61 K 38/08
A 61 K 38/10
A 61 K 38/16

(71) MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT
BESCHRÄNKTER HAFTUNG, Darmstadt, DE;

(72) Jonczyk Alfred dr., Darmstadt, DE;
Felding-Habermann Brunnhilde dr., Darmstadt, DE;
Diefenbach Beate, Darmstadt, DE;
Rippmann Friedrich dr., Darmstadt, DE;

(54) **Lineární peptidy, způsob jejich výroby,
farmaceutické přípravky na jejich bázi
a způsob jejich výroby**

(57) Lineární peptidy, způsob jejich výroby, farmaceutické přípravky na jejich bázi a způsob jejich výroby. Tyto lineární peptidy, které mají strukturu odpovídající obecnému vzorci X-A-Cys(R¹)-B-Z, kde A, B, R¹, X a Z mají význam uvedeny v nároku 1, jsou účinnými inhibitory vazby integrinu GP IIb/IIIa (α_{IIb}β₃) krevních destiček na přírodní ligandy a hodí se m.j. pro profylaxi a léčbu chorob krevního oběhu, při thrombose, srdečním infarktu, koronárních chorobách srdce, arteriosklerose a atherosklerose, nádorových onemocněních a osteolytických onemocněních. Také mají podpůrný účinek při hojení ran.

Lineární peptidy, způsob jejich výroby, farmaceutické přípravky na jejich bázi a způsob jejich výroby

Oblast techniky

Vynález se týká lineárních peptidů, způsobu jejich výroby, farmaceutických přípravků na jejich bázi a způsobu jejich výroby.

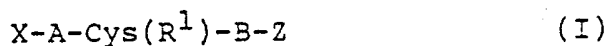
Dosavadní stav techniky

Lineárním peptidům podle tohoto vynálezu se například blíží sloučeniny popsané v Evropské patentové přihlášce č. 0 406 428.

Úkolem tohoto vynálezu je vyvinout nové sloučeniny s cennými vlastnostmi, kterých by bylo možno zejména použít pro výrobu léčiv.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou nové lineární peptidy obecného vzorce I



odvozené od C-terminální sekvence echistatinu, kde

X představuje atom vodíku nebo skupinu Ac,

A chybí nebo představuje zbytek Asp nebo peptidový fragment zvolený ze souboru zahrnujícího Ala-Asp, Thr-Ala-Asp, Lys-Thr-Ala-Asp,

Lys-Thr-Ala-Asn, Lys-Thr-Gly-Asp, Lys-Ala-Ala-Asp,
Arg-Thr-Ala-Asp, Ser-Ala-Asp, Gln-Ser-Ala-Asp,
Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Ile-Ser-Ala-Gly,
Arg-Ser-Ala-Gly, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp;
Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Gly-Lys-Thr-Cys-Asp,
Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp,
Gly-Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp.
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp.

- B chybí nebo představuje zbytek Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, 4-Hal-Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val nebo N-methylovaný derivát výše uvedeného zbytku aminokyseliny nebo peptidový fragment, který je zvolen ze souboru zahrnujícího Pro-Arg, Pro-Arg-Asn, Pro-Arg-Asn-Pro, Pro-Arg-Asn-Pro-His, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr.

příčemž chybět může pouze jeden ze zbytků A nebo B,

Z představuje hydroxyskupinu, skupinu vzorce OR^2 , aminoskupinu, nebo zbytek vzorce NHR^2 nebo $N(R^2)_2$,

R^1 představuje atom vodíku, R^2 nebo zbytek Trt, Dpm nebo Bzl,

R^2 představuje alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,

Hal představuje atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu a

Ac představuje alkanoylskupinu s 1 až 10 atomy uhlíku, aralkanoyle skupinu s 8 až 10 atomy uhlíku nebo aroylskupinu se 7 až 11 atomy uhlíku,

jakož i jejich fyziologicky nezávadné soli.

Nyní se zjistilo, že sloučeniny obecného vzorce I a jejich soli vykazují cenné vlastnosti. Působí především jako inhibitory integrinu, přičemž zejména blokují interakci mezi receptory β_3 -integrinu a ligandy. Toto působení je možno například prokázat způsobem popsaným v J. W. Smith et al., J. Biol. Chem. 265, 12267 až 12271 (1990). Kromě toho vykazují tyto sloučeniny také protizánětlivé účinky. Také toho způsobení je možno prokázat pomocí metod známých z literatury.

Sloučenin podle vynálezu je možno používat jako účinných látek v humánním a veterinárním lékařství, zejména k profylaxi a léčbě chorob krevního oběhu, při thrombose, srdečním infarktu, koronárních chorobách srdce, arteriosklerose a atherosklerose, zánětech, apoplexii, angině pectoris, nádorových onemocněních, osteolytických onemocněních, zejména osteoporose, angiogenesi a restenose po angioplastice. Kromě toho mohou tyto sloučeniny podpůrně působit při hojení ran.

Zkratky zbytků aminokyselin, které jsou uvedeny v předcházejícím nebo následujícím popisu, znamenají tyto zbytky:

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová

Arg	arginin
Cys	cystein
Gln	glutamin
Glp	pyroglutamin
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
His	histidin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Orn	ornithin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

Další zkratky mají tyto významy:

Boc	terc.butoxykarbonyl
Bzl	benzyl
CBZ	benzyloxykarbonyl
DCCI	dicyklohexylkarbodiimid
Dpm	difenylmethyl
DMF	dimethylformamid
EDCI	hydrochlorid N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)- karbodiimidu
Et	ethyl
Et ₂ O	diethylether
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl
HOBT	1-hydroxybenzotriazol
Me	methyl

MBHA	4-methylbenzhydrylamin
Mtr	4-methoxy-2,3,6-trimethylfenylsulfonyl
OBu	terc.butylester
OMe	methylester
OEt	ethylester
POA	fenoxyacetyl
TFA	kyselina trifluoroctová
Trt	trityl (trifenylmethyl).

Pokud se výše jmenované zbytky aminokyselin mohou vyskytovat ve více enantiomerních formách, je třeba chápat, že všechny formy, včetně jejich směsí (například DL-formy) takových zbytků uvedených výše a dále, spadají do rozsahu tohoto vynálezu. Pokud se používá třípísmenného kódu a není uvedena stereochemie, rozumí se tím vždy L-forma.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby sloučenin obecného vzorce I nebo jejich solí, jehož podstata spočívá v tom, že se tyto sloučeniny uvolní ze svých funkčních derivátů, například působením solvolytických nebo hydrogolytických činidel, nebo že se

peptid obecného vzorce II



kde

M představuje zbytek aminokyseliny nebo zbytek peptidu, který je zvolen ze souboru zahrnujícího A, A-Cys(R¹), Ala, Thr, Thr-Ala, Lys, Lys-Thr, Lys-Thr-Ala, Lys-Thr-Ala-Gly, Gly, Gly-Lys, Gly-Lys-Thr, Gly-Lys-Thr-Ala, Gly-Lys-Thr-Cys(R¹), Asn, Asn-Gly, Asn-Gly-Lys, Lys-Ala, Lys-Ala-Ala, Asn-Gly-Lys-Thr, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Cys, Cys-Asn, Cys-Asn-Gly, Arg, Arg-Thr, Arg-Thr-Ala, Ser,

Cys-Asn-Gly-Lys, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala,
Ser-Ala, Tyr, Tyr-Cys, Tyr-Cys-Asn, Tyr-Cys-Asn-Gly,
Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Gln, Gln-Ser, Gln-Ser-Ala,
Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp,
Asp-Tyr, Asp-Tyr-Cys, Asp-Tyr-Cys-Asn, Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Ile, Ile-Ser, Ile-Ser-Ala,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Arg-Ser, Arg-Ser-Ala,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp-Asp, Asp-Asp-Tyr,
Asp-Asp-Tyr-Cys, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly,
Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,
Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Met, Met-Asp,
Met-Asp-Asp, Met-Asp-Asp-Tyr, Met-Asp-Asp-Tyr-Cys,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn, Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp-Met, Asp-Met-Asp,
Asp-Met-Asp-Asp, Asp-Met-Asp-Asp-Tyr,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys, Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, A-Cys(R¹)-Pro,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg, A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro, A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala,

přičemž A a R¹ mají výše uvedený význam a

X má výše uvedený význam, přičemž však je rozdílný od vodíku, pokud A a s ním M, chybí,

nechá reagovat s aminosloučeninou obecného vzorce III

H-Q-Z

(III)

kde

Z má výše uvedený význam a

Q představuje zbytek aminokyseliny nebo zbytek peptidu, který je zvolen ze souboru zahrnujícího B, Cys(R¹)-B, Arg-Asn, Arg-Asn-Pro, Asn-Pro, Arg-Asn-Pro-His, Asn-Pro-His, Pro-His, Arg-Asn-Pro-His-Lys, Asn-Pro-His-Lys, Pro-His-Lys, His-Lys, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly, Asn-Pro-His-Lys-Gly, Pro-His-Lys-Gly, His-Lys-Gly, Lys-Gly, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro, Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro, Pro-His-Lys-Gly-Pro, His-Lys-Gly-Pro, Lys-Gly-Pro, Gly-Pro, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, His-Lys-Gly-Pro-Ala, Lys-Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Ala, Pro-Ala, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Gly-Pro-Ala-Thr, Pro-Ala-Thr, Ala-Thr, Gly-Asp-Cys(R¹)-B, Thr-Gly-Asp-Cys(R¹)-B, Asp-Cys(R¹)-B, Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Asn-Cys(R¹)-B, Ala-Asn-Cys(R¹)-B, Thr-Ala-Asn-Cys(R¹)-B, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Ala-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Ser-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,

Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Gly-Cys(R¹)-B,
Ala-Gly-Cys(R¹)-B, Ser-Ala-Gly-Cys(R¹)-B, Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B,
Thr-Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B, Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-B,
Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B oder
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-B,

příčemž R¹ má výše uvedený význam,

a/nebo že se alkyluje volná merkaptoskupina, hydroxyskupina
nebo aminoskupina,

a/nebo že se sloučenina obecného vzorce I převede působením
kyseliny nebo báze na některou ze svých solí.

Zbytkem A je přednostně Ac-Asp, Ala-Asp, Thr-Ala-Asp,
Lys-Thr-Ala-Asp, Ac-Lys-Thr-Ala-Asp, Gly-Lys-Thr-Cys-Asp,
Gly-Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp, Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Lys-Thr-Ala-Asn,
Lys-Thr-Gly-Asp, Lys-Ala-Ala-Asp, Arg-Thr-Ala-Asp, Gly-Ser-Ala-Asp,
Ac-Gln-Ser-Ala-Asp, Ile-Ser-Ala-Gly oder Arg-Ser-Ala-Gly.

Zbytek B přednostně chybí nebo znamená zvláště
přednostně zbytek Ala, který je popřípadě methylován,
Pro, Pro-Arg, Pro-Arg-Asn, Pro-Arg-Asn-Pro,
Pro-Arg-Asn-Pro-His, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys,
Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly nebo
Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, kde X přednostně
představuje atom vodíku nebo acetylskupinu a Z přednostně
představuje hydroxyskupinu nebo aminoskupinu.

R¹ přednostně představuje trifenylmethylskupinu,
zatímco R² přednostně představuje methylskupinu a dále pak
přednostně ethylskupinu, propylskupinu, butylskupinu nebo
terc.butylskupinu.

Zbytek Ac přednostně představuje acetyl skupinu, může však dále představovat též formyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, valeryl, isovaleryl, pivaloyl (trimethylacetyl) a dále též přednostně popřípadě jednou až třikrát substituovanou aroylskupinu se 7 až 11 atomy uhlíku, přičemž jako substituenty přicházejí v úvahu přednostně následující skupiny: alkyl, alkoxy, alkylthio, alkylsulfinyl nebo alkylsulfonyl, vždy s 1 až 3, přednostně 1 nebo 2 atomy uhlíku, methyldioxy, dále pak hydroxy, fluor, chlor, brom, jod, nitro, amino, alkylamino nebo dialkylamino, vždy s 1 až 3, přednostně 1 nebo 2 atomy uhlíku v alkylskupině. Jako konkrétní aroylskupiny je možno jmenovat benzoyl, o-, m- nebo p-toluylyl, o-, m- nebo p-methoxybenzoyl, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- nebo 3,5-dimethoxybenzoyl, 2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,5-, 2,4,6- nebo 3,4,5-trimethoxybenzoyl, o-, m- nebo p-methylsulfonylbenzoyl, 2,3- nebo 3,4-methyldioxybenzoyl, 1- nebo 2-naftoyl. Ac může dále představovat aralkanoylskupinu s 1 až 10 atomy uhlíku, jako je například fenylacetyl, 2- nebo 3-fenylpropionyl, 2-, 3- nebo 4-fenylbutyryl nebo 2- nebo 3-fenylisobutyryl.

Předmětem tohoto vynálezu jsou tedy zejména takové sloučeniny obecného vzorce I, v nichž alespoň jeden z výše uvedených zbytků má některý ze shora jmenovaných, zejména shora jmenovaných přednostních významů.

Některé přednostní skupiny sloučenin podle tohoto vynálezu lze charakterizovat následujícími dílčími vzorci Ia až Id, které odpovídají obecnému vzorci I, v nichž blíže neuvedené zbytky a parametry mají význam uvedený u obecného vzorce I, přičemž však v obecném vzorci

Ia Cys(R¹) představuje zbytek Cys(Trt) a B představuje zbytek Pro;

- Ib Cys(R¹) představuje zbytek Cys(Trt) a B představuje zbytek Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr;
- Ic Cys(R¹) představuje zbytek Cys(Trt) a B představuje zbytek Pro-Arg, Pro-Arg-Asn-Pro, Pro-Arg-Asn-Pro-His, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys a nebo Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly;
- Id Cys(R¹) představuje zbytek Cys(Trt) a A představuje zbytek Ala-Asp nebo Lys-Thr-Ala-Asp.

Další skupinu přednostních sloučenin lze charakterizovat dílčími vzorci Iaa až Ida, které jinak odpovídají obecným vzorcům I, popřípadě Ia až Id, v nichž však navíc X představuje atom vodíku a Z představuje hydroxyskupinu nebo aminoskupinu.

Sloučeniny obecného vzorce I a také výchozí látky pro jejich výrobu lze připravovat o sobě známými způsoby, které jsou popsány v literatuře (například ve standardních publikacích, jako je Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, SRN), a to za reakčních podmínek, které jsou pro uvedené reakce známé a vhodné. Může se též použít známých, zde blíže neuvedených variant.

Pokud je to žádoucí, mohou se výchozí látky také připravovat in situ, tak že se z reakční směsi neizolují, nýbrž se nechávají přímo dále reagovat na sloučeniny obecného vzorce I.

Jak již bylo uvedeno výše, sloučeniny obecného vzorce I je možno získat tak, že se uvolní ze svých funkčních derivátů solvolýzou, zejména hydrolýzou nebo

hydrogenolýzou.

Přednostními výchozími látkami pro solvolýzu nebo hydrogenolýzu jsou sloučeniny, které místo jedné nebo více volných aminoskupin a/nebo hydroxyskupin obsahují odpovídající chráněné aminoskupiny a/nebo hydroxyskupiny, přednostně takové sloučeniny, které místo atomu vodíku vázaného k atomu dusíku, obsahují chránicí skupinu aminoskupiny, například takové sloučeniny, které odpovídají obecnému vzorci I, ale místo aminoskupiny nesou skupinu NHR' (kde R' představuje chránicí skupinu aminoskupiny, například skupinu Fmoc, Boc nebo CBZ).

Dále se dává přednost takovým výchozím látkám, které místo atomu vodíku hydroxyskupiny nesou chránicí skupinu hydroxyskupiny, například takovým sloučeninám, které odpovídají obecnému vzorci I, ale místo hydroxyfenylskupiny obsahují R''O-fenylskupinu (kde R'' představuje chránicí skupinu hydroxyskupiny).

V molekule výchozí látky může být přítomno také více stejných nebo rozdílných chráněných aminoskupin a/nebo hydroxyskupin. Pokud jsou přítomné chránicí skupiny od sebe rozdílné, mohou se v mnoha případech odštěpovat selektivně.

Výraz "chránicí skupina aminoskupiny" je všeobecně znám a označují se jím skupiny, které se hodí pro ochranu (blokování) aminoskupiny před chemickými reakcemi. Tyto skupiny musí též splňovat podmínku snadné odštěpitelnosti po provedení požadované chemické reakce na jiných místech molekuly. Jako typické skupiny tohoto druhu je možno uvést zejména nesubstituované nebo substituované acylskupiny, arylskupiny, aralkoxymethylskupiny nebo aralkylskupiny. Vzhledem k tomu, že se chránicí skupiny aminoskupiny po provedení požadované reakce (nebo reakční sekvence)

odštěpují, nemá jejich druh a velikost obvykle kritický význam, přednostně se však používá skupin obsahujících 1 až 20, zejména 1 až 8 atomů uhlíku. Pojem "acylskupina" je třeba v souvislosti s nárokovaným postupem a sloučeninami chápat v nejširším slova smyslu. Tento pojem tedy zahrnuje acylové skupiny odvozené od alifatických, aralifatických, aromatických nebo heterocyklických karboxylových kyselin nebo sulfonových kyselin. Jedná se zejména o alkoxykarbonylskupiny, aryloxykarbonylskupiny a především aralkoxykarbonylskupiny. Jako příklady takových acylskupin je možno uvést alkanoyl, jako acetyl, propionyl nebo butyryl; aralkanoyl, jako fenylacetyl; aroyl, jako benzoyl nebo toluyl; aryloxyalkanoyl, jako POA; alkoxykarbonyl, jako methoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxykarbonyl, Boc nebo 2-jodethoxykarbonyl; aralkyloxykarbonyl, jako CBZ ("karbobenzoxy"), 4-methoxybenzyloxykarbonyl nebo Fmoc; a arylsulfonyl, jako Mtr. Přednostními chránicími skupinami aminoskupiny jsou skupiny Boc a Mtr a dále pak CBZ, Fmoc, benzyl a acetyl.

Výraz "chránicí skupina hydroxyskupiny" je všeobecně znám a označují se jím skupiny, které se hodí pro ochranu (blokování) hydroxyskupiny před chemickými reakcemi. Tyto skupiny musí též splňovat podmínku snadné odštěpitelnosti po provedení požadované chemické reakce na jiných místech molekuly. Jako typické skupiny tohoto druhu je možno uvést zejména výše uvedené nesubstituované nebo substituované arylskupiny, aralkylskupiny nebo acylskupiny a dále pak alkylskupiny. Vzhledem k tomu, že se chránicí skupiny hydroxyskupiny po provedení požadované reakce (nebo reakční sekvence) odštěpují, nemá jejich druh a velikost obvykle kritický význam, přednostně se však používá skupin obsahujících 1 až 20, zejména 1 až 10 atomů uhlíku. Jako příklady chránicích skupin hydroxyskupiny je mj. možno uvést benzylskupinu, p-nitrobenzoylskupinu, p-toluensulfonylskupinu

nu a acetyl skupinu, přičemž benzyl skupině a acetyl skupině se dává obzvláštní přednost. Karboxy skupiny v kyselině asparagové a kyselině glutamové se přednostně chrání v podobě terc.butylesteru (jako například Asp(OBut)).

Funkční deriváty sloučenin obecného vzorce I, které slouží jako výchozí látky, se mohou připravovat obvyklými způsoby výroby známými ze syntézy aminokyselin a peptidů, které jsou například popsány v uvedených standardních publikacích a patentových přihláškách. Tak například je také možno použít metody v tuhé fázi podle Merrifielda (B. F. Gysin a R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1994, 3102 a dále (1972)) nebo novějších o sobě známých moderních variant, které jsou od této metody odvozeny.

Uvolňování sloučenin obecného vzorce I z jejich funkčních derivátů se - podle použité chránicí skupiny - provádí například pomocí silných kyselin, účelně kyseliny trifluoroctové nebo kyseliny chloristé nebo též pomocí jiných silných anorganických kyselin, jako je kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová, silných organických kyselin, jako je kyselina trichloroctová nebo sulfokyselin, jako je kyselina benzensulfonová nebo p-toluensulfonová. Přítomnost přídatného inertního rozpouštědla je možná, ale není vždy nutná. Jako inertní rozpouštědla se přednostně hodí organická rozpouštědla, například karboxylové kyseliny, jako je kyselina octová, ethery, jako je tetrahydrofuran nebo dioxan, amidy, jako je dimethylformamid, halogenované uhlovodíky, jako je dichlormethan, dále též alkoholy, jako je isopropylalkohol, sek.- nebo terc.butanol a v některých případech také methanol nebo ethanol nebo voda. V úvahu přicházejí dále i směsi výše uvedených rozpouštědel. Kyseliny trifluoroctové se přednostně používá v nadbytku a nepřidává se žádné další rozpouštědlo. Kyseliny chloristé se přednostně používá ve formě směsi kyseliny

octové a 70% kyseliny chloristé v poměru 9 : 1. Reakční teplota pro štěpení leží účelně v rozmezí od asi 0 do asi 50°C, přednostně se pracuje v rozmezí od 15 do 30°C (tj. při teplotě místnosti).

Skupiny Boc, But, OBut, Trt a Mtr je možno přednostně odštěpovat například pomocí kyseliny trifluorooctové v dichlormethanu nebo pomocí asi 3 až 5N kyseliny chlorovodíkové v dioxanu při 0 až 30°C. Přitom se může používat pomocných činidel, která příznivě ovlivňují reakci, jako je anisol, thiofenol nebo thioanisol. Odštěpování skupiny Fmoc se například provádí pomocí 5 až 50% roztoku dimethylaminu, diethylaminu, morfolinu nebo piperidinu v dimethylformamidu při 0 až 30°C. Přitom je možné selektivně odštěpovat skupinu Trt od aminokyselinových zbytků, k nimž je vázána přes kyslík, přičemž Trt-skupina, která je vázána přes síru, v molekule zůstává. Také je možno zbytek Trt dodatečně zavést, přičemž přednostně dojde k vazbě k nukleofilní síře ale hydroxyskupiny v postranním řetězci nesubstituovány.

Hydrogenolyticky odštěpitelné chránicí skupiny (například CBZ nebo benzyl) je možno odštěpovat například působením vodíku za přítomnosti katalyzátoru, například katalyzátoru na bázi ušlechtilého kovu, jako je palladium, účelně naneseného na nosiči, jako je aktivní uhlí. Jako rozpouštědla jsou vhodná výše uvedená rozpouštědla, zejména například alkoholy, jako je methanol nebo ethanol, ethery, jako je tetrahydrofuran, karboxylové kyseliny, jako je kyselina octová a dále též voda nebo amidy, jako je dimethylformamid. Hydrogenolýza se zpravidla provádí při teplotách asi v rozmezí od 0 do 100°C a tlacích asi v rozmezí od 0,1 do 20 MPa, přednostně při teplotách v rozmezí od 20 do 30°C a tlacích od 0,1 do 1 MPa. Hydrogenolýza skupiny CBZ se může například dobře provádět na 5 až 10% palladiu na uhlíku v methanolu nebo za použití

mravenčanu amonného (místo plynného vodíku) na palladiu na uhlíku ve směsi vody a dimethylformamidu při 20 až 30°C.

Sloučeniny obecného vzorce I je také možno získat reakcí sloučeniny obecného vzorce II s aminosloučeninou obecného vzorce III za o sobě známých kondenzačních podmínek běžných v oboru peptidové syntézy, které jsou například popsány v publikaci Houben-Weyl, I.c., sv. 15/II, strana 1 až 806 (1974).

Reakce se přednostně provádí za přítomnosti dehydratačního činidla, například karbodiimidu, jako je DCCI nebo EDCI a dále též anhydridu propanfosfonové kyseliny (srov. Angew. Chem. 1991, 129 (1980)), difenylfosforylazidu nebo 2-ethoxy-N-ethoxykarbonyl-1,2-dihydrochinolinu, v inertním rozpouštědle, jako je například halogenovaný uhlíkový dioksid, jako dichlormethan, ether, jako tetrahydrofuran nebo dioxan, amid, jako dimethylformamid nebo dimethylacetamid, nitril, jako acetonitril nebo ve směsích těchto rozpouštědel, při teplotách v rozmezí od -10 do 40, přednostně od 0 do 30°C.

Místo sloučenin obecného vzorce II se na reakci může použít také vhodných reakčních derivátů těchto látek, například takových derivátů, v nichž jsou reaktivní skupiny intermediárně blokovány chránicími skupinami. Derivátů aminokyselin obecného vzorce II je například možno používat ve formě jejich aktivovaných esterů, které se účelně připravují in situ, například přidáním HOBt nebo N-hydroxysukcinimidu. Také je jich možno používat ve formě směsných anhydridů, které lze připravit pomocí halogenidů karboxylových kyselin, jako je například pivaloylchlorid nebo isobutoxykarbonylchlorid.

Výchozí látky obecného vzorce II jsou zpravidla nové. Je možno je připravovat o sobě známými metodami, například metodami peptidové syntézy a odštěpování chránících skupin.

Zpravidla se nejprve syntetizuje chráněný peptidový ester obecného vzorce $R'-M'-OR''$, například Boc-M-OMe nebo Fmoc-M-OBu^t. Tyto estery se zmýdelní na kyseliny obecného vzorce $R'-M'-OH$, například Boc-M-OH nebo Fmoc-M-OH a tyto kyseliny se potom kondenzují se sloučeninou obecného vzorce III, která je popřípadě rovněž opatřena na místech, která nemají být dostupná pro reakci, odpovídajícími chránícími skupinami.

V případě sloučenin obecného vzorce III se rovněž nejprve syntetizují peptidové estery obecného vzorce $R'-Q-Z'-R''$, jako například Boc-Q-Z'-OMe nebo Fmoc-Q-Z'-OMe, kde Z' představuje iminoskupinu nebo atom kyslíku, a potom se po provedení kondenzace, kterou se vyrábějí sloučeniny obecného vzorce I o sobě známým způsobem odštěpí chránící skupina R', například skupina Fmoc, působením roztoku piperidinu v dimethylformamidu.

Obzvláště výhodné je použít novějších metod peptidové syntézy podle modifikovaných Merrifieldových technik a za použití syntetizátorů peptidů, které například popsali A. Jonczyk a J. Meinenhofer v Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Sym., Eds. V. Hruby a D. H. Rich, Pierce Comp. III, strana 73 až 77 (1983) (Fmoc-strategie). Dále lze též použít technik popsaných v Angew. Chem. 104, 375 až 391 (1992). Tyto metody jsou o sobě známé.

Báze obecného vzorce I se může pomocí kyseliny převést na příslušnou adiční sůl s kyselinou. Pro tuto

reakci přicházejí v úvahu zejména kyseliny, které poskytují fyziologicky vhodné soli. Tak se může používat anorganických kyselin, jako je například kyselina sírová, kyselina dusičná, halogenovodíkové kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková nebo kyselina bromovodíková, kyseliny fosforečné, jako kyselina orthofosforečná a amidosulfonová kyselina a dále též organických kyselin, zejména alifatických, alicyklických, aralifatických, aromatických, nebo heterocyklických jedno- nebo vícesytných karboxylových, sulfonových kyselin nebo kyselin odvozených od kyseliny sírové, jako je například kyselina mravenčí, kyselina propionová, kyselina pivalová, kyselina diethyloctová, kyselina malonová, kyselina jantarová, kyselina pimelová, kyselina fumarová, kyselina maleinová, kyselina mléčná, kyselina vinná, kyselina jablečná, kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina 2-fenylpropionová, kyselina 3-fenylpropionová, kyselina citronová, kyselina glukonová, kyselina askorbová, kyselina nikotinová, kyselina isonikotinová, kyselina methansulfonová, kyselina ethansulfonová, kyselina ethandisulfonová, kyselina 2-hydroxyethansulfonová, kyselina benzensulfonová, kyselina p-toluensulfonová, kyselina naftalenmonosulfonová, kyselina naftalendisulfonová nebo kyselina laurylsírová. Solí s kyselinami, které neposkytují fyziologicky nezávadné zbytky, například pikrátů, se může používat pro izolaci a/nebo čištění sloučenin obecného vzorce I.

Na druhé straně je také možno kyseliny obecného vzorce I převádět reakcí s bázi na jejich fyziologicky vhodné soli s kovy nebo amoniové soli. Jako tyto soli přicházejí v úvahu zejména soli sodné, draselné, hořečnaté, vápenaté a amonné a dále též substituované amoniové soli, jako jsou například dimethyl-, diethyl-, nebo diisopropylamoniové soli, monoethanol-, diethanol-, nebo triethanolamoniové soli, cyklohexyl-, dicyklohexylamoniové soli, di-

benzylethylendiamoniové soli a dále též například soli s N-methyl-D-glukaminem nebo argininem nebo lysinem.

Nových sloučenin obecného vzorce I se může použít jako integrinových ligandů při výrobě kolon pro afinitní

chromatografii sloužících pro výrobu čistých integrinů. Také toto použití je předmětem předloženého vynálezu.

Ligand, tj. peptidový derivát obecného vzorce I, je přitom k polymernímu nosiči kovalentně vázán prostřednictvím kotvicích funkčních skupin.

Jako polymerní nosiče jsou vhodné polymerní pevné fáze, které mají přednostně hydrofilní vlastnosti a které jsou známé v oboru peptidové chemie, jako jsou například zesíťované polycukry, jako je celulóza, Sepharose nebo Sepharses^(R), akrylamidy, polymery na bázi polyethylenglykolu nebo Tentakelpolymery^(R).

Jako kotvicí funkční skupiny, které jsou připojeny k polymerním nosičům se přednostně hodí lineární alkylenové řetězce se 2 až 12 atomy uhlíku, které jsou jedním koncem přímo vázány k polymeru a které na druhém konci obsahují funkční skupinu, jako je například hydroxyskupina, aminoskupina, merkaptoskupina, maleinimidoskupina nebo karboxyskupina, schopnou připojit se k C- nebo N-terminálnímu úseku příslušného peptidu.

Přitom je možné, aby byl peptid přímo nebo přes případnou druhou kotvicí funkční skupinu spojen s kotvicí skupinou polymeru. Dále je též možné, aby byl peptid obsahující zbytky aminokyselin s funkcionalizovanými postranními řetězci, připojen přes tyto funkcionalizované postranní řetězce ke kotvicí funkční skupině polymeru. Kromě toho

mohou být určité zbytky aminokyselin, které tvoří složku peptidů obecného vzorce I, modifikovány ve svých postranních řetězcích tak, že je možno je zakotvit přes například merkaptoskupiny, hydroxyskupiny, aminoskupiny nebo karboxyskupiny ke kotvicím skupinám polymeru.

Přitom přicházejí v úvahu zbytky "nepřirozených" aminokyselin, jako jsou například deriváty fenylalaninu, které v poloze 4- fenylového kruhu nesou merkaptoalkylskupinu, hydroxyalkylskupinu, aminoalkylskupinu nebo karboxyalkylskupinu, přičemž tyto funkční skupiny se nalézají na konci řetězce.

Jako příklady zbytků aminokyselin, jejichž postranní řetězec může přímo sloužit jako kotvicí funkční skupina, je například možno uvést Lys, Orn, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys nebo Tyr.

Jako příklady N-terminálních kotvicích skupin je možno uvést takové zbytky, jako je $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$, $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$ nebo $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$, kde n představuje číslo 2 až 12, přičemž délka alkylenových řetězců není kritická a tyto řetězce mohou být popřípadě též zčásti nebo úplně nahrazeny odpovídajícími arylovými nebo alkylarylovými zbytky.

C-terminální kotvicí skupinou může být například skupina $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$ nebo $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$, přičemž pro n a pro alkylenový řetězec platí údaje, které jsou uvedeny v předcházejícím odstavci.

N- a C-terminální kotvicí skupiny mohou též tvořit kotvicí stavební kámen již funkcionalizovaného postranního řetězce zbytku aminokyseliny. V úvahu zde přicházejí napří-

klad takové zbytky aminokyselin, jako je Lys(CO-C₅H₁₀-NH₂), Asp(NH-C₃H₆-COOH) nebo Cys(C₃H₆-NH₂), přičemž tato kotvicí skupina je vždy vázána k funkční skupině postranního řetězce.

Výroba materiálů pro afinitní chromatografii se provádí za podmínek, které jsou obvyklé a o sobě známé pro kondenzaci aminokyselin a které již byly uvedeny v odstavci zabývajícím se výrobou sloučenin obecného vzorce I nebo které jsou popsány v Pierce, Immuno Technology Catalog & Handbook (1990).

Předmětem vynálezu je dále také použití sloučenin obecného vzorce I a jejich fyziologicky vhodných solí pro výrobu farmaceutických přípravků. Při této výrobě se mohou tyto sloučeniny zpracovávat, spolu s alespoň jedním nosičem nebo pomocnou látkou, popřípadě v kombinaci s jednou nebo více dalších účinných přísad, na vhodné dávkovací formy. Předmětem vynálezu jsou dále také farmaceutické přípravky, které obsahují přinejmenším jednu sloučeninu obecného vzorce I a/nebo její fyziologicky vhodnou adiční sůl. Takto získaných přípravků se může používat jako léčiv v humánním nebo veterinárním lékařství. Jako nosičové látky přicházejí v úvahu organické nebo anorganické látky, které se hodí pro enterální (například orální nebo rektální) nebo parenterální (například intravenosní) nebo lokální (například topickou, dermální, ophtalmickou nebo nasální) aplikaci nebo pro aplikaci ve formě inhalačního spreje. S těmito látkami nesmějí sloučeniny podle vynálezu reagovat. Jedná se například o vodu nebo vodní isotonický roztok kuchyňské soli, nižší alkoholy, rostlinné oleje, benzylalkoholy, polyethylenglykoly, triacetát glycerolu a jiné glyceridy mastných kyselin, želatinu, sojový lecithin, uhlohydráty, jako je laktoza nebo škrob, stearan hořečnatý, mastek,

celulozu a vazelínu. Pro orální podávání slouží zejména tablety, dražé, kapsle, sirupy, šťávy nebo kapky. Zajímavé jsou v tomto ohledu zejména speciální lakované tablety a kapsle s povlaky nebo obaly kapslí, které jsou odolné proti žaludečním šťávám. Pro rektální podávání se hodí čípky. Pro parenterální podávání se hodí roztoky, přednostně olejové nebo vodné roztoky a dále suspenze, emulze nebo implantáty. Pro topické podávání se hodí například roztoky, kterých lze používat ve formě očních kapek a dále například suspenze, emulze, krémy, masti nebo komprimáty. Pro aplikaci ve formě inhalačních sprejů se hodí spreje, které obsahují účinnou přísadu buď rozpuštěnou nebo suspendovanou v hnacím plynu nebo směsi hnacích plynů (jako je například oxid uhličitý nebo fluorchlorovaný uhlovodík nebo vhodná náhradní látka). Přitom se účelně používá účinných přísad v mikronizované formě a může se přidávat jedno nebo více přídatných fyziologicky vhodných rozpouštědel, jako je například ethanol. Inhalační roztoky je možno podávat pomocí obvyklých inhalátorů. Nové sloučeniny se též mohou lyofilizovat a získaných lyofilizátů se například může používat pro výrobu injekčních přípravků. Injekční přípravky se mohou podávat ve formě bolu nebo ve formě kontinuální infuze (například intravenózně, intramuskulárně, subkutánně nebo intratekálně). Uvedené přípravky se mohou sterilizovat a/nebo mísit s pomocnými látkami, jako jsou konzervační činidla, stabilizátory a/nebo smáčedla, emulgátory, soli pro ovlivnění osmotického tlaku, tlumiče pH, barvicí činidla a/nebo aromatizační činidla. Přípravky mohou obsahovat též jednu nebo více dalších účinných látek, například jeden nebo více vitaminů.

Sloučeniny podle vynálezu se zpravidla podávají podobně jako jiné známé obchodně dostupné peptidy, zejména podobně jako sloučeniny popsané v US-A-4 472 305, přičemž přednostní dávkování leží v rozmezí od asi 0,05 mg do 500 mg,

zejména od 0,5 do 100 mg na dávkovací jednotku. Denní dávka přednostně leží v rozmezí od asi 0,01 do 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Konkrétní dávka pro každého jednotlivého pacienta závisí však na nejrůznějších faktorech, například na účinnosti konkrétně podávané sloučeniny, stáří, tělesné hmotnosti, celkovém zdravotním stavu, pohlaví a stravě pacienta, na době a cestě podávání, rychlosti vylučování, použité kombinaci léčiv a závažnosti léčené choroby, na kterou je léčba orientována. Orální aplikaci se dává přednost.

Ve výše a dále uvedeném popisu jsou všechny teploty uváděny ve stupních Celsia. V dále uvedených příkladech, které mají výhradně ilustrativní charakter a v žádném ohledu neomezují rozsah vynálezu, představuje výraz "obvyklé zpracování" následující postup: Pokud je to zapotřebí, přidá se ke směsi voda, směs se neutralizuje a extrahuje dichlormethanem, organická fáze se oddělí, vysuší síranem sodným, přefiltruje a odpaří a zbytek se přečistí chromatografií na silikagelu a/nebo krystalizací. Pod výrazem "obvyklé přečištění" se rozumí následující postup: peptid se vysráží ze směsi kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu diethyletherem a potom se podrobí gelové filtraci ve vodném pufru a/nebo chromatografií na ionexu. RZ = retenční doba (v minutách) při HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie) na náplni kolony Lichrosorb RP^(R) select B (250-4,7 mm), za použití této mobilní fáze: 0,3% kyselina trifluoroctová ve vodě; s isopropanolovým gradientem 0 až 80 % objemových za 50 min při průtoku 1 ml/min, detekce při 215 nm. M⁺ = molekulární maximum ve hmotnostním spektru se získá metodou FAB (Fast Atom Bombardment) a zpravidla představuje M⁺+ H, tj. hmotnost příslušné sloučeniny zvětšenou o jednu hmotnostní jednotku. Výrazem "DMPP-pryskyřice" se označuje 4-(2',4'-di-methoxyfenylhydroxymethyl)fenoxyllová pryskyřice, což je pryskyřice vysoce labilní v kyselém

prostředí, která umožňuje syntézu peptidů s chráněným postranním řetězcem.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

0,6 mg Fmoc-Pro-OH se rozpustí ve 100 ml dichlor-methanu. Roztok se smíchá s 1,2 ekvivalentu Wangovy pryskyřice a míchá se po dobu 12 hodin při teplotě místnosti. Poté se odstraní rozpouštědlo, čímž se získá Fmoc-Pro-Wangova pryskyřice. V peptidovém syntetizátoru se kondenzuje Fmoc-Cys(Trt)-OH s H-Pro-Wangovou pryskyřicí (uvolnění z Fmoc-Pro-Wangovy pryskyřice se provede pomocí 20% piperidinu v DMF), přičemž se použije chráněného cysteinu v trojnásobném přebytku. Kondenzace se provádí v DCCI/HOBT při teplotě místnosti. Získá se Fmoc-Cys(Trt)-Pro-Wangova pryskyřice, která se nechá opět reagovat s 20% piperidinem v DMF, čímž se získá H-Cys(Trt)-Pro-Wangova pryskyřice.

P ř í k l a d 2

Podobně jako v příkladu 1 se v syntetizátoru peptidů (který pracuje průtočným způsobem) vyrobí produkt Fmoc-Ser(But)-Ala-Gly-OH za použití Fmoc-Gly-DMPP-pryskyřice, jako výchozí látky, kondenzací s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(But)OH a Fmoc-Ile-OH v uvedeném pořadí přičemž se provádějí následující stupně:

- uvolnění H-Gly-DMPP-pryskyřice pomocí 20% piperidinu v DMF
- promytí dimethylacetamidem (DMA),

- reakce s Fmoc-Ala-OH v DCCI/HOBt při teplotě místnosti,
- promytí a zpracování pomocí 20% piperidinu v DMF
- kondenzace vzniklé H-Ala-Gly-DMPP-pryskyřice s Fmoc-Ser(But)-OH,
- promytí a zpracování vzniklé Fmoc-Ser(But)-Ala-Gly-DMPP-pryskyřice směsí kyseliny trifluoroctové, dichlormethanu a vody.

P ř í k l a d 3

Podobně jako v příkladu 2 se získá produkt Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asn(Trt)-OH z výchozí Fmoc-Asn(Trt)-DMPP-pryskyřice po provedení následujícího reakčního postupu:

kondenzace s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí stupňů.

P ř í k l a d 4

Podobně jako v příkladu 2 se z výchozí Fmoc-Asp(OBut)-DMPP-pryskyřice po provedení následujícího reakčního postupu, zahrnujícího

kondenzaci s Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Gly-Asp(OBut)-OH;

kondenzaci s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OBut)-OH;

kondenzací s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Arg(Mtr)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Arg(Mtr)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH; kondenzací s Fmoc-Ala-OH a Fmoc-Ser(But)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Ser(But)-Ala-Asp(OBut)-OH;

kondenzací s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH;

kondenzací s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(But)-OH a Fmoc-Gln(Trt)-OH v uvedeném pořadí, získá Fmoc-Gln(Trt)-Ser(But)-Ala-Asp(OBut)-OH.

P ř í k l a d 5

0,4 g H-Cys(Trt)-Pro-Wangovy pryskyřice se v syntetizátoru peptidů, který pracuje kontinuálním postupem, kondenzuje s Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asn(Trt)-OH, přičemž se použije trojnásobného nadbytku Fmoc-peptidu. Kondenzace se provádí při teplotě místnosti ve směsi DCCI/HOBt. Získá se Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Wangova pryskyřice. Následujícím zpracováním pomocí směsi kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu a odštěpením skupiny Fmoc v systému 20% piperidin/DMF se získá H-Lys-Thr-Ala-Asn-Cys(Trt)-Pro-OH.

Podobně se kondenzací H-Cys(Trt)-Pro-Wangovy pryskyřice

- s Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(Trt)-OH: získá
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH; RZ = 28,9; M+ = 876;
- s Fmoc-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Lys-Ala-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Arg(Mtr)-Thr(But)-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Arg-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Ser(But)-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Ser-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Gln(Trt)-Ser(But)-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Gln-Ser-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;

- s Fmoc-Glp-Ser(But)-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Glp-Ser-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(Trt)-OH získá
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Ile-Ser(But)-Ala-Gly-OH získá
H-Ile-Ser-Ala-Gly-Cys(Trt)-Pro-OH;
- s Fmoc-Arg(Mtr)-Ser(But)-Ala-Gly-OH získá
H-Arg-Ser-Ala-Gly-Cys(Trt)-Pro-OH.
- s Fmoc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Asp(Trt)-OH získá
H-Lys-Gly-Gly-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH.

P ř í k l a d 6

Podobně jako v příkladu 5 se z H-Cys(Trt)-Wangovy pryskyřice kondenzací s Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH, v peptidovém syntetizátoru získá Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Wangova pryskyřice. Následujícím zpracováním tohoto produktu pomocí směsi kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu a odštěpením skupiny Fmoc v systému 20% piperidin/DMF se po obvyklém přečištění získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-OH; RZ = 28,8; M+ = 779.

P ř í k l a d 7

1,2 g Boc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys-Pro-Arg(Mtr)-OH se rozpustí ve směsi 150 ml dichlormethanu a 20 ml DMF, roztok se ochladí na 0°C a smíchá s 0,5 g DCCI, 0,3 g HOBt, 0,23 ml N-methylmorfolinu a jedním ekvivalentem H-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe (oba peptidy lze získat modifikovanou metodou podle Merrifielda). Směs se 20 hodin míchá při 0°C a 6 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se zkoncentruje, zpracuje iontoměničem a přidá se k vočnému roztoku hydrogenuhlíčníanu sodného. Vysrážený produkt se odsaje a promyje vodou. Po překrystalování ze směsi ethylacetátu a petroletheru se získá Boc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe.

Podobným způsobem se kondenzací

BOC-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Cys(Trt)-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe získá BOC-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Cys(Trt)-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(Eut)-OMe;

BOC-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH s H-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OMe získá BOC-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OMe.

P ř í k l a d 8

0,3 g Boc-Thr(But)-Ala-Asp(Obut)-Cys-Pro-Arg(Mtr)-Asn-Trt-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe se

rozpustí ve 30 ml methanolu, roztok se smíchá s 1,5 ml 2N roztoku hydroxidu sodného a směs se 4 hodiny míchá při 25°C. Rozpouštědlo se odstraní a zbytek se vyjme do vody. Hodnota pH se nastaví přidávkem zředěné kyseliny chlorovodíkové na 3 a směs se extrahuje ethylacetátem. Extrakt se vysuší síranem sodným a zbaví rozpouštědla. Získá se Boc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OH, který se vyjme do 20 ml 2N kyseliny chlorovodíkové v dioxanu a směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti. Reakční směs se zkoncentruje do sucha a zbytek se vyjme do směsi kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu. Produkt se srazí diethyletherem a přečistí RP-HPLC. Získá se H-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH; RZ = 12,6; M+ = 1465.

Analogicky se odstraněním chránicích skupin z výchozích sloučenin z příkladu 7 získají tyto sloučeniny:

H-Gly-Lys-Thr-Cys-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH; RZ = 13,1; M+ = 1681;

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH.

P ř í k l a d 9

Podobně jako v příkladu 1 se z výchozí H-Thr(But)-Wang-pryskyřice kondenzací s Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH a Fmoc-Pro-OH v uvedeném pořadí v syntetizátoru peptidů, který pracuje v systému kontinuálního toku, po opakovaném provedení výše uvedených stupňů získá Fmoc-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang-pryskyřice. Z této látky se opakovaným zpracováním pomocí 20% piperidinu v DMF získá H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang-pryskyřice.

P ř í k l a d 1 0

Podobně jako v příkladu 1 se z výchozí H-Gly-Wang-pryskyřice kondenzací s Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH a Fmoc-Pro-OH v uvedeném pořadí vyrobí v syntetizátoru peptidů, který pracuje v systému kontinuálního toku, po opakovaném provedení výše uvedených stupňů Fmoc-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Wangova pryskyřice, z níž se po novém zpracování pomocí 20% piperidinu v DMF získá H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Wangova pryskyřice.

p ř í k l a d 1 1

Podobně jako v příkladu 2 se za použití Fmoc-Asn(Trt)-Wang pryskyřice po provedení odpovídajících reakčních kroků

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH a Fmoc-Ala-OH v uvedeném pořadí získá
das Fmoc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH.

Podobně se z výchozí Fmoc-Asn(Trt)-Wang pryskyřice získá

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí
Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Thr(But)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH a Fmoc-Gly-OH v uvedeném pořadí
Fmoc-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Cys(Trt)-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH,
Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH a Fmoc-Ala-OH v uvedeném
pořadí

Fmoc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH,
Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ala-OH,
Fmoc-Thr(But)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH a Fmoc-Gly-OH
v uvedeném pořadí

Fmoc-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-
Asn(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH,
Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ala-OH a
Fmoc-Thr(But)-OH v uvedeném pořadí

Fmoc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH.

P ř í k l a d 1 2

Jako v příkladu 5 se získá kondenzací H-Pro-His(Trt)-
Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang pryskyřice s Fmoc-Ala-Asp(OBut)-
Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH Fmoc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-
Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-
Wang pryskyřice. Poté se působí směsí

H-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH;
RZ = 25,6; M+ = 1606.

Podobným způsobem se kondenzací

H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang pryskyřice s
Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-
OH získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-
Thr-OH; RZ = 24,6; M+ = 1835;

H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang pryskyřice s Fmoc-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Cys(Trt)-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Gly-Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH; RZ = 30,8; M+ = 2167;

H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Wang pryskyřice s Fmoc-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;
RZ = 24,5; M+ = 1623;

H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-Wang pryskyřice s Fmoc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH;
RZ = 24,9; M+ = 1707.

P ř í k l a d 1 3

Podobně jako v příkladech 7 a 8 se kondenzací a následným zmýdelněním a odštěpením chránicí skupiny BOC

z H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe a Boc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH;
RZ = 13,1; M+ = 1362;

z H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OMe a Boc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH; RZ = 10,6;
M+ = 1094;

z H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OMe a Boc-Gly-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;
RZ = 11,4; M+ = 1380;

z H-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Ala-Thr(But)-OMe a Boc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-OH získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH; RZ = 12,7; M+ = 1592.

P ř í k l a d 1 4

Podobně jako v příkladu 2 za použití Fmoc-Asp(OBut)-DMPP pryskyřice jako výchozí látky po provedení odpovídajících reakčních kroků

kondenzací Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(But)-OH a Fmoc-Lys(Boc)-OH v uvedeném pořadí získá Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH.

Podobně se z výchozí Fmoc-Cys(Trt)-DMPP pryskyřice

kondenzací s Fmoc-Asp(OBut)-OH v uvedeném pořadí získá Fmoc-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Asp(OBut)-OH a Fmoc-Ala-OH v uvedeném pořadí získá Fmoc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH;

kondenzací s Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ala-OH a Fmoc-Thr(But)-OH v uvedeném pořadí získá Fmoc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH.

P ř í k l a d 1 5

Podobně jako v příkladu 1 se z výchozí H-Pro-Wang-pryskyřice kondenzací s Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH v uvedeném pořadí vyrobí

v syntetizátoru peptidů, který pracuje v systému kontinuálního toku, po opakovaném provedení výše uvedených stupňů Fmoc-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-Wangova pryskyřice, z níž se po novém zpracování pomocí 20% piperidinu v DMF získá H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-Wangova pryskyřice.

Podobně se

z Fmoc-Lys(Boc)-Wang pryskyřice kondenzací s Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH v uvedeném pořadí získá

H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Wang-pryskyřice;

z Fmoc-His(Trt)-Wang pryskyřice kondenzací s Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH v uvedeném pořadí získá

H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Wang-pryskyřice;

z Fmoc-Gly-Wang-pryskyřice kondenzací s Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH v uvedeném pořadí, získá

H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Wang-pryskyřice;

z Fmoc-Arg(Mtr)-Wang pryskyřice kondenzací s Pro-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH v uvedeném pořadí získá

H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Wang pryskyřice;

z Fmoc-Ala-Wang pryskyřice kondenzací s Fmoc-Cys(Trt)-OH získá H-Cys(Trt)-Ala-Wang pryskyřice.

P ř í k l a d 1 6

Podobně jako v příkladu 5 se kondenzací Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-Wang-pryskyřice získá Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-Wang-pryskyřice. Následujícím zpracováním pomocí kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu a odštěpením skupiny Fmoc pomocí 20% piperidinu v dimethylformamidu se získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-OH; RZ = 25,4; M+ = 1243.

Podobně se kondenzací

Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Wang pryskyřicí získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-OH;

RZ = 23,6; M+ = 1509;

Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Wang pryskyřicí získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-OH; RZ = 24,3;

M+ = 1380;

Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Wang pryskyřicí získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;

RZ = 23,7; M+ = 1565;

Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mtr)-Wang pryskyřicí získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-OH; RZ = 25,7; M+ = 1032;

Fmoc-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH s H-Pro-Arg(Mtr)-Asn(Trt)-Pro-His(Trt)-Lys(Boc)-Wang pryskyřicí získá

H-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-OH;

Fmoc-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH s H-Pro-Arg(Mtr)-Wang pryskyřicí získá

H-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-OH; RZ = 27,4; M+ = 803;

Fmoc-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-OH s H-Pro-Arg(Mtr)-Wang pryskyřicí získá

H-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-OH; RZ = 27,3; M+ = 904;

Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-Pro-Wang pryskyřicí získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH.

P ř í k l a d 1 7

0,9 g H-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys(Boc)-DMPP-pryskyřice (vyrobené způsobem popsáním v příkladu 1) se rozpustí ve 100 ml dichlormethanu a potom kondenzuje, podobně jako v příkladu 2, s H₃C-CO-Asp-OH a reakční směs se zpracuje. Po novém zavedení skupiny Trt působením trifenylmethanolu se získá H₃C-CO-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-OH; RZ = 26,0; M+ = 1250.

Podobně se

z H-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH mit H₃C-CO-Lys(BOC)-OH získá H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH;

z H-Ser-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH mit H₃CO-Gln(Trt)-OH získá H₃C-CO-Gln-Ser-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH.

P ř í k l a d 1 8

0,7 g Fmoc-Cys(Trt)-Pro-OH rozpustí ve 100 ml dichlormethanu, vzniklý roztok se smíchá s 1,4 ekvivalentu MBHA-pryskyřice, 1,4 ekvivalentu HOBt a 1,4 ekvivalentu DCC a směs se 24 hodin míchá při teplotě místnosti. Po odstranění rozpouštědla se získá Fmoc-Cys(Trt)-Pro-MBHA-pryskyřice. Zpracováním tohoto produktu pomocí 20% piperidinu v dimethylformamidu (1 hodina při teplotě místnosti) se získá H-Cys(Trt)-Pro-MBHA-pryskyřice, která se následně kondenzuje s trojnásobným nadbytkem Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH. Kondenzace se provádí ve směsi DCCI/HOBt při teplotě místnosti. Získá se H-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-Cys(Trt)-Pro-MBHA-pryskyřice.

Výsledná sloučenina se vyjme do 20 ml kyseliny trifluoroctové a směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti. Po obvyklém přečištění se získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-NH₂.

Podobně se reakcí volných peptidů s MBHA-pryskyřicí a následujícím odštěpením pryskyřice získají následující peptidamidy:

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-NH₂;
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-NH₂;
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-NH₂;
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-NH₂;
H-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-NH₂;
H-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-NH₂;
H-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-NH₂;
H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-NH₂.

P ř í k l a d 19

Podobně jako v příkladu 17 se kondenzací H-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-NH₂ s H₃C-CO-Lys(Boc)-OH a následujícím odštěpením skupiny Boc získá H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-NH₂.

H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-NH₂;
H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-NH₂;
H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-NH₂;
H₃C-CO-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-NH₂;
H₃C-CO-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-NH₂.

P ř í k l a d 20

Podobně jako v příkladu 5 se kondenzací Fmoc-Lys(Boc)-Thr(But)-Ala-Asp(OBut)-OH s H-Cys(Trt)-NMeAla-Wangovy pryskyřice získá Fmoc-Lys(Eoc)-Thr(But)-NMeAla-Wangova pryskyřice. Následujícím zpracováním pomocí kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu a odštěpením skupiny Fmoc 20% piperidinem v DMF se získá:

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-NMeAla-OH.

P ř í k l a d 21

0,2 g H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH se rozpustí ve 30 ml dichlormethanu a 30 ml kyseliny trifluoroctové a ke vzniklému roztoku se při teplotě místnosti přidá 1,2 ekvivalentu trifenylmethyl-

alkoholu. Vzniklá směs se 1 hodinu míchá a vzniklý peptid se po zkoncentrování směsi vysráží přidavkem diethyletheru. Po obvyklém zpracování se získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;
RZ = 23,7; M⁺ = 1565.

Podobným způsobem se alkyací H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH

methyljodidem

získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Me)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH; RZ = 9,8; M⁺ = 1338;

methyljodidem

získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Et)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH; RZ = 10,4; M⁺ = 1352;

benzylchloridem

získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Bzl)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH; RZ = 13,8; M⁺ = 1415;

terc.butylchloridem

získá H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(tBu)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH; RZ = 12,3; M⁺ = 1379;

difenylmethylchloridem získá

H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Dpm)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;
RZ = 17,8; M⁺ = 1489.

Následující příklady se týkají farmaceutických přípravků.

P ř í k l a d A

Injekce

Roztok 100 g účinné látky obecného vzorce I a 5 g hydrogenfosforečnanu dvojsodného ve 3 litrech redestilované vody se upraví 2N kyselinou chlorovodíkovou na pH 6,5, sterilizuje filtrací a naplní do injekcí. Injekce se za sterilních podmínek lyofilizují a uzavřou. Každá injekce obsahuje 5 mg účinné látky.

P ř í k l a d B

Čípky

Roztaví se směs 20 g účinné látky obecného vzorce I se 100 g sojového lecithinu a 1 400 g kakaového másla a nalije do forem. Hmota se nechá zchladnout. Každý čípek obsahuje 20 mg účinné látky.

P ř í k l a d C

Roztok

Připraví se roztok 1 g účinné látky obecného vzorce I, 9,38 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 28,48 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného a 0,1 g benzalkoniumchloridu v 940 ml redestilované vody. Hodnota pH roztoku se upraví na 6,8, jeho objem se doplní na 1 litr a roztok se sterilizuje ozářením. Vzniklého roztoku je možno používat ve formě očních kapek.

P ř í k l a d D

Mast

Za aseptických podmínek se smíchá 500 mg účinné látky obecného vzorce I s 99,5 g vaseliny.

P ř í k l a d E

Tablety

Ze směsi 1 kg účinné látky obecného vzorce I, 4 kg laktosy, 1,2 kg bramborového škrobu, 0,2 kg mastku a 0,1 kg stearanu hořečnatého se obvyklým způsobem vylisují tablety. Každá tableta obsahuje 10 mg účinné látky.

P ř í k l a d F

Dražé

Podobně jako v příkladu E se lisováním vyrobí tablety, které se potom obvyklým způsobem potáhnou povlakem ze sacharosy, bramborového škrobu, mastku, tragantu a barviva.

P ř í k l a d G

Kapsle

2 kg účinné látky obecného vzorce I se obvyklým způsobem naplní do kapslí z trvdé želatiny tak, aby každá kapsle obsahovala 20 mg účinné látky.

P ř í k l a d H

Ampule

Roztok 1 kg účinné látky obecného vzorce I v 60 litrech redestilované vody se sterilizuje filtrací a naplní do ampulí. Obsah ampulí se za sterilních podmínek lyofilizuje a ampule se za sterilních podmínek uzavřou. Každá ampule obsahuje 10 mg účinné látky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Lineární peptidy obecného vzorce I



- X představuje atom vodíku nebo skupinu Ac,
- A chybí nebo představuje zbytek Asp nebo peptidový fragment zvolený ze souboru zahrnujícího Ala-Asp, Thr-Ala-Asp, Lys-Thr-Ala-Asp, Lys-Thr-Ala-Asn, Lys-Thr-Gly-Asp, Lys-Ala-Ala-Asp, Arg-Thr-Ala-Asp, Ser-Ala-Asp, Gln-Ser-Ala-Asp, Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp, Ile-Ser-Ala-Gly, Arg-Ser-Ala-Gly, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp; Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp. Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp. Gly-Lys-Thr-Cys-Asp. Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp. Gly-Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp. Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp. Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp.
- B chybí nebo představuje zbytek Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, 4-Hal-Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val nebo N-methylovaný derivát výše uvedeného zbytku aminokyseliny nebo peptidový fragment, který je zvolen ze souboru zahrnujícího Pro-Arg, Pro-Arg-Asn, Pro-Arg-Asn-Pro, Pro-Arg-Asn-Pro-His, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr.

příčemž chybět může pouze jeden ze zbytků A nebo B,

Z představuje hydroxyskupinu, skupinu vzorce OR^2 , aminoskupinu, nebo zbytek vzorce NHR^2 nebo $N(R^2)_2$,

R^1 představuje atom vodíku, R^2 nebo zbytek Trt, Dpm nebo Bzl,

R^2 představuje alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,

Hal představuje atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu a

Ac představuje alkanoylskupinu s 1 až 10 atomy uhlíku, aralkanoyle skupinu s 8 až 10 atomy uhlíku nebo aroylskupinu se 7 až 11 atomy uhlíku,

jakož i jejich fyziologicky nezávadné soli.

2. Lineární peptidy obecného vzorce I podle nároku 1 ve formě enantiomerů nebo diastereomerů.

3. Lineární peptidy obecného vzorce I podle nároku 1, kterými jsou

- (a) H-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH;
- (b) H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr-OH;
- (c) H-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;
- (d) H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-OH;
- (e) H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-OH;

- (f) H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-OH:
- (g) H-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(Trt)-Pro-OH
- (h) H₃C-CO-Asp-Cys(Trt)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-OH.

4. Způsob výroby lineárních peptidů obecného vzorce I podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se tyto sloučeniny uvolní ze svých funkčních derivátů, působením solvolytických nebo hydrogenolytických činidel, nebo že se

peptid obecného vzorce II

X-M-OH

(II)

kde

M představuje zbytek aminokyseliny nebo zbytek peptidu, který je zvolen ze souboru zahrnujícího A, A-Cys(R¹), Ala, Thr, Thr-Ala, Lys, Lys-Thr, Lys-Thr-Ala, Gly-Lys-Thr-Ala-Gly, Gly-Lys, Gly-Lys-Thr, Gly-Lys-Thr-Ala, Gly-Lys-Thr-Cys(R¹), Asn, Asn-Gly, Asn-Gly-Lys, Lys-Ala, Lys-Ala-Ala, Asn-Gly-Lys-Thr, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Cys, Cys-Asn, Cys-Asn-Gly, Arg, Arg-Thr, Arg-Thr-Ala, Ser, Cys-Asn-Gly-Lys, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Ser-Ala, Tyr, Tyr-Cys, Tyr-Cys-Asn, Tyr-Cys-Asn-Gly, Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Gln, Gln-Ser, Gln-Ser-Ala, Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp, Asp-Tyr, Asp-Tyr-Cys, Asp-Tyr-Cys-Asn, Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly, Ile, Ile-Ser, Ile-Ser-Ala, Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr, Arg-Ser, Arg-Ser-Ala, Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp-Asp, Asp-Asp-Tyr, Asp-Asp-Tyr-Cys, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys, Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,

Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Met, Met-Asp, Met-Asp-Asp,
Met-Asp-Asp-Tyr, Met-Asp-Asp-Tyr-Cys, Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly, Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, Asp-Met, Asp-Met-Asp,
Asp-Met-Asp-Asp, Asp-Met-Asp-Asp-Tyr, Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn, Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr,
Asp-Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala, A-Cys(R¹)-Pro,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg, A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn, A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His, A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro,
A-Cys(R¹)-Pro-Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala,

přičemž A a R¹ mají význam uvedený v nároku 1 a

X má výše uvedený význam, přičemž však je rozdílný od
vodíku, pokud A a s ním M, chybí,

nechá reagovat s aminosloučeninou obecného vzorce III



kde

Z má výše uvedený význam a

Q představuje zbytek aminokyseliny nebo zbytek
peptidu, který je zvolen ze souboru zahrnujícího

B, Cys(R¹)-B, Arg-Asn, Arg-Asn-Pro, Asn-Pro, Arg-Asn-Pro-His,

Asn-Pro-His, Pro-His, Arg-Asn-Pro-His-Lys, Asn-Pro-His-Lys,
Pro-His-Lys, His-Lys, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly, Asn-Pro-His-Lys-Gly,
Pro-His-Lys-Gly, His-Lys-Gly, Lys-Gly, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro,
Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro, Pro-His-Lys-Gly-Pro, His-Lys-Gly-Pro,
Lys-Gly-Pro, Gly-Pro, Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala,
Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala, Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala,
His-Lys-Gly-Pro-Ala, Lys-Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Ala, Pro-Ala,
Arg-Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Asn-Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr,
Pro-His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, His-Lys-Gly-Pro-Ala-Thr,
Lys-Gly-Pro-Ala-Thr, Gly-Pro-Ala-Thr, Pro-Ala-Thr, Ala-Thr,
Gly-Asp-Cys(R¹)-B, Thr-Gly-Asp-Cys(R¹)-B, Asp-Cys(R¹)-B,
Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,
Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,
Asn-Cys(R¹)-B, Ala-Asn-Cys(R¹)-B, Thr-Ala-Asn-Cys(R¹)-B,
Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Ala-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,
Ser-Ala-Asp-Cys(R¹)-B, Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,
Gly-Cys(R¹)-B, Ala-Gly-Cys(R¹)-B, Ser-Ala-Gly-Cys(R¹)-B,
Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B, Thr-Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B,
Lys-Thr-Cys(Trt)-Asp-Cys(R¹)-B,
Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B,
Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B oder
Met-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Lys-Thr-Ala-Asp-Cys(R¹)-B

přičemž R¹ má výše uvedený význam,

a/nebo že se alkyluje volná merkaptoskupina, hydroxyskupina
nebo aminoskupina,

a/nebo že se sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1
převeďe působením kyseliny nebo báze na některou ze svých
solí.

5. Způsob výroby farmaceutických přípravků,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se lineární peptid
obecného vzorce I podle nároku 1 a/nebo některá z jeho

fyziologicky vhodných solí převede spolu s alespoň jedním pevným, kapalným nebo polopevným nosičem nebo pomocnou látkou na vhodnou dávkovací formu.

6. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden lineární peptid obecného vzorce I podle nároku 1 a/nebo některou z jeho fyziologicky vhodných solí.

7. Použití lineárních peptidů obecného vzorce I podle nároku 1 nebo jejich fyziologicky vhodných solí pro výrobu léčiv pro potlačování chorob.

8. Lineární peptidy obecného vzorce I podle nároku 1 nebo jejich fyziologicky vhodné soli pro potlačování chorob.

9. Použití lineárních peptidů obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu immobilizovaných ligandů pro afinitní sloupcovou chromatografii.

10. Použití lineárních peptidů obecného vzorce I podle nároku 1 pro čištění integrinů afinitní chromatografií.

MP-1722-94-Ho