

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245626

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 14 09 84

/21/ PV 6912-84

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 1/04

/C 07 K 1/04, 1/06/

(40) Zveřejněno 16 01 86

(45) Vydáno 15 10 87

(75)

Autor vynálezu

BLÁHA IVO RNDr. CSc., ZAORAL MILAN ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob odštěpování terc.butyloxykarbonylových chránících skupin
při syntézách peptidů na nosičích

Způsob odštěpování terc.butyloxykarbonylových chránících skupin při syntézách peptidů na nosičích.

Při tomto způsobu se na peptid s chráněnou koncovou aminoskupinou působí roztokem 1 a 5% hmot. bromovodíku ve směsi methylenchlorid a kyselina octová, ve které je obsaženo 50 až 90 % obj. methylenchloridu.

Způsobu lze použít v chemii peptidů.

Vynález se týká odštěpování terc.butyloxykarbonylových /Boc/ chránících skupin při syntézách peptidů na nosičích.

K chránění alfa-aminoskupin aminokyselin při syntézách peptidů v pevné fázi /Merrifield R. B.: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 /1963// se dnes nejčastěji používá terc.butyloxykarbonylový zbytek /Carpino L. A.: J. Am. Chem. Soc. 79, 4427 /1957//, který je odštěpitelný kyselými činidly za teploty místnosti.

Nejběžnějším štěpicím činidlem je 30 až 80% roztok kyseliny trifluoroctové v methylenchloridu /Gutte B., Merrifield R. B.: J. Biol. Chem. 246, 1922 /1971//. Kyselina trifluoroctová je drahá chemikálie, která se z filtrátů z pevné fáze obtížně regeneruje.

Kromě trifluoroctové kyseliny je popsáno také použití roztoku chlorovodíku v kyselině octové, mravenčí nebo v dioxanu a některá další činidla /Barany G., Merrifield R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis, str. 102, v knize The Peptides, Vol. 2, Gross B., Meienhofer J. ed., Academic Press, New York, 1980/. Roztoky chlorovodíku jsou snadno dostupné a levné, nelze je však dlouhodobě skladovat. Další popsaná činidla jsou buď obtížně dostupná nebo nepůsobí univerzálně.

Předmětem vynálezu, který zmírňuje uvedené nevýhody, je způsob odštěpování terc.butyloxykarbonylových chránících skupin roztokem halogenovodíku v kyselině octové při syntézách peptidů na nosičích, přičemž uvedená skupina chrání koncovou aminoskupinu peptidu, vyznačující se tím, že se na peptid působí po dobu 2 až 10 min roztokem 1 až 5% hmot. bromovodíku ve směsi methylenchlorid a kyselina octová, ve které je obsaženo 50 až 90 % obj. methylenchloridu.

Methylenchlorid umožňuje botnání nosiče, kyselina octová zvyšuje rozpustnost bromovodíku. Roztok je levný a až 1 rok skladovatelný. V tabulce 1 je doba potřebná ke kompletnímu odštěpení terc.butyloxykarbonylové skupiny z Boc-Gly na nosiči v závislosti na koncentraci bromovodíku ve směsi $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{COOH}$ /5:1 obj./. Z tabulky vyplývá, že 3% roztok je pro úplné odštěpení Boc-skupiny postačující.

T a b u l k a 1

% HBr v roztoku	Doba potřebná k odštěpení Boc-skupiny	
	z Boc-Gly-P	/min/
1		20
3		2
5		1

P = nosič

Bromovodík v methylenchloridu a kyselině octové je snadno dostupné činidlo. Získá se ředěním 35% bromovodíku v kyselině octové, což je v chemii peptidů běžně používaný roztok, a přidáním methylenchloridu.

Tvoří stálé roztoky. Výhodou při jeho použití je zkrácená reakční doba ve srovnání s odštěpováním roztoky kyseliny trifluoroctové. I když použití uvedeného činidla s bromovodíkem může působit i na odštěpování samotného peptidu z nosiče, vzhledem k výhodě zkrácené reakční doby se tento vliv neprojeví.

Popsaný způsob odštěpování terc.butyloxykarbonylových chránících skupin lze použít při běžných syntézách peptidů, jak dokládá dále uvedený příklad:

Amid beta-benzylthiopropionyl-D-tyrosyl-fenylalanyl-alfa-aminobutyryl-asparaginylyl-S-benzylcysteinyl-prolyl- N^G -tosyl-D-arginyl-glycinu

Postupná syntéza uvedeného peptidu byla provedena na chlormethylované polystyrenové pryskyřici síťované 1% divinylbenzenem /obsah chloru 2,9 %/ esterifikované Boc-Gly /obsah 0,3 mmol Gly/g nosiče/.

Syntéza v pevné fázi byla provedena na automatickém syntetizátoru peptidů a bylo použito 4 g esterifikovaného nosiče /1,2 mmol Gly/. Odštěpování chránicích Boc-skupin bylo po připojení každé aminokyseliny k peptidickému řetězci prováděno tříminutovým působením 3% HBr v CH_2Cl_2 - CH_3COOH /5:1 obj./, kondenzace každé aminokyseliny byla provedena symetrickými anhydridy chráněných aminokyselin /3 ekv., 30 až 60 min/.

Po skončení syntézy byl peptid na nosiči amonolyzován a bylo získáno 1,04 g /64 %/ produktu, t.t. 144 až 152 °C. Analytický vzorek byl dvakrát překrystalizován ze směsi methanol - voda, t.t. 154 až 156 °C, $[\alpha]_D^{20} = -10,3^\circ /c = 0,4$, dimethylformamid/.

Byl chromatograficky jednotný v soustavě n-butanol - terc.butanol - kyselina octová - voda /2:2:1:1 obj./, Aminokyselinové složení: Tyr 0,92, Phe 0,98, Abu 0,99, Asp 0,95, Cys /S-Bzl/ 1,02, Pro 1,07, Arg 0,99, Gly 1,06. Pro $\text{C}_{66}\text{H}_{83}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ /1 390/ vypočteno: 57,04 % C, 6,24 % N; nalezeno: 56,88 % C, 5,97 % H, 12,84 % N.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob odštěpování terc.butyloxykarbonylových chránicích skupin při syntézách peptidů na nosičích roztokem halogenovodíku v kyselině octové, přičemž uvedená skupina chrání koncovou aminoskupinu peptidu, vyznačující se tím, že se na peptid působí po dobu 2 až 10 min roztokem 1 až 5% hmot. bromovodíku ve směsi methylenchlorid a kyselina octová, ve které je obsaženo 50 až 90 % obj. methylenchloridu.