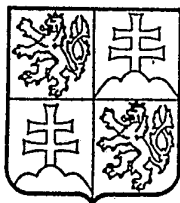


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 924

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 1/04

(21) PV 2497 - 89.M

(22) Přihlášeno 21 04 89

(40) Zveřejněno 14 08 90

(45) Vydáno 25 05 92

(75) Autor vynálezu

SOUČEK MILAN ing. CSc.,
URBAN JAN RNDr., PRAHA

(54)

Způsob přípravy N-chráněných peptidových
alkoholů

(57)

Řešení se týká způsobu přípravy
N-chráněných peptidových alkoholů. Pod-
stata spočívá v reduktivním štěpení este-
rové vazby, kterou je chráněný peptid
vázan na nerozpustný nosič, methoxyboro-
hydridem sodným nebo draselným.

Vynález se týká způsobu přípravy N-chráněných peptidových alkoholů redukcí N-chráněných peptidů vázaných na nerozpustný nosič esterovou vazbou, přičemž se redukce provádí methoxyborohydridy sodíku nebo draslíku, bez předchozího odštěpení peptidu z nerozpustného nosiče.

Dosud se N-chráněné peptidové alkoholy připravují převážně redukcí methyl- a ethyl-esterů N-chráněných peptidů ve vodném methanolu (D. Hudson, G. W. Kenner, R. Sharpe, M. Szelke: Int. J. Pept. Protein Res. 14, 177 (1979)), a nebo ve směsi tetrahydrofuranu s methanolem (K. Soai, H. Ogamata, M. Takase: Bull. Chem. Soc. Jpn. 57, 2327 (1984)) borohydridem sodným. Nechráněné peptidové alkoholy byly připraveny z peptidů, vázaných na Merrifioldovou pryskyřici hydridem lithno-boritým (J. M. Stewart, D. H. Morris: US patent č. 4 254 023). V tomto patentu je rovněž zmínka o redukcí peptidů vázaných na pryskyřici záměnou hydridu lithno-boritého za hydridy sodno-boritý a draselno-boritý, ale redukce těmito komplexními hydridy nejsou doloženy příkladem.

Pokusy, opakovanými s řadou chráněných i nechráněných peptidů vázaných na Merrifioldovu pryskyřici, bylo však zjištěno, že za podmínek uvedených v patentu hydrid sodno-boritý a hydrid draselno-boritý peptidové alkoholy neposkytují. Nevýhodou redukcí hydridem lithno-boritým je jeho rozklad vodou a nižšími alkoholy, dále jeho vysoká reaktivita, která vylučuje použití některých chránících skupin. Další nevýhodou hydridu lithno-boritého je jeho vysoká cena.

Uvedené nevýhody odstraňuje reduktivní štěpení N-chráněného peptidu vázaného esterovou vazbou na polymerní nosič, vyznačující se tím, že štěpení se provádí směsí methoxyborohydridů, popřípadě připravenými in situ přikapáním methanolu do suspenze alkalického borohydridu v příslušném rozpouštědle.

Postup podle vynálezu je výhodný v tom, že oproti známému postupu dovoluje připravit chráněné peptidové alkoholy ve vyšších výtěžcích a snadno izolovatelné formě. Dalšími výhodami jsou možnost použití rozpouštědel, ve kterých jsou hydridy alkalických zemin nerozpustné a nebo jsou jimi rozkládány, dále nízká cena redukčního činidla (asi 10krát nižší než hydrid lithno-boritý).

Následující příklady provedení vynález objasňují, ale jeho rozsah neomezují a ani nevyčerpávají.

Příklad 1

K Merrifioldově pryskyřici (53 mg), obsahující esterově vázaný peptid se sekvencí Boc-Pro-Gln-Val-Ser(Bzl)--Gln-O-polymer (0,021 mmol Pro), suspendované v THF (1,5 ml) byl přidán hydrid sodno-boritý (3,8 mg; 0,1 mmol). K suspenzi zahřáté na 50 °C byl za míchání během 10 min přikapán roztok methanolu (0,16 ml) v THF (0,5 ml). Po dalších 40 min při teplotě 50 °C byla směs ochlazená na teplotu místnosti a pryskyřice byla odfiltrována a promyta methanolem (5 ml). Spojené filtráty byly odpařeny ve vakuu a tuhý odparek byl rozmíchán s DMF (2 x 1 ml). Spojené extrakty byly přefiltrovány přes sloupeček, obsahující Amberlyst A 15 (v H⁺ formě, 1 ml) a Amberlyst A 26 (v HO⁻ formě, 1 ml). Produkt byl ze směsi ionexů vymyt DMF (6 ml). Eluát byl zahuštěn ve vakuu při 40 °C na objem asi 1,5 ml. Ke koncentrátu byl za míchání přikapán t-BuOMe (20 ml). Vysrážený produkt byl odfiltrován a na filtru promyt t-BuOMe (3 x 3 ml) a vysušen ve vakuu. Bylo získáno 8,7 mg (57 %) Boc-Pro-Gln-Val-Ser(Bzl)-Gln-ol. Aminokyselinová analýza: Pro 0,93, Gln 0,87, Ser 0,63, Val 1,10.

Pro $C_{35}H_{55}N_7O_{10}$ (733,9) vypočteno: 63,39 % C, 7,91 % H, 11,37 % N;
nalezeno : 62,93 % C, 8,23 % H, 11,10 % N.

MS: 734 (M + 1).

Příklad 2

K Merrifieldově pryskyřici (37 mg), obsahující esterově vázaný peptid, se sekvencí Boc-Met-Ser(Bzl)-Leu-Asn-Sta-Val-Ala-Lys(Z)-Val (0,013 mmol Met), suspendované v DMF (1,5 ml), byl za míchání při 50 °C přidán 1M roztok methoxyborohydridu sodného v THF (0,10 ml). Po 50 min míchání byla reakční směs zpracována stejně jako v Příkladu 1. Bylo získáno 14,0 mg (81 %) Boc-Met-Ser(Bzl)-Leu-Asn-Sta-Val-Ala-Lys(Z)-Val-ol. Aminokyselinová analýza: Met nestanoven, Ser 0,54, Leu 1,07, Asp 0,96, Sta 0,21, Val 0,98, Ala 1,02, Lys 1,00.

Pro $C_{65}H_{105}N_{11}O_{16}S$ (1328,7) vypočteno: 58,76 % C, 7,97 % H, 11,60 % N;
nalezeno : 58,40 % C; 8,23 % H, 11,31 % N.

MS: 1328 (M + 1).

Zkratky použité v příkladech vynálezu:

Boc	terc. butoxykarbonyl
Z	benzyloxykarbonyl
Pro	prolin
Gln	glutamin
Glu	glutamová kyselina
Val	valin
Ser	serin
Met	methionin
Leu	leucin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Sta	statin
Ala	alanin
Lys	lysin
THF	tetrahydrofuran
t-BuOMe	terc. butylmethylether
DMF	dimethylformamid

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy N-chráněných peptidových alkoholů reduktivním štěpením N-chráněných peptidů, vázaných esterovou vazbou na nerozpustný polymerní nosič, vyznačený tím, že štěpení esterové vazby se provádí směsí mono-, di- a trimethoxyborohydridů sodíku nebo draslíku, popřípadě připravených in situ.