ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
( 19 )

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

247791

(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 07 K 7/12 //
A 61 K 37/02

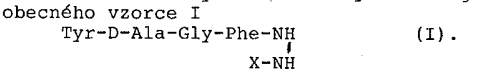
(22) Přihlášeno 21 09 84
(21) PV 7110-84

(40) Zveřejněno 12 06 86
(45) Vydáno 16 05 88

(75)
Autor vynálezu
LIPKOWSKI ANDRZEJ dr., KONOPKA MIROSLAVA dr., VARŠAVA (PLR)
SERVÍTOVÁ LINDA RNDr. CSc., HAUZER KAREL RNDr. CSc., PRAHA (ČSSR)
BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY u Prahy (ČSSR)

## (54) Analogy enkefalinu a způsob jejich přípravy

Nové deriváty enkefalinových analogů obecného vzorce I

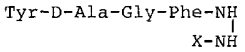


(I).

kde X je zbytek Pro-Leu-Gly, kyseliny γ-aminomáselné, kyseliny nikotinové, nebo Tyr-D-Arg. Derivát opioidního peptidu enkefalinu Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-$NH_2$ byl použit k přípravě bifunkčních derivátů vzorce I s cílem získat látky s pozměněným spektrem účinků a distribučních vlastností. Způsob přípravy látek vzorce I se provádí tak, že se kondenzuje hydrazid chráněného tetrapeptidu vzorce Tyr-D-Ala-Gly-Phe-$NHNH_2$ s komponentami obsahujícími X, odstraní se chránící skupiny a konečný produkt se čistí chromatograficky.

Vynález se týká analogů enkefalinu. Po objevu a izolaci opoidních peptidů enkefalinu z mozku (Hughes et al. 1976) bylo připraveno mnoho syntetických analogů enkefalinů, zejména řada analogů se značně pozměněnou afinitou k různým populacím receptorů s jinými biologickými účinky a větší metabolickou stabilitou. Pozitivní výsledky přinesla zejména záměna L-aminokyselin za D-stereoisomery (Coy D. H. et al. Biochim Biophys. Res Commun. 83, 977-983, 1978, Hughes J. et al., Nature 258, 577-579, 1975), synthesa sloučenin s vlastnostmi prohormonu (Lewis R. V., Stern A. S., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol 23, 353-72, 1983) a příprava dimerů (Lipkowski A. W. et al., Proc. of the 17th Peptide Symposium, Prague 1982, Walter de Gruyrer, Berlin, New York 1983,Str. 481-484).

Podstatou vynálezu jsou další nové analogy enkefalinu obecného vzorce I



(I).

kde X je zbytek Pro-Leu-Gly, kyselina γ-aminomáselné, kyseliny nikotinové, nebo Tyr-D-Arg.

Dále je předmětem vynálezu způsob přípravy těchto látek, jehož podstatou je, že se provede fragmentová kondenzace hydrazidu chráněného tetrapeptidu vzorce Tyr-D-Ala-Gly-Phe-$NHNH_2$ s komponentami ve významu uvedeném pro X ve vzorci I, potom se odstraní chránící skupiny a konečný produkt se čistí chromatograficky. Analogy enkefalinu mají bifunkční charakter, podmíněný kovalentním spojením jednoho z velmi účinných analogů přirozeného enkefalinu

Tyr-D-Ala-Gly- Phe-Met

se známými neurotransmittery a neuromodulátory.

Dimerisace molekuly analogu enkefalinu vede k řádovému zvýšení biologické aktivity. Spojení dvou látek s biologicky odlišnými aktivitami vytvořilo dimer se zachovanou biologickou aktivitou, a rovněž se změněmýni distribučními vlastnostmi, jež jsou podmíněny charakterem kombinovaných látek.

Biologické vlastnosti látek byly stanoveny testem na morčecím ileu, myším vas deferens a stanovením vazebné afinity k membránové frakci připravené z mozku (Paton, 1955; Hutchinson et al., 1975; Lord et al., 1977; Lipkowski, 1982).

Látky byly synthetisovány fragmentovou kondensací Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-$NH_2$ v dimetylformamidu s chráněnými formami čtyř známých neuromodulátorů nebo neurotransmitterů, tj. Pro-Lue-Gly-$NH_2$ (MIF), kys. γ-aminomáselná (GABA). D-$Arg^2$-kyotorfin (tyrosyl-D-arginin) a kyseliny nikotinové. Detailní synthesa je uvedena v příkladech provedení, biologické vlastnosti připravených látek jsou uvedeny v tabulce I.

P ř í k l a d 1

0,01 molu hydrazidu tercbutyloxykarbonyl-tyrosyl-alanyl-glycyl-fenylalaninu (Boc-Tyr--D-Ala-Gly-Phe- NH-$NH_2$) bylo rozpuštěno v 50 ml dimetylformamidu a postupně k tomuto roztoku přidáno 0,01 molu tercbutyloxykarbonyl-prolyl-leucyl-glycinu (Boc-Pro-Leu-GlyOH) a 0,05 molu N-hydroxybenztriazolu (HOBt). Směs byla ochlazena na 0 °C a poté k ní přidáno 0,011 molu dicyklohexylkarbodiimidu (DCC). Při této teplotě byla směs míchána 2 hodiny a poté při teplotě místnosti dalších 12 hodin. Utvořená sraženina dicyklohexylmočoviny byla odsáta a promyta 10 ml dimetylformamidu. Filtrát byl doplněn do 250 ml 0,1M $Na_2CO_3$.

Vysrážený produkt byl odsát, promyt 2x 50 ml vody, 50 ml 0,5M kyseliny citronové a opět 50 ml vody. Produkt byl vysušen v exsikátoru nad práškovým $P_2O_5$. Po vysušení byla látka rozpuštěna v 25 ml koncentrované kyseliny octové obsahující 2N HCl a 0,5 ml anisolu. Po 30 minutách bylo do roztoku přidáno 100 ml etyletheru. Vysrážený produkt byl odsát a promyt

dvakrát 20 ml etyletheru. Produkt byl získán ve výtěžku 71 %. Pro účely dalšího čištění byla látka rozpuštěna v metanolu a chromatografována na sloupci Sephadexu LH-20 za použití metanolu. Výtěžek této operace byl 92 %. Látka byla charakterizována $[\alpha]_D^{25}$ (c = 0,2,metanol). $R_F$ (silikagel) v butanol-kyselina octová-voda (4:1:5 obj. %) aminokyselinovou analýzou a elementární analýzou. Získaná sloučenina vzorce II

$$(HCl)_2 . Tyr\text{-}D\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Phe\text{-}NH\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH \qquad (II)$$

má následující charakteristiku:$[\alpha]_D^{25}$= -16,8°, $R_F$ = 0,45, aminokyselinová analýza:Ala:Gly: Leu:Phe:Tyr, 1,01:1,98:1,01:1,00:0,95:0,92. Pro $C_{36}H_{53}O_8N_9Cl_2$ (810,87) vypočteno: 53,32 % C: 6,60 % H: 15,55 % N: nalezeno: 53,26 % C. 6,87 % H: 15,31 % N.

P ř í k l a d 2

0,01 molu hydrazidu tercbutyloxykarbonyl-tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalaninu (Boc-Tyr--D-Ala-Gly-Phe-NH-$NH_2$) bylo rozpuštěno v 50 ml dimetylformamidu (DMF) a postupně přidáno do roztoku 0,011 molu 2,4,5-trichlorfenylesteru kyseliny tercbutyloxykarbonyl-γ-aminomáselné (kyselina γ-aminomáselná-GABA) spolu s 0,03 molu N-hydroxybenztriazolu. Směs byla míchána při teplotě místnosi 18 h a surový produkt vysrážen přidáním 200ml 0,1M $Na_2CO_3$. Sraženina byla odsáta a promyta 2x 50 ml vody, 0,5M kyselinou citronovou a opět 50 ml vody. Látka byla vysušena ve vakuu nad $P_2O_5$. Po vysušení byl produkt rozpuštěn v 25 ml koncentrované kyseliny octové obsahující 2N HCl a 0,5 ml anisolu.

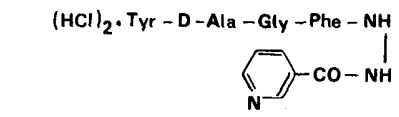
Po 30 min byl do roztoku přidán etylether v množství 100 ml. Výtěžek reakce byl 82 %. Pro další čištění byla látka rozpuštěna v metanolu a chromatografována na koloně Sephadexu LH-20 za použití metanolu jako elučního činidla. Látka byla získána ve výtěžku 89 %. Charakteristika sloučeniny vzorce III

$$(HCl)_2 . Tyr\text{-}D\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Phe\text{-}NH\text{-}NH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}NH \qquad (III)$$

je následující:$[\alpha]_D^{25}$= 26°, $R_F$= 0,44, aminokyselinová analýza:Ala:Gly:GABA:Pher:Tyr, 1,00: 0,97: 0,97: 1,10: 0,95. Pro $C_{27}H_{39}O_6N_7Cl_2$ (628,63) vypočteno: 51,58 % C; 6,27 % H; 15,60 % N, nalezeno: 51,71 % C; 6,45 % H; 15,48 % N.

P ř í k l a d 3

0,01 molu hydrazidu tercbutyloxykarbonyl-tyrosyl-D-alanyl-glycyl-phenylalaninu (Boc-Tyr-D--Ala-Gly-Phe-NH-$NH_2$) bylo rozpuštěno v 30 ml dimetylformamidu a postupně přidáno 0,01 molu 2,4,5-trichlorfenylesteru kyseliny nikotinové spolu s 0,01 molu hydroxybenztriazolu. Směs byla míchána při teplotě místnosti po 18 h a poté byl produkt vysrážen přidáním 100 ml etylesteru kyseliny octové a 100 ml etyletheru. Sraženina byla odsáta a rozpuštěna ve 30 ml kyseliny octové obsahující 4N HCl a 0,5 ml anisolu. Po 20 min bylo přidáno 100 ml etyletheru. Vysrážený produkt byl čištěn chromatografií na koloně Sephadexu LH-20 v metanolu, za použití metanolu jako elučního činidla. Výtěžek činil 65 %. Charakteristika sloučeniny vzorce IV




je následující:$[\alpha]_D^{25}$= 10,8°, $R_F$= 0,27, aminokyselinová analýza: Ala:Gly:Phe:Tyr, 1,00: 1,02: 1,01: 0,94. pro $C_{29}H_{35}O_6N_7Cl_2$ (648,61) vypočteno: 53,70 % C; 5,45 % H; 15,12 % N; nalezeno: 53,70 % C; 5,58 % H; 14,98 % N.

P ř í k l a d 4

0,01 molu hydrazidu tercbutyloxykarbonyl-tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalaninu (Boc-Tyr--D-Ala-Gly-Phe-NH-$NH_2$) bylo rozpuštěno ve 40 ml dimetylformamidu a postupně k tomuto roztoku přidáno 0,01 molu Boc-Tyr-D-Arg ($NO_2$) a 0,05 molu hydrobenztriazolu. Po ochlazení na 0 °C bylo do roztoku přidáno 0,01 molu dicyklohexylkarbodiimidu. Po 1 hodině míchání při 0 °C byl roztok ohřát na teplotu místnosti a míchán dalších 12 hodin. Vysrážená dicyklohexyl--močovina byla odsátá a z filtrátu byl vysrážen surový produkt přidáním 150 ml 1M $NaHCO_3$.

Produkt byl odsát a rozpuštěn ve 20 ml kyseliny octové obsahující 4N HCl a 0,2 ml anisolu. Po 20 min bylo přidáno 100 ml metanolu a roztok byl redukován vodíkem v přítomnosti 10 % Pd/C katalysátoru. Po šesti hodinách redukce byl roztok zahuštěn na 20 ml a bylo přidáno 100 ml etylesteru kyseliny octové. Surový produkt byl čištěn chromatografií na Sephadexu LH-20 v metanolu při výtěžnosti 43 %. Získaná sloučenina vzorce V

$$(HCl)_3.\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH}\begin{matrix}\\|\\\text{Tyr-D-Arg-NH}\end{matrix} \qquad (V)$$

má následující charakteristiku: $[\alpha]_D^{25} = 8,8^o$, $R_F = 0,15$, aminokyselinová analýza:Ala:Arg:Gly:Phe: Tyr, 1,00:0,92:0,95:1,03:1,92. Pro $C_{38}H_{54}O_8N_{11}Cl_3CH_3OH$ (931,45) vypočteno: 50,29 % C; 6,29 % H, 16,55 % N; nalezeno: 50,11 % C; 6,39 % H; 16,81 % N. V následující tabulce I jsou uvedeny některé biologické účinky čtyř nově synthetisovaných analogů.

T a b u l k a I

Biologické účinky nových analogů enkefalinu

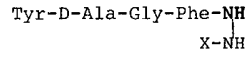
| Látka | Myší vas deferens $IC_{50}$.n molu.$l^{-1}$ | Morčecí ileum $IC_{50}$.n molu.$l^{-1}$ | vazba na receptory $IC_{50}$.n molu.$l^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| I | 4,5 | 84,8 | 3,2 |
| II | 520,0 | 50,1 | 1,1 |
| III | 140,0 | 25,0 | 2,8 |
| IV | 35,0 | - | 1,7 |

$Il_{50}$ = koncentrace (n molu.$l^{-1}$) látky vedoucí k 50% inhibici stimulovaného biol. efektu.

Bifunkční peptidy umožňují nový přístup ke studiu různých interakcí na úrovni receptorů a samoregulačních mechanismů jednotlivých peptidů (Lipkowski et al., 1982, 1983). Struktura peptidů I - IV byla zvolena pro přípravu bifunkčních látek, ze kterých se mohou uvolňovat dvě biologicky aktivní složky v přítomnosti specificky působících peptidas.

# P Ř E D M Ě T  V Y N Á L E Z U

1. Analogy enkefalinu obecného vzorce I



(I).

kde X je zbytek Pro-Leu-Gly, kyseliny $\gamma$-aminomáselné, kyseliny nikotinové, nebo Tyr-D-Arg.

2. Způsob přípravy analogů enkefalinu vzorce I podle bodu 1, vyznačený tím, že se provede fragmentová kondenzace hydrazidu chráněného tetrapeptidu vzorce Tyr-D-Gly-Phe-$NHNH_2$ s komponentami ve významu uvedeném pro X ve vzorci I, potom se odstraní chránicí skupiny a konečný produkt se čistí chromatograficky.