

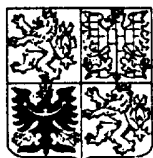
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 695

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **704-92**

(22) Přihlášeno: 10. 03. 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;

Jiráček Jiří RNDr., Praha, CZ;

Anzenbacherová Eva RNDr., Praha, CZ;

Velek Jiří ing. CSc., Praha, CZ;

Bláha Ivo RNDr. CSc., Praha, CZ;

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

Svoboda Ivan RNDr., Praha, CZ;

Pospíšek Jan ing. CSc., Praha, CZ;

Čapka Martin ing. DrSc., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Synthetické analogy oktapeptidické
karboxytermální sekvence B-řetězce
lidského insulinu a způsob jejich výroby**

(57) Anotace:

Synthetické analogy karboxyterminální
sekvence B-řetězce lidského insulinu s obmě-
nou aminokyselin v posici B-24 a/nebo v posi-
ci B-25 obecného vzorce

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

kde

X je D-Phe,	Y je D-Phe	(látka I)
X je L-Phe,	Y je L-p-MePhe	(látka II)
X je L-Phe,	Y je D-p-MePhe	(látka III)
X je L-Phe,	Y je L-p-EtPhe	(látka IV)
X je L-Phe,	Y je D-p-EtPhe	(látka V)
X je L-p-MePhe	Y je L-Phe	(látka VI)
X je D-p-MePhe,	Y je L-Phe	(látka VII)

X je L-p-EtPhe, Y je L-Phe (látka VIII)
X je D-p-EtPhe, Y je L-Phe (látka IX)

Látky se připraví syntesou na pevné
fázi při použití Boc/Blz chránící strate-
gie z hydroxybenztriazolových esterů
jednotlivých aminokyselin, jejichž případné
postranní hydroxyl jsou chráněny, a to
hydroxyl tyrosinu skupinou 2,5-
dichlorbenzyloxikarbonylovou a hydroxyl
threoninu skupinou benzylovou.

CZ 280 695 B6

Syntetické analogy oktapeptidické karboxytermální sekvence B-řetězce lidského inzulinu a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

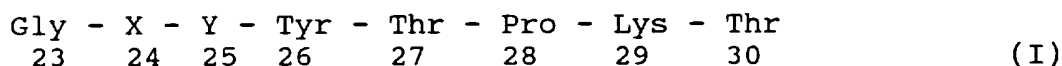
Předmětem vynálezu jsou syntetické analogy oktapeptidické karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulinu s obměnou aminokyselin v pozici B-24 a/nebo v pozici B-25 a způsob jejich přípravy.

Dosavadní stav techniky

Metoda enzymové semisyntézy je využívána v řadě případů nových analogů větších peptidů. Tato metoda je podmíněna primární strukturou modifikované oblasti s ohledem na použitý enzymový systém. V případě inzulinu se jedná o karboxyterminální oblast B-řetězce inzulinu, kde se dá využít trypsin a trypsinu podobné enzymy k semisyntetickým reakcím. Připravili jsme řadu analogů karboxyterminálního oktapeptidu B-řetězce inzulinu, ve kterých byla ϵ -aminoskupina lysinu chráněnou fenylacetylovou skupinou (CZ patent 280 690).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou syntetické analogy oktapeptidické karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulinu s obměnou aminokyselin v pozici B-24 a/nebo v pozici B-25 obecného vzorce I



kde podle vynálezu X je D-Phe a Y je D-Phe (látko I)
 nebo X je L-Phe a Y je L-p-MePhe (látko II)
 nebo X je L-Phe a Y je D-p-MePhe (látko III)
 nebo X je L-Phe a Y je L-p-EtPhe (látko IV)
 nebo X je L-Phe a Y je D-p-EtPhe (látko V)
 nebo X je L-p-MePhe a Y je L-Phe (látko VI)
 nebo X je D-p-MePhe a Y je L-Phe (látko VII)
 nebo X je L-p-EtPhe a Y = L-Phe (látko VIII)
 nebo X je D-p-EtPhe a Y = L-Phe (látko IX)

Látky se připraví syntézou na pevné fázi, při níž se α a ϵ -primární NH_2 -skupiny z hydroxybenztriazolových esterů chrání pomocí Boc/Bzl chránících skupin a postranní hydroxyly jsou chráněny u tyrosinu skupinou 2,5-dichlorbenzyloxykarbonylovou a u threoninu skupinou benzylovou. Dále je výhodné, jestliže peptidy obsahující racemické aminokyseliny L,D-p-methylfenylalanin nebo L,D-p-ethylfenylalanin se uvolní z nosiče kapalným fluorovodíkem, jednotlivě se čistí a analogy se stereoisomery uvedených aminokyselin se oddělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Jiný způsob přípravy peptidů I-IX využívá působení penicilin amidohydrolazy, s výhodou zakotvené na inertním nosiči (AO 218 777), na peptidy s ϵ -aminoskupinou lysinu v pozici 29 chráněnou skupinou fenylactovou, které se připraví postupem dle našeho vynálezu (CZ patent 280 690).

Oktapeptidy s volnou ϵ -aminoskupinou lysinu jsme připravili pro srovnávací a metabolické studie. Tyto byly připraveny jednak syntézou na pevné fázi, jednak odštěpením chránící fenylacetylové skupiny z ϵ -aminoskupiny lysinu peptidů, jež byly předmětem našeho vynálezu (CZ patent 280 690).

Výsledné peptidy jsou čištěny a izolovány vysoce účinnou chromatografií.

Pro syntézu peptidu bylo použito obecné schéma připojení chráněné aminokyseliny k peptidickému řetězci na nosič.

Schéma syntetického postupu

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

1. Odštěpením 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) (2 x 20 ml, cyklus 20 sekund).
5. Přidání hydroxybenzotriazolového esteru chráněné aminokyseliny v DMF do negativního ninhydrinového testu.
6. Promytí 50% ethanolem (EtOH) (2 x 20 ml, cyklus 20 sekund) v dichlormethanu.

Při přípravě diastereoizomerních směsí analogů s D,L-p-ethylfenylalaninem a D,L-p-methylfenylalaninem byl použit pouze 1,1 molární přebytek terc. butyloxykarbonyl-D,L-p-ethylfenylalaninu, respektive terc. butyloxykarbonyl-D,L-p-methylfenylalaninu. V ostatních případech byl použit 3 molární přebytek.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava Gly-D-Phe-D-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 1978, 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.

Hydroxybenzotriazolové estery Boc-chráněných aminokyselin byly připraveny před kopulační reakcí mícháním směsi 0,9 mmol chráněné aminokyseliny, 0,9 mmol HOBt.H₂O a 0,9 mmol dicyklobenzylkarbodiimidu (DCC) v CH₂Cl₂. 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 přidavkem 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 vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) (Separon C-18) v systému H₂O (0,05% TFA) (MeOH s gradientem MeOH 1%-min počínaje 30% MeOH). Produkt byl izolován a lyofilizován. Výtěžek 150 mg (46 %). Aminokyselinová analýza: Gly 1,02, Phe 2,14, Tyr 1,04, Thr 1,84, Pro 0,95, Lys 1,01.

Příklad 2

Příprava Gly-X-Y-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys-L-Thr

kde X = L-Phe a Y = L-p-methylfenylalanin nebo D-p-methylfenylalanin nebo L-p-ethylfenylalanin nebo D-p-ethylfenylalanin. Na pryskyřici s navázaným pentapeptidem byl připojen Boc racemátů p-methylfenylalaninu nebo p-ethylfenylalaninem podle obecného schéma a postupu uvedeného v příkladu 1. Také připojení dalších aminokyselin Boc-L-fenylalaninu a Boc-glycinu bylo provedeno jako v příkladu 1. Po odštěpení byly jednotlivé peptidy rozděleny pomocí kapalinové chromatografie na L- a D-formu. Byla použita modulární sestava firmy Knauer. Peptid byl dělen na koloně se Sepharonem SG-X-C18 (10 µm, 250x16 mm), koncentračním gradientem MeOH.

Příklad 3

Příprava peptidů VI-IX

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

kde X = L-p-methylfenylalanin nebo D-p-methylfenylalanin, nebo L-p-ethylfenylalanin nebo D-p-ethylfenylalanin a Y=L-fenylalanin. Na pryskyřici s navázaným hexapeptidem byl připojen Boc-racemátů p-methylfenylalanin nebo p-ethylfenylalaninem podle obecného schéma a postupu uvedeného v příkladu 1. Připojení Boc-glycinu, odštěpení peptidů a jejich čištění bylo provedeno podobně jako v příkladu 2.

Příklad 4

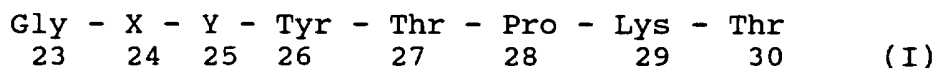
Příprava peptidů - látek I-IX

1mM roztok látek 1 až IX obsahující chránící fenylacetylovou skupinu na ε-NH₂-lysinu v poloze B-29 řetězce lidského inzulinu

v roztoku 1M močoviny a 40 mM Na-fosfátového pufru pH 6,5 byl cirkulován přes kolonu porézního skla se zakotvenou penicilin amidohydrolazou; do systému byla dále zapojena kolonka s Dowexem 1x8, kde byla vychytávána odštěpená kyselina fenyloctová, inhibitor enzymu. Průběh reakce byl sledován a izolace produktů látek I-IX byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Syntetické analogy oktapeptidické karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulínu s obměnou aminokyselin v pozici B-24 a/nebo v pozici B-25 obecného vzorce I



kde	X je D-Phe a Y je D-Phe	(látko I)
	nebo X je L-Phe a Y je L-p-MePhe	(látko II)
	nebo X je L-Phe a Y je D-p-MePhe	(látko III)
	nebo X je L-Phe a Y je L-p-EtPhe	(látko IV)
	nebo X je L-Phe a Y je D-p-EtPhe	(látko V)
	nebo X je L-p-MePhe a Y je L-Phe	(látko VI)
	nebo X je D-p-MePhe a Y je L-Phe	(látko VII)
	nebo X je L-p-EtPhe a Y je L-Phe	(látko VIII)
	nebo X je D-p-EtPhe a Y je L-Phe	(látko IX)

2. Způsob přípravy látek obecného vzorce I podle nároku 1 syntézou na pevné fázi, v y z n a č e n ý t í m, že se α a ϵ -primární NH_2 -skupiny hydroxybenztriazolových esterů chrání pomocí Boc/Bzl chránících skupin a postranní hydroxyly jsou chráněny u tyrosinu skupinou 2,5-dichlorbenzyloxykarbonylovou a u threoninu skupinou benzylovou.
3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č e n ý t í m, že peptidy obsahující racemické aminokyseliny L,D-p-methylfenylalanin nebo L,D-p-ethylfenylalanin se uvolní z nosiče kapalným fluorovodíkem, jednotlivě se čistí a analogy se stereoisomery uvedených aminokyselin se oddělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.
4. Způsob přípravy látek obecného vzorce I až IX podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že se na ϵ -aminoskupině lysinu v pozici 29B-řetězce použije chránící fenylacetylová skupina a odštěpí se pomocí zakotvené penicilinamidohydrolazy.

Konec dokumentu
