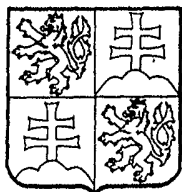


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

271 584

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 1/04

(21) PV 1387-88.T
(22) Přihlášeno 03 03 88

(40) Zveřejněno 12 02 90
(45) Vydáno 02 09 91

(75) Autor vynálezu KRCHŇÁK VIKTOR RNDr. CSc.,
VÁGNER JOSEF ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy peptidů na pevné fázi

(57) Řešení se týká způsobu přípravy peptidů na pevné fázi. Podstata spočívá v tom, že se zakotvení karboxyterminální aminokyseliny a postupná výstavba peptidového řetězce včetně promývacích kroků provádí v ultrazvukovém poli. Reaktor s polystyrenovým nosičem se umístí do ultrazvukové lázně. Za občasného mechanického promíchání se působí na směs polymerního nosiče a reaktantů, příp. promývacích roztoků ultrazvukem. Působením ultrazvuku se reakce výrazně urychlí.

Vynález se týká způsobu přípravy peptidů na pevné fázi v ultrazvukovém poli.

Příprava peptidů na pevné fázi je charakterizována jako sled opakujících se reakcí a promývacích operací, které probíhají na polymerním nosiči. Vyznačuje se tím, že není možné čistit reakční meziprodukty. Proto jsou kladeny vysoké požadavky na průběh jednotlivých reakcí, mimo jiné i na jejich úplnou konverzi. Stupeň konverze je možné ovlivnit: dobou reakce, změnou reakčního prostředí (např. z DCM do DMF), vhodným katalyzátorem (např. DMAP), opakováním reakce s novou navážkou činidel, příp. změnou činidel. Často se stává, že reakce probíhá velmi pomalu, potom jsou uvedené způsoby zdlouhavé, dochází ke zvýšené spotřebě činidel, příp. k nežádoucím reakcím (např. racemizace při dlouhodobé katalýze DMAP).

Uvedené nevýhody přípravy peptidů na pevné fázi odstraňuje způsob přípravy podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se jednotlivé reakční kroky postupně vystavby peptidového řetězce provádějí v ultrazvukovém poli.

Použití ultrazvukového pole při přípravě peptidů na pevné fázi podle vynálezu se provádí tak, že se do reaktoru umístí polymerní nosič polystyrenového typu síťovaný divinylbenzenem, s výhodou jedním procentem, funkcionalizovaný vhodnými funkčními skupinami, s výhodou p-methylbenzhydrolými. K polymernímu nosiči se přidá reakční komponenta a reaktor se umístí do ultrazvukové lázně. N-alfa-aminoskupiny byly chráněny acidolabilní chránicí skupinou, s výhodou Boc skupinou, její odštěpování v jednotlivých fázích syntézy bylo prováděno acidolyticky, s výhodou směsí TFA a DCM nebo HCl v DCM, čs. autorské osvědčení č. 255500. Postranní funkční skupiny vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Kondenzace chráněných aminokyselin byly prováděny vhodně aktivovanými deriváty, s výhodou HOBt estery. Ukončení reakce bylo monitorováno barvenou změnou acidobazického indikátoru, s výhodou bromfenolovou modří, čs. autorského osvědčení č. 268230. Všechny kroky postupné výstavby peptidového řetězce byly provedeny v ultrazvukovém poli. Po ukončení syntézy byl peptid z pryskyřice odštěpen a současně byly odstraněny chránicí skupiny vícefunkčních aminokyselin acidolyticky, s výhodou působením kapalného HF. Surový produkt byl čistěn, buď pomocí sloupcové chromatografie na nosičích používaných v chemii peptidů, s výhodou nosičů fungujících jako molekulární síta. Peptidy byly charakterizovány aminokyselinovou analýzou a jejich čistota byla ověřena chromatografickými a elektroforetickými metodami.

Způsob přípravy peptidů na pevné fázi v ultrazvukovém poli podle vynálezu urychluje reakce a promývací operace probíhající na polymerním nosiči, umožňuje dosažení úplné konverze v krátké době, zjednodušuje přípravu peptidů a přináší úspory materiálu (snížení spotřeby činidel, rozpouštědel a katalyzátoru).

Následující příklady způsobu přípravy peptidů na pevné fázi v ultrazvukovém poli podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezuji.

Příklad 1

Do průtokového reaktoru (vnitřní objem 10 ml) bylo umístěno 400 mg p-methylbenzhydrolaminové kopoly(styren-1% divinylbenzen)ové pryskyřice (obsah aminoskupin 0,4 meq/g). Syntéza byla provedena na manuálně ovládaném syntetizátoru vlastní konstrukce (viz čs. autorské osvědčení č. 262081) kontinuální průtokovou metodou podle čs. autorského osvědčení č. 255089. Průtočný reaktor byl umístěn do kádinky naplněné DMF, tak aby byl celý obsah reaktoru ponořen v kapalině. Podobně byla umístěna kádinka s reaktorem do ultrazvukové lázně naplněné vodou. α -aminoskupiny byly chráněny Boc skupinou, postranní řetězce vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Arg p-toluensulfonovou skupinou. Chráněné aminokyseliny byly aktivovány pro kondenzaci formou HOBt esterů. Jeden syntetický cyklus obsahoval tyto kroky:

- (1) štěpení Boc chránících skupin, 40% TFA v DCM, 30 min (3 min promývat, 27 min v klidu);
- (2) promývání, DCM, do slabě kyselého efluentu (kontrolováno navlhčeným pH papírkem);
- (3) neutralizace, 5% DIEA v chloroformu, 3 min;
- (4) promývání, DMF, do neutrálního efluentu;
- (5) kondenzace: chráněná aminokyselina, 0,8 meq v DCM (nebo DCM : DMF, 4 : 1, je-li třeba), přidat HOBt, 0,8 meq v DMF, přidat DCC, 0,8 meq v DCM, 30 min při 20 °C, odfiltrovat N,N-dicyklohexylmočovinu, promýt DCM, odpařit DCM za sníženého tlaku ($t < 25$ °C), naředit DMF, zfiltrvat, promýt DMF, doplnit DMF na koncentraci 0,2 M, přidat několik kapek 0,001 M roztoku bromfenolové modře v DMF (70 mg/100 ml), nastříknout do průtokového reaktoru, ponechat reagovat do přechodu acidobazického indikátoru z modré do žluté barvy;
- (6) promývání, DMF, 5 min.

Průtok během promývacích cyklů byl cca 20 až 30 ml/min, přetlak inertního plynu 20 až 50 kPa. Syntéza byla ukončena odštěpením Boc skupiny z poslední kondenzované aminokyseliny /krok (1)/, peptidyl-pryskyřice byla promyta DCM, methanolem a byla vysušena proudem dusíku. Výtěžek 920 mg. Surový peptid byl získán po štěpení peptidyl-pryskyřice kapalným fluorovodíkem. Po odstranění HF byly produkt a pryskyřice suspendovány v etylacetátu, zfiltrvány, promyty etylacetátem a produkt extrahován do 20% kyseliny octové a lyofilizován. Výtěžek 330 mg. Surový peptid byl čistěn na koloně (2,6 x 100 cm) obsahující jako stacionární fázi polyamidový gel (Biogel P4), mobilní fáze 20% kyseliny octové ve vodě. Frakce obsahující homogenní produkt byly spojeny a lyofilizovány. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (R_t 4,5 min, mobilní fáze 50 % MeOH, 50 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : vody - 4 : 1 : 1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 94 mg

Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-Val-Asn-Gly-Ser-Leu-NH₂

Příklad 2

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ib. K chránění postranní skupiny cysteinu byla použita p-methylbenzyllová skupina, výtěžek peptidyl-pryskyřice byl 820 mg, výtěžek surového produktu 262 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (R_t 4,5 min, mobilní fáze 40 % MeOH, 60% vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda - 4 : 1 : 1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 132,5 mg

H-Cys-Val-Pro-Thr-Asp-Pro-Asn-Pro-Gln-Glu-Val-Val-NH₂

Příklad 3

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ic. K chránění postranní skupiny cysteinu byla použita p-methylbenzyllová skupina. Výtěžek peptidyl-pryskyřice byl 1 005 mg, výtěžek surového produktu 346 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (R_t 6,0 min, mobilní fáze 45 % MeOH, 55 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda - 4 : 1 : 1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 201 mg

H-Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile

Příklad 4

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Id. K chránění postranní funkce tryptofanu byla použita formylová skupina. Výtěžek peptidyl-pryskyřice byl 945 mg, výtěžek surového produktu 401 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (Rt 7,5 min, mobilní fáze 45 % MeOH, 55 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda - 4 : 1 : 1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 199 mg

H-Gly-Gly-Gly-Asp-Met-Arg-Asp-Asn-Trp-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr-NH₂

Příklad 5

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ie. K chránění postranní funkce tryptofanu byla použita formylová skupina. Výtěžek peptidyl-pryskyřice 840 mg, výtěžek surového produktu 368 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (Rt 7,5 min, mobilní fáze 55 % MeOH, 45 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda - 4 : 1 : 1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 186 mg

H-Val-Pro-Trp-Asn-Ala-Ser-Trp-Ser-Asn-Lys-Ser-Leu-Glu-Gln-Ile-NH₂

Příklad 6

Chlormethylovaná kopoly(styren-1%divinylbenzen)ová pryskyřice (2,0 g, obsah aktivního chloru 0,8 meq/g) byla esterifikována KF metodou Boc glycinem (obsah Gly 0,76 meq/g) a byla umístěna do reakční nádoby automatického syntetizátoru vlastní konstrukce. Jeden syntetický cyklus obsahoval tyto kroky:

- (1) štěpení Boc chránicích skupin, 40 % TFA v DCM, 1 x 5 min, 1 x 30 min;
- (2) promývání, DCM, 3 x 2 min;
- (3) neutralizace, 5% DIEA v chloroformu, 2 x 3 min;
- (4) promývání, DCM, 3 x 2 min;
- (5) kondenzace: chráněná aminokyselina, 5 mmol v DCM (nebo DCM : DMF, 4 : 1, je-li třeba), přidat HOBt, 5 mmol v DMF, přidat DCC, 5 mmol v DCM, 30 min při 20 °C, odfiltrovat N,N-dicyklohexylmočovinu, promýt DCM, odpařit DCM za sníženého tlaku (t < 25 °C), naředit DMF, zfiltrovat, promýt DMF, doplnit DMF na koncentraci 0,2 M, přidat několik kapek 0,001 M roztoku bromfenolové modře v DMF (70 mg/100 ml), ponechat reagovat do přechodu acidobazického indikátoru z modré do žluté barvy;
- (6) promývání, DMF, 2 x 2 min;
- (7) promývání, DCM, 3 x 2 min;

V jednotlivých cyklech byly kondenzovány následující aminokyseliny: Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Cys(Bzl), Boc-Asn, Boc-Gln, Boc-Ile, Boc-Tyr a Boc-Cys(Bzl). Syntéza byla ukončena odštěpením Boc skupiny z poslední kondenzované aminokyseliny (krok 1) a peptidyl-pryskyřice byla promyta DCM, methanolem a vysušena proudem suchého dusíku. Výtěžek byl 3,8 g. Surový peptid byl získán po amonolýze peptidyl-pryskyřice, chránicích skupiny byly odstraněny sodíkem v kapalném amoniaku. Po odstranění kapalného amoniaku byl produkt

oxidován 0,01 M roztokem ferrikyanidu draselného při pH 6,8 (30 min). Okyselený roztok (pH 3 až 4) byl odsolen na sloupci IRA 400 v H+ cyklu. Výtěžek 1,18 g. Odsolený surový peptid byl čistěn na koloně (2,6 x 100 cm) obsahující jako stacionární fázi polyamido-vý gel (Biogel P4), mobilní fáze 20% kyselina octová ve vodě. Frakce obsahující homogenní produkt byly spojeny a lyofilizovány. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami. Čistota produktu byla potvrzena při analytické HPLC (Rt 4,5 min, mobilní fáze 50 % MeOH, 50 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda = 4 : 1 : 1) a elektroforézou na papíře při pH 2,5.

Výtěžek 940 mg

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

Příklad 7

Do dvou průtočných reaktorů (vnitřní objem 10 ml) bylo umístěno po 400 mg p-methylbenzhydrolaminové kopoly(styren-1%divinylbenzen)ové pryskyřice (obsah volných aminoskupin 0,4 meq/g). Reaktory byly spojeny a podle postupu uvedeném v příkladu 1 byly připraveny dva peptidy shodné sekvence, s tím rozdílem, že jen v prvním reaktoru byly reakce urychlovány ultrazvukem. Z obou reaktorů bylo odebráno cca 1/8 peptidyl-pryskyřice a ke zbytku byla přikondenzována další aminokyselina Boc-Nle. Po odštěpení Boc skupin byly surové peptidy získány fluorovodíkovým štěpením. Bylo získáno 22,6 mg Leu-Gln-Pro-Gln-Asn-Pro-Ser-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln-NH₂ z reaktoru 1 a 22,4 mg Leu-Gln-Pro-Gln-Asn-Pro-Ser-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln-NH₂ z reaktoru 2; 175,2 mg Nle-Leu-Gln-Pro-Gln-Asn-Pro-Ser-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln-NH₂ z reaktoru 1 a 180,5 mg Nle-Leu-Gln-Pro-Gln-Asn-Pro-Ser-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln-NH₂ z reaktoru 2.

Produkty měly aminokyselinové analýzy shodné s teoretickými hodnotami. Čistota byla zjištěna pomocí HPLC. Pro stanovení byly použity následující podmínky:

kolona 250 x 4 mm naplněná reverzní fází C18, průtok 0,8 ml/min, rozpouštědlo A 90% acetonitrilu ve vodě s přísadkou 0,1 % TFA, rozpouštědlo B 5% acetonitrilu ve vodě s přísadkou 0,1 % TFA, gradientový profil v % A v B: 0 - 5 min 0,1 %, 5 až 95 min 0,1 až 35,2 %, 95 až 115 min 35,2 až 58,8 %, 115 až 116 min. 58,8 až 99,9 %, 116 až 122 min 99,9 %, 122 až 123 min 0,1 %.

Analýzou bylo zjištěno, že srovnávané dvojice peptidů jsou vysoce čisté, totožné látky se shodným elučním profilem. Stejných výsledků bylo docíleno i při chromatografii na tenké vrstvě a elektroforéze. Úspory syntézy provádění v ultrazvuku jsou uvedeny v tabulce:

Tabulka
Vyhodnocení srovnávací syntézy

Sledovaný údaj	Syntéza		Úspora
	s ultrazvukem	bez ultrazvuku	
Doba kondenzací	210 min	520 min	310 min
Počet opakování kondenzace	1x	4x	
Spotřeby chemikálií:			
DCM	1 300 ml	1 600 ml	300 ml
DMF	650 ml	800 ml	150 ml
Akt. komponenta	14 mmol	17 mmol	3 mmol
Výtěžek 100% látky	47,9 %	46,8 %	

Vysvětlivky ke zkratkám použitým v textu:

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TPA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormetan
DMF	N,N-dimethylformamid
HOBt	N-hydroxybenzotriazol
Boc	t-butyloxykarbonyl
DIEA	ethyl-diisopropylamin
MeOH	methanol
DCC	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
HF	fluorovodík
Arg	arginin
Asp	kyselina asparágová
Cys	cystein
Gln	glutamin
Gly	glycin
Glu	kyselina glutámová
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Val	valin

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy peptidů na pevné fázi, vyznačující se tím, že se jednotlivé reakční kroky postupné výstavby peptidového řetězce provádějí v ultrazvukovém poli.