



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

202096

(11)

(B2)

/22/ Přihlášeno 21 04 78
/21/ /PV 2580-78/
/32//31//33/ Právo přednosti
od 21 04 77 /789472/
Spojené státy americké

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52
A 61 K 37/02

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 03 83

(72) Autor vynálezu SHIELDS JAMES EDWIN, INDIANAPOLIS /Sp. st. a./

(73) Majitel patentu ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS /Sp. st. a./

(54) Způsob přípravy analogů somatostatinu

Vynález se týká způsobu přípravy tetradeka-peptidu vzorce I

D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH (I)

a jeho farmaceuticky vhodných adičních solí s kyselinami. Vynález se týká též intermediárních sloučenin připravených při syntéze tohoto tetradeka-peptidu

Somatostatin (rovněž známý jako inhibiční faktor uvolňování somatotropinu) je tetradeka-peptid vzorce

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH.

Tento tetradeka-peptid byl izolován z extraktů hypothalamu ovčí a zjistilo se, že je účinný při inhibici sekrece růstového hormonu, rovněž známého jako somatotropin, viz P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. River a R. Guillemin, Science, 179, 77 (1973).

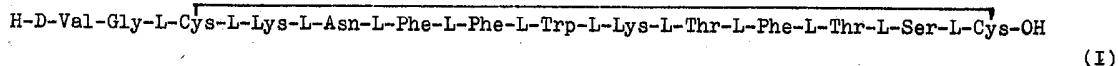
Kromě toho patent USA č. 904 594 uvádí přírodní somatostatin a generickou třídu jiných sloučenin s dideka-peptidovou sekvencí odpovídající polohám 3 až 14 přírodního hormonu.

Sloučenina účelně označovaná jako D-Ala¹-somatostatin byla kromě toho popsána v práci Ferland a další, Molecular and Cellular Endocrinology, 4, 79 až 88 (1976). D-Ala¹-somatostatin, ačkoli je strukturně stereoisomerem přírodního L-Ala¹-somatostatinu, je přibližně polovičně účinný ve srovnání s přírodním somatostatinem při in vivo inhibici sekrece žlučové kyseliny. Sloučenina podle vynálezu, D-Val¹-somatostatin, se liší od D-Ala¹-somatostatinu substitucí dvou vodíkových atomů methylskupinami. Při úvahách o potenciální farma-

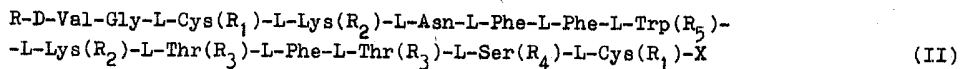
kologické účinnosti D-Val¹-somatostatinu, by se mělo dojít k závěru, že jeho účinnost by měla být podobná jako účinnost D-Ala¹-somatostatinu. Teoreticky by tedy bylo možno předpokládat, že D-Val¹-somatostatin bude méně účinný než přírodní hormon, jako in vivo inhibitor sekrece žaludeční kyseliny. D-Val¹-somatostatin má však účinnost poněkud vyšší než je účinnost přírodního hormonu. Tento výsledek ukazuje, že účinnost D-Val¹-somatostatinu nebylo možno předpokládat na základě srovnání se strukturně podobnými známými sloučeninami.

Struktura biologicky účinného tetradeka-peptidu vzorce I definovaného shora (a jeho netoxických adičních solí) se liší od somatostatinu a příslušných solí přítomností D-valinového zbytku v poloze 1 místo L-alaninového zbytku. Účelně je tetradeka-peptid vzorce I označován jako D-Val¹-somatostatin.

Vynález se tedy týká způsobu přípravy sloučeniny vzorce I



a jejích farmaceuticky vhodných netoxických adičních solí s kyselinami a meziproductů obecného vzorce II

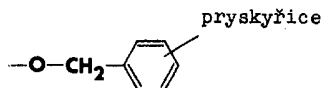


kde

R představuje vodík nebo ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny,
R₁ představuje vodík nebo ochrannou skupinu thioskupiny,
R₂ představuje vodík nebo ochrannou skupinu epsilon-aminoskupiny,

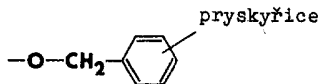
každý ze symbolů

R₃ a R₄ představuje vodík nebo ochrannou skupinu hydroxyskupiny,
R₅ představuje vodík nebo formylskupinu a
X představuje hydroxyskupinu nebo skupinu vzorce



kde pryskyřicí je polystyren, s tou podmínkou, že když

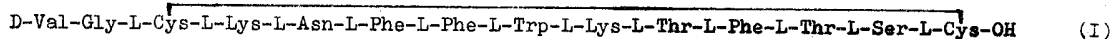
X představuje hydroxyskupinu, každý ze symbolů
R, R₁, R₂, R₃, R₄ a R₅ představuje vodík a když
X představuje zbytek vzorce



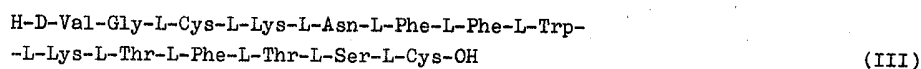
každý ze symbolů

R, R₁, R₂, R₃ a R₄ je odlišný od vodíku.

Nový tetradeka-peptid vzorce I,



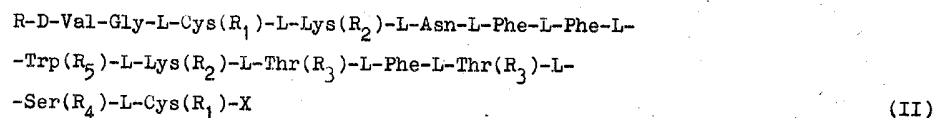
se připravuje reakcí odpovídajícího tetradeka-peptidu obecného vzorce III



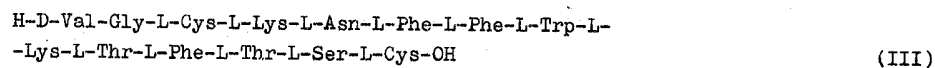
s oxidačním činidlem. Touto reakcí se převedou dvě sulfhydrylové skupiny na disulfidový můstek.

Jako farmaceuticky vhodné netoxické adiční soli s kyselinami přicházejí v úvahu adiční soli s organickými a anorganickými kyselinami, například soli odvozené od kyseliny chlorovodíkové, sírové, sulfonových kyselin, kyseliny vinné, fumarové, bromovodíkové, glykolové, citrónové, maleinové, fosforečné, jantarové, octové, dusičné, benzoové, askorbové, p-toluen-sulfonové, benzensulfonové, naftalensulfonové a propionové. Přednostními adičními solemi s kyselinami jsou acetáty. Adiční soli s kyselinami se připravují běžnými způsoby.

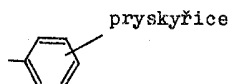
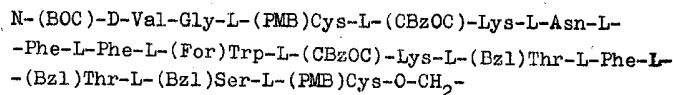
Jako příklady intermediárních sloučenin obecného vzorce II



kterým se dává přednost, lze uvést sloučeninu vzorce III



a sloučeninu vzorce



Shora uvedené vzorce definující intermediární sloučeniny, zahrnují též sloučeniny, obsahující ochranné skupiny amino-, hydroxy- a thio-(sulfhydryl)-skupin. Ochranné skupiny musí mít vlastnosti splňující dvě hlediska. Jednak musí ochranné skupiny zabránit tomu, aby reaktivní seskupení přítomné v určité molekule podlehl reakci během vystavení molekuly podmínkám, které by jinak měly za následek zánik tohoto reaktivního seskupení. Ochranná skupina však musí mít na druhé straně takovou povahu, aby ji bylo možno snadno odštěpit za současné regenerace původní reaktivní skupiny, a to za takových podmínek, které by neměly nežádoucí vliv na jiné části molekuly. Skupiny vhodné k těmto účelům, tj. k ochraně amino-, hydroxy- a thioskupin, jsou odborníkovi dobře známé. Popisu těchto ochranných skupin a jejich použití byly věnovány celé svazky. Jedním z nich je práce *Protective Groups in Organic Chemistry*, red. J. F. W. McOmie, vyd., Plenum Press, New York, 1973.

Ve shora uvedených vzorcích definujících intermediární sloučeniny představuje R buď

alfa-aminický vodík, nebo ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny. Ochranné skupiny aminoskupiny jsou dobře známy všem odborníkům v chemii peptidů a mnohé z nich jsou uvedeny ve shora citované McOmieově práci v kapitole 2, jejímž autorem je J. W. Barton. Jako ilustrativní příklady takových ochranných skupin lze uvést benzyloxykarbonyl-, p-chlorbenzyloxykarbonyl-, p-brombenzyloxykarbonyl-, o-chlorbenzyloxykarbonyl-, 2,6-dichlorbenzyloxykarbonyl-, 2,4-dichlorbenzyloxykarbonyl-, o-brombenzyloxykarbonyl-, p-methoxybenzyloxykarbonyl-, p-nitrobenzyloxykarbonyl-, terc.butyloxykarbonyl-(BOC), t-amyloxykarbonyl-, 2-(p-bifenyl)isopropoxykarbonyl-(BpOC), adamantyloxykarbonyl-, isopropoxykarbonyl-, cyklopentyloxykarbonyl-, cyklohexyloxykarbonyl-, cykloheptyloxykarbonyl-, trifenylmethyl-(trityl) a p-toluensulfonylskupinu. Přednostní ochrannou skupinou alfa-aminoskupiny ve významu R je terc.butyloxykarbonylskupina.

R₁ představuje buď atom vodíku, nebo sulfhydrylovou skupinu cysteinu nebo ochrannou skupinu sulfhydrylového substituentu. Mnohé tyto ochranné skupiny jsou popsány v McOmieově práci citované shora v kapitole 7, jejímiž autory jsou R. G. Hickey, V. R. Rao a W. G. Rhodes. Jako ilustrativní příklady těchto ochranných skupin lze uvést p-methoxybenzyl-, benzyl-, p-tolyl-, benzhydryl-, acetamidomethyl-, trityl-, p-nitrobenzyl-, terc.butyl-, isobutyloxymethylskupinu a jakékoliv z velkého počtu tritylových derivátů. Další příklady lze nalézt například v encyklopedii Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, "Synthese von Peptiden", sv. 15/1 a 15/2, (1974), Stuttgart, NSR. Přednostní ochrannou skupinou sulfhydrylskupiny ve významu R₁ je p-methoxybenzylskupina.

R₂ představuje buď vodík na epsilon-aminoskupině lysinového zbytku, nebo vhodnou ochrannou skupinu epsilon-aminoskupiny. Jako ilustrativní příklady mohou sloužit skupiny uvedené shora, jako skupiny vhodné pro ochranu alfa-aminoskupiny. Jako typické skupiny vhodné k tomuto účelu lze uvést benzyloxykarbonyl-, terc.butyloxykarbonyl-, terc.amyloxykarbonyl-, cyklopentyloxykarbonyl-, adamantyloxykarbonyl-, p-methoxybenzyloxykarbonyl-, p-chlorbenzyloxykarbonyl-, p-brombenzyloxykarbonyl-, o-chlorbenzyloxykarbonyl-, 2,6-dichlorbenzyloxykarbonyl-, 2,4-dichlorbenzyloxykarbonyl-, o-brombenzyloxykarbonyl-, p-nitrobenzyloxykarbonyl-, isopropoxykarbonyl-, cyklohexyloxykarbonyl-, cykloheptyloxykarbonyl- a p-toluensulfonylskupinu.

Jak bude zřejmé z dalšího popisu, způsob přípravy tetradekaptidů obecného vzorce I zahrnuje periodické odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny z termální aminokyseliny, přítomné v peptidovém řetězci. Jediným omezením, pokud se týče totožnosti ochranné skupiny epsilon-aminoskupiny lysinového zbytku, spočívá tedy v tom, že ochranná skupina musí mít takovou povahu, aby se neodštěpovala za podmínek používaných pro selektivní odštěpování alfa-aminoskupiny.

Vhodná volba ochranných skupin alfa-amino a epsilon-aminoskupin je pro běžného odborníka v chemii peptidů snadná, je pouze třeba uvážit relativní snadnost, s jakou lze jednotlivé ochranné skupiny odštěpit. Tak například skupiny jako je 2-(p-bifenyl)isopropoxykarbonylskupina (BpOC) a tritylskupina jsou velmi labilní a lze je odštěpovat i v přítomnosti slabé kyseliny. Středně silná kyselina, jako kyselina chlorovodíková, trifluoroctová nebo fluorid boritý v kyselině octové je zapotřebí pro odštěpení jiných skupin, jako terc.butyloxykarbonyl-, terc.amyloxykarbonyl-, adamantyloxykarbonyl-, a p-methoxybenzyloxykarbonylskupiny.

Pro odštěpení jiných ochranných skupin je nutno použít ještě silnějších kyselin, tak například odštěpování benzyloxykarbonyl-, halogenbenzyloxykarbonyl-, p-nitrobenzyloxykarbonyl-, cykloalkoxykarbonyl- a isopropoxykarbonylskupiny vyžaduje silně kyselé podmínky, tj. použití bromovodíku, fluorovodíku nebo trifluoracetátu bromitého v kyselině trifluoroctové. Samozřejmě, že za použití silnějších kyselin se rovněž odštěpí i všechny labilnější skupiny. Při volbě ochranných skupin aminoskupin je tedy třeba zajistit, aby skupina na alfa-aminoskupině byla labilnější než ochranná skupina epsilon-aminoskupiny a podmínky odštěpování musí být selektivní, aby docházelo jen k odštěpování ochranné skupiny alfa-

-aminoskupiny. Přednostní kombinací ochranných skupin vyhovující těmto podmínkám je kombinace o-chlorbenzyloxykarbonyl- nebo cyklopentyloxykarbonylskupiny ve významu R_2 a terc.butyloxykarbonylskupiny jako ochranné skupiny alfa-aminoskupiny používané u každé aminokyseliny adované na řetězec polypeptidu.

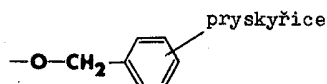
Skupiny R_3 a R_4 představují hydroxylové vodíky nebo ochranné skupiny alkoholické hydroxyskupiny threoninu a serinu. Mnohé takové ochranné skupiny jsou popsány ve shora citované McOmisoově práci, kapitole 3, jejímž autorem je C. B. Reese. Jako typické příklady takových ochranných skupin lze uvést C_1 - C_4 alkylskupiny, jako methyl-, ethyl- a terc.butylskupinu, benzylskupinu, substituovanou benzylskupinu, jako je p-methoxybenzyl-, p-nitrobenzyl-, p-chlorbenzyl- a o-chlorbenzylskupina, C_1 - C_3 alkanoylskupina, jako je formyl-, acetyl- a propionylskupina, trifenylmethylskupinu (tritylskupinu). Když jsou R_3 a R_4 ochranné skupiny, s výhodou se v obou případech jako tyto skupiny volí benzylskupiny.

Skupina R_5 představuje buď vodík, nebo formylskupinu a definuje skupinu



tryptofanového zbytku. Formylskupina slouží jako ochranná skupina. Použití této ochranné skupiny není obligatorní, a proto R_5 může představovat buď vodík (skupina nechráněná na dusíku), nebo formylskupinu (skupina chráněná na dusíku).

Skupina X definuje povahu karboxylové terminální skupiny tetradekapeptidového řetězce. Může jí být hydroxyskupina, a v takovém případě se jedná o volnou karboxyskupinu. Může kromě toho znamenat pevný pryskyřicový nosič, ke kterému je terminální karboxylová skupina peptidu vázána v průběhu jeho syntézy. Zbytek pevné pryskyřice lze znázornit vzorcem



Přitom platí, že vždy, když X představuje hydroxyskupinu, znamená každý ze symbolů R , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 a R_5 vodík. Když X představuje pevný pryskyřičný nosič, představuje každý ze symbolů R , R_1 , R_2 , R_3 a R_4 vždy ochrannou skupinu.

V popisu je používáno následujících zkratk, z nichž většina jsou zkratky v tomto oboru běžně zavedené.

Ala - alanin
 Asn - asparagin
 Cys - cystein
 Gly - glycin
 Lys - lysin
 Phe - fenylalanin
 Ser - serin
 Thr - treonin
 Trp - tryptofan
 Val - valin
 DCC - N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
 DMF - N,N-dimethylformamid
 BOC - terc.butyloxykarbonyl
 PMB - p-methoxybenzyl
 CBzOC - o-chlorbenzyloxykarbonyl
 CPOC - cyklopentyloxykarbonyl

Bzl - benzyl

For - formyl

BpOC - 2-(p-bifenyl)isopropoxykarbonyl

I když volba konkrétních ochranných skupin, kterých se má použít při přípravě sloučenin obecného vzorce I je v rozsahu zkušeností odborníka v syntéze peptidů, je samozřejmé, že sekvence reakcí, které musejí být provedeny, ovlivňuje volbu konkrétních ochranných skupin. Jinými slovy zvolená ochranná skupina musí být stálá jak vůči použitým reakčním složkám, tak za podmínek následujících reakčních stupňů. Tak například, jak již bylo v určitém rozsahu uvedeno, musí zůstat konkrétně použitá ochranná skupina netknuta za podmínek použitých při odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny terminálního zbytku aminokyseliny peptidového fragmentu při přípravě pro kondenzaci následujícího aminokyselinového fragmentu na peptidový řetězec. Je rovněž důležité zvolit jako ochrannou skupinu takovou skupinu, která zůstane netknuta během budování peptidového řetězce a kterou lze snadno odštěpit po skončení syntézy požadovaného tetradeka-peptidového produktu. Všechny tyto faktory jsou však v rozsahu zkušeností odborníka v tomto oboru.

Jak je ze shora uvedené diskuse zřejmé, mohou se tetradeka-peptidy obecného vzorce I připravovat syntézou v pevné fázi. Tato syntéza spočívá v postupném budování peptidového řetězce počínaje na terminálním uhlíkovém konci peptidu. Většinou se postupuje tak, že se nejprve cystein váže prostřednictvím své karboxylové funkční skupiny k pryskyřici, reakcí cysteinu s chráněnou aminoskupinou a chráněnou sulfhydrylovou skupinou s chlormethylovanou nebo hydroxymethylovanou pryskyřicí. Příprava hydroxymethylované pryskyřice je popsána v práci Bodanszky a další, Chem. Ind. (Londýn), 38, 1597 až 1589 (1966). Chlormethylovaná pryskyřice je obchodně dostupná (Lab Systems, Inc., San Mateo, California, USA).

Při provádění vazebné reakce karboxylové funkční skupiny cysteinu a pryskyřice se nejprve chráněný cystein převede na cesnou sůl. Tato sůl se pak nechá reagovat s pryskyřicí způsobem popsaným v práci B. F. Gisin, Helv. Chim. Acta, 56, 1476 (1973). Alternativně se může cystein vázat k pryskyřici tak, že se jeho karboxylová funkční skupina nejprve běžným způsobem aktivuje. Tak například se může nechat cystein reagovat s pryskyřicí v přítomnosti sloučeniny aktivující karboxyskupinu, jako je N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC).

Po navázání volné karboxyskupiny cysteinu na pryskyřičný nosič se začne postupně budovat peptidový řetězec, postupnou kondenzací jednotlivých aminokyselin k N-terminální části peptidového řetězce. Přitom je tedy zapotřebí v každém stupni odštěpit ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny z aminokyseliny v terminální části peptidového fragmentu a pak se připojí k volnému a reaktivnímu N-konci terminální aminokyseliny následující aminokyselinový zbytek. Odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny se může provádět v přítomnosti kyseliny, jako kyseliny bromovodíkové, chlorovodíkové, trifluoroctové, p-toluensulfonové, benzensulfonové, naftalensulfonové a octové za vzniku odpovídající adiční soli produktu s kyselinou.

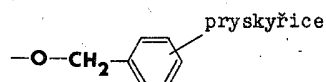
Jinou metodou odštěpování ochranné skupiny aminoskupiny je působení fluoridem boritým. Tak například působením diethyletherátu fluoridu boritého v ledové kyselině octové se fragment peptidu s chráněnou aminoskupinou převede na komplex s fluoridem boritým, který se pak převede na volný peptidový fragment působením zásady, jako vodného hydrogenuhličitanu draselného. Může se použít kterékoli z těchto metod za předpokladu, že se jí dosáhne odštěpení ochranné skupiny N-terminální alfa-aminoskupiny bez porušení jakýchkoli dalších ochranných skupin přítomných v peptidovém řetězci. S ohledem na tento požadavek se přednostně odštěpuje N-terminální ochranná skupina za použití kyseliny trifluoroctové. Obvykle se štěpení provádí při teplotě od asi 0 °C do asi teploty místnosti.

Po odštěpení ochranné skupiny v N-terminální poloze je získaný produkt obvykle ve formě adiční soli s kyselinou, které bylo použito pro odštěpování ochranné skupiny. Tento produkt se pak může převést na sloučeninu s volnou aminoskupinou působením slabé zásady, ty-

pícky terciárního aminu, jako pyridinu nebo triethylaminu.

Nyní je řetězec peptidu připraven pro reakci s následující aminokyselinou. Reakce s aminokyselinou se může provádět kteroukoli z několika známých technik. Pro připojování následující aminokyseliny k N-konci řetězce peptidu se používá aminokyseliny, která má volnou karboxyskupinu, ale která má vhodně chráněnou alfa-aminoskupinu a všechny ostatní popřípadě přítomné reaktivní skupiny. Aminokyselinu je pro reakci s N-koncem řetězce peptidu třeba aktivovat. Jedním ze způsobů aktivace, kterého lze při syntéze použít, je převedení aminokyseliny na směsný anhydrid. Přitom se volná karboxylová funkční skupina aminokyseliny aktivuje reakcí s jinou kyselinou, typicky s derivátem kyseliny uhličitě ve formě chloridu kyseliny. Jako příklady takových chloridů kyselin, kterých lze použít pro tvorbu směsných anhydridů, lze uvést ethylchlorformiát, fenylochloformiát, sek.butylochloformiát, isobutylochloformiát a pivaloylochloformiát.

Jiným způsobem aktivace karboxylové funkční skupiny aminokyseliny pro kondenzaci s řetězcem peptidu, je převedení aminokyseliny na reaktivní esterový derivát. Jako příklady takových reaktivních esterů lze uvést 2,4,5-trichlorfenylester, pentachlorfenylester, p-nitrofenylester, ester vzniklý z 1-hydroxybenzotriazolu a ester vzniklý z N-hydroxysukcinimidu. Jiným způsobem připojování C-terminální části aminokyseliny k peptidovému fragmentu je způsob, při kterém se kondenzace provádí v přítomnosti alespoň ekvimolárního množství N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC). Posledně uvedeného způsobu se přednostně používá při přípravě tetradekapeptidu obecného vzorce II, kde X představuje skupinu vzorce



Po připravení řetězce peptidu s požadovaným sledem aminokyselin se může výsledný peptid odstranit z pryskyřičného nosiče. To se provádí působením fluorovodíku na tetradekapeptid vázaný k pryskyřici s chráněnými reaktivními skupinami. Působením fluorovodíku se odštěpí peptid od pryskyřice, kromě toho se jím však odštěpí všechny ostatní ochranné skupiny přítomné na reaktivních skupinách peptidového řetězce, stejně tak jako ochranná skupina alfa-aminoskupiny terminální aminokyseliny. Když se peptid odštěpuje od pryskyřice za současného odštěpení ochranných skupin působením fluorovodíku, přednostně se reakce provádí v přítomnosti anisolu. Zjistilo se, že přítomnost anisolu inhibuje potenciální alkylaci určitých zbytků aminokyselin přítomných v řetězci peptidu. Kromě toho se odštěpování přednostně provádí v přítomnosti ethylmerkaptanu. Ethylmerkaptan slouží k ochraně indolového kruhu tryptofanového zbytku a kromě toho usnadňuje převedení chráněných cysteinových zbytků do thiolové formy. Rovněž v případě, že R_5 představuje formylskupinu, usnadňuje přítomnost ethylmerkaptanu odštěpení formylskupiny fluorovodíkem.

Po shora popsaném štěpení se získá jako produkt peptid s přímým řetězcem obsahujícím 14 zbytků aminokyselin. Pro získání konečného produktu obecného vzorce I je zapotřebí oxidovat tetradekapeptid s přímým řetězcem za takových podmínek, za kterých se sulfhydrylové skupiny přítomné v molekule po jedné na každém zbytku cysteinu zoxiduují za vzniku disulfidového můstku. Oxidace se může provést tak, že se na zředěný roztok lineárního tetradekapeptidu působí některým z řady oxidačních činidel, jako je například jód a ferrikyanid draselný. Jako oxidačního činidla lze též použít vzduchu, přičemž pH směsi se obvykle udržuje od asi 2,5 do asi 9,0, přednostně od asi 6,2 do asi 7,2. Když se jako oxidačního činidla používá vzduchu, bývá koncentrace roztoku peptidu obvykle nižší než asi 0,4 mg peptidu/ml roztoku a obvykle asi 50 $\mu\text{g/ml}$.

Sloučeniny obecného vzorce I se mohou podávat teplokrevným živočichům, včetně lidem kterýmkoli z těchto způsobů: orálně, sublinguálně, subkutánně, intramuskulárně, intravenózně i jinými způsoby. Všechny tyto sloučeniny jsou rovněž účinné, i když ne vždy ve stejné

míře, jako inhibitory uvolňování růstového hormonu. Tento inhibiční účinek je prospěšný v těch případech, kdy je žádoucí léčit nadměrnou sekreci somatotropinu. Nadměrná sekrece somatotropinu může být spojena s nepříznivými poruchami, jako je juvenilní diabetes a akromegalie. Tyto sloučeniny mají rovněž jiné fyziologické účinky, jako je inhibice sekrece žaludeční kyseliny, užitečná při léčení vředů, inhibice exokrinní sekrece pankreatu, potenciálně užitečná při léčení pankreatitidy a inhibice sekrece inzulínu a glukagonu a snížení pohyblivosti střev, což je užitečné v gastrointestinální radiologii.

Rozmezí dávkování při sublinguálním nebo orálním podávání je přednostně asi 1 mg až asi 100 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Dávkování při intravenózním, subkutánním nebo intramuskulárním podávání je v rozmezí od asi 10 μ g do asi 1 mg/kg tělesné hmotnosti za den a přednostně od asi 50 μ g do asi 100 μ g/kg tělesné hmotnosti za den. Je samozřejmé, že dávkovací rozmezí je ve velké míře závislé na konkrétní léčené poruše a na její prudkosti.

Sloučeniny obecného vzorce I se mohou podávat orálně nebo sublinguálně ve spojení s farmaceutickým nosičem, například ve formě tablet nebo kapslí. Jako farmaceutických nosičů se používá běžných inertních ředidel a nosičů, jako například uhličitany hořečnatého nebo laktózy ve spojení s běžnými desintegračními činidly, například kukuřičným škrobem a alginovou kyselinou a lubrikačními činidly, například stearanem hořečnatým. Typicky je množství nosiče nebo ředidla v rozmezí od asi 5 do asi 95 %, vztaheno na konečný preparát a přednostně od asi 50 do asi 85 %, vztaheno na konečný preparát. Do konečného preparátu se též mohou přidat vhodné ochucovací přísady zlepšující chuť dávkovacích forem.

Když se mají sloučeniny obecného vzorce I podávat intravenózně, může se jako vhodných nosičů použít například isotonického roztoku chloridu sodného a roztoků fosfátových pufrů.

Následující příklady blíže objasňují přípravu sloučenin obecného vzorce I a meziproduktů. Příklady mají pouze ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném směru neomezují.

P ř í k l a d

Oxidace na D-Val¹-somatostatín

Roztok redukováného D-Val¹-somatostatínu (374 ml, teoreticky 175 mg) se zředí 147 ml 0,2 M kyseliny octové a 2 967 ml destilované vody na koncentraci 50 μ g/ml. Přidá se koncentrovaný hydroxid amonný, aby se pH směsi nastavilo na 6,7. Roztok se míchá při teplotě místnosti ve tmě po dobu 64 hodin a pak se zjistí Ellmanovou titrací, že oxidace je skončena.

Směs se za vakua zkoncentruje na objem asi 10 ml a přidá se 10 ml ledové kyseliny octové. Směs se odsolí na sloupci Sephadexu G-25F. Chromatografie se provádí za těchto podmínek:

rozpuštědlo:	odplyněná 50% kyselina octová,
rozměr sloupce:	50 x 900 mm,
teplota:	26 °C,
rychlost toku:	246 ml/h a
objem frakce:	16,4 ml.

Absorbance při 280 nm každé frakce se vynese oproti pořadí frakce do grafu. Získaná křivka obsahuje dvě velká maxima. První maximum je tvořeno agregovanými formami produktu a druhé maximum tvoří monomerní produkt. Látka odpovídající druhému maximu se shromáždí [(frakce 49 až 64 (787 až 1 050 ml)], a roztok se ve tmě lyofilizuje do sucha. Výsledná pevná látka se rozpustí v 15 ml odplyněné 0,2 M kyseliny octové a nanese na sloupec Sephadexu G-25F. Chromatografie se provádí za těchto podmínek:

rozpuštědlo:	odplyněná 0,2 M kyselina octová,
rozměry sloupce:	50 x 1 500 mm,
teplota:	26 °C,
rychlost toku:	475 ml/h a
objem frakce:	16,6 ml.

Absorbance při 280 nm každé frakce se vynese do grafu oproti pořadí frakce. Získaná křivka obsahuje jedno velké maximum. UV-spektroskopie ukazuje, že hlavní část maxima je tvořena produktem. Spojí se frakce 157 až 172 (od 2 590 do 2 855 ml eluátu, maximum odpovídá 2 667 ml proteklého eluátu) a ve tmě lyofilizující do sucha. UV-spektroskopie ukazuje, že výtěžek je 95 mg požadovaného (výtěžek vztažený na redukovanou formu 54,3 %).

Část výsledného produktu se rozpustí v 5 ml 50% kyseliny octové a znovu chromatografuje na sloupci Sephadexu G-25F. Chromatografie se provádí za těchto podmínek:

rozpouštědlo: odplynněná 50% kyselina octová,
 rozměry sloupce: 25 x 1 800 mm,
 teplota: 26 °C,
 rychlost toku: 53,2 ml/h a
 objem frakce: 8,87 ml.

Absorbance při 290 nm každé frakce se vynese do grafu oproti pořadí frakce. Získaná křivka obsahuje jedno velké maximum. UV-spektroskopie ukazuje, že hlavní část maxima je tvořena produktem. Spojí se frakce 56 až 60 (488 až 532 ml, maximum = 505 ml) a ve tmě lyofilizují do sucha.

Optická otáčivost $[\alpha]_D^{26} = -42,1$ (1% kyselina octová).

Analýza aminokyselin:

Val 0,98, Gly 1,01, 2Cys 1,81, 2Lys 1,99, Asn 0,95, 3Phe 2,94, Trp 0,80, 2Thr 1,91, Ser 0,85.

Shora uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako poměry vzhledem k $(\text{Gly} + \text{Lys})/3 = 1,0$. Provádějí se tři 2hodinové hydrolýzy:

1. v přítomnosti dimethylsulfoxidu, aby se cystein oxidoval na cysteovou kyselinu,
2. za použití kyseliny thioglykolové, jako akceptoru,
3. bez akceptoru a bez oxidačního činidla.

Všechny uvedené hodnoty jsou průměry z těchto tří hydrolýz s výjimkou

Cys a Ser - průměr pouze z hydrolýz 1. a 3.

Trp - hodnota pouze z hydrolýzy 2.

Phe - průměr pouze z hydrolýz 2. a 3.

D-Val¹-somatostatin byl zkoušen na psech, jakožto činidlo pro "in vivo" inhibici sekrece žaludeční kyseliny. Šesti psům s chronickým píštělem a Heidenhainovým váčkem se vyvolá sekrece žaludeční kyseliny chlorovodíkové infúzí C-terminálního tetrapeptidu gastrinu při dávkování 0,5 $\mu\text{g/kg.h.}$ Každý pes slouží sám sobě rovněž pro kontrolu. Při kontrolním pokuse se jeden den podává pouze tetrapeptid. Jiný den se šesti psům podává tetrapeptid a po jedné hodině sekrece kyseliny chlorovodíkové v ustáleném stavu se 1 hodinu zavádí infuze D-Val¹-somatostatinu v dávce 0,75 $\mu\text{g/kg.h.}$ Pokračuje se v odeírání vzorků žaludeční kyseliny po dalších 1,5 hodin při intervalu odběru 15 minut.

Vzorky se v automatickém titrátoru titrují na pH 7. Maximální inhibiční účinek D-Val¹-somatostatinu se extrapoluje proti křivce dávka-odezva somatostatinu a relativní účinnost analogu vůči účinnosti somatostatinu se vyjádří jako % aktivity. D-Val¹-somatostatin inhibuje ustálenou sekreci žaludeční kyseliny, vyvolanou C-terminálním tetrapeptidem gastrinem z $85,1 \pm 6,0$ % (standardní střední chyba měření). Tento účinek je ekvivalentní účinku 0,935 $\mu\text{g/kg.h}$ somatostatinu. Relativní aktivita této látky vůči somatostatinu je tedy 125 %.

D-Val¹-somatostatin byl rovněž zkoušen na účinek při snižování pohyblivosti střev psů při vědomí. Jako zkušebních zvířat se používá tři psů se zavedenými intralumenárními katetry umístěnými v antru, duodenu a pyloru. Tlakové změny v lumeni střeva se zaznamenávají v zařízení Visicorder za použití měřičů napětí a miniaturních galvanometrů se světelným paprskem.

Po ustavení ustáleného stavu se psům infúzí podává intravenózně po dobu 10 minut zkušební sloučenina. Zkušební sloučenina zpočátku zvyšuje intralumenární tlak v pyloru a pak ho snižuje, zatímco tlak v duodenu a antru zůstává během zkoušky snížen. Nejnižší účinná dávka nutná pro zvýšení tlaku v pyloru a snížení tlaku v duodenu a antru je nižší než 0,125 $\mu\text{g/kg}$. 10 min. Odpovídající hodnota pro samotný somatostatin je 0,125 až 0,25 $\mu\text{g/kg}$. 10 min.

D-Val¹-somatostatin byl rovněž zkoušen, pokud se týče jeho účinku, na inhibici sekrece pankreasu. Pokus byl prováděn takto: Třem psům, kteří mají jak pankreatickou, tak úplnou žaludeční píštěl, se infúzí sekretinu v dávce 2 jednotky/kg.h a cholecystokininu v dávce 0,45 jednotek/kg.h vyvolá sekrece pankreasu a infúzí tetragastrinu v dávce 0,5 $\mu\text{g/kg}$.h vyvolá sekrece žaludeční kyseliny chlorovodíkové. Poté, co je odezva v ustáleném stavu, se každému psu podává po dobu 1 hodiny D-Val¹-somatostatin v dávce 0,75 $\mu\text{g/kg}$.h. Maximální inhibiční účinek, vyjádřený jako procentuální změna vůči kontrolnímu pokusu pro všechny protein je -51 %.

D-Val¹-somatostatin byl rovněž zkoušen, pokud se týče účinnosti, na uvolňování růstového hormonu. Použitý postup se prováděl za použití normálních samců krys Sprague-Dawley o hmotnosti 100 až 120 g (Laboratory Supply Company, Indianapolis, Indiana). Zkouška je modifikací metody P. Brazeau, W. Vale a R. Guilleman, *Endocrinology*, 94, 184 (1974).

Při zkoušce se použije celkem pět skupin po osmi kryších pro zkoušení každé sloučeniny. Pro stimulaci sekrece růstového hormonu se všem krysám intraperitoneálně podá pentobarbital sodný. Jedna skupina slouží jako kontrolní a dostává pouze roztok soli. Zvířatům ze dvou skupin se subkutánně podá somatostatin, a to zvířatům z jedné skupiny v dávce 2 $\mu\text{g/zvíře}$ a zvířatům z druhé skupiny v dávce 50 $\mu\text{g/zvíře}$. Zvířatům ze zbývajících dvou skupin se subkutánně podá zkoušená sloučenina, a to zvířatům z jedné skupiny v dávce 2 $\mu\text{g/zvíře}$ a zvířatům z druhé skupiny v dávce 50 $\mu\text{g/zvíře}$.

Koncentrace růstového hormonu v séru se měří 20 minut po simultánním podání pentobarbitalu sodného a zkoušené sloučeniny. Určí se stupeň inhibice koncentrace růstového hormonu v séru vzhledem ke kontrolní skupině a relativní účinnost D-Val¹-somatostatinu vzhledem k samotnému somatostatinu.

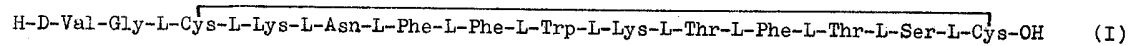
Při dávce 2 $\mu\text{g/krysu}$ inhibuje D-Val¹-somatostatin zvýšení sekrece růstového hormonu o 2 % ve srovnání s kontrolním pokusem, zatímco somatostatin způsobuje 44% inhibici. Při dávce 50 $\mu\text{g/krysu}$ D-Val¹-somatostatin inhibuje zvýšení sekrece růstového hormonu o 73 % ve srovnání s kontrolním pokusem, zatímco samotný somatostatin způsobuje 79% inhibici.

D-Val¹-somatostatin byl rovněž zkoušen na účinnost "in vivo" při inhibici sekrece glukagonu a insulinu po stimulaci L-alaninem. Běžní nečistokrevní psi obojího pohlaví se nechají přes noc bez potravy. Odeberou se kontrolní vzorky krve a pak se zahájí intravenózní infúze solného roztoku obsahujícího somatostatin nebo zkoušenou sloučeninu. Po 30 minutách se navíc intravenózně po dobu 15 minut podává L-alanin. V infúzi solného roztoku obsahujícího somatostatin nebo zkoušenou sloučeninu se pokračuje po dobu 15 minut po skončení podávání L-alaninové infúze.

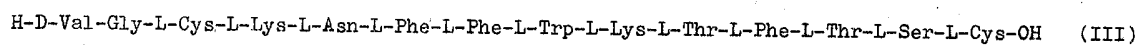
Infúze L-alaninu způsobí náhlé zvýšení koncentrace glukagonu a insulinu v séru, která se vrátí na kontrolní koncentraci po skončení infúze L-alaninu. Tímto postupem se zjistilo, že minimální dávka D-Val¹-somatostatinu na inhibici glukagonu je 0,06 až 0,11 $\mu\text{g/kg/min}$, a pro inhibici insulinu 0,006 až 0,03 $\mu\text{g/kg/min}$, zatímco minimální dávka somatostatinu pro inhibici glukagonu je 0,10 až 0,12 $\mu\text{g/kg/min}$ a pro inhibici insulinu 0,03 až 0,10 $\mu\text{g/kg/min}$.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy analogů somatostatinu vzorce I



a jejich farmaceuticky vhodných netoxických adičních solí s kyselinami, vyznačený tím, že se odpovídající tetradeka-peptid s přímým řetězcem obecného vzorce III



nechá reagovat s oxidačním činidlem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako oxidačního činidla používá vzduchu.