



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 617

(21) PV 778-88.D
(22) Přihlášeno 08 02 88

(40) Zveřejněno 13 12 89
(45) Vydáno 04 06 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 7/12

(75) Autor vynálezu

POSPÍŠEK JAN *ing.*, CSc., PRAHA,
BARTH TOMISLAV RNDr. DrSc., ROZTOKY U PRAHY,
MAŠKOVÁ HANA-PATRICIA RNDr. CSc.,
ANZENBACHEROVÁ EVA RNDr., PRAHA (CS),
BESPALOVA ŽANNA DMITRIJEVNA Dr.,
TITOV MICHAIL IVANOVICH Dr., MOSKVA (SU)

(54)

Analogy enkefalinu a způsob jejich přípravy

(57)

Předmětem řešení jsou nové analogy en-
kefalinu - odvozené od Dalarginu, s nekódo-
vou aminokyselinou se stericky náročným po-
stranním řetězcem vzorce I

L-Tyr-D-Ala-Gly-L-Phe-X-L-Arg (I),
kde X = L-neopentylglycin (L-Neo)
nebo X = D-neopentylglycin (D-Neo)

a způsob přípravy těchto látek. Ten spočívá
v tom, že koncový chráněný tripeptid se kon-
denzuje s C-koncovým tripeptidem obsahujícím
D, L nepřirozenou aminokyselinu. Hexapeptid
se po odstranění chránicí skupiny rozdělí
vysokoučinnou chromatografií na své diaste-
reoizomery. Tyto látky mají vyšší opioidní
účinky než Dalargin a derivát s D-Neo v po-
zici 5 má protrahovaný účinek.

Řešení se týká syntetických analogů enkefalinu, opioidního pentapeptidu, který byl poprvé izolován a charakterizován Hugem v roce 1975 (Huges J. et al., Nature 258, 577, 1975).

Do současné doby byly připraveny řádově tisíce analogů enkefalinu. Řada syntéz byla motivována přípravou analogů se zvýšenou afinitou k různým populačním receptorům, zvýšenou selektivitou účinku a větší metabolickou stabilitou.

Jedním z přístupů k syntéze je záměna přirozených aminokyselin stericky náročnými aminokyselinami, ať již D- nebo L-formy, jež má za následek snížení počtu konformací připravovaného peptidu.

V rámci tohoto výzkumu byly připraveny také analogy enkefalinu modifikované v poloze 5. Do polohy 5 byl zaveden L-terc-leucin, který má objemový terc. butýlový postranní řetězec (Pospíšek J. a kol., Collection Czechoslov. Chem. Commun. 52, 1867, 1987).

Použití této nekódové aminokyseliny mělo za následek vyšší stabilitu k enzymovému štěpení a 2 až 3x vyšší aktivitu při sledování opiatové aktivity než měl D-Ala², Leu⁵-enkefalin (Fauchere J.L., Petermann C., Chim. Acta 63, 824, 1980).

Práce byla zaměřena na obměnu pozice 5 ve známém účinném analogu enkefalinu Dalarginu, L-Tyr-D-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-L-Arg (Titov M.L. et al., Bull. Vsesoyuz. kardiolog. nauch. tsentr. AMN SSSR 2, 72, 1985). V této práci je přinášena syntéza analogu Dalarginu, (L-Neo⁵)Dalarginu a (D-Neo⁵)Dalarginu s uvedením struktury, ve kterých byl L-leucin nahrazen L-či D-neopentylglycinem.

Předmětem vynálezu jsou nové

analogy enkefalinu odvozené od Dalarginu s nekódovou aminokyselinou se stericky náročným postranním řetězcem vzorce I

L-Tyr-D-Ala-Gly-L-Phe-X-L-Arg,

(I)

kde X = D-neopentylglycin nebo L-neopentylglycin, a dále způsob výroby analogů enkefalinu odvozených od Dalarginu obecného vzorce I, vyznačující se tím, že N-koncový tripeptid L-tyrosyl-D-alanyl-glycin chráněný tercbutyloxykarbonylovou skupinou se kondenzuje s C-koncovým tripeptidem L-fenylalanyl-D, L-neopentylglycyl-L-argininem a chráněný hexapeptid se po odštěpení chránicí skupiny trifluoroctovou kyselinou rozdělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na své diastereoizomery.

Látky připravené fragmentovou kondenzací tripeptidů byly nejprve čištěny chromatografií přes kolonu silikagelu. Po odštěpení chránicí skupiny pomocí TFA byl výsledný produkt rozdělen preparativní chromatografií na C-18 na své diastereoizomery. Obě látky jsou opioidně potentnější než Dalargin, přičemž D-forma vykazuje protražovaný účinek.

P ř í k l a d 1

(L-Neo⁵)-Dalargin a (D-Neo⁵)-Dalargin

K roztoku 0,72 g (1,13mmol) p-nitrofenylesteru (o-tercbutyloxykarbonyl)-L-tyrosyl-D-alanyl-glycinu v 10 ml dimethylformamidu bylo za míchání přidáno 0,48 g (1,13 mmol) L-fenylalanyl-D, L-neopentylglycyl-L-argininu. Reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Potom byl dimethylformamid odpařen ve vakuu a zbytek byl rozpuštěn v chloroformu a chromatografován přes kolonu silikagelu v soustavě chloroform-metanol (7:3).

Hlavní frakce byla odpařena ve vakuu k suchu a pevná látka byla překrystalována ze směsi etanol-eter. Získáno bylo 0,86 g látky, tj. 73 %, b.t. 180 - 182 °C. Aminokyselinová analýza: Tyr: 1,06; Ala: 1,07; Gly: 1,06; Phe: 1,01; Neo: 1,00; Arg: 0,98.

Tercbutyloxykarbonylová skupina byla odštěpena obvyklým způsobem pomocí trifluor-octové kyseliny a po vyizolování bylo získáno 0,6 g, tj. 96 % látky, která byla preparativní chromatografií (HPLC) na koloně silasorbu C-18 za využití gradientu (0 - 100%) metanol-voda rozdělena na dvě diastereoizomerní látky: (L-Neo⁵)-Dalargin a (D-Neo⁵)-Dalargin.

Aminokyselinové analýzy:

(L-Neo⁵)-Dalargin: Tyr: 1,00; Ala: 1,10; Gly: 1,19;
Phe: 0,99; Neo: 1,00; Arg: 0,92.

(D-Neo⁵)-Dalargin: Tyr: 1,01; Ala: 1,02; Gly: 1,02;
Phe: 1,01; Neo: 1,00; Arg: 0,98.

P ř í k l a d 2

K testování derivátů Dalarginu byli použiti samci morčat o hmotnosti 200 - 300 g. Ze zvířat omráčených a zabitých zlomením vazy bylo ve vzdálenosti asi 7 cm od slepého střeva vyoperováno asi 8 cm ilea. Ze střeva byla opatrně oddělena vrchní mukózní vrstva a upevněna do testovací nádoby se živným roztokem provzdušňovaným pneumoxidem, který obsahoval v 1 litru: 120 mmol/l NaCl, 5,9 mmol/l KCl, 15,4 mmol/l NaHCO₃, 1,2 mmol/l NaH₂PO₄, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgCl₂ a 2 g glukózy. Teplota média byla udržována na 33 °C. Mukózní vrstva ilea byla připevněna chirurgickou nití k magnetoelektrickému snímači kontrakcí, který byl připojen k registračnímu zařízení. Po 20 minutách bylo na platinové elektrody v nádobce přivedeno napětí o frekvenci 1 puls/10 s a amplitudě 8 V/1 cm vzdálenosti mezi elektrodami.

Při testování (L-neopentylglycin⁵)-Dalarginu a (D-neopentylglycin⁵)-Dalarginu byl jako standard použit Dalargin. Z roztoku 1 mg/ml byly ředěním živným médiem připraveny řady ředění 10⁻¹ až 10⁻³ mg/ml. Zmenšení kontrakcí ilea bylo měřeno v takovém rozmezí dávek, aby alespoň jedna dávka odpovídala větší a jedna menší inhibici než 50 %. Po každé dávce byla nádobka 3x vypláchnuta živným roztokem a další dávka byla podána až po ustálení kontrakcí na původní hladině před dávkou. Z vynesení závislosti velikosti kontrakcí na log dávky (mg) byla zjištěna dávka odpovídající 50 % inhibici, která byla přepočtena na příslušnou koncentraci látky označovanou jako IC₅₀ (mol/l). Následující tabulka I shrnuje IC₅₀ zjištěné pro Dalargin a jeho neopentylglycinové deriváty ze 6 nezávislých měření.

T a b u l k a I

Hodnoty IC₅₀ pro Dalargin, (L-Neo⁵)-Dalargin a (D-Neo⁵)-Dalargin

Látka	IC ₅₀ (nmol/l)
Dalargin	380 ± 30
(L-Neo ⁵)-Dalargin	20 ± 7
(D-Neo ⁵)-Dalargin	85 ± 10

Výsledky ukazují na asi 4násobně vyšší biologickou aktivitu (D-Neo⁵)-Dalarginu a 20 x vyšší aktivitu (L-Neo⁵)-Dalarginu oproti Dalarginu. Kromě toho se při testování (D-Neo⁵)-Dalarginu projevil protrahovaný účinek látky. Při stejné dávce 2×10^{-3} mg byla doba odeznívání účinku "D-formy" dvojnásobná oproti "L-formě".

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Analogy enkefalinu odvozené od Dalarginu s nekódovou aminokyselinou se stericky náročným postranním řetězcem vzorce I

L-Tyr-D-Ala-Gly-L-Phe-X-L-Arg,

(I)

kde X = D-neopentylglycin nebo L-neopentylglycin

2. Způsob výroby analogů obecného vzorce I, podle bodu 1, vyznačující se tím, že N-koncový tripeptid L-tyrosyl-D-alanyl-glycin chráněný tercbutyloxykarbonylovou skupinou se kondenzuje s C-koncovým tripeptidem L-fenylalanyl-D, L-neopentylglycyl-L-argininem a chráněný hexapeptid se po odštěpení chránicí skupiny trifluoroctovou kyselinou rozdělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na své diastereoizomery.