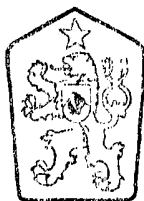


POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

262407
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 23 03 82
(21) [PV 2017-82]
(32) (31) (33) Právo přednosti od 24 03 81
[247008] Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 15 07 89

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 1/00
//A 61 K 37/02

(72) Autor vynálezu MANNING MAURICE, TOLEDO, OHIO, SAWYER WILBUR
HENDERSON, SCARSDALE, NEW YORK (Sp. st. a.)

(73) Majitel patentu MEDICAL COLLEGE OF OHIO, TOLEDO, OHIO THE TRUSTEES
OF COLUMBIA UNIVERSITY, NEW YORK, NEW YORK (Sp. st. a.)

1/2 odst. 29 odst.)

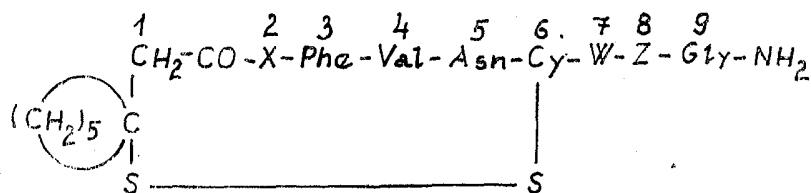
(54) Způsob výroby peptidů

1

Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů s antagonistickým účinkem vůči anti-

2

diuretickému působení argininvasopresinu, obecného vzorce



ve kterém

X značí Tyr-X', Tyr- je D- nebo L-, X' značí methylovou, ethylovou, n-propylovou, isopropylovou nebo butylovou skupinu,

W značí Pro nebo Δ³-Pro a

Z značí L- nebo D-Arg.

Sloučeniny, kde X značí D-Tyr(X') a X' značí vodík nebo X značí D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Arg, D-norvalin, D-norleucin, D-cyklohexylalanin, D-α-aminomáselnou kyselinu, D-theronin nebo D-methionin, W- značí Pro a Z- značí D- nebo L-Arg, působí rovněž jako antagonisté antidiuretické účinnosti argininvasopresinu. Příbuzné sloučeniny, kde X' značí vodík, methylovou nebo ethylovou skupinu, W značí Pro a Val- v poloze

4 je nahrazen Gln- mají antivasopresorický účinek proti arginin vasopresinu.

Vynález se týká způsobu výroby nových peptidů, které antagonizují antidiuretické a/nebo vasopresorické působení argininvasopresinu in vivo.

Pokusy nalézt klinicky použitelné syntetické antagonisty s antidiuretickou a/nebo vasopresorickým účinkem in vivo proti argininvasopresinu, antidiuretickému hormonu (ADH), vedly k syntéze a farmakologickému hodnocení stovek analogů neurohypofyzálních peptidů, oxytocinu a vasopresinu.

Analogy, která mohou efektivně antagonizovat in vivo vasopresorickou reakci na ADH, jsou uvedena v pracích, jejichž autorem je Dyckes se spol., v časopise:

J. Med. Chem., roč. 17 (1974), str. 250; Manningem se spol.,

J. Med. Chem., roč. 20 (1977), str. 1228; Bankowskim se spol.,

J. Med. Chem., roč. (1978), str. 850; Kruszynskim se spol.,

J. Med. Chem., roč. 23 (1980), str. 364 a Lowbridgem se spol.,

J. Med. Chem., roč. 21 (1978), str. 313, na které se zde odkazuje.

Kruszynski se spol. uvedl, že $[-(\beta\text{-merkaptop-}\beta,\beta\text{-cyklopentamethylenpropionová kyselina}), 2\text{-(O-methyl-tyrosin)argininvasopresin a } [1\text{-}\beta\text{-merkaptop-}\beta,\beta\text{-cyklopentamethylenpropionová kyselina)]\text{-argininvasopresin}$ jsou účinnými vasopresorickými antagonisty, které mají rovněž velice nízkou antidiuretickou účinnost.

Manning se spol. (1977) popsal syntézu $[1\text{-desaminopeniciliamin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresinu}$ a Lowbridge se spol. syntézu $[1\text{-}(\beta\text{-merkaptop-}\beta,\beta\text{-cyklopentamethylenpropionová kyselina, 4-valin, 8-D-arginin})\text{-vasopresinu}]$. Obě tyto sloučeniny mají slabou antidiuretickou účinnost a jsou mohutnými antagonisty vasopresorické reakce AVP.

Analoga vasopresinu nebo oxytocinu, která antagonizují antidiuretickou reakci ADH byla popsána Chanem se spol., Science, sv. 161 (1968), str. 280 a J. Pharmacol. Exp. Ther., sv. 174 (1970), str. 541 a sv. 196 (1976), str. 746; Nestorem se spol., J. Med. Chem. sv. 18 (1975), str. 1022 a Larssonem se spol., J. Med. Chem. sv. 21 (1978), str. 746, na které je zde odkazováno. Žádná z uvedených sloučenin nebyla farmakologicky nebo klinicky použitelná jako antidiuretický antagonist.

Syntéza a hodnocení vasopresinových ana-

log, zahrnujících tyrosin etherifikovaný v poloze 2, valin v poloze 4 a D- nebo L-Arg v poloze 8, které antagonizují antidiuretickou účinnost ADH in vivo, byla popsána Sawyerem se spol., Science, sv. 212 (1981), str. 49 a Manningem se spol., J. Med. Chem., sv. 24 (1981), str. 701, na které je zde odkazováno.

Syntetické vasopresiny byly uvedeny v následujících amerických patentových spisech č.

3 371 080	Boissonnas se spol.,
3 415 805	Siedel se spol.,
3 418 307	Boissonnas se spol.,
3 454 549	Boissonnas se spol.,
3 497 491	Zaoral,
4 148 787	Mulder se spol.

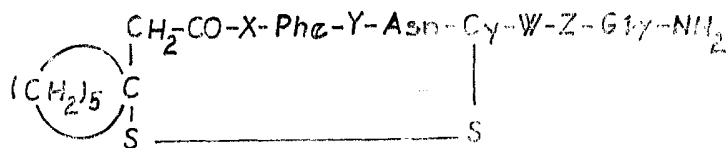
V US patentu č. 3 371 080 Boissonnas a kolektiv uvádějí, že 2-fenylalanin-8-ornitin-vasopresin má vasokonstriční účinek ekvivalentní přirozeným vasopresinům, avšak nízkou antidiuretickou účinnost. Zbývající odkazy popisují syntetické vasopresiny s vysokou nebo relativně specifickou antidiuretickou účinností.

Syntetické modifikace oxytocinu jsou popsány Manningem v amerických patentových spisech č. 3 691 147 a 3 700 652.

Je tudíž zřejmé, že existuje trvalá potřeba vývoje farmakologicky a klinicky účinných antagonistů antidiuretického účinku argininvasopresinu.

Úkolem vynálezu je získat antagonisty antidiuretického účinku ADH, které jsou účinné in vivo. Dalším úkolem je získat antagonisty vasopresorické účinnosti ADH, které mají nízkou antidiuretickou účinnost.

Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů obecného vzorce



kde

X představuje Tyr X', kde X' znamená vodík, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl nebo n-butyl a Tyr je D- nebo L-, D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Arg, D-norvalin, D-norleucin, D-cyklohexylalanin, D- α -aminomáselnou kyselinu, D-threonin nebo D-methionin,

W představuje Pro nebo $\Delta^3\text{-Pro}$,

Z představuje D- nebo L-Arg, a jestliže X značí Tyr-X', pak W značí $\Delta^3\text{-Pro}$, a

Y představuje Val nebo Gln,

vyznačující se tím, že se provádí postupem zahrnujícím tyto po sobě následující stupně:

a) zpracování Boc-Gly-pryskyřice syntézou v pevné fázi o šesti cyklech deprotektace, neutralizace a kopulace s vybranou aminokyselinou za vzniku odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-Phe-Y-Asn-Cy(Bzl)-W-Z(Tos)-Gly-pryskyřice,

v němž

Y, W a Z mají výše uvedený význam,

b) zpracování odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stup

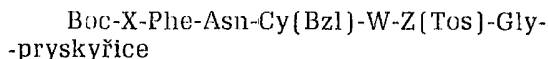
ni a) peptidovou syntézou v pevné fázi v cyklu deprotektace, neutralizace a kopulace se sloučeninou obecného vzorce



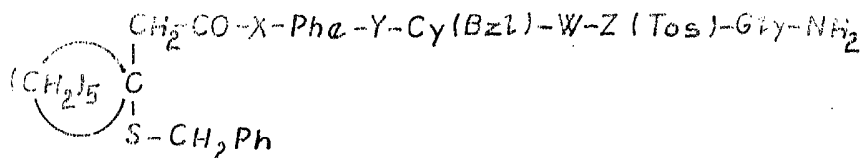
v němž

X má výše uvedený význam,

za vzniku odpovídající terc.butoxykarbonyloktapeptidylové pryskyřice obecného vzorce



v němž



v němž

X, Y, W a Z mají výše uvedené významy, kopulací neutralizovaného, deprotektovaného roztoku odpovídajícího terc.butoxykarbonyloktapeptidového amidu s p-nitrofenyl-β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionátem v přítomnosti monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, a

e) redukcí odpovídajícího β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionyloktapeptidového amidu, vyrobeného ve stupni d), sodíkem v kapalném amoniaku, a oxidační cyklizací vzniklé disulfhydriové sloučeniny ferrikyanidem draselným.

Sloučeniny podle vynálezu je možno používat k antagonistizaci antidiuretického nebo/ a vasopresorického působení ADH a lze jich používat in vivo.

Na obr. 1 jsou uvedeny osmolality moče jako funkce času u krys léčených interperitoneálně sloučeninou podle vynálezu.

Na obr. 2 je uvedeno množství moče jako funkce času u krys léčených sloučeninou podle vynálezu.

Sloučeniny získané způsobem podle vynálezu jsou deriváty argininvasopresinu (AVP). Aminokyseliny, pokud není uvedeno jinak, jsou v L-formě. Korelace mezi úplnými názvy a zkratkami je následující:

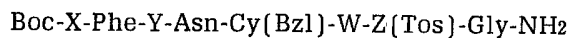
dAVP,

1-desamino-argininvasopresin;

dPAVP,

X, Y, W a Z mají výše uvedené významy,

c) amonolýzu odpovídající chráněné oktapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni b) na odpovídající Boc-oktapeptidový amid obecného vzorce



v němž

X, Y, W a Z mají výše uvedené významy,

d) přeměnu odpovídajícího Boc-oktapeptidového amidu vyrobeného ve stupni c) na odpovídající β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidový amid obecného vzorce

[1-desaminopenicilamin]argininvasopresin;

d(CH₂)₂AVP,

[1-β-merkapt-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina]-argininvasopresin;

dVDAVP,

1-desamino[4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

dPDAVP,

[1-desamino-penicilamin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₂VDAVP,

[1-β-merkapt-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina], 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

dTyr(Me)AVP,

[1-desamino-2-(O-methyl)tyrosin]argininvasopresin;

dPTyr(Me)AVP,

[1-desaminopenicilamin, 2-(O-methyl)-tyrosin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(Me)VDAVP,

[1-β-merkapt-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-O-methyltyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(Et)VDAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-O-ethyltyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(Me)VAPV,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-methyl)tyrosin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(Et)VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-O-ethyltyrosin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(i-Pr)VDAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-isopropyl)tyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(n-Pr)-VDAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-n-propyl)tyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(i-Pr)VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-isopropyl)tyrosin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅Tyr(n-Pr)VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-n-propyl)tyrosin, 4-valin]argininvasopresin, a

d(CH₂)₅Tyr(Et)V-Δ³-Pro⁷-AVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-(O-ethyl)tyrosin, 4-valin, 7-[3,4-dehydroprolin]]argininvasopresin;

d(CH₂)₅-D-Tyr-VDAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-tyrosin, 4-valin, 8-D-argininvasopresin;

d(CH₂)₅D-Tyr-VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-tyrosin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅-D-Phe²VDAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-fenylalanin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin;

d(CH₂)₅D-Phe VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-fenylalanin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅[Gly²]VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-glycin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅-[D-Ala²]VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-alanin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅[D-Val²]VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-valin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅[D-Leu²]VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-leucin, 4-valin]argininvasopresin;

d(CH₂)₅[D-Ile²]VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-isoleucin, 4-valin]argininvasopresin] a

d(CH₂)₅[D-Arg²] VAVP,

[1-(β-merkaptο-β,β-cyklopentamethylen-propionová kyselina), 2-D-arginin, 4-valin]argininvasopresin.

Účinné peptidy byly připraveny syntézou v pevné fázi, jak je popsáno Bankowskim se spol., (1978), výše; Merrifieldem, J. Am. Chem. Soc., sv. 85, 2149 (1963) a Biochemistry, sv. 3 (1964), str. 1385, Mannigem, J. Am. Chem. Soc., sv. 90, 1348, (1968), Mannigem se spol. J. Med. Chem., sv. 19, 376, (1976), Lowbridgem se spol. J. Med. Chem., sv. 20, 1173, (1977), Mannigem se spol., J. Med. Chem., sv. 16, 975 (1973), Kruszynskim se spol., (1980), výše; Sawyerem se spol., (1981), výše nebo Mannigem se spol. (1981), výše.

Peptidy obsahující Δ³-Pro v poloze 7 byly připraveny rovněž tímto způsobem. Inkorporace Δ³-Pro do peptidů byla popsána Felixem se spol., J. Peptide Protein Res., sv. 10 (1977), str. 299 a Botosem se spol., J. Med. Chem., sv. 22 (1979), str. 926.

Počáteční pokusy vytvořit antagonistu anti-diuretické reakce argininvasopresinu (AVP) zahrnovaly syntézu [1-desaminopenicilamin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresinu [dPVDAVP], popsanou výše Mannigem se spol. (1977) a

[1-(β -merkaptob- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina), 4-valin, 8-D-arginin]vasopresinu d(CH₂)₅VDAVP, popsanou Lowbridgem (1978), výše. Tato analoga se vyznačovala náhradou dvou vodíků na β -uhlíku v poloze 1 vysoce aktivního a selektivního antidiuretického peptidu 1-desamino[4-valin, 8-D-arginin]vasopresinu (dVDAVP), popsaného Manningem se spol., J. Med. Chem., sv. 16, 975 (1973), dvěma methylovými skupinami, popř. cyklopentamethylenovou skupinou. Již dříve bylo ukázáno, že tyto skupiny převádějí vysoce účinného oxytoxického antagonistu 1-desaminoxytocin (dOT), v účinného antagonistu oxytocické reakce na oxytocin, specificky (1-desaminopenicilamin)-oxytocin (dPOT) a [1-(β -merkaptob- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina)]oxytocin [d(CH₂)₅OT]. Viz Hope se spol., J. Biol. Chem., sv. 237 (1962), str. 1563, Schulz se spol., J. Med. Chem., sv. 9, (1966), str. 647 a Nestor se spol., J. Med. Chem., sv. 18, (1975), str. 284.

Bylo překvapující, že ani dPVDAVP ani d(CH₂)₅VDAVP nebyly antagonisty antidiuretické reakce na AVP, ačkoliv mají 0,1, resp. pouze 0,0001 antidiuretické aktivity dVDAVP. Každá látka však byla významným antagonistou vasopresorické reakce na AVP, vyjádřené jako pA₂. pA₂ značí negativní logaritmus na bázi 10, a to průměru molárních koncentrací antagonisty, který sníží specifickou biologickou reakci na 2krát jednotek u antagonisty na hladinu reakce x jednotek agonisty. dPVDAVP a d(CH₂)₅VDAVP měly antivasopresorické hodnoty pA₂ 7,82 a 7,68.

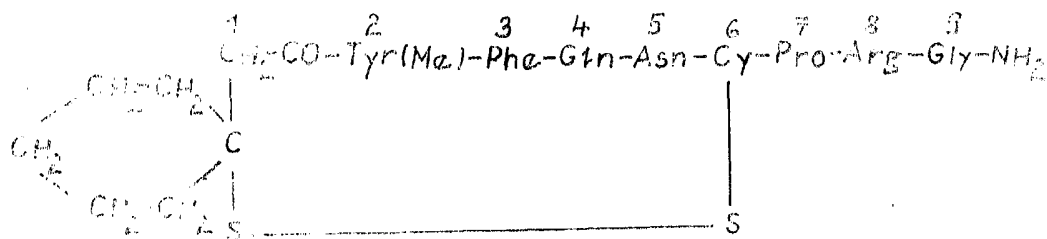
Nález těchto vasopresorických antagonistů dPVDAVP a d(CH₂)₅VDAVP vedl k výzkumu účinků β , β -dimethyl- a β , β -cyklopentamethylenových substitucí v poloze 1 u dalších analog AVP, zejména v kombinaci se substitucí O-methyltyrosinu v poloze 2 vysoce aktivního antidiuretického a vasopresorického agonisty 1-desamino-argininvasopresinu (d-

AVP), v naději na získání antivasopresorického peptidu, dokonce účinnějšího a selektivnějšího než dPVDAVP nebo d(CH₂)₅VDAVP. Viz Huguenin se spol., Helv. Chem. Acta, sv. 49 (1966), str. 695; Manning se spol., J. Med. Chem., sv. 19 (1976), str. 842 a Law se spol., J. Am. Chem. Soc. sv. 82, (1960), str. 4579.

Objev antidiuretických antagonistů d(CH₂)₅Tyr(alk)VAVP Sawyerem se spol., (1981) výše, Manningem se spol., (1981), výše, vedl k syntéze dvouanalogů substituovaných v jiné poloze. Zvýšenou antidiuretickou aktivitu vykazovaly různé O-alkyl-D-tyrosinové analogy, Manning se spol., Peptides, Structure, Function, vyd. Dan H. Rich a E. Gross, Pierce Chemical Co (v tisku) a J. Med. Chem. (předloženo k tisku). Nealkylované D-tyrosinové izomery d(CH₂)₅VDAVP a d(CH₂)₅VAVP, tj. d(CH₂)₅D-Tyr-VDAVP a d(CH₂)₅D-Tyr-VAVP, byly rovněž anti-antidiuretiky. Pokusy zvýšit dále anti-antidiuretickou účinnost a selektivitu vedly k syntéze analog d(CH₂)₅D-Tyr²VAVP a d(CH₂)₅D-Tyr²VDAVP obsahujících jiné D-aminokyseliny namísto D-tyrosinu v poloze 2 podle vynálezu.

S překvapením bylo zjištěno Bankowskim se spol., (1978), výše, že [1-desaminopenicilamin]argininvasopresin (dPAVP) a [1-desaminopenicilamin, 2-(O-methyl)tyrosin]argininvasopresin [dPyr(Me)-AVP], dPAVP, byl méně účinný než dPVDAVP nebo d(CH₂)₅VDAVP, avšak dPyr(Me)AVP měl antivasopresorickou účinnost pA₂ 7,96 a byl neúčinnějším známým antivasopresorickým peptidem.

Vliv kombinace β , β -cyklopentamethylenové a O-methyltyrosinové substituce v dAVP na antivasopresorickou účinnost byl vyvinut ve vynálezu k přípravě [1-(β -merkaptob- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-methyl)tyrosin]argininvasopresinu [d(CH₂)₅Tyr(Me)AVP] obecného vzorce



Tato sloučenina má velmi vysokou antivasopresorickou účinnost a velmi slabou antidiuretickou účinnost jako nemethylovaný 2-tyrosinový derivát d(CH₂)₅AVP.

Sloučeniny získané způsobem podle vynálezu,

které mají účinnost jako antagonisté antidiuretické účinnosti argininvasopresinu patří k sérii 4-valin-8-argininvasopresinu a mají vzorec I



Bylo nalezeno, že některé deriváty $d[(CH_2)_5VAVP]$, mající D-aminokyselinu odlišnou od tyrosinu a větší než alanin v poloze 2, jsou účinnějšími antagonisty antidiuretické účinnosti AVP než sloučeniny mající D- nebo L-tyrosinové etherové jednotky nebo D-tyrosinovou jednotku v poloze 2 $d[(CH_2)_5VAVP]$ nebo $d[(CH_2)_5VDAVP]$.

Výhodnými sloučeninami jsou ty, jejichž substituent v poloze 8 je Arg nebo v poloze 2 je D-Phe, D-Val, D-Leu a D-Ile.

Jak bylo ukázáno pomocí intravenózního podání sloučenin získaných způsobem podle vynálezu normálně hydratovaným bdělým krysám a hydratovaným krysám anestetizovaným ethanolem, sloučeniny mající v poloze 2 D-Phe, D-Val, D-Leu nebo D-Ile jako substituenty, mají vysoké hodnoty pA_2 a účinné dávky blízké nebo nižší než nejnižší zatím známé účinné dávky.

Sloučeniny mající D-Phe, D-Val, D-Leu nebo D-Ile v poloze 2 a Arg v poloze 8, jsou rovněž čistými antidiuretickými antagonisty, tj. tyto sloučeniny nemají přechodný antidiuretický agonismus. Kromě toho, tyto sloučeniny mají selektivnější účinnost v důsledku vysokého poměru anti-ADH antivasopresorické aktivity než známé sloučeniny.

Sloučenin získaných způsobem podle vynálezu lze používat ve směsi s obvyklými pomocnými látkami, tj. fyziologicky a farmaceuticky přijatelnými organickými nebo anorganickými nosiči, vhodnými pro parenterální nebo enterální aplikaci, které nereagují nepříznivě s účinnými látkami.

Vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují, nejsou na ně však omezeny, vodu, roztoky solí, alkoholy, rostlinné oleje, polyethylenglykoly, želatinu, laktózu, amylozu, stearát hořečnatý, talek, silikagel, viskózní parafin, parfémované oleje, monoglyceridy a diglyceridy mastných kyselin, estery pentaerytritu s mastnými kyselinami, hydroxymethylcelulózu, polyvinylpyrrolidon atd.

Farmaceutické přípravky lze sterilizovat a je-li to požadováno, mísit s pomocnými činidly, například s klznými látkami, ochrannými látkami, stabilizátory, smáčedly, emulgačními činidly, solemi, ovlivňujícími osmotický tlak, pufrů, barviv, chuťových a/nebo aromatických látkami a podobně, které nereagují nepříznivě s účinnými látkami.

Pro parenterální nebo intranazální použití jsou vhodné roztoky, s výhodou vodné roztoky, stejně jako suspenze, emulze nebo implantáty, včetně čípků. Ampulky představují vhodné dávkovací jednotky.

Sloučeniny získané způsobem podle vynálezu jsou obecně podávány živočichům, včetně savců, avšak bez omezení na ně, například živému inventáři, domácím zvířatům, lidem, dobytku, kočkám a psům.

Diuretické účinné denní dávky účinných látek lze podávat parenterálně v jedné dávce nebo v rozdělených dávkách během dne.

Výhodné je parenterální a intranazální podání, antidiuretické sloučeniny jsou zejména cenné při léčbě lidí postižených retencí vody jakéhokoliv původu. Z tohoto hlediska je lze podávat v podstatě stejně jako známé sloučeniny oxytocin a vasopresin, aby se docílilo jejich fyziologických účinků.

Lze předpokládat, že aktuální používaná výhodná množství se budou měnit podle specifické látky, které má být použito, přísluš-

né lékové formy přípravků, způsobu podání a jednotlivých organismů, které mají být léčeny. Optimální způsob aplikace za daných podmínek může stanovit odborník za použití testů ke stanovení obvyklého dávkování se zřetelem na výše udané pokyny.

Výhodnými antidiuretickými antagonisty získané způsobem podle vynálezu jsou [1-(β -merkaptobenzyl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-ethyl)tyrosin, 4-valin]-argininvasopresin, nejvýhodnější je sloučenina 8-L-argininu. Výhodnou je i odpovídající sloučenina Δ^3 -Pro⁷.

Jinými výhodnými sloučeninami jsou ty, kde X značí D-Phe, D-Val, D-Leu nebo D-Ile a Z značí L-Arg. Nejvýhodnější je D-Ile nebo D-Phe sloučenina.

Bez dalšího zpracování se předpokládá, že odborník může za použití předchozího popisu využívat tohoto vynálezu v jeho nejširším rozsahu. Následující specifická provedení jsou spíše ilustrativní, avšak nikterak neomezuji rozsah vynálezu. Teploty v následujících příkladech jsou uváděny nekorigované ve stupních Celsia. Pokud není uvedeno jinak, všechny díly a procenta jsou hmotnostní.

Chlormethylovaná pryskyřice (Bio-Rad Bio-Beads SX-1) byla esterifikována způsobem podle Gisina, *Helv. Chim. Acta*, sv. 56, (rok 1973), str. 1476, s Boc-Gly za inkorporace 0,47 mmolu/g a ~0,64 mmolu/g. Deriváty aminokyselin, včetně Boc-Tyr(Me) [R_1 (A) 0,7, R_1 (B) 0,8] pocházely od firmy Bachem Inc., nebo byly syntetizovány.

Triethylamin (TEA) a N-methylmorpholin (NMM) byly destilovány z ninhydrinu.

Kyselina octová používaná ve formě štěpícího činidla kyselina chlorovodíková — kyselina octová, byla zahřívána k teplotě varu s bortriacetátem a oddestilována od činidla. Dimethylformamid (DMF) byl destilován za sníženého tlaku bezprostředně před použitím. Methanol byl sušen methoxidem hořečnatým a destilován. Ostatní rozpouštědla a reakční činidla byla analytické kvality.

Tenkovrstevná chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách se silikagelem (0,25 mm, Brinkmann Silplate) s použitím následujících systémů rozpouštědel:

A. cyklohexan-chloroform-kyselina octová (2 : 8 : 1 obj./obj.),

B. propan-1-ol-amoniak (34%) (2 : 1 obj./obj.),

C. ethanol- (95%) -amoniak (34%) (3 : 1 obj./obj.),

O. chloroform-methanol (7 : 3 obj./obj.),

E. butan-1-ol-kyselina octová — voda (4 :

1 : 6 obj./obj., horní fáze),

F. butan-1-ol-kyselina octová — voda — pyridin (15 : 3 : 3 : 10 obj./obj.).

Použité nanášky byly 10 až 50 μ g. Minimální délka chromatogramů byla 10 cm. K vyvíjení chromatogramů bylo použito chloroplatičitého činidla a jodových par.

Analýza aminokyselin, peptidů byla provádě-

děna metodou podle Spackmana se sp., Anal. Chem., sv. 30 (1958), str. 1190, při které byly hydrolýzovány vzorky peptidů vážící asi 0,5 mg konstantně vroucí kyselinou chlorovodíkovou (400 μ l) v evakuovaných a zatavených ampulích po dobu 18 hodin při teplotě 120 °C. Analýzy byly prováděny za použití Beckmanova automatického analyzátoru aminokyselin, modelu 121. Molární poměry byly vztahovány na Gly = 1,00. Elementární analýzy byly provedeny v Galbraith Laboratories Inc., Knoxville, Tenn. Analytické výsledky pro jednotlivé prvky jsou udávány jejich příslušnými symboly v rozmezí $\pm 0,4$ % teoretických hodnot. Optické otáčivosti byly měřeny na polarimetru model A, typ p1, firmy Bellingham Stanley.

Příklad 1

β -(S-benzylmerkaptó)- β , β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂

(a) Kombinace metody v pevné fázi a v roztoku

319 mg (0,26 mmol) Boc-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂, připraveného způsobem podle Bankowského se sp., J. Med. Chem., sv. 21 (1976), str. 842, bylo rozpuštěno v 6,5 ml TEA a mícháno při teplotě místnosti po dobu 40 minut. 20 ml studeného etheru bylo přidáno za vzniku sraženiny, která byla odfiltrována a promyta 5krát po 10 ml etheru. Produkt byl vysušen ve vakuu nad pevným hydroxidem sodným. 318,5 mg tohoto materiálu bylo rozpuštěno v 0,8 ml dimethylformamidu, ke kterému bylo přidáno 10 μ l N-methylmorpholinu. Vzniklý roztok měl pH 7 až 8 po měření na vlhkém pH-papírku. Potom byl neutralizovaný roztok míchán při teplotě místnosti po dobu 30 minut, byl přidán roztok p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β , β -cyklopentamethylenpropionátu, Nestor se sp., J. Med. Chem., sv. 18 (1975), str. 284, (445 mg, 1,155 mmol v 0,4 ml dimethylformamidu). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti. Po 72 hodinách míchání ukázala tenkovrstevná chromatografie, s použitím systému D, že reakční směs obsahovala ještě stopu volného oktapeptidamidu. Bylo přidáno 39,3 mg (0,26 mmol) monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, König se spol., Chem. Ber., sv. 103 (rok 1970), str. 788. Po uplynutí doby 5 hodin byla reakce skončena. Sraženina byla odfiltrována, promyta studeným ethylacetátem (4 krát po 10 ml) a vysušena ve vakuu. Surový produkt (330 mg) byl přesrážen dvakrát ze směsi dimethylformamid-methanol za vzniku acylpeptidamidu (295,2 mg, 77,3 %); teplota tání 209 až 211 °C;

$[\alpha]_D^{24} = -43,6^\circ$ ($c = 0,5$ DMF);

R_f (E) 0,45, R_f (F) 0,63, elementární analýza pro (C₇₃H₉₄O₁₄S₃) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,80, Phe 1,01, Glu 1,04, Asp 1,02, Cys(Bzl) 0,98, Pro 1,06, Arg 1,01, Gly 1,00, NH₃ 2,91.

(b) Totální syntéza na pryskyřici

Boc-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice (1,11 g, 0,4 mmol, připravená z Boc-Gly-pryskyřice za použití metodiky pevné fáze) byla převedena v acyloktapeptid-pryskyřici (1,167 g, přírůstek hmotnosti 57 mg, 97,6 % teorie) v jednom cyklu s odstraněním chránicí skupiny, neutralizací a kopulací s p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β , β -cyklopentamethylenpropionátem, viz Nestor, výše. Pryskyřice byla amonolýzována, Manning, J. Am. Chem. Soc., sv. 90, (1968), str. 1348. Produkt byl extrahován dimethylformamidem (DMF). Po odpaření rozpouštědla ve vakuu byl zbytek vysrážen přidáním vody. 410 mg surového produktu bylo přesráženo dvakrát ze směsi DMF-ethanol za vzniku acyloktapeptidu (302 miligramy, 50,7 %), vztaženo na počáteční obsah glycinu v pryskyřici; teplota tání 206 až 208 °C (rozklad);

R_f (E) 0,45, R_f (F) 0,63;

$[\alpha]_D^{24} = -43,1^\circ$ ($c = 1$, DMF).

Elementární analýza pro (C₇₃H₉₄N₁₄S₃) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,79, Phe 1,01, Glu 1,03, Asp 1,04 Cys(Bzl) 0,97, Pro 1,03, Arg 0,99, Gly 1,00, NH₃ 2,95.

Příklad 2

β -(S-benzylmerkaptó)- β , β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Bzl)-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂

1,46 g (0,5 mmol) Boc-Tyr(Bzl)-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice bylo převedeno v 1,55 g acyloktapeptidové pryskyřice (hmotnostní přírůstek 70 mg, 95,9 procenta teorie) jako v příkladu 1, v jednom cyklu odstranění ochranných skupin, neutralizace a kopulace s p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β , β -cyklopentamethylenpropionátem. Produkt získaný pomocí amonolýzy pryskyřice byl extrahován dimethylformamidem. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuu a zbytek byl sražen přidáním vody. 723 mg surového produktu bylo přesráženo ze směsi dimethylformamid-ethanol a dimethylforma-

mid = 2% vodná kyselina octová (488 mg, 62,4 %, vztaženo na počáteční obsah Gly v pryskyřici); teplota tání 183 až 185 °C;

R_f (E) 0,38, R_f (D) 0,41;

$[\alpha]_D^{23} = -32,9^\circ$ ($c = 1$ DMF).

Elementární analýza pro (C₇₉H₉₆N₁₄O₁₄S₃) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,97, Phe 1,02, Glu 1,05, Asp 1,01, Cys-(Bzl) 0,98, Pro 1,04, Arg 0,98, Gly 1,00, NH₃.

Příklad 3

[1-(β-merkaptó-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-methyl)-tyrosin]argininvasopresin

(a) z nonapeptidamidu

Roztok 170 mg (0,114 mmolu) chráněného nonapeptidamidu, připraveného jako v příkladu 1, ve 400 ml amoniaku (sušeného nad sodíkem a předestilovaného) byl míchán při teplotě varu se sodíkem z kousku kovu obsaženého v malé skleněné trubičce, až světlemodrá barva roztoku vydržela po dobu 30 sekund, podle du Vigneauda, J. Am. Chem. Soc., sv. 76 (1959), str. 3115. Bylo přidáno 0,4 ml bezvodé kyseliny octové, aby zmizela barva. Roztok byl odpařen. Roztok odparku ve vodné kyselině octové (0,2 %, 800 ml) byl zpracován 2M hydroxidem amonným za vzniku roztoku o hodnotě pH 7,5. K tomuto míchanému roztoku byl přidán postupně nadbytek roztoku ferikyanidu draselného (0,01 M, 11,4 ml), Hope se spol., J. Biol. Chem., sv. 237 (1962), str. 1563. Žlutý roztok byl míchán 90 minut a potom po dobu 1 hodiny s aniontovou pryskyřicí (BioRad AG-3, Cl⁻ forma, 10 g vlhké hmotnosti). Suspenze byla filtrována pomalu ložem pryskyřice (80 g vlhké hmotnosti). Pryskyřice byla promyta 300 ml vodné 0,2% kyseliny octové a spojené filtráty a promývací roztoky byly lyofilizovány. 1 386 mg získaného prášku bylo odsoleno na koloně Sephadex G-15 (110 × 2,7 cm) a eluováno 50% vodnou kyselinou octovou rychlostí 4 ml/h způsobem podle Manninga se spol., J. Chromatog., sv. 38 (1968), str. 396. Eluát byl frakcionován a sledován při absorpenci 280 nm. Frakce obsahující žádané maximum byly shromážděny a lyofilizovány. Zbytek 55,5 mg byl podroben dále gelové filtraci na koloně Sephadexu G-15 (100 × 1,5 cm) a eluován vodnou kyselinou octovou (0,2M) rychlostí 2,5 ml/h. Peptid byl eluován jako jedno maximum (absorbance 280 nm). Lyofilizace příslušných frakcí vedla k vasopresinovému analogu (49 miligramů, 37,3 %);

R_f (E) 0,19, R_f (F) 0,30;

$[\alpha]_D^{22} = -59,6^\circ$ ($c = 0,19$ 1M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,81, Phe 1,01, Glu 1,04, Asp 0,98, Pro 1,04, Arg 0,95, Gly 1,00, NH₃ 3,10.

Analýza používající oxidaci permravenčí kyselinou před hydrolýzou podle Moora, J. Biol. Chem., sv. 238 (1963), str. 235, poskytla poměr Cys(O₃H)-Gly 1,03 : 1,00.

(b) z acyloktapeptidu

Zpracování 160 mg (0,107 mmolu) acyloktapeptidu, popsané v příkladu 3 (a), vedlo k 64 mg (51,7 %) analoga, které se nelišilo od produktu z předchozí preparace pomocí tenkovrstevné chromatografie:

$[\alpha]_D^{23} = -59,1^\circ$ ($c = 0,5$ 1 M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,80, Phe 1,02, Flu 1,02, Asp 0,98, Pro 1,03, Arg 0,96, Gly 1,00, NH₃ 3,05.

Analýza používající oxidaci kyselinou permravenčí před hydrolýzou poskytla poměr Cys(O₃H)-Gly 1,02 : 1,00.

Příklad 4

[1-(β-merkaptó-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina)]argininvasopresin

Reakce 173 mg (0,111 mmolu) acyloktapeptidu popsaného v příkladu 3 (a) poskytla analog (66 mg, 52,5 %);

R_f (E) 0,19, R_f (F) 0,43.

$[\alpha]_D^{23} = -58,7^\circ$ ($c = 0,5$, 1M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,96, Phe 0,98, Glu 1,01, Asp 1,01, Pro 1,05, Gly 1,00, NH₃ 2,95.

Analýza používající oxidaci kyselinou permravenčí před hydrolýzou poskytla poměr Cys(O₃H)-Gly 1,01 : 1,00.

Příklad 5

[1-(β-merkaptó-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-alkyl)-tyrosin, 4-valin]-(L- a D-) argininvasopresin

Sloučeniny z této série byly připraveny technikou syntézy v pevné fázi, modifikovanou Manningem, J. Med. Chem., sv. 16 (rok 1973), str. 975 a Kruszynskim se spol., J.

Med. Chem., sv. 23 (1980), str. 364, za získání chráněných meziproduktů pro každý analog. Bylo použito způsobu podle Bodanszkého se spol., J. Am. Chem. Soc., sv. 81 (1959), str. 5688 a J. Org. Chem., sv. 39 (1974), str. 444, za použití p-nitrofenylesteru a hydroxybenzotriazolu [Konig se spol., výše] ke kopulaci β -(S-benzylmerkaptó- β,β -cyklopentamethylenpropionové kyseliny) podle Nestora, výše, za získání prekurzorů. Každý prekurzor byl zbaven chránicí skupiny (du Vigneaud, výše) sodíkem v tekutém amoniaku. Získané disulfhydrilové sloučeniny byly oxidačně cyklizovány ferrikyanidem draselným [Hope se spol., výše]. Analogy byly odsoledy a čistěny gelovou filtrací na Sephadexu G-15 dvoustupňovým způsobem, používajícím 50% kyselinu octovou a 0,2M kyselinu octovou jako eluční činidla. Čistota a identita každého analogu byla potvrzena tenkovrstevnou chromatografií ve třech různých rozpouštědlových systémech, Kruszynski se spol., J. Med. Chem., sv. 23 (1980), str. 364 a analýzou aminokyselin jako výše.

Boc-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

1,562 g (1,0 mmol Gly) Boc-Gly-pryskyřice bylo podrobeno šesti cyklům deprotektce, neutralizace a kopulace za získání chráněné heptapeptidylové pryskyřice A (2,522 g, 1,0 milimol).

Boc-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

Chráněná heptapeptidylová pryskyřice B (2,522 g, 1,0 mmol) byla připravena z 1,562 gramu (1,0 mmol) Boc-Gly-pryskyřice za použití syntézy v pevné fázi.

Boc-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

Syntéza peptidu v pevné fázi v jediném cyklu s Boc-Tyr(Me) jako karboxylovou složkou převedla heptapeptidylovou pryskyřici A (1,261 g, 0,5 mmol) v odpovídající terc.butyloxykarbonyloktapeptidylovou pryskyřici C (1,35 g, 0,5 mmol).

Boc-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

Heptapeptidylová pryskyřice A (1,261 g, 0,5 mmol) poskytla terc.butyloxykarbonyloktapeptidylovou pryskyřici D (1,357 g, 0,5 milimol) syntézou v pevné fázi v jediném cyklu s Boc-Tyr(Et) jako karboxylovou složkou.

Boc-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

Heptapeptidylová pryskyřice B (1,261 g, 0,5 mmol) bylo převedena v chráněnou ok-

tapeptidylovou pryskyřici E (1,35 g, 0,5 milimol) v jediném cyklu deprotektce, neutralizace a kopulace s Boc-Tyr(Me).

β -(S-benzylmerkaptó- β,β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice

Heptapeptidylová pryskyřice B (1,261 g, 0,5 mmol) byla převedena v acyloktapeptidylovou pryskyřici (1,43 g, 0,5 mmol) při dvoucyklové syntéze v pevné fázi za použití karboxylové složky Boc-Tyr(Et) a p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó- β,β -cyklopentamethylenpropionátu).

Boc-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Chráněná oktapeptidylová pryskyřice C (1,35 gramu, 0,5 mmol) byla amonolyzována a produkt byl extrahován teplým dimethylformamidem. Produkt byl vysrážen přidáním vody. Surový produkt byl přesrážen ze směsi dimethylformamid-ethanol-ethylether za vzniku čistého produktu ve formě bezbarvého prášku (0,581 g, 88,52 %, vztaženo na počáteční obsah Gly v pryskyřici), teplota tání 239 až 240 °C;

$[\alpha]_D^{24} = -14,9^\circ$ (c = -1, DMF);

R_f (E) 0,54, R_f (D) 0,73;

elementární analýza pro: (C₆₃H₈₅N₁₃O₁₄S₂) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 1,02, Phe 0,98, Val 1,02, Asp 1,00, Cys(Bzl) 0,98, Pro 1,01, Arg 0,97, Gly 1,00, NH₃ 2,1.

Boc-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Reakce chráněné oktapeptidylové pryskyřice D (1,357 g, 0,5 mmol) jako vpředu, vedla k Boc-oktapeptidamidu (0,535 g, 80,69 %, vztaženo na počáteční obsah Gly na pryskyřici), teplota tání 211 až 213 °C;

$[\alpha]_D^{24} = -16,4$ (c = 1, dimethylformamid),

R_f (E) 0,61, R_f (D) 0,83.

Elementární analýza pro: (C₆₄H₈₇N₁₃O₁₄S₂) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,99, Phe 1,00, Val 1,01, Asp 1,02, Cys(Bzl) 0,98, Pro 1,00, Arg 0,98, Gly 1,00, NH₃ 2,13.

Boc-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Reakce chráněné oktapeptidové pryskyřice E (1,35 g, 0,5 mmolu) jako vpředu, poskytla příslušný Boc-aktapeptidamid (0,597 gramu), 90,96 %, vztaženo na počáteční obsah Gly na pryskyřici. Teplota tání 216 až 217 °C (rozklad).

$$[\alpha]_D^{24} = -34,82^\circ \quad (c = 1, \text{DMF});$$

R_f (E) 0,54, R_f (D) 0,73.

Elementární analýza pro: (C₆₃H₈₅N₁₃N₁₄S₂)
C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,99, Phe 1,00, Val 1,02, Asp 1,01, Cys-[Bzl] 0,98, Pro 1,01, Arg 0,98, Gly 1,00, NH₃ 2,09.

β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Chráněná acyloktapeptidová pryskyřice (1,43 g, 0,5 mmolu) byla amonolyzována a produkt extrahován horkým DMF. Produkt byl vysrážen přidáním vody. Surový produkt byl přesrážen ze směsi dimethylformamid-ethanol-ethylether za vzniku čistého produktu, (0,490 g, 66,54 %, vztaženo na počáteční obsah glycinu na pryskyřici). Teplota tání 211 až 213 °C;

$$[\alpha]_D^{24} = -39,8^\circ \quad (c = 1, \text{dimethylformamid});$$

R_f (E) 0,59, R_f (D) 0,75.

Analýza pro: (C₇₄H₉₇N₁₃O₁₃S₃) C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,99, Phe 1,01, Val 1,01, Asp 1,01, Cys-[Bzl] 0,99, Pro 1,02, Arg 0,98, Gly 1,00 NH₃ 2,07.

β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-NH₂

0,270 g (0,206 mmolu) terc.butyloxykarbonyloktapeptidamidu připraveného jako vpředu, bylo rozpuštěno ve 3 ml TFA a ponecháno stát při teplotě místnosti po dobu 20 minut. Byl přidán studený ether. Vysrážený materiál byl odfiltrován a promyt 5krát po 10 mililitrech etheru. Produkt byl vysušen ve vakuu nad pevným hydroxidem sodným. 250 miligramů tohoto materiálu bylo rozpuštěno v 0,8 ml dimethylformamidu, ke kterému byl přidán roztok N-methylmorpholinu za vzniku roztoku o hodnotě pH 7 až 8 (vlhký pH-papírek). Neutralizovaný roztok byl míchán při teplotě místnosti po dobu 20 minut. Byl přidán roztok p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionátu (0,135 g, 0,37 mmolu) a 57 mg (0,37 mili-

molu) monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu v 1,0 ml dimethylformamidu. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc a tenkovrstevná chromatografie (systém E) ukázala, že reakce byla skončena. Za intenzivního míchání bylo přidáno 80 ml methanolu a 20 ml etheru. Vysrážený materiál byl odfiltrován, promyt směsí methanol-ether (8:2) a vysušen ve vakuu. Surový produkt (270 mg) byl přesrážen ze směsi dimethylformamid-methanol za vzniku acylpeptidamidu (263 mg, 75,2 %); teplota tání 220 až 221 °C;

$$[\alpha]_D^{24} = -25,7^\circ \quad (c = 1, \text{DMF});$$

R_f (E) 0,55, R_f (D) 0,83.

Elementární analýza pro: (C₇₃H₉₅N₁₃O₁₃S₃)
C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,98, Phe 1,01, Val 1,02, Asp 1,02, Cys-[Bzl] 0,97, Pro 1,03, Arg 1,0, Gly 1,00, NH₃ 2,06.

β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-D-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Terc.butyloxykarbonyloktapeptidamid (0,398 g, 0,3 mmolu) byl zbaven chránicí skupiny a kopulován s p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionátem (0,232 g, 0,6 mmolu), jak popsáno výše, za vzniku acyloktapeptidamidu (0,361 g, 81,67 %); teplota tání 222 až 224 °C;

$$[\alpha]_D^{20} = -22,8^\circ \quad (c = 0,5, \text{DMF});$$

R_f (E) 0,5, R_f (D) 0,83.

Elementární analýza pro: (C₇₄H₉₇N₁₃O₁₃S₃)
C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 1,0, Phe 1,02, Val 1,03, Asp 1,02, Cys-[Bzl] 0,98, Pro 1,03, Arg 0,99, Gly 1,00, NH₃ 2,11.

β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionyl-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-NH₂

Terc.butyloxykarbonyloktapeptidamid (0,394 g, 0,33 mmolu) byl zbaven chránicí skupiny a kopulován s p-nitrofenyl- β -(S-benzylmerkaptó)- β,β -cyklopentamethylenpropionátem (0,232 g, 0,6 mmolu) jako vpředu, za vzniku acyloktapeptidamidu (0,388 g, 88,65 procenta), teplota tání 211 až 214 °C;

$$[\alpha]_D^{21} = -39,2^\circ \quad (c = 1, \text{DMF});$$

R_f (E) 0,47, R_f (D) 0,85.

Elementární analýza pro: (C₇₃H₉₅N₁₃O₁₃S₃)
C, H, N.

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,99, Phe 1,02, Val 1,03, Asp 1,01, Cys-(Bzl) 0,99, Pro 1,02, Arg 0,99, Gly 1,00, NH₃ 2,04.

[1-(β-merkapto-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-ethyl)tyrosin, 4-valin]-argininvasopresin

Roztok 140 mg (0,095 mmolu) chráněného acyloktapeptidamidu ve 400 ml amoniaku (sušeného) a redestilovaného ze sodíku) byl míchán a při teplotě varu uváděn v reakci se sodíkem, ve formě kousku kovu obsaženého ve skleněné kapiláře, pokud v roztoku nevydržela světle modrá barva po dobu 30 sekund. Bylo přidáno 0,4 ml bezvodé kyseliny octové, aby se odstranila barva. Roztok byl odpařen proudem dusíku zavedeným do baňky. Po 5 minutách byl odparek rozpuštěn v 50 ml 10% vodné kyseliny octové, k roztoku bylo přidáno 800 ml vody. Roztok byl neutralizován 2M hydroxidem amonným za vzniku roztoku o hodnotě pH 6,5. Za míchání byl postupně přidáván nadbytečný roztok ferrikyanidu draselného (16 ml, 0,01 M). Žlutý roztok byl míchán dalších 10 minut a po dobu 10 minut s anexovou pryskyřicí (Bio-Rad Ag-3 v Cl⁻ formě, 10 g vlhké hmotnosti). Suspenze byla pomalu filtrována pryskyřicí (50 g vlhké hmotnosti). Po promytí pryskyřice 200 ml 0,2% vodné kyseliny octové byly spojené filtráty a promývací roztoky lyofilizovány. 1,63 g získaného prášku bylo odseleno na sloupci Sephadexu G-15 (110 krát 2,7 cm) elucí 50% vodnou kyselinou octovou rychlostí 5 ml/h. Eluát byl frakcionován a sledován při absorpci 280 nm. Frakce obsahující hlavní maximum byly shromážděny a lyofilizovány. 28 mg odparku bylo podrobeno gelové filtraci na sloupci Sephadexu G-15 (100 × 1,5 cm). Produkt byl eluován 0,2M vodnou kyselinou octovou rychlostí 4 ml/h. Peptid byl eluován v jediném maximu (absorpce při 280 nm). Lyofilizace příslušných frakcí poskytla vasopresinový analog (24 mg, 20,6 %). Tenkovrstevná chromatografie R_f (E) 0,31, R_f (F) 0,62;

$[\alpha]_D = -65,1^\circ$ (c = 0,2, 1M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 1,00, Phe 1,01, Val 1,01, Asp 1,01, Pro 1,01, Arg 1,00, Gly 1,00, NH₃ 1,97.

Analýza po oxidaci kyselinou permravenčí před hydrolýzou poskytla poměr Cys-(O₃H)-Gly 1,01 : 1,00.

1-[β-merkapto-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-methyl)tyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin

168 mg (0,115 mmolu) peptidického meziproductu bylo redukováno sodíkem v kapalném amoniaku, znovu oxidováno, delonizováno a čistěno jako vpředu, za vzniku 49,5 miligramu produktu (35,5 %);

R_f (E) 0,30, R_f (F) 0,61;

$[\alpha]_D^{25} = -46,4^\circ$ (c = 0,4, 1M kyselina octová).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,98, Phe 1,01, Val 0,98, Asp 0,99, Pro 1,03, Arg 0,98, Gly 1,00, NH₃ 12,1.

Analýza pro oxidaci kyselinou permravenčí, předcházející hydrolýze, poskytla poměr Cys-(O₃H)-Gly 1,03 : 1,00.

[1-(β-merkapto-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-ethyl)tyrosin, 4-valin, 8-D-arginin]vasopresin

Výtěžek analoga ze 167 mg (0,113 mmolu) meziproductu byl 29 mg (20,9 %).

R_f (E) 0,29, R_f (F) 0,57;

$[\alpha]_D^{25} = -41,1^\circ$ (c = 0,3, 1M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,98, Phe 1,01, Val 1,03, Asp 0,99, Pro 1,03, Arg 1,02, Gly 1,00, NH₃ 1,98.

Analýza po oxidaci kyselinou permravenčí před hydrolýzou poskytla poměr Cys-(O₃H)-Gly 1,01 : 1,00.

[1-(β-merkapto-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-methyl)pyrosin, 4-valin]argininvasopresin

Reakce 174 mg (0,119 mmolu) acyloktapeptidu jako vpředu poskytla 51,5 mg produktu (35,6 %).

R_f (E) 0,28, R_f (F) 0,60;

$[\alpha]_D^{25} = -66,3^\circ$ (c = 0,4, 1M AcOH).

Analýza aminokyselin:

Tyr 0,99, Phe 1,01, Val 1,02, Asp 1,01, Pro 1,00, Arg 1,01, Gly 1,00, NH₃ 2,11.

Analýza po oxidaci kyselinou permravenčí předcházející hydrolýze poskytla poměr Cys-(O₃H)-Gly 1,03 : 1,00.

Příklad 6

[1-(β-merkapto-β,β-cyklopentamethylenpropionová kyselina), 2-(O-ethyl)tyrosin, 4-valin, 7-(3,4-dehydroprolin)]-argininvasopresin

Sloučenina byla připravena stejně jako v příkladu 5, za použití Δ^3 -prolinu místo prolinu.

Příklad 7

[1-(β -merkapt)- β,β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-substituovaná, 4-valin, 7-prolin]- (L- a D-)arginin-vasopresin

X	Z	R _f E	R _f E
D-Tyr	L-Arg	0,17	0,50
D-Ph	L-Arg	0,17	0,52
Gly	L-Arg	0,15	0,48
D-Ala	L-Arg	0,16	0,49
D-Val	L-Arg	0,17	0,49
D-Leu	L-Arg	0,17	0,53
D-Ile	L-Arg	0,17	0,53
D-Arg	L-Arg	0,08	0,30
D-Phe	D-Arg	0,16	0,51

Příklad 8

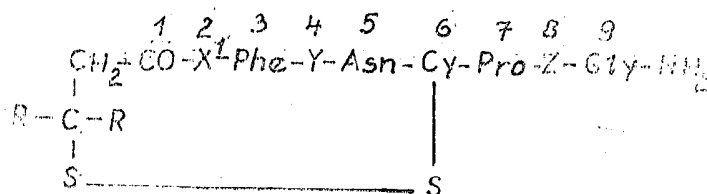
Antagonismus k vasopresorické reakci byl stanoven podle Dyckese se spol., J. Med. Chem., sv. 17 (1974), str. 969. Hodnoty se vyjadřují jako hodnoty pA₂, definované Schildem se spol., Br. J. Pharmacol., sv. 2 (1947), str. 189.

Účinnost antidiuretických agonistů byla stanovena pomocí intravenózní injekce hodnocených sloučenin na ethanolem anestetizovaných hydratovaných krysách podle Sawyera se spol., Endocrinology, sv. 63 (1958), str. 694.

Sloučeniny této série byly připraveny jako v příkladu 5. Čistota byla stanovena pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu ve dvou systémech rozpouštědel; E: butanol/kyselina octová/voda (BAW) (4:1:5) nebo F: butanol/kyselina octová/voda/pyridin (15:3:3:10). Byly získány následující výsledky:

Antagonistická aktivita byla stanovena a vyjádřena jako „účinné dávky“ a jako hodnoty pA₂. „Účinná dávka“ je definována jako dávka (v nanomolech na kilogram), která redukuje reakci pozorovanou po 2× jednotkách agonisty podaného injekčně 20 minut po dávce antagonisty na reakci 1× jednotek agonisty. Stanovené in vivo, hodnoty „pA₂“ představují negativní logaritmy účinných dávek dělené stanoveným distribučním objemem (67 ml/kg). Výsledky jsou udány v tabulce I.

Tabulka I



Peptid	R ₂	X ¹	Y	Z	Antivasopresorická účinnost pA ₂	Antidiuretická účinnost U/mg
dAVP	(H) ₂	Tyr	Gln	Arg	agonista	1 745 ± 385
dPAVP	(CH ₃) ₂	Tyr	Gln	Arg	7,45 ± 0,11	42 ± 3
d(CH ₂) ₅ AVP	(CH ₂) ₅	Tyr	Gln	Arg	8,35 ± 0,99	0,033 ± 0,005
dVDAVP	(H) ₂	Tyr	Val	D-Arg	7,03 ± 0,11	1 230 ± 170
dPVDAVP	(CH ₃) ₂	Tyr	Val	D-Arg	7,82 ± 0,05	123 ± 22
d(CH ₂) ₅ VDAVP	(CH ₂) ₅	Tyr	Val	D-Arg	7,68 ± 0,05	0,10 ± 0,02
dTyr(Me)AVP	H ₂	Tyr(Me)	Gln	Arg	agonista	830 ± 70
dPTyr(Me)AVP	(CH ₃) ₂	Tyr(Me)	Gln	Arg	7,96 ± 0,05	3,5 ± 0,5
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me)AVP	(CH ₂) ₅	Tyr(Me)	Gln	Arg	8,62 ± 0,03	0,31 ± 0,07

Výsledky uvedené v tabulce I ukazují, že sloučeniny získané způsobem podle vynálezu, zejména [1-(β -merkaptopropan-2-yl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 8-arginin]vasopresin a [1-(β -merkaptopropan-2-yl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-methyl)-tyrosin, 8-arginin]vasopresin antagonizují vasopresorickou reakci na argininvasopresin a vykazují význačné snížení antidiuretické účinnosti.

Příklad 9

[1-(β -merkaptopropan-2-yl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-alkyl)tyrosin, 4-valin, 8-(L- a D-)arginin]vasopresinové sloučeniny, hodnocené jako v příkladu 8, byly slabými antidiuretickými agonisty. Způsobují počáteční submaximální inhibici vylučování moče, trvající asi 10 minut, následovanou obdobím inhibice reakce na ADH, trvající 1 až 3 hodiny, v závislosti na dávce. Ta-

to inhibice byla reverzibilní, tj. lze ji překonat zvýšením dávek ADH. Opakované pokusy dovolovaly stanovení „účinné dávky“ každého analoga, jež je definována jako dávka, která redukuje antidiuretickou reakci na 2 $\times$ jednotek ADH, podaných injekčně 20 minut po dávce antagonisty, odpovídající reakci 1 $\times$ jednotek, podaných injekčně před antagonistou. Stanovené účinné dávky pro tato analoga (v nmol/kg) a antivasopresorická aktivita jsou udány v tabulce II.

Zatímco [1-(β -merkaptopropan-2-yl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-alkyl)-tyrosin, 4-valin, 7-(L- a D-)arginin]vasopresinové sloučeniny byly slabými antidiuretickými agonisty, vyvolávajícími počáteční submaximální inhibici vylučování moče trvající po dobu asi 10 minut, následovanou obdobím inhibice reakcí na ADH trvající po dobu 1 až 3 hodin, výhodné sloučeniny, označené hvězdičkou v tabulce níže, neměly antidiuretickou agonistickou účinnost.

Tabulka II

Sloučenina	Anti-antidiuretická účinnost		Antivasopresorická účinnost	
	ED nmol/kg	pA ₂	ED nmol/kg	pA ₂
d(CH ₂) ₅ D-Tyr VAVP	2,2 $\pm$ 0,2	7,51 $\pm$ 0,08 (4)	0,29 $\pm$ 0,09	8,41 $\pm$ 0,11 (4)
d(CH ₂) ₅ D-Phe VAVP	0,67 $\pm$ 0,13*	8,07 $\pm$ 0,09 (8)	0,58 $\pm$ 0,04	8,06 $\pm$ 0,03 (4)
d(CH ₂) ₅ [Gly ²]VAVP	agonista	—	atonista	—
d(CH ₂) ₅ [DAla ²]VAVP	agonista	—	177 $\pm$ 31	5,79 $\pm$ 0,08 (4)
d(CH ₂) ₅ [D-Val ²]VAVP	2,3 $\pm$ 0,3*	7,48 $\pm$ 0,06 (4)	27 $\pm$ 3	6,41 $\pm$ 0,05 (4)
d(CH ₂) ₅ [D-Leu ²]VAVP	1,2 $\pm$ 0,3*	7,79 $\pm$ 0,12 (4)	26 $\pm$ 5	6,45 $\pm$ 0,09 (4)
d(CH ₂) ₅ [D-Ile ²]VAVP	0,70 $\pm$ 0,0*	7,98 $\pm$ 0,05 (4)	8,2 $\pm$ 1,4	6,95 $\pm$ 0,08 (5)
d(CH ₂) ₅ [D-Arg ²]VAVP	>90	<5,9	~260	~5,4
d(CH ₂) ₅ D-Phe VDAVP	6,9 $\pm$ 1,3	7,07 $\pm$ 0,10 (9)	0,73	7,98 $\pm$ 0,07 (4)
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me)VDAVP	15 $\pm$ 3	6,88 $\pm$ 0,11 (4)	0,28 $\pm$ 0,05	8,44 $\pm$ 0,07 (8)
d(CH ₂) ₅ Tyr(Et)VDAVP	5,7 $\pm$ 0,5	7,10 $\pm$ 0,08 (4)	0,34 $\pm$ 0,04	8,31 $\pm$ 0,05 (8)
d(CH ₂) ₅ Tyr(i-Pr)VDAVP	8,5 $\pm$ 0,07	6,88 $\pm$ 0,07 (4)	0,28 $\pm$ 0,07	8,41 $\pm$ 0,08 (8)
d(CH ₂) ₅ Tyr(n-Pr)VDAVP	14 $\pm$ 2	6,67 $\pm$ 0,05 (4)	1,1 $\pm$ 0,2	7,86 $\pm$ 0,10 (8)
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me)VAVP	3,1 $\pm$ 0,4	7,35 $\pm$ 0,06 (4)	0,29 $\pm$ 0,06	8,32 $\pm$ 0,08 (4)
d(CH ₂) ₅ Tyr(Et)VAVP	1,9 $\pm$ 0,2	7,57 $\pm$ 0,06 (4)	0,49 $\pm$ 0,11	8,16 $\pm$ 0,09 (4)
d(CH ₂) ₅ Tyr(i-Pr)VAVP	3,6 $\pm$ 0,9	7,32 $\pm$ 0,06 (6)	0,31 $\pm$ 0,06	8,36 $\pm$ 0,09 (4)
d(CH ₂) ₅ Tyr(n-Pr)VAVP	3,5 $\pm$ 0,06	7,29 $\pm$ 0,07 (4)	0,40 $\pm$ 0,04	8,22 $\pm$ 0,04 (4)
d(CH ₂) ₅ -D-Tyr(Me)VAVP	1,2 $\pm$ 0,3	7,77 $\pm$ 0,07 (6)	0,23 $\pm$ 0,04	8,48 $\pm$ 0,08 (4)
d(CH ₂) ₅ -D-Tyr(Et)VAVP	1,1 $\pm$ 0,2	7,81 $\pm$ 0,07 (5)	0,45 $\pm$ 0,11	8,22 $\pm$ 0,12 (4)
d(CH ₂) ₅ -Tyr(Et)-V- Δ^5 -Pro ⁷ -AVP	1,5 $\pm$ 0,3			

Výhodné sloučeniny získané způsobem podle vynálezu jsou také selektivnější než dřívější antidiuretickí antagonisté se zřetelem na antivasopresorické aktivity, jak je ukázáno poměrem antivasopresorické anti-antidiuretické účinné dávky:

Sloučenina	ED	Antivasopresorická Anti-antidiuretická
d(CH ₂) ₅ D-Tyr(Et) VAVP		0,41
d(CH ₂) ₅ D-Phe VAVP		0,87
d(CH ₂) ₅ [D-Val ²]VAVP		12
d(CH ₂) ₅ [D-Leu ²]VAVP		22
d(CH ₂) ₅ [D-Ile ²]VAVP		12

Příklad 10

(a)

Antagonismus [1-(β -merkaptopropan-2-yl)- β -cyklopentamethylenpropionová kyselina], 2-(O-alkyl)tyrosin, 4-valin]-(L- a D-)argininvasopresinové sloučeniny na endogenní ADH byl ukázán injekcí sloučeniny intraperitoneálně bdělým krysám. Po 4 hodiny po injekci byla odebírána moč. Údaje v tabulce níže představují průměr $\pm$ SE výsledků ve skupinách 4 až 6 krys. *P < 0,05 a **P < 0,005 jsou udány pro rozdíl mezi průměry u krys po podání antagonistů a průměry reakcí stej-

ných krys po injekci samotného rozpouštědla. Průměrná velikost objemu moče u kontrolních krys po injekci rozpouštědla byla

$0,9 \pm 0,1$ ml/kg za hodinu a průměrná osmolalita byla 1544 ± 85 mOsm/kg H₂O ($n = 32$).

	Dávka $\mu\text{g/kg}$	Objem moče ml/kg za h.	Osmolalita mOsm/kg H ₂ O
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me)VDAVP	100	$1,5 \pm 0,3$	1341 ± 428
d(CH ₂) ₅ Tyr(Et)VDAVP	300	$2,2 \pm 0,4^*$	$961 \pm 204^*$
	30	$2,8 \pm 0,3^{**}$	$640 \pm 47^{**}$
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me)VAVP	100	$9,5 \pm 1,8^{**}$	$234 \pm 25^{**}$
	10	$1,1 \pm 0,5$	1303 ± 190
d(CH ₂) ₅ Tyr(Et)VAVP	30	$3,4 \pm 0,9^*$	$514 \pm 105^{**}$
	10	$7,4 \pm 1,0^{**}$	$316 \pm 38^{**}$
	30	$13,3 \pm 2,5^{**}$	$194 \pm 17^{**}$

(b)

Reakce intaktních krys samic o hmotnosti 200 až 240 g po intraperitoneálních injekcích d(CH₂)₅Tyr(Et)VAVP byly hodnoceny v pokuse, při němž každá krysa dostala rozpouštědlo a obě dávky antagonisty ADH. Injekce byly podávány v rozmezí nejméně dvou dnů. Krysám byla voda k dispozici ad libitum. Injekce byly podávány v 11 hodin dopoledne, načež byla spontánně odcházející moč sbírána v 1 hod. intervalech po dobu 4 hodin.

Na obr. 1 je znázorněna osmolalita moče jako funkce času. Osmolalita moče u kontrol (injekce rozpouštědla) byly hodnoceny po dvouhodinovém období v důsledku nepravidelnosti močení.

Na obr. 2 je znázorněno vylučování moče jako funkce času.

Na obou obrázcích vertikální přímký procházející body označují SE.

Příklad 11

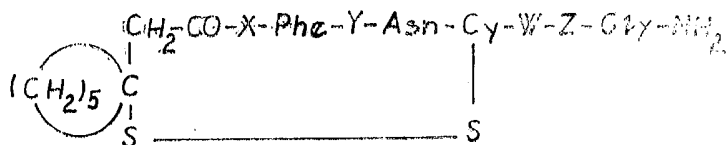
Sloučeniny, ve kterých Tyr v poloze 2 patří do D-série a není etherifikován [X' značí vodík] se připravují jako v příkladech 1 až 5. Sloučenina, ve které Z značí L-Arg, je velice aktivní jako antagonist antidiuretické aktivity arginin-vasopresinu.

Předchozí příklady lze opakovat s podobným úspěchem náhradou obecně nebo specificky popsaných reakčních činidel a/nebo reakčních podmínek podle vynálezu za ty, které jsou používány v předchozích příkladech.

Z předchozího popisu odborník snadno zjistí podstatné charakteristiky tohoto vynálezu a aniž by opustil jeho ducha a rozsahu, může provádět různé změny a modifikace, aby jej přizpůsobil různému použití a podmínkám.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby peptidů obecného vzorce



kde

X představuje Tyr X', kde X' znamená vodík, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl nebo n-butyl a Tyr je D- nebo L-, D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Arg, D-norvalin, D-norleucin, D-cyklohexylalanin, D- α -aminomáselnou kyselinu, D-threonin nebo D-methionin,

W představuje Pro nebo Δ^3 -Pro,

Z představuje D- nebo L-Arg, a jestliže X značí Tyr-X', pak W značí Δ^3 -Pro, a

Y představuje Val nebo Gln,

vyznačující se tím, že se provádí postupem zahrnujícím tyto po sobě následující stupně:

(a) zpracování Boc-Gly-pryskyřice syntézou v pevné fázi o šesti cyklech deprotektce, neutralizace a kopulace s vybranou aminokyselinou za vzniku odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-Phe-Y-Asn-Cy(Bzl)-W-Z(Tos)-Gly-pryskyřice,

v němž

Y, W a Z mají výše uvedený význam,

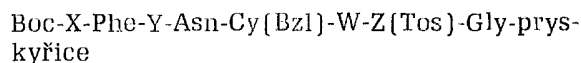
b) zpracování odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni a) peptidovou syntézou v pevné fázi v

cyklu deprotektce, neutralizace a kopulace se sloučeninou obecného vzorce



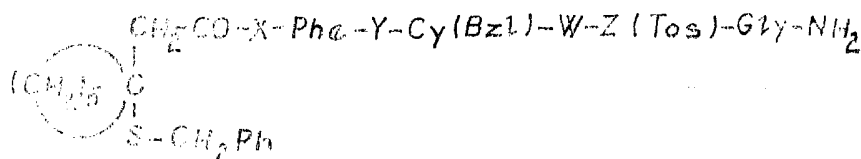
v němž

X má výše uvedený význam, za vzniku odpovídající terc.butoxykarbonyl-oktapeptidylové pryskyřice obecného vzorce



v němž

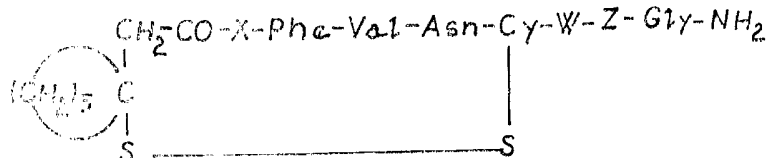
X, Y, W a Z mají výše uvedené významy,



v němž

X, Y, W a Z mají výše uvedené významy,

kopulací neutralizovaného, deprotektovaného roztoku odpovídajícího terc.butoxykarbonyl-oktapeptidového amidu s p-nitrofenyl-β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionátem v přítomnosti monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, a



ve kterém

X představuje Tyr X', kde X' znamená methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl nebo n-butyl a Tyr je D- nebo L-, D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Arg, D-norvalin, D-norleucin, D-cyklohexylalanin, D-α-aminomáselnou kyselinu, D-threonin nebo D-methionin,

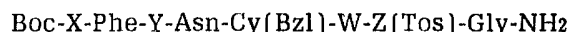
W značí Pro nebo Δ³-Pro,

Z značí D- nebo L-Arg, a jestliže X značí Tyr-X', pak W značí Δ³-Pro,

vyznačující se tím, že se provádí postupem zahrnujícím tyto po sobě následující stupně:

a) zpracování Boc-Gly-pryskyřice syntézou v pevné fázi o šesti cyklech deprotektce, neutralizace a kopulace s vybranou aminokyselinou za vzniku odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

c) amonolýzu odpovídající chráněné oktapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni b) na odpovídající Boc-oktapeptidový amid obecného vzorce

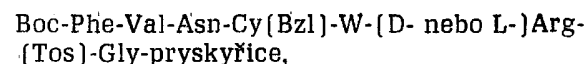


v němž

X, Y, W a Z mají výše uvedené významy, d) přeměnu odpovídajícího Boc-oktapeptidového amidu vyrobeného ve stupni c) na odpovídající β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidový amid obecného vzorce

e) redukci odpovídajícího β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionyl-oktapeptidového amidu, vyrobeného ve stupni d), sodíkem v kapalném amoniaku, a oxidační cyklizací vzniklé disulfhydrikové sloučeniny ferrikyanidem draselným.

2. Způsob podle bodu 1 pro výrobu sloučenin obecného vzorce



v němž

W má výše uvedený význam,

b) zpracování odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni a) peptidovou syntézou v pevné fázi v cyklu deprotektce, neutralizace a kopulace se sloučeninou obecného vzorce



v němž

X má výše uvedený význam,

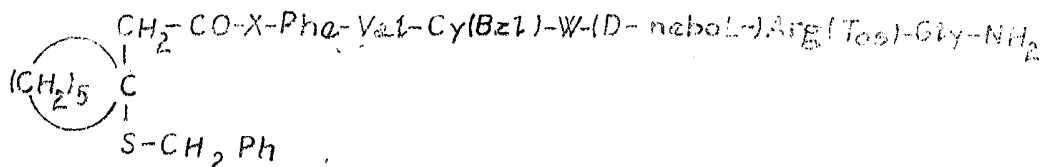
za vzniku odpovídající terc.butoxykarbonyl-oktapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-X-Phe-Val-Asn-Cy(Bzl)-W-(D- nebo L-)-Arg(Tos)-Gly-pryskyřice,

v němž

X a W mají výše uvedené významy,

c) amonolýzu odpovídající chráněné oktapeptidové pryskyřice vyrobené ve stupni b) na odpovídající Boc-oktapeptidový amid obecného vzorce



v němž

X a W mají výše uvedené významy,

kopulací neutralizovaného, deprotektovaného roztoku odpovídajícího terc.butoxykarbonyl-oktapeptidového amidu s p-nitrofenyl-β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionátem v přítomnosti monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, a

e) redukcí odpovídajícího β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionyl-oktapeptidového amidu, vyrobeného ve stupni d), sodíkem v kapalném amoniaku, a oxidační cyklizací vzniklé disulfhydriové sloučeniny ferrikyanidem draselným.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl nebo butyl, Tyr je D- nebo L- a W značí Pro nebo Δ⁵-Pro.

4. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-methyl)tyrosin a Z značí arginin.

5. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-methyl)tyrosin a Z značí (L- nebo D-)arginin.

6. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 1, v nichž X značí (O-ethyl)tyrosin a Z značí (L- nebo D-)arginin.

7. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-methyl)-D-tyrosin a Z značí (L- nebo D-)arginin.

8. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-isopropyl)tyrosin a Z značí (L- nebo D-)arginin.

Boc-X-Phe-Val-Asn-Cy(Bzl)-W-(D- nebo L-)-Arg(Tos)-Gly-NH₂

v němž

X a W mají výše uvedené významy,

d) přeměnu odpovídajícího Boc-oktapeptidového amidu vyrobeného ve stupni c) na odpovídající β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidový amid obecného vzorce

9. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-n-propyl)tyrosin a Z značí (L- nebo D-)arginin.

10. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí (O-ethyl) tyrosin, W značí 3,4-dehydroprolin a Z značí arginin.

11. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Arg, D-norvalin, D-norleucin, D-cyklohexylalanin, D-α-amino-máselnou kyselinu, D-threonin nebo D-methionin, W značí prolin a Z značí D- nebo L-arginin.

12. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-Phe, D-Val, D-Leu nebo D-Ile.

13. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž Z značí L-arginin.

14. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-fenylalanin a Z značí arginin.

15. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-valin a Z značí arginin.

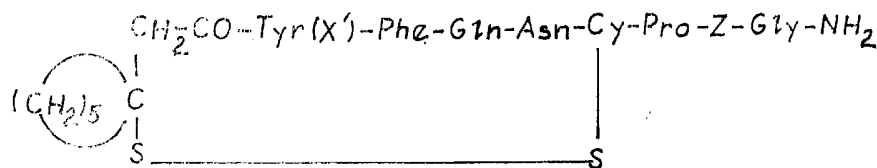
16. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-leucin a Z značí arginin.

17. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-isoleucin a Z značí arginin.

18. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se používá sloučenin obecných vzorců

ců uvedených v bodě 2, v nichž X značí D-fenylalanin a Z značí D-arginin.

19. Způsob podle bodu 1 pro výrobu sloučenin obecného vzorce



ve kterém

X' značí vodík, methyl nebo ethyl a
Z značí L- nebo D-Arg,

vyznačující se tím, že se provádí postupem zahrnujícím tyto po sobě následující stupně:

a) zpracování Boc-Gly-pryskyřice syntézou v pevné fázi o šesti cyklech deprotektce, neutralizace a kopulace s vybranou aminokyselinou za vzniku odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-Phe-Gln-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-pryskyřice

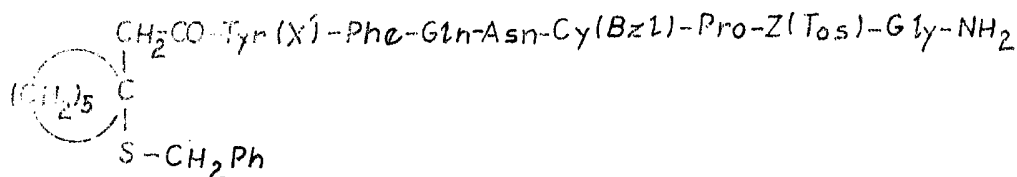
v němž

Z má výše uvedený význam,

b) zpracování odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni a) peptidovou syntézou v pevné fázi v cyklu deprotektce, neutralizace a kopulace se sloučeninou obecného vzorce

Boc-Tyr(X')

v němž



v němž

X a Z mají výše uvedené významy,

kopulací neutralizovaného, deprotektovaného roztoku odpovídajícího terc.butoxykarbonyl-oktapeptidového amidu s p-nitrofenyl-β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylen-propionátem v přítomnosti monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, a

X' má výše uvedený význam,

za vzniku odpovídající terc.butoxykarbonyl-oktapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-Tyr(X')-Phe-Gln-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-pryskyřice

v němž

X a Z mají výše uvedené významy,

c) amonolýzu odpovídající chráněné butoxykarbonyl-oktapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni b) na odpovídající Boc-oktapeptidový amid obecného vzorce

Boc-Tyr(X')-Phe-Gln-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-NH2

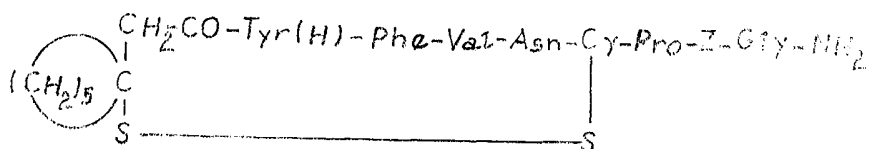
v němž

X a Z mají výše uvedené významy,

d) přeměnu odpovídajícího Boc-oktapeptidového amidu vyrobeného ve stupni c) na odpovídající β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidový amid obecného vzorce

e) redukci odpovídajícího β-(S-benzylmerkapt)-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidového amidu, vyrobeného ve stupni d), sodíkem v kapalném amoniaku, a oxidační cyklizací vzniklé disulfhydrikové sloučeniny ferrikyanidem draselným.

20. Způsob podle bodu 1, pro výrobu sloučenin obecného vzorce



ve kterém

Tyr je D-Tyr a
Z značí D- nebo L-Arg,

vyznačující se tím, že se provádí postupem zahrnujícím tyto po sobě následující stupně:

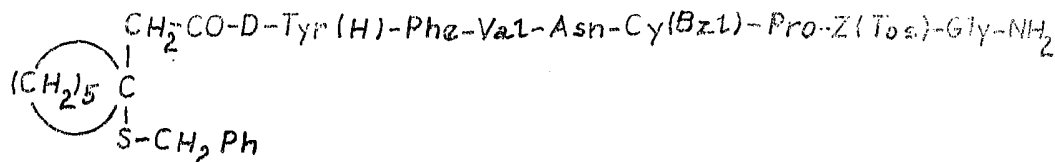
a) zpracování Boc-Gly-pryskyřice syntézou v pevné fázi o šesti cyklech deprotekce, neutralizace a kopulace s vybranou aminokyselinou za vzniku odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-Phe-Val-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-pryskyřice,

v němž

Z má výše uvedený význam,

b) zpracování odpovídající chráněné heptapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni a) peptidovou syntézou v pevné fázi v cyklu deprotekce, neutralizace a kopulace se sloučeninou vzorce



v němž

Z má výše uvedený význam,

kopulací neutralizovaného, deprotektovaného roztoku odpovídajícího terc.butoxykarbonyl-oktapeptidového amidu s p-nitrofenyl-β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethyl-

za vzniku odpovídající terc.butoxykarbonyl-oktapeptidylové pryskyřice obecného vzorce

Boc-D-Tyr(H)-Phe-Val-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-pryskyřice,

v němž

Z má výše uvedený význam,

c) amonolýzou odpovídající chráněné oktapeptidylové pryskyřice vyrobené ve stupni b) na odpovídající Boc-oktapeptidový amid obecného vzorce

Boc-D-Tyr(H)-Phe-Val-Asn-Cy(Bzl)-Pro-Z(Tos)-Gly-NH₂,

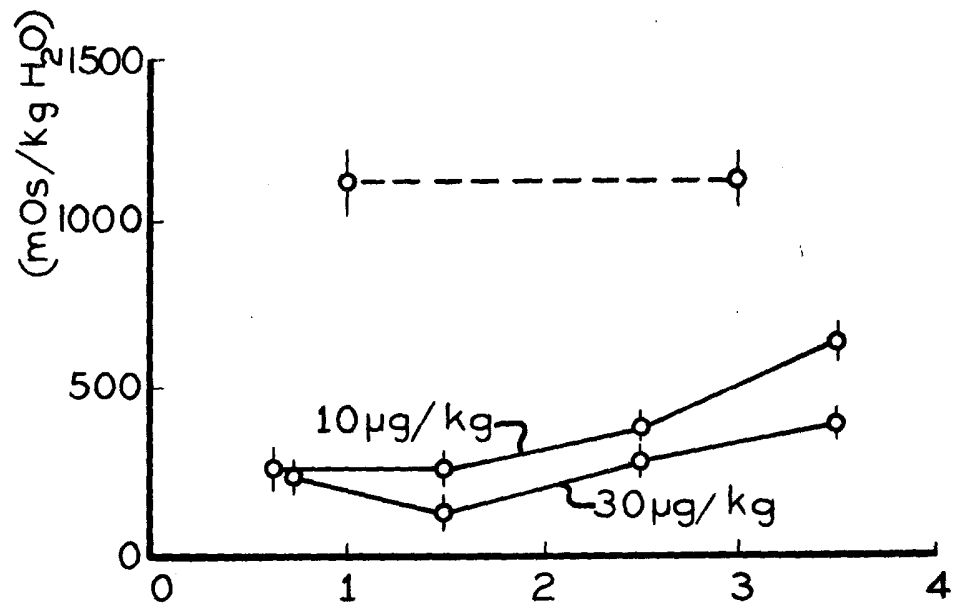
v němž

Z má výše uvedený význam,

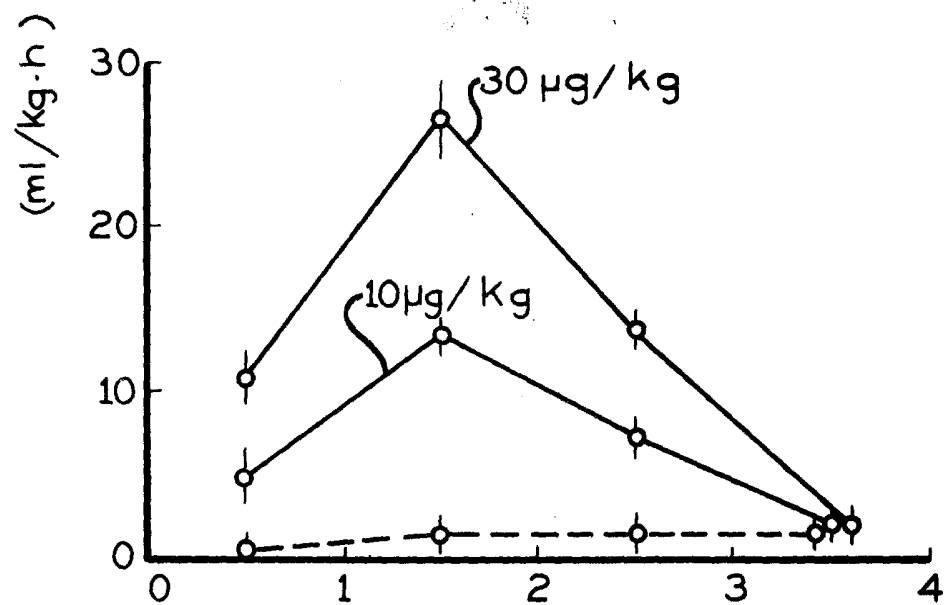
d) přeměnu odpovídajícího Boc-oktapeptidového amidu vyrobeného ve stupni c) na odpovídající β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidový amid obecného vzorce

len-propionátem v přítomnosti monohydrátu N-hydroxybenzotriazolu, a

e) redukci odpovídajícího β-(S-benzylmerkapt)-β,β-cyklopentamethylenpropionyl-oktapeptidového amidu, vyrobeného ve stupni d), sodíkem v kapalném amoniaku, a oxidační cyklizací vzniklé disulfhydriové sloučeniny ferrikyanidem draselným.



1



2