

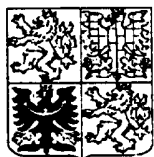
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 690

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **604-92**

(22) Přihlášeno: 28. 02. 92

(40) Zveřejněno: 15. 12. 93

(47) Uděleno: 06. 02. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 04. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 7/06

C 07 K 14/62

// **A 61 K 38/28,**

C 07 K 105:00

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie AVČR,
Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Barth Tomislav RNDr. DrSc., Roztoky u
Prahy, CZ;

Velek Jiří ing. CSc., Praha, CZ;

Bláha Ivo RNDr. CSc., Praha, CZ;

Barthová Jana RNDr. CSc., Roztoky u
Prahy, CZ;

Černá Věra, Praha, CZ;

Jiráček Jiří, Praha, CZ;

Svoboda Ivan RNDr., Praha, CZ;

Pospíšek Jan ing. CSc., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Analogy karboxyterminálního
oktapeptidu (B23-B30) B-řetězce lidského
insulinu a způsob jejich přípravy**

(57) Anotace:

Analogy karboxyterminálního oktapeptidu (B-23, B-30) B řetězce lidského insulinu s alternací aminokyselin v posici B-24 a/nebo B-25 řetězce a s ε-aminoskupinou lysinu v posici B-29 řetězce chráněnou enzymově odštěpitelnou fenylacetylovou skupinou obecného vzorce I

Gly - X - Y - Tyr - Thr - Pro - Lys(Pac) - Thr
23 24 25 26 27 28 29 30 (I)

kde X a Y jsou zbytky aminokyselin ze skupiny zahrnující L a D-fenylalanin, L a D-p-methylfenylalanin, L a D-p-ethylfenylalanin a Pac je fenylacetylová skupina, a způsob jejich přípravy.

CZ 280 690 B6

Analogy karboxyterminálního oktapeptidu (B23-B30) B-řetězce lidského inzulinu

Oblast techniky

Předmětem řešení jsou nové analogy karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulinu.

Dosavadní stav techniky

Pro přípravu nových analogů lidského inzulinu je kromě organické syntézy peptidů stále více využívána metoda enzymové semi-syntézy. Semisyntetická metoda aplikovaná na analogy inzulinu je podmíněna vhodností primární sekvence dané peptidové oblasti. V případě inzulinu je to karboxyterminální oblast B-řetězce inzulinu, která předurčuje trypsin a jemu podobné enzymy k modifikaci, a to jak karboxyterminální aminokyseliny nacházející se za lysinem v pozici 29, tak k inzerci modifikovaného peptidu nacházejícího se v pozicích 23 až 30 za argininem B-22. Syntéza peptidové vazby mezi desoktapeptidinzulinem a požadovaným peptidem obsahujícím chráněný lysin je katalyzována trypsinem, vyžaduje však chránění ϵ -aminoskupiny lysinu vhodnou skupinou, tak, aby nedocházelo k tvorbě peptidové vazby mezi desoktapeptidinzulinem a požadovaným oktapeptidem via ϵ -aminoskupinou lysinu namísto s primární skupinou glycinu v poloze B-23.

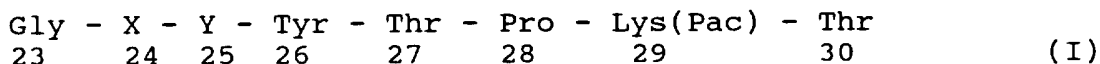
K chránění ϵ -aminoskupiny lysinu byla fenylacetylová skupina použita při přípravě /8-L-lysin/ deaminovasopresinu (čs. autorské osvědčení č. 218 777). Výhodnost použití této skupiny je dáno mírnými podmínkami její eliminace penicilinamidohydrolázou.

Charakter aminokyselin v pozicích B-24 a B-25 je určující pro biologickou aktivitu v analogích lidského inzulinu, a to především u nezkráceného inzulinu.

(H. Kobayashi et al. BBRC 107, 329 až 336, 1982 a R. G. Mirra et al., J. Biol. Chem. 266, 1428 až 1436, 1991).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou analogy karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulinu s alternací aminokyselin v pozici B-24 a/nebo B-25 řetězce a s ϵ -aminoskupinou lysinu v pozici B-29 řetězce chráněnou enzymově odštěpitelnou fenylacetylovou skupinou obecného vzorce I



kde, X a Y jsou zbytky aminokyselin ze skupiny zahrnující L a D-fenylalanin, L a D-p-methylfenylalanin, L a D-p-ethylfenylalanin a Pac je fenylacetylová skupina.

Peptidy se připraví syntézou v pevné fázi při použití terc. butylkarbonyl/benzyl (Boc/Bzl) chránící strategie N- α -primárních NH_2 -skupin z hydroxybenzotriazolových esterů jednotlivých amino-

kyselin. Postranní funkční skupiny jsou chráněny dalšími chránícími skupinami, a to hydroxyl tyrosinu skupinou 2,5-dichlorbenzyl-karbonylovou, hydroxyl threoninu skupinou benzylovou a ϵ -aminoskupina lysinu skupinou fenylacetylovou. Syntetizované peptidy se uvolní z nosiče kapalným fluorovodíkem v přítomnosti anisolu, kdy dojde také k odštěpení chránících skupiny z hydroxylu tyrosinu a threoninu. Peptidy jsou dále čištěny a izolovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Pro přípravu jednotlivých látek bylo použito obecné schéma, jež se pro připojení jednotlivých aminokyselinových zbytků opakuje.

Schéma syntetického postupu

Cyklus připojení chráněné aminokyseliny k peptidickému řetězci na nosiči lze popsát tímto schématem:

1. Odštěpení Boc skupiny 20 ml kyseliny trifluoroctové (TFA) po dobu 2 min, opakované po 10 min.
2. Promytí dichlormethanem (2x20 ml, 1 promytí 20 sekund).
3. Neutralizace 10% diisopropylethylaminu (20 ml) v dichlormethanu (2x1 min).
4. Promytí dimethylformamidem (DMF) (2x20 ml, cyklus 20 sekund)
5. Přidání hydroxybenztriazolového esteru chráněné aminokyseliny v DMF do negativního ninhydrinového testu.
6. Promytí 50% ethanolem (EtOH) (2x20 ml, cyklus 20 sekund) v dichlormethanu.

Při přípravě diastereoizomerních směsí analogů s D,L-p-ethyl-fenylalaninem a D,L-p-methylfenylalaninem byl použit pouze 1.1 molární přebytek terc.butyloxykarbonyl-D,L-p-methylfenylalaninu. V ostatních případech byl použit 3 molární přebytek.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava Gly-L-Phe-L-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Látka byla připravena v pevné fázi na chlormethylovaném polystyrenovém nosiči síťovaném 1% divinylbenzenem (0,96 mmol Cl/g). Karboxykoncový threonin byl připojen kaliumfluoridovou metodou (Horiki, K. a spol. Chem. Letters 1979, 165). Obsah navázané kyseliny byl stanoven aminokyselinovou analýzou a činil 0,56 mmol/g. K syntéze bylo použito 0,54 g (0,3 mmol) esterifikovaného nosiče.

Hydroxybenztriazolové estery Boc-chráněných aminokyselin byly připraveny před kopulační reakcí mícháním směsi 0,9 mmol chráněné aminokyseliny, 0,9 mmol hydroxybenztriazolu (HOBt.H₂O)

a 0,9 mmol dicyklobenzylkarbodiimidu (DCC) v dichlormethanu (CH_2Cl_2). Po 20 minutách při 20 °C byla odsáta vzniklá dicyklohexylmočovina a roztok v chladu za vakua zahuštěn na cca 3 ml a doplněn na 10 ml DMF. Jednotlivé aminokyseliny byly připojeny podle sledu peptidového řetězce způsobem podle shora uvedeného postupu. Z důvodů urychlení reakce bylo v některých případech přidáno 50 mg 4-dimethylaminopyridinu. Po 5 minutách byla reakční směs odsáta, promyta 50 % EtOH a testována Kaiserovým testem (Kaiser, E. a spol., Anal. Biochem. 34, 595, 1970). Po připojení aminokoncového glycinu byla jeho Boc skupina odštěpena TFA a reakce dovedena do kroku 4 syntetického postupu. Po promytí EtOH a pečlivém vysušení bylo odštěpení peptidu od pryskyřice provedeno kapalným fluorovodíkem (HF) s přídavkem 10% anisolu (20 ml HF, 1 h, 0 °C) v teflonové aparatuře. Po vyfoukání HF a promytí pryskyřice etherem byl vzniklý peptid rozpuštěn v 100 ml 20% kyseliny octové a lyofilizován.

Surový peptid byl vyčištěn na vysoceúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) (Separon C-18) v systému H_2O (0,5% TFA), methanol (MeOH) s gradientem MeOH 1% - min. počínaje 30% MeOH. Produkt byl izolován a lyofilizován. Výtěžek 149 mg (46 %). Aminokyselinová analýza: Gly 1,09, Phe 1,99, Tyr 0,98, Thr, 2,02, Pro 0,87, Lys 1,04.

Příklad 2

Příprava Gly-D-Phe-L-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným hexapeptidem byl připojen podle obecného schématu 1,1 ekvivalent Boc-D-phenylalaninu po 24 h, a dále jeden ekvivalent chráněné aminokyseliny v přítomnosti dimethylaminopyridinu po 30 min. Po navázání celého oktapeptidu na pryskyřici bylo další zpracování analogické příkladu 1. Surový peptid byl vyčištěn na HPLC (Separon C-18) v systému H_2P (0,05% TFA/MeOH) s gradientem MeOH 1% - min. počínaje 30% MeOH. Produkt byl izolován a lyofilizován. Výtěžek 187,2 mg. Aminokyselinová analýza: Gly 0,48, Phe 2,10, Tyr 0,94, Thr 2,11, Lys 1,07, Pro 0,80.

Příklad 3

Příprava Gly-L-Phe-D-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným pentapeptidem byl připojen Boc-D-fenylalanin podle schéma v 1,1 ekvivalentu a reagoval 24 h. Potom reagoval ještě s jedním ekvivalentem v přítomnosti dimethylaminopyridinu po 30 min. Boc-fenylalanin a Boc-glycin byly připojeny podle obecného schéma. Po navázání celého oktapeptidu na pryskyřici bylo provedeno odštěpení a čištění peptidu podle příkladu 1. Výtěžek 65 mg. Aminokyselinová analýza: Gly 1,05, Phe 1,78, Tyr 1,17, Thr 1,95, Pro 0,90, Lys 1,10.

Příklad 4

Příprava Gly-D-Phe-D-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným pentapeptidem byl připojen Boc-D-fenylalanin, podle obecného schéma a postupu uvedeného v příkladě 3. Další Boc-D-fenylalanin a Boc-glycin byly připojeny podobně jako v příkladu 3. Výtěžek peptidu byl 158 mg. Aminokyselinová analýza: Gly 1,00, Phe 2,09, Tyr 1,01, Thr 1,88, Pro 0,99, Lys 1,01.

Příklad 5

Příprava Gly-D,L-p-ethyl-Phe-L-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným hexapeptidem bylo připojováno podle schéma 1,1 ekvivalentu Boc-L,D-p-ethylfenylalaninu po 24 hodin a potom ještě jeden ekvivalent v přítomnosti dimethylamino-pyridinu po 30 min. Po navázání celého oktapeptidu na pryskyřici bylo další zpracování analogické příkladu 1. Lyofilizací bylo získáno 58 mg produktu. Získaný peptid je racemát a byl proto rozdělen pomocí kapalinové chromatografie na L- a D-formu. Byla použita modulární sestava firmy Knauer (SRN). Kolona byla naplněna Sepharonem SG-X-C18 (10 μ m, 250x16 mm). Peptid byl nastříkovan v množství 5 mg a vymýván koncentračním gradientem MeOH (start 40% MeOH, 1%/1 min). Pohyblivost L-formy (11,24 min), D-formy (12,52 min). L-formy bylo získáno 15 mg, D-formy 11 mg. Aminokyselinová analýza: L-forma Gly, 0,98, EtPhe 0,80, Phe 1,07, Tyr 0,98, Thr 2,01, Pro 1,08, Lys 1,15
D-forma Gly 1,05, EtPhe 0,86, Phe 1,12, Tyr 0,96, Thr 1,99, Pro 1,04, Lys 0,96.

Příklad 6

Příprava Gly-L,D-p-MePhe-L-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným hexapeptidem byl Boc-L,D-p-methyl-fenylalanin připojen analogicky příkladu 2. Také další zpracování peptidu bylo obdobné. Pohyblivost L-formy byla větší (13,42 min) než D-formy (15,42 min) L-derivátu bylo získáno 8,2 mg a D-derivátu 7,1 mg. Aminokyselinová analýza: L-forma Gly 0,92, MePhe 0,88, Phe 1,09, Tyr 0,89, Thr 2,05, Pro 1,12, Lys 1,02.

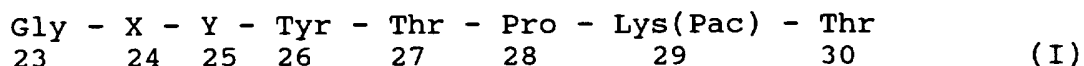
Příklad 7

Příprava Gly-L-Phe-L,D-p-MePhe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr

Na pryskyřici s navázaným pentapeptidem byl Boc-L,D-p-methyl-fenylalanin připojen analogicky příkladu 2. Také další zpracování peptidu bylo obdobné. Pohyblivost L-formy byla větší (14,20 min) než D-formy (16,28 min). L-derivátu bylo získáno 7,1 mg a D-derivátu 5,6 mg. Aminokyselinová analýza: L-forma Gly 0,98, MePhe 0,91, Phe 1,13, Tyr 0,91, Thr 2,13, Pro 0,94, Lys 0,89.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Analogy karboxyterminálního oktapeptidu (B-23, B-30) B řetězce lidského inzulinu s alternací aminokyselin v pozici B-24 a/nebo B-25 řetězce a s ϵ -aminoskupinou lysinu v pozici B-29 řetězce chráněnou enzymově odštěpitelnou fenylacetylovou skupinou obecného vzorce I



kde X a Y jsou zbytky aminokyselin ze skupiny zahrnující L a D-fenylalanin, L a D-p-methylfenylalanin, L a D-p-ethylfenylalanin a Pac je fenylacetylová skupina.

2. Způsob přípravy analogů vzorce I podle nároku 1 syntézou na pevném nosiči, v y z n a č e n ý t í m, že se N-terminální aminové skupiny z hydroxybenztriazolových esterů jednotlivých aminokyselin chrání pomocí kombinace Boc/Bzl chránících skupin, přičemž aminokyseliny s postranními funkčními skupinami se chrání dalšími chránícími skupinami, a to hydroxyl tyrosinu skupinou 2,5-dichlorbenzyloxykarbonylovou, hydroxyl threoninu skupinou benzylovou a ϵ -aminoskupina lysinu skupinou fenylacetylovou, potom se hotové analogy po výstavbě v pevné fázi uvolní kapalným fluorovodíkem za přítomnosti anisolu, a peptidy se dále čistí a izolují, zejména vysoce účinnou kapalinovou chromatografií.

Konec dokumentu
