



BREVET DE INVENTIE

(12)

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 92-200368

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: 19.03.92

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: 21.12.90 YU P-2424/90

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.04.94 BOPI nr. 4/94

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 105699

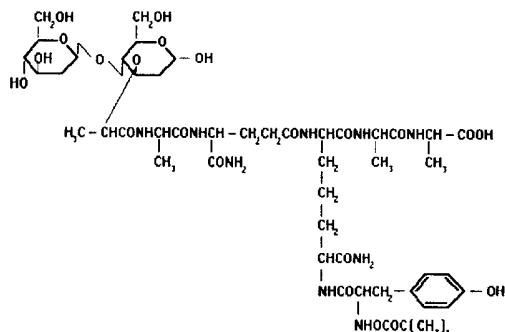
(71) Solicitant: Pliva Farmaceutska, Kemijska, Prehrambena i Kozmetička Industrija s p.o., Zagreb, Croația, YU

(73) Titular: (71)

(72) Inventatori: Djurdjica Ljevaković, Branka Vranešić, Jelka Tomašić, Ivo Hršak, Branko Ladešić, Croația, YU

(54) Monomer derivat de peptidoglican și derivatul său, procedee pentru
prepararea acestora

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un monomer
derivat de peptidoglican cu formula:



și derivatul său ¹²⁵I-Boc-Tyr-PGM marcat cu ¹²⁵I,
precum și la procedee pentru prepararea acestora,
compusi care, împreună cu materiale de suport
cunoscute, formează compoziții cu acțiune
imunostimulatoare și antitumorală.

Revendicări: 4



Prezenta invenție se referă la un monomer derivat de peptidoglican și derivatul său, marcat cu ^{125}I , și la procedee pentru obținerea acestor compuși, utilizați pentru obținerea de produse farmaceutice cu activitate imunomodulatoare și antitumorală, precum și de legare anti-PGM anticorp.

Se conoaște că monomerul peptidoglican (PGM, GlcNAc- β -(1,4)-MurNAc-L-Ala-D-iGln-(L)-mezo-A₂pm-(D)-amido-(L)-D-Ala-D-Ala/, care este cea mai mică unitate repetitivă a peptidoglicanului din peretele celulei de *Brevibacterium divaricum*, posedă proprietăți imunostimulatoare și antitumorale și proprietăți antimetastatice (Tomășic, J. și Hršak, I., 1988). Monomerul peptidoglican provenind din *Brevibacterium divaricum*, metabolismul său și activitatea în gazdă est cunoscut din *Structura de suprafață a microorganismelor și interacțiunea acestora cu mamiferul gazdă* (Schrinner E., Richmond M.H., Seibert G. și Schwartz U., Eds., pag. 113-121, VCH, Verlagsgesellschaft, Weinheim).

Se cunoaște că formarea unei legături peptidice poate fi condusă cu condiția ca aminoacidul:

a) să fie mai întâi transformat într-un aminoacid N-protejat, prin introducerea de grupări protectoare;

b) să fie activat la gruparea carboxilică;

c) se realizează o reacție cu *di*-, *tri*- sau polipeptide având aminoacid protejat la C-terminal și

5 d) grupările protectoare ale *di*-, *tri*- sau polipeptidelor obținute sunt eliminate cu grijă cu ajutorul reacțiilor specifice (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, herausgegeben von Egon Müller, Synthese von Peptiden I und II, Bd. 15/1 și 15/2 Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974).

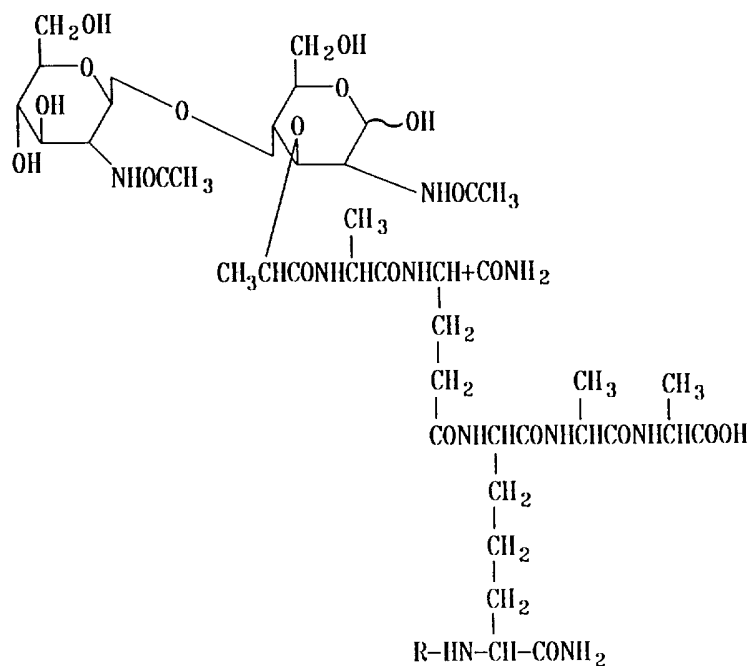
10 Apoi, în moleculele polifuncționale ale structurilor de înaltă complexitate, cum ar fi, de exemplu, monomerul de peptidoglican, constând din dizaharid pentapeptidic (porțiuni de zaharid și peptidă), este necesar;

15 a) să fie protejate grupările hidroxilice la GlcNAc și MurNAc (porțiunea de zaharid a moleculei) și

20 b) după realizarea reacției de formare a legăturii peptidice să se efectueze deprotecția porțiunii de zaharid.

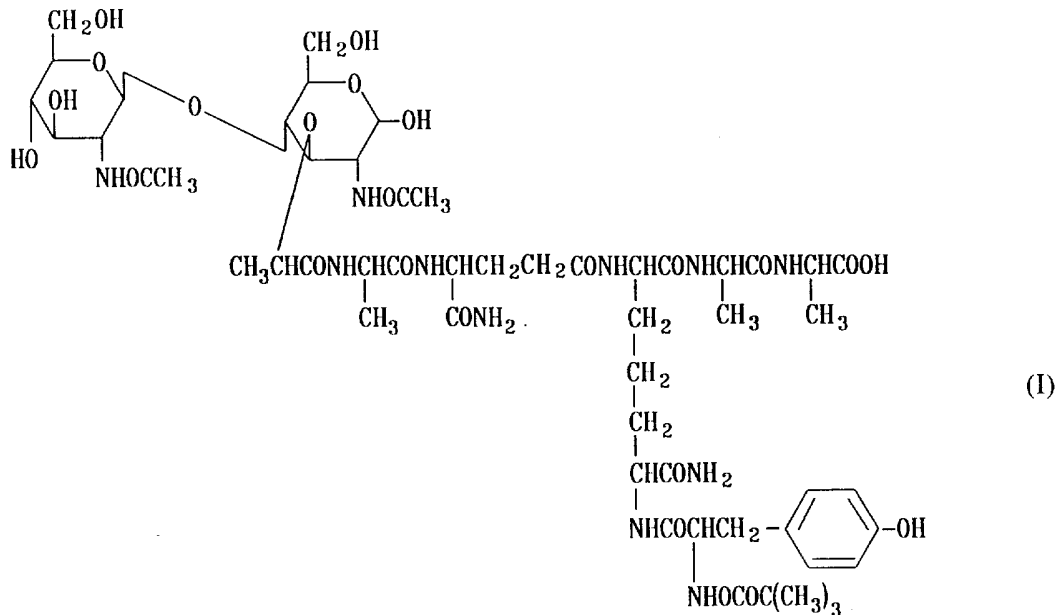
25 Se conoaște, de asemenea, că metoda convențională de inserare a tirozinei în interiorul peptidei sau proteinei este „metoda esterului activ”, în care Boc-L-Tyr-ONSu este componenta de acilare [Assoian R.K. (1980) *Anal. Biochem.* 103,70].

30 Se cunosc, de asemenea, derivați N-acil ai peptidoglicanului monomer cu formula generală:



în care R reprezintă o grupare acil a unui acid alchilcarboxilic, compuși utilizabili în produse farmaceutice cu proprietăți imuno-modulatoare (RO 105699).

Invenția lărgeste gama derivaților N-acil ai peptidoglicanului monomer, cu noi compuși, care prezintă structura corespunzătoare formulei generale I:



și derivatul său (^{125}I -Boc-Tyr-PGM), 5
marcat cu ^{125}I .

Monomerul *tert*-butiloxycarbonil-L-tirosil-peptidoglican cu formula generală I

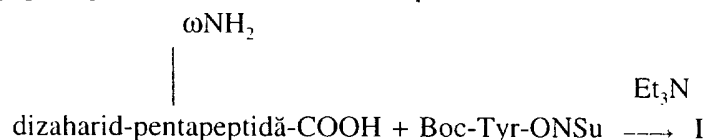
se prepară prin condensarea a 1,2 echivalenți ester *tert*-butiloxycarbonil-L-tirosil-N-succinimidic cu monomer peptidoglican neprotejat, în prezența a doi echivalenți de

trietilamină, în dimetilformamidă, timp de 16 h, la temperatura camerei, după care se izolează prin cromatografie pe gel.

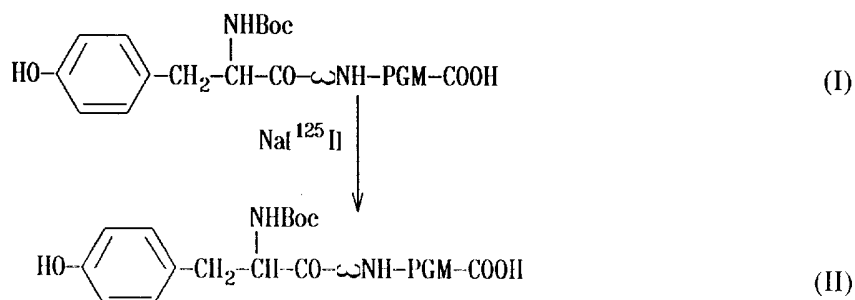
Conform invenției, o foarte mică cantitate din Boc-Tyr-PGM este marcată cu ^{125}I , prin adăugare de $3,7 \times 10^7$ Bq (1 mG) de $\text{Na}^{(125)\text{I}}$ și un exces mare de cloramină T, timp de 45 s, la temperatura camerei și, după stoparea reacției cu bisulfid de sodiu, se izolează produsul pe coloană cromatografică.

Invenția prezintă avantajul obținerii unor compuși noi, cu proprietăți superioare imunomodulatoare și antitumorale.

Noul monomer peptidoglican cu formula



Conform prezentei invenții, reacția selectivă a Boc-Tyr-ONSu este realizată cu gruparea omega-amino a acidului mezo-diaminopimelic în molecula de PGM, în prezența trietilaminei, rezultând noul derivat dizaharid-hexapeptidă, care mai întâi a fost izolat prin cromatografie pe gel pe o coloană cu Sefadex G-25 și prin cromatografie pe o coloană cu silica-gel, după care a fost purificat total și adaptat pentru investigații biologice cu ajutorul cromatografiei pe gel pe Biogel P-2.



Conform prezentei invenții, sinteza Boc-Tyr-PGM marcat cu iod radioactiv este realizată cu ajutorul metodei cu cloramină standard T cu Na^{125}I , rezultând

generală I este un compus cu lipofilicitate crescută, care face posibilă o penetrare cu mai multă ușurință a substanței prin pereții celulelor și un timp de ședere prelungit a acesteia în organism. Acest lucru a fost realizat prin introducerea aminoacidului aromatic nativ tirozină, în molecula de peptidoglican monomer (PGM), după care din dizaharid-pentapeptidă s-a obținut dizaharid-hexapeptidă (Boc-Tyr-PGM), care a fost ulterior marcată cu ^{125}I radioactiv, astfel rezultând derivatul său ^{125}I -Boc-Tyr-PGM (II).

Procedeul pentru prepararea noului derivat PGM din prezenta invenție este ilustrat prin următoarea schemă de reacție:

Marcarea Boc-Tyr-PGM cu iod radioactiv este realizată cu ajutorul metodei cu cloramină T standard [Bolton A.E. (1985): *Tehnici de radioiodurare*, ed. a II-a pag. 109, Amersham Int.plc., England].

După substituirea electrofilă a inelului fenolic al tirozinei, în poziția *orto* față de gruparea hidroxi, se obține molecula marcată cu ^{125}I de o înaltă activitate specifică și cu o stabilitate radiochimică suficientă.

Procedeul de preparare este reprezentat prin următoarea schemă:

30 produsul iodurat II, care este izolat prin cromatografie pe gel pe o coloană cu Sefadex G-25 și a fost utilizat în studiul reacției de legare antigen anticorp.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Prepararea monomerului *terț-butiloxycarbonil-L-tirozil-peptidoglicanului (I)*

Se dizolvă 100 g (0,1 mmoli) monomer de peptidoglican (PGM) în 2,6 ml dimetilformamidă (DMF) anhidră, cu adăugare de 30 μ l trietilamină. În soluția răcită cu gheață se adaugă, în porțiuni mici, sub agitare, 56 mg (0,12 mmoli) Boc-Tyr-ONSu solid. După reacționare timp de 16 h la temperatura camerei, se evaporă DMF la vid generat de o pompă mecanică. Reziduul, obținut după evaporare, de consistența unui sirop gros, se dizolvă în apă, se acidulează cu acid citric solid până la pH=3, după care se extrage cu 3 x 10 ml acetat de etil. Faza apoasă se concentrează până la 2 ml și se încarcă pe o coloană cu Sefadex G-25 (90 x 2,5 cm) în apă. Frațiunile, în cantitate de 3 ml, sunt examinate privind absorbția la 230 nm și cele corespunzând unui compus cu masă moleculară mai înaltă sunt reunite și evaporate. Reziduul sticlos obținut, în cantitate de 110 mg, se dizolvă într-un amestec 5:3:2:2 de *n*-butanol, etanol, soluție 25% NH₃ și apă, după care se cromatografiază pe o coloană cu silicagel cu același element. Neutralizarea cu acid acetic și evaporarea fracțiunilor duce la obținerea produsului, care, în final, este purificat cu ajutorul gel-cromatografiei pe o coloană cu Biogel P-2 (70 x 2,5 cm), eluentul utilizat fiind apă. Frațiunile cele mai mobile se reunesc, se concentrează și se liofilizează. Se obțin 58 mg (46%) Boc-Tyr-PGM (I) pur.

Analiza aminoacizilor: GlcNH₂:0,82; MurNH₂:0,57; Ala, 3; Glu, 1; A₂pm, 0,98; Tyr, 0,80

Spectrul ¹H-RMN (D₂O): 1,29 (s, Me₃C), 1,34 - 1,70 (m, parțial suprapus cu Me₃C, 21H, 3 x Me - Ala + lactoil - Me);

1,89 și 1,98 (2 s, 6 H, 2 x NAc), 6,77 și 7,07 (2d, 2H fiecare, I_{H,H} 8,55 Hz, - C₆H₄-).

Cromatografie în strat subțire: *n*-butanol - etanol - NH₃ (25%) - apă (5:3:2:2), se face detecția cu vapori de iod și reactant de peptidă, R_f = 0,5.

Exemplul 2. Prepararea monomerului *terț-butoxicarbonil-¹²⁵I-L-tirozil-peptidoglicanului (II)*

Într-o soluție de 5 μ g Boc-Tyr-PGM în 25 μ l (0,5 M) tampon fosfat pH=7,5, se adaugă 10 μ l (3,70 x 10 Bq 1 mCi) de Na¹²⁵I și 50 μ g cloramină T în 25 μ l (0,25 M) tampon fosfat pH=7,5 și după 45 sec se oprește reacția, prin adăugare de 50 μ g metabisulfid de sodiu în 25 μ l apă. Amestecul de reacție este încărcat imediat pe o coloană cu Sefadex G-25 (30 x 1,5 cm), care este spălată în prealabil cu o soluție de albumină umană și este echilibrată cu tampon fosfat 0,025 M de pH=7,5, care se utilizează în eluare. Frațiunile, în volum de 2 ml, se testează din punctul de vedere al radioactivității și cele corespunzând pentru Boc-¹²⁵I-L-Tyr-PGM se reunesc. Activitatea specifică a derivatului II obținut: aproximativ: 3,12 MBq/ μ g (0,087 mCi/ μ g).

Noul derivat de PGM dizaharid hexapeptidic poate fi utilizat în obținerea produselor farmaceutice posedând activitatea imunomodulatoare și antitumorală, pe când noul derivat marcat cu ¹²⁵I poate fi utilizat pentru obținerea produselor farmaceutice, caracterizate prin proprietățile de legare anti-PGM anticorp.

Activitatea imunostimulatoare a monomerului *terț-butoxicarbonil-L-tirozil-peptidoglican* (Boc-Tyr-PGM) a fost testată prin imunizarea șoarecilor cu eritrocite de oaie (celule roșii de sânge de oaie SRBC).

Șoareci (CBA sau AKR), câte 5 în grup, se imunizează *i.p.* cu eritrocite de oaie (1 x 10⁸ SRBC) în soluția lui Hanks. O zi mai târziu (o zi + 1), grupului de șoareci de control i s-a administrat *i.v.* exclusiv solu-

ția lui Hanks, pe când grupului test de șoareci i s-a dat *i.v.* 200 μg de Boc-Tyr-PGM în soluția lui Hanks; drept control pozitiv s-a utilizat un grup de șoareci căruia i s-a administrat *i.v.* 200 μg de monomer peptidoglican (PGM) în soluția lui Hanks. După 4 zile (o zi + 4) s-a determinat în splină, prin metoda lui Jerne, numărul de celule foratoare de

anticorpi (celule formatoare de plăci, PFC) [Jerne N.K., Nordin A.A. și Henry C. (1963) *Anticorpi legați de celulă*, pag. 109, Wistar Institute Press, Philadelphia - *Tehnica plăcii de agar pentru recunoașterea celulelor care produc anticorpi*].

Rezultatele testelor sunt prezentate în tabelul 1 care urmează.

Tabelul 1

Specie șoarece	Tratament	PFC Domeniul de valori individuale	X	%
CBA	Hanks	95.200 ÷ 238.000	188.906	100
	Boc-Tyr-PGM	257.600 ÷ 304.266	295.966	157
	PGM	198.800 ÷ 449.866	313.413	166
AKR	Hanks	20.000 ÷ 55.200	37.388	100
	Boc-Tyr-PGM	37.730 ÷ 68.670	55.974	150
	PGM	27.200 ÷ 61.070	48.668	130

Boc-Tyr-PGM demonstrează o activitate imunostimulatoare (adjuvantă) la ambele specii de șoareci, la care s-a detectat un număr de PFC crescut cu aproximativ 50%, în comparație cu grupul de control. Eficacitatea Boc-Tyr-PGM a fost în ambele teste comparabilă cu efectul controlului pozitiv, adică a monomerului peptidoglican.

Activitatea antitumorală (antimetastatică) a monomerului de *terț*-butiloxicarbonil-L-tirozil-peptidoglican (Boc-Tyr-PGM) a fost investigată la șoareci inoculați cu melanom B-16.

Șoarecilor (CS 7 BL/6, masculi, în vârstă de 4 luni), câte 5 de grup, li s-a administrat *i.v.* celule de melanom B-16, fiecare 1 x 10⁵ celule, în ziua 0.

Un grup de șoareci a fost ales drept control și nu a fost tratat suplimentar în nici un fel. Șoarecilor din grupul experimental li s-a administrat *i.v.* fiecare 1 mg de Boc-Tyr-PGM, conform următorului protocol:

- primul grup - ziua 3;
- al doilea grup - ziua 7;
- al treilea grup - ziua 3 și 7 (total 2 mg Boc-Tyr-PGM)

Trei grupe de șoareci, care au primit PGM *i.v.*, conform aceluiași protocol, au fost aleși drept control pozitiv.

Metastazele din ficat detectabile macroscopic au fost numărate după omorâre în ziua a 23-a. Rezultatele sunt reprezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

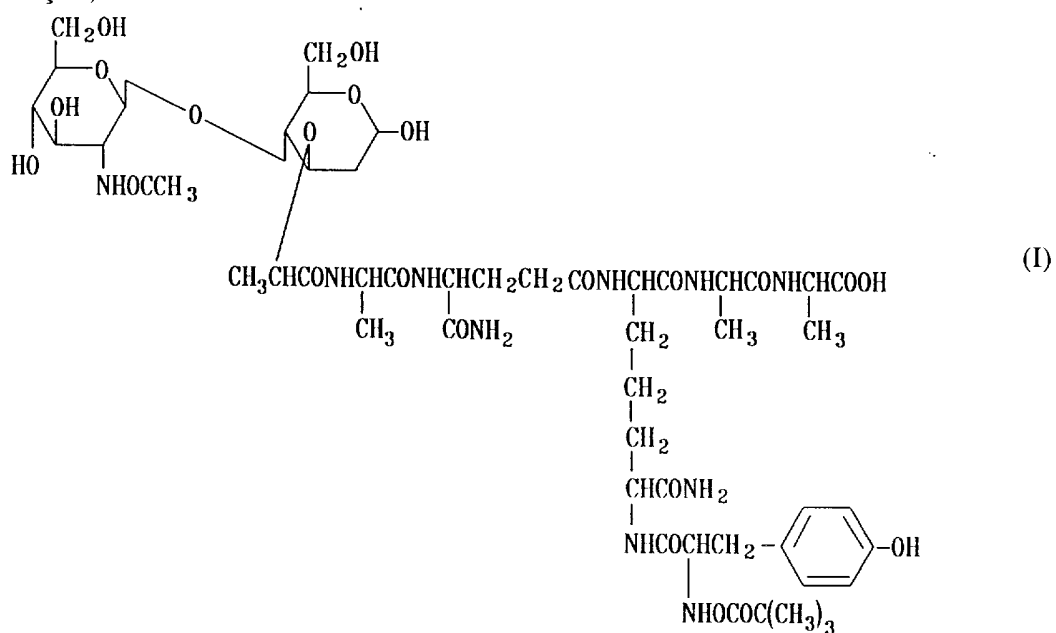
Tratament	Ziua	Număr X	Metastaze %	Inhibare %
Hanks	-	12,4 ± 6,1	100	
Boc-Tyr-PGM	3	7,6 ± 1,9	61 ,3	38,7
	7	7,2 ± 4,0	58 ,1	41,9
	3+7	7,0 ± 2,7	56 ,4	43,6
	3	6,2 ± 4,4	50 ,0	50,0
PGM (PLIVA)	7	5,4 ± 1,7	43 ,5	66,5
	3+7	5,3 ± 1,7	42 ,7	67,3

Tratamentul cu Boc-Tyr-PGM a produs un efect antimetastatic, având drept consecință diminuarea numărului de metastaze la toate grupurile de șoareci tratați (procentul de inhibare 37,8% ÷ 43,6%). Nu s-a observat o diferență semnificativă în gradul de inhibare la șoareci tratați în perioade diferite (în ziua 3 sau 7) și cu o doză totală administrată diferită (1 mg de fiecare, în ziua 3 sau 7 sau în total 2 mg în ziua 3 și 7).

Efectul Boc-Tyr-PGM este comparabil cu efectul PGM (PLIVA) utilizat drept control pozitiv.

Revendicări

1. Monomer derivat de peptidoglican, caracterizat prin aceea că este monomer *terț*-butiloxycarbonil-L-tirozil-peptidoglican cu formula I:



și derivatul său (125 I-Boc-Tyr-PGM), mar-

cat cu 125 I.

2. Procedeu pentru prepararea *terț*-butiloxicarbonil-L-tirozil-peptidoglican, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se condensează 1,2 echivalenți ester *terț*-butiloxicarbonil-L-tirozil-N-hidroxid-succinimidic cu monomer peptidoglican neprotejat, în prezența a 2 echivalenți de trietilamină, în dimetilformamidă, timp de 16 h, la temperatura camerei, și, după stoparea reacției cu bisulfid de sodiu, se izolează produsul pe coloană cromatografică.

3. Procedeu, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** o foarte mică cantitate din Boc-Tyr-PGM este marcată

5

10

15

cu ^{125}I , prin adăugare de $3,7 \times 10^7$ Bq (1 mG) de $\text{Na}(^{125}\text{I})$ și un exces mare de cloramină T, timp de 45 sec, la temperatura camerei, și, după stoparea reacției cu bisulfid de sodiu, se izolează produsul pe coloană cromatografică.

4. Monomer derivat, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în cantitate eficientă, care, în cazul șoarecilor, este de 200 $\mu\text{g}/\text{șoarece}$, împreună cu materiale de suport cunoscute, formează compoziții cu acțiune imunostimulatoare și în cantitate de 1...2 mg/șoarece, alături de materiale de suport cunoscute formează compoziții cu acțiune antimetastatică.

Președintele comisiei de invenții: ing. Orășeanu Cornelia
Examinator: ing. Marin Elena

Grupa 12

Preț lei

3120