



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

256897

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 7/06

(22) Přihlášeno 17 12 84

(21) PV 9887-84

(40) Zveřejněno 17 09 87

(45) Vydáno 16 01 89

(75)

Autor vynálezu

KASAFÍREK EVŽEN ing. CSc., ČERNÝ MARTIN ing., KOČIŠ PETR ing.,
KŘEPELKA JIŘÍ ing. CSc., PRAHA, ROVENSKÝ JOZEF MUDr. CSc., PIEŠŤANY

(54) Peptidy typu analogů sérového thymického faktoru

Analogy sérového thymického faktoru modifikované jak v N- a C-terminální části, tak i uprostřed aminokyselinového řetězce odpovídají obecnému vzorci I

A - Gly - Gly - Ser - Asn - B - C - NH - R

(I),

kde A je pGlu, Gln, anebo zbytek peptidu Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-, pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-, Ala-Lys-Ser-Gln-,

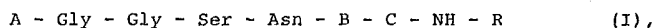
B je Gly, Phe, Ala nebo nula,

C je totéž co B,

R je atom vodíku nebo alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo 2-fenylethyl.

Analogy s C-prodlouženým aminokyselinovým anebo peptidickým řetězcem, zakončené amidickou anebo alkylamidickou skupinou a s modifikovanou N-terminální pozicí, zvláště glutaminem, vykazují imunosupresi. Sloučeniny s eliminovanou N-terminální pozicí, tzv. des-pyroglutamylpeptidy, zakončené amidickou skupinou, vykazují imunostimulaci, zatímco tytéž sloučeniny, zakončené alkylamidovou skupinou vykazují imunosupresi.

Vynález se týká peptidů typu analogů sérového thymického faktoru obecného vzorce I



kde A je pGlu, Gln, anebo zbytek peptidu Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-, pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-, Ala-Lys-Ser-Gln-,

B je Gly, Phe, Ala nebo nula,

C je totéž co B,

R je atom vodíku nebo alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo 2-fenylethyl.

Hormony thymu získané buď izolací extrakcí thymu anebo syntetické, jsou therapeuticky využívány u imunodeficientních pacientů (thymotherapie) ke zvýšení jejich imunologické reaktivity. Prakticky se to týká systémového onemocnění lupus erythematosus, myastenia gravis, dětského astmatu, ale i nádorového onemocnění.

S překvapením bylo zjištěno, že látky podle vynálezu se vyznačují tím, že stimulují a diferencují vývoj T-lymfocytů, zvláště jejich zrání. Jejich aktivita in vitro E-rosetovým testem je vyšší než u přírodních hormonů thymu, kupř. sérového thymického faktoru, ale i thymosinu V, viz tab. I.

Dosavadní vývoj v hledání nových specifických analogů sérového thymického faktoru se soustřeďoval na látky modifikované v N-terminální části řetězce anebo přímo v aminokyselinové sekvenci uvnitř řetězce a zcela opomíjel prodloužení C-terminálního peptidického řetězce.

S překvapením bylo zjištěno, že látky podle vynálezu s C-terminálním prodlouženým aminokyselinovým anebo peptidickým zbytkem, zvláště pak zakončených amidovým nebo alkylamidovým zbytkem, se vyznačují zvýšenou imunomodulační aktivitou.

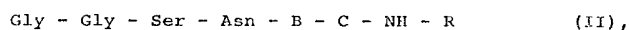
Dosud prováděné záměny u N-terminální části sekvence sérového thymického faktoru prokázaly nevýznamnost pyroglutamového zbytku v pozici 1. (int. J. Pept. Protein Res. 14, 41 /1979/, Mol. Immunol. 17, 1 213 /1980/, Int. J. Pept. Protein Res. 21, 135 /1983/, Int. J. Immunopharmac. 6, 141 /1984/), stejně tak jeho substituci glutaminem. Nyní bylo zjištěno, že u analogů prodloužených u C-konce peptidického řetězce aminokyselinovým anebo peptidickým řetězcem a zakončených amidickou anebo alkylamidickou skupinou, zaujímá N-terminální pozice sérového peptidického hormonu klíčové postavení. Tak je-li u souboru C-prodloužených hormonů N-terminální pozice zakončena zbytkem glutaminu, dochází k imunosupresi; tato aktivita je dokonce zesílena u kratších peptidů. Naproti tomu, je-li pozice 1 zcela eliminována (tzv. des-pyroglutamylopeptidy) a C-konec zakončen nesubstituovanou amidickou skupinou, dochází k potenciaci imunostimulační aktivity; při substituci C-koncové amidické skupiny, tj. hormony s alkylamidovou skupinou, dochází k imunosupresi. Tyto vztahy mezi agonistickými a antagonistickými aktivitami názorně a přesvědčivě dokumentuje tabulka 1.

Peptidy s imunomodulačním účinkem obecného vzorce I lze připravit obecnými, všeobecně známými metodami používanými v synthese peptidů, například synthosou v roztoku anebo na pevné fázi a to fragmentovou kondenzací či postupnou výstavbou, případně synthosou katalyzovanou enzymy.

Podobně použití chránicích skupin a kondenzačních činidel zahrnuje současný stav obecně známých skupin a syntetických metod.

Podle vynálezu lze peptidy s imunomodulačním účinkem obecného vzorce I například připravit tak, že se

a) sloučenina obecného vzorce II

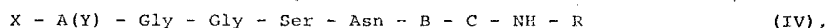


ve kterém B, C a R značí totéž co ve vzorci I, kondenzuje s kyselinou pyroglutámovou, nebo tak, že se

b) sloučenina obecného vzorce II kondenzuje se sloučeninou obecného vzorce III



ve kterém X a Y značí chránicí skupiny pro alfa- nebo omega-aminoskupiny a A totéž co ve vzorci I, v meziprodukt obecného vzorce IV



kde X a Y značí totéž co ve vzorci III a A, B, C a R značí totéž co ve vzorci I, z něhož se postupně nebo současně odstraní chránicí skupiny X a Y.

Je samozřejmé, že k přípravě peptidů obecného vzorce I podle vynálezu lze použít i jiných vhodných výchozích fragmentů nebo metod obecně známých v tomto oboru.

Způsob výroby podle vynálezu je blíže popsán v následujících příkladech provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Poznámky k experimentální části:

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nebyly korigovány. Vzorky k analýze byly sušeny ve vakuu při 70 Pa nad kysličníkem fosforečným při teplotě místnosti (látky s teplotou tání (t.t.) nižší než 115 °C) anebo při 105 °C (látky s teplotou tání nad 115 °C). Optické rotace byly změřeny na polarimetru Perkin-Elmer 141. Obsah vody byl měřen na přístroji Aquatest II Photovolta.

T a b u l k a 1

Thymické hormony

Rozdíl počtu *
znovuvzniklých
roset (%)

pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn (sérový thymický faktor)	9,20
Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn	-1,64
Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn	3,18
pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH ₂	7,54
Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH ₂	16,09
Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH ₂	-1,52
pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Gly-NH ₂	6,31
Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Gly-NH ₂	12,75
Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH ₂	-22,90
pGlu-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH ₂	2,89
pGlu-Gly-Gly-Ser-Asn-Gly-NH ₂	6,35
Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-Phe-NH-EtPh	-6,0
pGlu-Gly-Gly-Asn-Phe-NH-EtPh	-13,0
Thymosin frakce V	3,80

* metodou viz. Clin. exp. Immunol. 47, 183 (1982)

pGlu = kyselina pyroglutámová; alanin;
Lys = lysin; Ser = serin; Gln = glutamin; Gly = glycin;
Asn = asparagin; Phe = fenylalamin; -NH-EtPh = 2-fenyl-
ethylamidová skupina; -NH₂ = amidová skupina.

Chromatografie byla provedena na tenké vrstvě silikagelu (kiesel-gel G, Merck) v následujících systémech:

Soustava S₁:

1-butanol-kyselina octová-voda (4:1:1)

Soustava S₂:

1-butanol-kyselina octová-pyridin-voda (15:3:10:6)

Soustava S₃:

2-propanol-voda (2:1)

Detekce volných aminokyselin a peptidů byla provedena ninhydrinem.

Detekce chráněných peptidů byla provedena chlorační technikou s 2-tolidinem.

Odpaření roztoků bylo provedeno výhradně ve vakuu na rotačním vakuovém odpařováku.

P ř í k l a d 1

Methylester benzyloxykarbonylasparaginy-fenylalaninu

K roztoku benzyloxykarbonylasparaginu (13,3 g; 50 mmolů), N-ethylpiperidinu (7,0 ml) a pyridinu (5,0 ml) v dichlormethanu (100 ml), ochlazenému na -20 °C byl přidán za stálého míchání pivaloylchlorid (6,3 ml); roztok byl míchán a chlazen (0 °C) 8 minut. Potom byl během 2 až 3 minut přidán k reakčnímu roztoku roztok methylesteru fenylalaninu v dichlormethanu (100 ml), uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu methylesteru fenylalaninu (10,7 g; 50 mmolů) přídatkem N-ethylpiperidinu (7,0 ml). Reakční směs byla dále míchána 2 hod při teplotě místnosti, vyloučená krystalická látka byla odfiltrována a postupně roztírána s 1M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Krystalizací z methanolu bylo získáno 14,5 g (68%) produktu o t.t. 196 až 197 °C. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a 2-propanolu; t.t. byla nezměněna; R_f = 0,71/S₁, 0,75/S₂; [α]_D²⁰ -2,0 ° (c = 0,2; dimethylformamid)

Pro C₂₂H₂₅N₃O₆ (427,5)

vypočteno: 61,82 % C, 5,90 % H, 9,83 % N,

nalezeno: 61,68 % C, 5,96 % H, 9,65 % N.

Hydrobromid methylesteru asparaginy-fenylalaninu

K roztoku methylesteru benzyloxykarbonylasparaginy-fenylalaninu (4,3 g; 10 mmolů) v ledové kyselině octové (7,0 ml) byl přidán 38% roztok bromovodíku v kyselině octové (10 ml) a směs byla odstavena za občasného míchání 1 hodinu při teplotě místnosti. Potom byl produkt vysrážen přídatkem etheru, odfiltrován, promyt etherem a vysušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným a kyslíčnickem fosforečným. Bylo získáno 3,6 g (97 %) produktu. Látka byla elektroforetický a chromatograficky homogenní: R_f = 0,37/S₁, 0,70/S₂.

Methylester benzyloxykarbonylseryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku benzyloxykarbonylserinu (8,4 g; 35 mmolů), N-ethylpiperidinu (4,9 ml) a pyridinu (3,5 ml) v dichlormethanu (100 ml), ochlazenému na -20°C byl za stálého míchání přidán pivaloylchlorid (4,4 ml). Roztok byl míchán a chlazen (0°C) 8 minut. Po této době byl během 2 až 3 minut přidán roztok methylesteru asparaginyln-fenylalaninu v dichlormethanu (100 ml), uvolněného z hydrobromidu methylesteru asparaginyln-fenylalaninu (13,1 g; 35 mmol) přidavkem N-ethylpiperidinu (4,9 ml). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při teplotě místnosti a odpařena. Nekrystalický odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém a postupně promýván 1M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, vodou, vysušen bezvodým síranem sodným, odpařen a odparek byl krystalován z methanolu. Bylo získáno 9,1 g (51 %) produktu o t.t. 180 až 183°C . Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. 184 až 186°C ; $R_f = 0,71/S_1$, $0,82/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -13,8^{\circ}$ ($c = 0,2$; methanol)

Pro $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_{14}\text{O}_8$ (514,5)

vypočteno: 58,36 % C, 5,88 % H, 10,89 % N,

nalezeno : 58,36 % C, 5,83 % H, 11,26 % N.

Amid benzyloxykarbonylseryl-asparaginyln-fenylalaninu

K ochlazenému roztoku methylesteru benzyloxykarbonylseryl-asparaginyln-fenylalaninu (5,2 g; 10 mmol) v 98 % methanolu (130 ml) byl přidán kapalný amoniak (cca 33 g) a reakční směs byla odstavena 70 hodin při teplotě místnosti. Vyloučený krystalický produkt byl odfiltrován a promyt methanolem. Bylo získáno 3,9 g (78 %) produktu o t.t. 218 až 221°C . Vzorek k analýze byl krystalován ze směsi dimethylformamid-methanol (1:1) přidavkem etheru, t.t. 222 až 224°C ; $[\alpha]_D^{20} -15,9^{\circ}$ ($c = 0,2$; dimethylformamid); $R_f = 0,64/S_1$, $0,71/S_2$.

Pro $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_7$ (499,5)

vypočteno: 57,70 % C, 5,86 % H, 14,02 % N,

nalezeno : 57,03 % C, 5,96 % H, 13,90 % N.

Amid seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku amidu benzyloxykarbonylseryl-asparaginyln-fenylalaninu (5,0 g; 10 mmol) a kyseliny octové (0,1 ml) v 70% methanolu (400 ml) byla přidána Pd-čern (cca 50 mg); hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku 3 hodiny při teplotě místnosti. Po odfiltrování Pd-černi byl roztok odpařen a pevný odparek byl krystalován z 95 % methanolu přidavkem etheru. Bylo získáno 3,6 g (96 %) produktu o t.t. 169 až 172°C . Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. byla nezměněna; $R_f = 0,24/S_1$, $0,57/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -19,3^{\circ}$ ($c = 0,2$; methanol)

Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (374,4)

vypočteno: 51,32 % C, 6,47 % H, 18,70 % N,

nalezeno : 51,67 % C, 6,35 % H, 18,49 % N.

Methylester benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycinu

K suspenzi hydrochloridu methylesteru glycyl-glycinu (1,9 g; 10 mmol) ve směsi dimethylformamid-dichlormethan (1:2) (30 ml) byl přidán N-ethylpiperidin (1,4 ml) a směs byla míchána 2 hodiny při teplotě místnosti. Potom byl přidán pentachlorfenylester benzyloxykarbonylglutaminu (5,3 g; 10 mmolů) a reakční směs byla míchána další 4 hodiny při teplotě místnosti. Po dalších 8 hodinách stání při teplotě místnosti byl vyloučený krystalický produkt odfiltrován a krystalován z methanolu přidavkem dichlormethanu. Bylo získáno 2,5 g (61 %) produktu o t.t. 129 až 134°C . Vzorek k analýze byl krystalován z methanolu, t.t. 132 až 134°C ; $R_f = 0,57/S_1$, $0,78/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -8,5^{\circ}$ ($c = 0,2$; 50% kyselina octová).

Pro $C_{18}H_{24}N_4O_7 \cdot 1/2H_2O$ (417,4)

vypočteno: 51,79 % C, 6,05 % H, 13,43 % N,

nalezeno : 51,74 % C, 5,96 % H, 13,32 % N.

Hydrazid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycinu

K roztoku methylesteru benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycinu (8,3 g; 20 mmol) v methanolu (100 ml) byl přidán 100% hydrazin hydrát (4,7 ml). Po 48 hodin stání při teplotě místnosti byl vyloučený krystalický produkt odfiltrován, promyt methanolem a krystalován z 80 % ethanolu. Bylo získáno 6,1 g (74 %) produktu o t.t. 169 až 171 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. 167 až 170 °C; $R_f = 0,30/S_1, 0,70/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -9,05^\circ$ ($c = 0,2$; methanol)

Pro $C_{17}H_{24}N_6O_6$ (408,4)

vypočteno: 49,99 % C, 5,94 % H, 20,58 % N,

nalezeno : 50,15 % C, 6,06 % H, 21,16 % N.

Amid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku hydrazidu benzyloxykarbonylglutaminyl-glycylglycinu (4,1 g; 10 mmol) a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4,0 ml) v dimethylformamidu (50 ml), ochlazenému na -20 °C byl přidán 3,6M roztok dusitanu sodného (2,8 ml). Roztok byl míchán a chlazen (-20 °C) 10 minut. Po této době bylo pH reakčního roztoku upraveno přidávkou N-ethylpiperidinu na hodnotu 6,9 a byl přidán roztok amidu seryl-asparaginyln-fenylalaninu (3,7 g; 10 mmol) v dimethylformamidu (50 ml); po 12hodinovém stání při teplotě 0 °C byl roztok odpařen a pevný odparek byl postupně roztírán s 1M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, vodou a krystalován z butanolu přidávkou octanu ethylatého. Bylo získáno 5,6 g (74 %) produktu o t.t. 225 až 227 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. 226 až 229 °C; $R_f = 0,30/S_1, 0,58/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -12,1^\circ$ ($c = 0,2$; dimethylformamid). Aminokyselinová analýza: Glu (1,00), Gly (2,02), Ser (0,76), Asp (0,94), Phe (0,92).

Pro $C_{33}H_{43}N_9O_{11} \cdot H_2O$ (759,8)

vypočteno: 52,16 % C, 5,98 % H, 16,59 % N,

nalezeno : 51,85 % C, 5,79 % H, 16,33 % N.

Amid glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku amidu benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu (2,2 g; 3 mmol) a kyseliny octové (0,1 ml) ve směsi dimethylformamid-methanol (1:2) (100 ml) byla přidána Pd-čern (cca 25 mg). Hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku 6 hodin při teplotě místnosti. Po odfiltrování Pd-černi byl roztok odpařen a pevný odparek byl krystalován z 95 % methanolu přidávkou etheru. Bylo získáno 1,7 g (86%) produktu o t.t. 202 až 204 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobným způsobem, t.t. 209 až 212 °C; $R_f = 0,05/S_1, 0,42/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -21,9^\circ$ ($c = 0,2$; 50 % methanol)

Pro $C_{25}H_{37}N_9O_9 \cdot 3H_2O$ (661,7)

vypočteno: 45,37 % C, 6,56 % H, 19,05 % N, 8,17 % H_2O

nalezeno : 46,91 % C, 6,04 % H, 18,33 % N, 9,32 % H_2O .

Hydrochlorid methylesteru alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllseryl-serinu

K roztoku methylesteru terc. butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllseryl-serinu (3,4 g; 6 mmol) v leďové kyselině octové (12 ml) byl přidán 1M roztok chlorovodíku v kyselině octové (12 ml). Reakční směs byla ponechána 1 hodinu při teplotě místnosti, potom byl produkt vysrážen etherem, odfiltrován a sušen v exsikátoru nad hydrosidem sodným a kyslíčnickem fosforečným. Bylo získáno 2,7 g (93 %) produktu; $R_f = 0,35/S_1, 0,62/S_2$.

Methylester pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu

Roztok kyseliny pyroglutámové (0,9 g; 7 mmol), N-hydroxybenztriazol (0,95 g) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (1,6 g) v dimethylformamidu (50 ml) byl míchán a chlazen (-10 °C) 10 minut. Potom k reakčnímu roztoku byl přidán předchlazený roztok (-10 °C) methylesteru alanylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu v dimethylformamidu (50 ml) uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu methylesteru alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (3,4 g; 7 mmol) přidavkem N-ethylpiperidinu (1,0 ml). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při 0 °C a odstavena 8 hodin při teplotě místnosti. Poté byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, roztok byl odpařen, nekystalický odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém a postupně promýván 1% roztokem kyseliny citronové, vodou, 5% roztokem hydrogenuhlitanu sodného, vodou, vysušen bezvodým síranem sodným, odpařen a krystalován z 2-propanolu. Bylo získáno 2,4 g (59 %) produktu o t.t. 120 až 122 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. 135 až 137 °C. $R_f = 0,53/S_1$, $0,83/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -24,4^\circ$ ($c = 0,2$; dimethylformamid). Aminokyselinová analýza: Glu (0,85), Lys (1,00), Ala (1,06), Ser (0,82).

Pro $C_{26}H_{37}N_5O_9 \cdot H_2O$ (581,7)

vypočteno: 53,68 % C, 6,77 % H, 12,04 % N,

nalezeno : 53,96 % C, 6,47 % H, 11,34 % N.

Hydrazid pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyl-lysyl-serinu

K roztoku methylesteru pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (2,9 g; 5 mmol) ve směsi dimethylformamid-methanol (1:1) (40 ml) byl přidán 100% hydrazin hydrát (3,0 ml). Po 8hodinovém stání při teplotě místnosti byl vyloučený krystalický produkt odfiltrován a promyt methanolem. Bylo získáno 2,3 g (79 %) produktu o t.t. 212 až 214 °C. Vzorek k analýze byl krystalován z 80% methanolu, t.t. 217 až 218 °C; $R_f = 0,54/S_1$, $0,73/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -48,9^\circ$ ($c = 0,2$ 80 % methanol).

Pro $C_{25}H_{37}N_7O_8 \cdot H_2O$ (581,6)

vypočteno: 51,62 % C, 6,77 % H, 16,86 % N, 3,10 % H_2O ,

nalezeno : 52,01 % C, 6,55 % H, 16,54 % N, 3,22 % H_2O .

Amid pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

K roztoku hydrazidu pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (0,95 g; 1,63 mmol) a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (0,6 ml) v dimethylformamidu (20 ml), ochlazenému na -20 °C byl přidán 3,6M roztok dusitanu sodného (0,5 ml). Roztok byl míchán a chlazen (-20 °C) 10 minut. Po úpravě pH roztoku přidavkem N-ethylpiperidinu na hodnotu 6,9 byl přidán roztok amidu glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu (0,92 g; 1,51 mmol) v dimethylformamidu (40 ml). Po 12hodinovém stání při teplotě 0 °C byl roztok odpařen a nekystalický odparek byl rozmíchán s nasyceným roztokem chloridu sodného (2,0 ml), po 1 hodině stání při 0 °C byl krystalický produkt odfiltrován, promyt a krystalován z butanolu (nasyceného vodou při 20 °C) přidavkem octanu ethylnatého a rekrystalován z 80% methanolu přidavkem octanu ethylnatého. Bylo získáno 0,58 g (33%) produktu o t.t. 248 až 252 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. 259 až 261 °C; $R_f = 0,08/S_1$, $0,42/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -48,2^\circ$ ($c = 0,1$; 50% kyselina octová). Aminokyselinová analýza: Glu (1,90), Ala (1,18), Lys (1,06), Ser (1,79), Gly (1,95), Asp (1,05), Phe (1,00).

Pro $C_{50}H_{70}N_{14}O_{17} \cdot 2H_2O$ (1 175,3)

vypočteno: 51,10 % C, 6,35 % H, 16,68 % N,

nalezeno : 51,13 % C, 6,26 % H, 16,20 % N.

Amid pyroglutamyl-alanyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

K roztoku amidu pyroglutamyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu (300 mg; 0,26 mmol) v 10% kyselině octové (100 ml) byla přidána Pd-čern (cca 20 mg). Hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku 3 hodiny při teplotě místnosti. Po odfiltrování Pd-černi byl roztok odpařen, odparek byl rozpuštěn v 0,2M kyselině octové (5,0 ml) a čištěn gelovou filtrací na Sephadexu G 15, na koloně (1,8 x 90 cm); homogenní frakce byly zahuštěny a lyofilizovány. Bylo získáno 200 mg (64 %) produktu. Látka byla chromatograficky homogenní; $R_f = 0,02/S_1, 0,25/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -67,9^\circ$ ($c = 0,1$; 0,1M kyselina octová). Aminokyselinová analýza: Glu (1,94), Ala (1,18), Lys (1,10), Ser (1,78), Gly (2,03), Asp (1,04), Phe (1,00).

Pro $C_{42}H_{64}N_{17}O_{15} \cdot 2AcOH \cdot 4H_2O$ (1 197,3)
 vypočteno: 46,47 % C, 6,74 % H, 17,24 % N, 6,34 % H_2O ,
 nalezeno : 46,75 % C, 6,25 % H, 16,82 % N, 8,84 % H_2O

P ř í k l a d 2

Amid pyroglutamyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku amidu benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu (4,0 g; 5,26 mmol) v 10% kyselině octové (100 ml) byla přidána Pd-čern (cca 25 mg). Hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku při teplotě 40 °C po dobu 3 hodin. Po odfiltrování Pd-černi byl roztok odpařen, odparek byl rozpuštěn v 0,2M kyselině octové (5 ml) a látka čištěna gelovou filtrací na Sephadexu G 15; homogenní frakce byly spojeny, zahuštěny a lyofilizovány. Bylo získáno 2,5 g (77 %) produktu o t.t. 218 až 221 °C; $[\alpha]_D^{20} -35,7^\circ$ ($c = 0,1$; 1M kyselina octová). Látka byla chromatograficky homogenní (ninhydrin negativní): $R_f = 0,15/S_1, 0,56/S_2$. Aminokyselinová analýza: Glu (1,00), Gly (2,00), Ser (0,87), Asp (1,04), Phe (0,97).

Pro $C_{24}H_{33}N_8O_9 \cdot 1 a 1/2H_2O$ (616,6)
 vypočteno: 48,69 % C, 5,90 % H, 18,18 % N,
 nalezeno : 49,20 % C, 5,86 % H, 17,64 % N.

P ř í k l a d 3

Terc.butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyl-lysyl-serin

K roztoku methylesteru terc.butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (2,0 g; 3,6 mmol) v methanolu (20 ml) byl přidán roztok 1M hydroxidu sodného (5,4 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při teplotě místnosti, potom bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7, z roztoku byl oddestilován methanol, pH vodného odparku bylo upraveno 1M kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 3 a produkt byl postupně vytřepán octanem ethylnatým (3krát 100 ml). Spojené organické výtřepky byly vysušeny bezvodým síranem sodným, odpařeny a odparek byl krystalován z octanu ethylnatého přidávkem petroletheru. Bylo získáno 1,7 g (88 %) produktu o t.t. 132 až 134 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. byla nezměněna. $R_f = 0,75/S_1, 0,75/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -23,2^\circ$ ($c = 0,2$; methanol).

Pro $C_{25}H_{38}N_4O_9$ (538,6)
 vypočteno: 55,74 % C, 7,13 % H, 10,40 % N,
 nalezeno : 56,13 % C, 7,46 % H, 10,40 % N.

Amid terc. butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Roztok terc. butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (0,8 g; 1,49 mmol), N-hydroxybenzotriazolu (0,2 g) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (0,3 g) v dimethylformamidu (30 ml) byl míchán a chlazen (-10 °C) 10 minut. Potom byl přidán předchlazený roztok (-10 °C) amidu glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu (1,0 g; 1,51 mmol) v dimethylformamidu (50 ml).

Reakční směs byla míchána 2 hodiny při 0 °C a potom odstavena 8 hodin při teplotě místnosti. Po odfiltrování N,N'-dicyklohexylmočoviny byl roztok odpařen a nekrystalický odparek rozmíchán s nasyceným roztokem chloridu sodného (3,0 ml). Po 1 hodině stání při 0 °C byl krystalický produkt odfiltrován, promyt a krystalován z butanolu (nasyceného vodou při 20 °C) přidávkou octaru ethylnatého. Bylo získáno 0,4 g (23 %) produktu o t.t. 225 až 227 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. byla nezměněna. $R_f = 0,25/S_1$, $0,76/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -39,2^\circ$ ($c = 0,1$; 50% kyselina octová).

Aminokyselinová analýza: Ala (1,03), Lys (0,98), Ser (1,77), Glu (0,94), Gly (2,03), Asp (1,00), Phe (1,03).

Pro $C_{50}H_{73}N_{13}O_{17} \cdot H_2O$ (1 146,2)
 vypočteno: 52,39 % C, 6,59 % H, 15,88 % N,
 nalezeno : 51,99 % C, 6,55 % H, 15,59 % N.

Amid alanyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

K roztoku amidu terc. butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu (0,4 g; 0,35 mmolů) v 10% kyselině octové (100 ml) byla přidána Pd-čern (cca 20 mg). Hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku 2 hodiny při teplotě místnosti. Po odfiltrování Pd-černi byl roztok odpařen, odparek vysušen v exsikátoru 5 hodin nad hydrosidem sodným a kysličníkem fosforečným a rozpuštěn v kyselině trifluoroctové (1,8 ml). Roztok byl míchán 1 hodinu při teplotě místnosti, produkt byl vysrážen etherem, zfiltrován, promyt, sušen v exsikátoru nad hydrosidem sodným a kysličníkem fosforečným 2 hodiny a rozpuštěn v 50% methanolu; konverzí na Zerolitu FF v acetátovém cyklu (nejprve vsádkově a potom na koloně 1,8 x 25 cm) byl produkt převeden v odpovídající acetát. Spojené methanolicke eluáty byly odpařeny, odparek byl rozpuštěn v 0,2M kyselině octové a dále čištěn gelovou filtrací na Sephadexu G 15 jak uvedeno v příkladě 1. Bylo získáno 0,2 g (57 %) homogenního produktu. $R_f = 0,02/S_1$, $0,45/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -40,4^\circ$ ($c = 0,1$; 0,1M kyselina octová. Aminokyselinová analýza: Ala (1,09), Lys (1,03), Ser (1,65), Glu (1,00), Gly (1,97), Asp (1,02), Phe (0,98).

Pro $C_{37}H_{59}N_{13}O_{13} \cdot 2AcOH$ (1 014,1)
 vypočteno: 48,56 % C, 6,66 % H, 17,96 % N,
 nalezeno : 49,07 % C, 6,42 % H, 17,51 % N.

P ř í k l a d 4

Trifluoroacetát amidu alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

Roztok amidu terc.butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu (1,0; 0,87 mmolů) a anisolu (0,3 ml) v kyselině trifluoroctové (2,7 ml) byl míchán 30 minut při teplotě místnosti. Produkt byl vysrážen přidávkou etheru, odfiltrován, promyt a sušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným a kysličníkem fosforečným. Bylo získáno 0,9 g (89 %) produktu. $R_f = 0,21/S_1$, $0,65/S_2$.

Amid benzyloxykarbonylglutaminyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

Roztok benzyloxykarbonylglutaminu (250 mg; 0,89 mmolů), N-hydroxybenztriazolu (120 mg) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (200 mg) v dimethylformamidu (30 ml) byl míchán a chlazen (-10 °C) 10 minut. Po této době byl přidán předchlazený (-10 °C) roztok amidu alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu v dimethylformamidu (30 ml), uvolněného z odpovídajícího trifluoroacetátu přidávkou N-ethylpiperidinu (0,15 ml). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při 0 °C a potom odstavena 8 hodin při teplotě místnosti.

Po zahustění (cca na půl objemu) a následujícím ochlazením (1 hodinu při 0 °C) byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována a roztok byl odpařen. Pevný odparek byl rozmíchán s vodou (3 ml). Potom byl krystalický produkt odfiltrován a krystalován z kyseliny octové přidávkou octanu ethylnatého. Bylo získáno 200 mg (18 %) produktu o t.t. 251 až 254 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně, t.t. byla nezměněna. $R_f = 0,02/S_1, 0,03/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -38,8^\circ$ ($c = 0,1$; 25% kyselina octová). Aminokyselinová analýza: Glu (1,84), Ala (0,95), Lys (1,11), Ser (1,73), Gly (2,04), Asp (1,00), Phe (1,09).

Pro $C_{58}H_{79}N_{15}O_{19} \cdot 2H_2O$ (1 326,4)

vypočteno: 52,88 % C, 6,27 % H, 15,99 % N,
nalezeno : 52,88 % C, 6,32 % H, 15,32 % N.

Amid glutaminy-l-alanyl-lysyl-seryl-glutaminy-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-l-fenylalaninu

K roztoku amidu benzyloxykarbonylglutaminy-l-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminy-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-l-fenylalaninu (100 mg; 0,08 mmolu) v 10% kyselině octové (100 ml) byla přidána 1M kyselina chlorovodíková (0,4 ml) a Pd-čern, (cca 30 mg). Hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku 3 hodiny při teplotě místnosti. Po odfiltrování Pd-černi byl filtrát odpařen, a odparek byl rozpuštěn ve vodě (5 ml) a roztok znovu odpařen (2krát opakováno). Pevný odparek byl rozpuštěn v 0,2M kyselině octové a čištěn gelovou filtrací stejným způsobem jak uvedeno v příkladě 1. Bylo získáno 70 mg (75 %) produktu. $R_f = 0,00/S_1, 0,25/S_2$; $[\alpha]_D^{20} -47,8^\circ$ ($c = 0,1$; 0,1M kyselina octová). Aminokyselinová analýza: Glu (1,92), Ala (1,00), Lys (0,99), Ser (1,77), Gly (2,04), Asp (1,01), Phe (0,97).

Pro $C_{42}H_{67}N_{15}O_{15} \cdot 2HCl \cdot 4H_2O$ (1 167,1)

vypočteno: 43,22 % C, 6,66 % H, 18,00 % N,
nalezeno : 43,73 % C, 6,20 % H, 16,78 % N.

P ř í k l a d 5

2-fenylethylamid benzyloxykarbonylasparaginy-l-fenylalaninu

Byl připraven obdobným způsobem jako odpovídající methylester metodou směsného anhydridu jak uvedeno v příkladě 1 ve výtěžku 70 %. Vzorek k analýze byl krystalován z kyseliny octové a etheru; t.t. 239 až 143 °C.

Pro $C_{29}H_{32}N_4O_5 \cdot 1/2AcOH$ (546,6)

vypočteno: 65,92 % C, 6,27 % H, 10,25 % N,
nalezeno : 65,92 % C, 6,50 % H, 10,28 % N.

Hydrazid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-serinu

Roztok benzyloxykarbonylglycyl-glycinu (13,31; 50 mmolů), N-hydroxysukcinimidu (5,75 g) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (11,3 g) v dimethylformamidu (180 ml) byl míchán a chlazen (-10 °C) 1 hodinu. Po této době byl přidán k reakčnímu roztoku předchlazený roztok (-10 °C) methylesteru serinu v dimethylformamidu (50 ml) uvolněného N-ethylpiperidinem (6,85 ml) z odpovídajícího hydrochloridu (7,8 g; 50 mmolů). Reakční směs byla míchána 3 hodiny při 0 °C a potom odstavena 8 hodin při teplotě místnosti. Vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a k filtrátu byl přidán 100% hydrazinhydrát (15 ml). Po 3 dnech stání reakční suspenze při teplotě místnosti byl vyloučený hydrazid odfiltrován, promyt ethanolom a krystalován ze zředěného ethanolu. Bylo získáno 15,2 g (83 %) produktu o t.t. 172 až 175 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobně; t.t. byla nezměněna.

Pro $C_{15}H_{21}N_5O_6$ (367,4)
 vypočteno: 49,04 % C, 5,76 % H, 19,07 % N,
 nalezeno : 49,07 % C, 5,91 % H, 18,52 % N.

Hydrobromid 2-fenylethylamidu asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku fenylethylamidu benzyloxykarbonylasparaginyln-fenylalaninu (5,2 g; 10 mmolů) v kyselině octové (40 ml) byl přidán 38% roztok bromovodíku v kyselině octové (10 ml). Po 1-hodinovém stání při teplotě místnosti byl hydrobromid vysrážen etherem, odfiltrován a důkladně promyt etherem; produkt byl sušen 12 hodin nad hydroxidem sodným a kysličníkem fosforečným. $R_f = 0,48/S_1$, $0,53/S_2$.

2-Fenylethylamid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku hydrazidu benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-serinu (3,7 g; 10 mmolů) a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4 ml) v dimethylformamidu (80 ml) ochlazenému na -30°C byl přidán roztok dusitanu sodného (690 mg) ve vodě (2,8 ml). Po 10minutovém míchání a chlazení (-25°C) reakčního roztoku bylo pH upraveno N-ethylpiperidinem na 6,9 a takto zneutralizovaný roztok byl přidán k předchlazenému roztoku (-30°C) fenylethylamidu asparaginyln-fenylalaninu v dimethylformamidu (50 ml) uvolněného z odpovídajícího hydrobromidu (10 mmolů) N-ethylpiperidinem (cca 1,6 ml). Po 12hodinovém stání při $+3^\circ\text{C}$ byl reakční roztok odpařen, produkt vysrážen přidávkou vody, odfiltrován, postupně roztírán 1M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným, vodou a krystalován z kyseliny octové a etheru. Bylo získáno 2,45 g (43 %) produktu o t.t. 225 až 229°C .

Hydrobromid 2-fenylethylamidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven v kvantitativním výtěžku z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu působením bromovodíku v kyselině octové; t.t. 227 až 230°C ; $R_f = 0,52/S_1$; $0,71/S_2$.

Pro $C_{28}H_{37}N_7O_7 \cdot 2\text{HBr} \cdot 1/2\text{AcOH}$ (775,5)
 vypočteno: 44,89 % C, 5,42 % H, 12,86 % N,
 nalezeno : 44,92 % C, 5,33 % H, 12,64 % N.

2-fenylethylamid glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Base byla uvolněna z odpovídajícího hydrobromidu rozpuštěného v dimethylformamidu 10% vodným amoniakem a izolována přidávkou vody. Krystalizací z dimethylformamidu a etheru byl získán produkt ve výtěžku 51 % a t.t. 223 až 226°C ; $R_f = 0,61/S_1$, $0,74/S_2$.

2-fenylethylamid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

K roztoku benzyloxykarbonylglutaminu (0,42 g; 1,5 mmolů) a N-ethylpiperidinu (0,21 ml) v dimethylformamidu (2,5 ml) ochlazenému na -10°C , byl přidán chlormravenčan ethylnatý (0,14 ml). Po 20minutovém míchání a chlazení (-5°C) byl přidán předchlazený roztok fenylethylamidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu (0,88 g) v dimethylformamidu (15 ml) a reakční roztok byl míchán 2 hodiny při 0°C a potom odstaven 8 hodin při teplotě místnosti. Druhý den byl roztok odpařen, produkt vysrážen vodou a postupně roztírán 1M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným, vodou a krystalován z dimethylformamidu a etheru. Bylo získáno 0,9 g (72 %) produktu o t.t. 192 až 195°C .

Hydrobromid 2-fenylethylamidu glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven v kvantitativním výtěžku z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu působením bromovodíku v kyselině octové. $R_f = 0,21/S_1$, $0,53/S_2$.

2-fenylethylamid terc.butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

K roztoku terc.butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu (0,148 mg; 0,25 mmolů), N-hydroxysukcinimidu (0,03 g) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (0,06 g) v dimethylformamidu (6 ml) ochlazenému na -10 °C byl po 1-hodinovém míchání a chlazení (-10 °C) přidán roztok 2-fenylethylamidu glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu v dimethylformamidu (10 ml), uvolněného z odpovídajícího hydrobromidu (0,25 mmolu) přidavkem N-ethylpiperidinu; další postup je shodný jako u odpovídajícího amidu uvedeného v příkladu 3. bylo získáno 162 mg (53 %) produktů. $R_f = 0,63/S_1$, $0,76/S_2$.

Aminokyselinová analýza: Ala (1,00), Lys (1,00), Ser (1,63), Glu (1,2), Gly (2,53), Asn (1,3), Phe (1,3).

Hydrochlorid 2-fenylethylamidu alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího terc. butoxykarbonyl-derivátu působením 2,5M kyselinou chlorovodíkovou v kyselině octové obdobným postupem uvedeným v příkladě 1. Bylo získáno 100 mg (95 %) produktu. Aminokyselinová analýza: Ala (1,00), Lys (0,93), Ser (1,62), Glu (1,03), Gly (2,54), Asp (1,29), Phe (1,26).

2-fenylethylamid alanyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu.

Katalytickou hydrogenolýzou z příslušného benzyloxykarbonyl-derivátu obdobným postupem jak uvedeno v příkladě 1 byl získán diacetát ve výtěžku 78 %. Aminokyselinová analýza: Ala (1,00), Lys (0,97), Ser (1,55), Glu (1,02), Gly (2,18), Asp (1,14), Phe (1,16).

P ř í k l a d 6

2-fenylethylamid glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

Byl získán z odpovídajícího hydrobromidu uvedeného v příkladě 5; pH roztoku hydrobromidu v dimethylformamidu bylo upraveno na hodnotu 7,1 přidavkem N-ethyl-piperidinu a produkt vysrážen vodou. $R_f = 0,18/S_1$, $0,51/S_2$.

P ř í k l a d 7

2-fenylethylamid pyroglutamyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu

Byl připraven z kyseliny pyroglutámové a z příslušného fenylethylamidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalaninu karbodiimidovou methodou postupem uvedeným v příkladě 5 ve výtěžku 72 % a t.t. 209 až 211 °C. $R_f = 0,25/S_1$, $0,67/S_2$.

P ř í k l a d 8

Amid benzyloxykarbonylfenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího methylesteru amonolýzou uvedenou v příkladě 1 v kvantitativním výtěžku a t.t. 230 až 232 °C.

Hydrobromid amidu fenylalanyl-fenylalaninu

Byl získán z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu působením bromovodíku v kyselině octové postupem uvedeným v příkladě 1. $R_f = 0,56/S_1$.

Amid benzyloxykarbonylasparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z benzyloxykarbonylasparaginu a amidu fenylalanyl-fenylalaninu uvolněného z odpovídajícího hydrobromidu uvolněného na ionexu Zerolit FF v methanolu ve výtěžku 74 %. Analytický vzorek byl krystalován z kyseliny octové přidavkem etheru; t.t. byla 265 až 267 °C.

Pro $C_{30}H_{33}N_5O_6 \cdot 1/2H_2O$ (568,6)
 vypočteno: 63,37 % C, 6,03 % H, 12,32 % N,
 nalezeno : 63,87 % C, 6,17 % H, 12,21 % N.

Hydrobromid amidu asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu v kvantitativním výtěžku.
 $R_f = 0,37/S_1, 0,72/S_2$.

Amid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z hydrazidu benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-serinu a amidu asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu, uvolněného z příslušného hydrobromidu na ionexu Zerolit FF v methanolu, azidovou metodou, uvedenou v příkladě 5 ve výtěžku 50 %. Analytický vzorek byl krystalován z kyseliny octové přidavkem etheru, t.t. 232 až 234 °C.

Pro $C_{37}H_{44}N_8O_{10} \cdot 1/2AcOH$ (790,8)
 vypočteno: 57,71 % C, 5,86 % H, 14,17 % N,
 nalezeno : 57,81 % C, 5,91 % H, 14,39 % N.

Hydrobromid amidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu v kvantitativním výtěžku působením bromovodíku v kyselině octové. $R_f = 0,60/S_1, 0,69/S_2$.

Amid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z benzyloxykarbonylglutaminu a amidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu obdobným způsobem, jak uvedeno v příkladě 5 u fenylethylamidového derivátu ve výtěžku 96 %. Analytický vzorek byl krystalován z kyseliny octové přidavkem etheru, t.t. 196 až 199 °C.

Pro $C_{42}H_{52}N_{10}O_{12} \cdot AcOH \cdot 1/2H_2O$ (958,0)
 vypočteno: 55,16 % C, 6,00 % H, 14,62 % N,
 nalezeno : 55,01 % C, 5,93 % H, 14,57 % N.

Amid glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu působením bromovodíku v kyselině octové a získaný hydrobromid byl uvolněn na ionexu Zerolit FF. Produkt byl přesrážen z dimethylformamidu přidavkem etheru. $R_f = 0,08/S_1, 0,31/S_2$.

Příklad 9

Amid pyroglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu

Byl připraven z kyseliny pyroglutámové a amidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninu obdobným postupem, jak uvedeno v příkladě 7 ve výtěžku 83 %. Krystalizací z dimethylformamidu a etheru byl získán produkt o t.t. 250 až 253 °C. $R_f = 0,22/S_1, 0,51/S_2$.

Šťavelan 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu glycinu

K roztoku 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu benzyloxykarbonylglycinu (27,9 g; 64 mmoly) a kyseliny octové (0,1 ml) v methanolu (100 ml) byla přidána Pd-čern (cca 60 mg); hydrogenolýza byla provedena za normálního tlaku při teplotě místnosti po dobu 5 hodin. Po odfiltrování Pd-černi, byl filtrát zahuštěn cca na 1/4 původního objemu, smísen s roztokem kyseliny šťavelové (5,8 g) v methanolu (50 ml) a produkt byl krystalován přidavkem etheru, po 30 minutách byl odfiltrován a překrystalován stejným způsobem. Bylo získáno 22,2 g (87 %) produktu o t.t. 171 až 173 °C. Vzorek k analýze byl krystalován obdobným způsobem, t.t. 179 až 182 °C. $R_f = 0,86/S_1, 0,72/S_2$.

Pro $C_{19}H_{22}N_2O_7 \cdot 1/2 \cdot H_2O$ (399,4)

vypočteno: 57,13 % C, 5,82 % H, 7,02 % N,

nalezeno : 57,32 % C, 5,74 % H, 6,64 % N.

4-nitrobenzylester benzyloxykarbonylseryl-asparaginu

K roztoku benzyloxykarbonylserinu (12,0 g; 50 mmolů) a N-ethylpiperidinu (7,0 ml) v dimethylformamidu (100 ml), ochlazenému na -20 °C byl za stálého míchání přidán chlormravenčan ethylnatý (5,0 ml). Po 10minutovém míchání a chlazení (-10 °C) byl reakční roztok ochlazen na -20 °C a přidán roztok 4-nitrobenzylesteru asparaginu v dimethylformamidu (100 ml) uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu (15,2 g; 50 mmolů) přidavkem N-ethylpiperidinu (7,0 ml) a zpracována jak uvedeno v příkladu 1. Krystalizací z octanu ethylnatého bylo získáno 18,8 g (77 %) produktu o t.t. 174 až 177 °C. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu přidavkem petroletheru, t.t. 179 až 180 °C. $R_f = 0,73/S_1, 0,76/S_2$. $[\alpha]_D^{20} -8,6^\circ$ (c = 0,2; dimethylformamid).

Pro $C_{22}H_{24}N_4O_9$ (488,5)

vypočteno: 54,09 % C, 4,96 % H, 11,47 % N,

nalezeno : 53,49 % C, 5,13 % H, 11,54 % N.

Hydrazid benzyloxykarbonylseryl-asparaginu

Byl připraven z odpovídajícího 4-nitrobenzylesteru postupem uvedeným v příkladě 1 ve výtěžku 95 %. Vzorek k analýze byl krystalován z 80% methanolu. t.t. 218 až 220 °C.

Pro $C_{15}H_{21}N_5O_6$ (367,4)

vypočteno: 49,03 % C, 5,77 % H, 19,07 % N,

nalezeno : 48,59 % C, 5,81 % H, 18,77 % N.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylseryl-asparaginy-glycinu

Byl připraven z hydrazidu benzyloxykarbonylseryl-asparaginu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu glycinu uvolněného z odpovídajícího šťavelanu N-ethylpiperidinem postupem uvedeným v příkladě 1 ve výtěžku 64 %. Analytický vzorek byl krystalován ze směsi dimethylformamid-methanol 1:1 přidavkem etheru, t.t. 160 až 162 °C. $R_f = 0,68/S_1, 0,80/S_2$.

Pro $C_{32}H_{37}N_5O_9$ (635,7)

vypočteno: 60,45 % C, 5,88 % H, 11,02 % N,

nalezeno: 60,18 % C, 6,00 % H, 10,59 % N.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid seryl-asparaginy-glycinu

Byl připraven katalytickou hydrogenolýzou odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu

ve výtěžku 99 %. Vzorek k analýze byl krystalován z 2-propanolu přidavkem octanu ethylnatého, t.t. 137 až 138 °C. $R_f = 0,31/S_1, 0,72/S_2$.

Pro $C_{24}H_{31}N_5O_7 \cdot 3H_2O$ (555,6)

vypočteno: 51,88 % C, 6,73 % H, 12,61 % N,

nalezeno : 51,39 % C, 5,87 % H, 13,29 % N.

4,4'-dimethoxybenzhydrylamid N-alfa-benzyloxykarbonyl-glutaminyglycyl-glycyl-seryl-asparaginyglycinu

Byl připraven z hydrazidu benzyloxykarbonylglutaminyglycyl-glycinu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu seryl-asparaginyglycinu postupem uvedeným v příkladě 1 ve výtěžku 54 %. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu přidavkem octanu ethylantého, t.t. 200 až 202 °C. $R_f = 0,38/S_1, 0,85/S_2$. Aminokyselinová analýza: Glu (1,03), Gly (3,00), Ser (0,86), Asp (1,00)

Pro $C_{41}H_{51}N_9O_{13} \cdot H_2O$ (895,9)

vypočteno: 54,97 % C, 5,96 % H, 14,07 % N,

nalezeno : 54,50 % C, 5,82 % H, 13,87 % N.

Hydrochlorid 4,4'-dimethoxybenzhydrylamid glutaminyglycyl-glycyl-seryl-asparaginyglycinu

Katalytickou hydrogenolýzou odpovídajícího chráněného derivátu v roztoku 10% kyseliny octové a 2M kyseliny chlorovodíkové postupem uvedeným v příkladě 1 byl připraven produkt ve výtěžku 97 %. Látka chromatograficky homogenní: $R_f = 0,10/S_1, 0,63/S_2, 0,36/S_3$.

Amid pyroglutamyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyglycinu

Byl připraven z odpovídajícího 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu 1-hodinovým zahříváním s kyselinou trifluoroctovou a anisolem pod zpětným chladičem ve výtěžku 66 %. $R_f = 0,01/S_1, 0,03/S_2$. $[\alpha]_D^{20} -27,5^\circ$ (c = 0,1; 0,1M kyselina octová). Aminokyselinová analýza: Glu (1,03), Gly (2,80), Ser (0,88), Asp (1,00).

P ř í k l a d 11

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylasparaginyalaninu

Byl připraven z benzyloxykarbonylasparaginu a z 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu alaninu obdobným postupem jako byl připraven methylester benzyloxykarbonylasparaginyfenylalaninu uvedeným v příkladě 1 ve výtěžku 87 %. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a etheru; t.t. 235 až 236 °C.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid asparaginyalaninu

Byl připraven katalytickou hydrogenolýzou z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu obdobným způsobem jak uvedeno v příkladě 1. Vzorek k analýze byl krystalován z methanolu a etheru; t.t. 155 až 157 °C.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyalaninu

Byl připraven z hydrazidu benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-serinu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu asparaginyalaninu azidovou metodou, uvedenou v příkladu 5, ve výtěžku 61 %. $R_f = 0,40/S_1, 0,77/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou obdobným způsobem, jako je uvedeno v příkladu 1, ve výtěžku 95 %. Analytický vzorek byl krystalován z dimethylformamidu a etheru. $R_f = 0,04/S_1$; $0,070/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu

Byl připraven z benzyloxykarbonylglutaminu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu metodou směsného anhydridu, jak uvedeno v příkladě 1, ve výtěžku 70 %. $R_f = 0,23/S_1$, $0,80/S_2$.

Amid glutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu

Do roztoku 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu benzyloxykarbonylglutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu v kyselině trifluoroctové byl zaváděn plynný bromovodík po dobu 30 minut při teplotě 0°C . Příslušný hydrobromid byl vysrážen etherem a vysušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným a kyslíčnickem fosforečným. Base byla uvolněna N-ethylpiperidinem z methanolického roztoku hydrobromidu a vysrážena dichlormethanem. Produkt byl získán ve výtěžku 70 %. $R_f = 0,00/S_1$; $0,11/S_2$.

P ř í k l a d 12

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid glutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonyl-derivátu katalytickou hydrogenolýzou obdobným způsobem jak uvedeno v příkladě 1, ve výtěžku 80 %. $R_f = 0,00/S_1$, $0,38/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid terc. butyloxykarbonyl-alanyl-N-omega-benzyloxykarbonyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu

Byl připraven z terc. butyloxykarbonylalanyl-N-omega-benzyloxykarbonyllysyl-serinu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu glutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu karboimidovou metodou, obdobným způsobem jak uvedeno v příkladě 5, ve výtěžku 85 %. $R_f = 0,21/S_1$, $0,81/S_2$.

Amid alanyl-lysyl-seryl-glutaminyl-glycy-l-glycy-l-seryl-asparaginy-l-alaninu. $2\text{ CF}_3\text{COOH}$

Byl připraven z odpovídajícího terc.butyloxykarbonyl-derivátu acidolytickým štěpením varem s kyselinou trifluoroctovou a anisolem, obdobným způsobem jak uvedeno v příkladě 10, ve výtěžku 65 %. T.t. 178 až 181°C (rozklad), slíná od 140°C ; $R_f = 0,00/S_1$, $0,02/S_2$.

P ř í k l a d 13

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylalanyl-alaninu

K roztoku amidu benzyloxykarbonylalanyl-alaninu (4,8 g; 16 mmol) v bezvodé kyselině octové (80 ml) byl přidán 4,4'-dimethoxybenzhydrol (4,0 g; 16 mmol). Po rozpuštění byla přidána konc. kyselina sírová (0,1 ml) a po třech dnech stání při teplotě místnosti byl reakční roztok vlit do vody (620 ml). Vyloučená sraženina byla po 2 hodinách zfiltrována a čištěna roztíráním s 5% hydrogen-uhličitanem sodným a vodou. Krystalizací z octanu ethylnatého a petroletheru bylo získáno 7,1 g (86 %) produktu. Vzorek k analýze byl krystalován z octanu ethylnatého, t.t. 208 až 210°C .

Pro $C_{29}H_{33}N_3O_6$ (519,6)

vypočteno: 67,04 % C, 6,40 % H, 8,08 % N,

nalezeno : 67,06 % C, 6,48 % H, 7,97 % N.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid alanyl-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou obdobným postupem jak uvedeno v příkladě 1., ve výtěžku 97 %. Vzorek k analýze byl krystalován z 2-propanolu. $R_f = 0,23/S_1$, $0,69/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylasparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven obdobným způsobem jako methylester benzyloxykarbonylasparaginylnyl-fenyl-alaninu metodou směsného anhydridu, jak uvedeno v příkladě 1., ve výtěžku 91 %. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a octanu ethylnatého, t.t. 242 až 245 °C.

Pro $C_{33}H_{39}N_5O_8$ (633,7)

vypočteno: 62,55 % C, 6,20 % H, 11,05 % N,

nalezeno : 62,18 % C, 6,29 % H, 10,56 % N.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid asparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou obdobným postupem jak uvedeno v příkladě 1., ve výtěžku 90 %. Vzorek k analýze byl krystalován z methanolu a etheru, t.t. 210 až 212 °C.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven z hydrazidu benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-serinu a 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu asparaginylnyl-alanyl-alaninu azidovou metodou, jak uvedeno v příkladě 5. $R_f = 0,32/S_1$, $0,76/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid glycyl-glycyl-seryl-asparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou obdobným postupem jak uvedeno v příkladě 1., ve výtěžku 90 %. $R_f = 0,00/S_1$, $0,39/S_2$.

4,4'-Dimethoxybenzhydrylamid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven z benzyloxykarbonylglutaminu a příslušného 4,4'-dimethoxybenzhydrylamidu glycyl-glycyl-seryl-asparaginylnyl-alanyl-alaninu anhydridovou metodou jak uvedeno v příkladě 5., ve výtěžku 60 %. $R_f = 0,37/S_1$, $0,77/S_2$.

Amid glutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginylnyl-alanyl-alaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu acidolytickým štěpením bromovodíkem v kyselině trifluoroctové a uvolněním base N-ethylpiperidinem, jak uvedeno v příkladě 11. T.t. 181 až 185 °C (rozklad), slíná od 145 °C. $R_f = 0,00/S_1$, $0,04/S_2$.

P ř í k l a d 14

Ethylamid benzyloxykarbonylasparaginylnyl-fenylalaninu

Byl připraven anhydridovou metodou obdobným způsobem jako odpovídající 2-fenylethylamid uvedený v příkladě 5. ve výtěžku 89 % a t.t. 246 až 248 °C. $[\alpha]_D^{20} -34,9^\circ$ ($c = 0,2$; methanol).

Ethylamid asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou na Pd-černi v methanolu ve výtěžku 99 %. Vzorek k analýze byl krystalován z methanolu a etheru; t.t. 196 až 199 °C; $R_f = 0,15/S_1, 0,62/S_2$.

Pro $C_{15}H_{22}N_4O_3$ (306,4)

vypočteno: 58,81 % C, 7,24 % H, 18,29 % N;

nalezeno : 58,97 % C, 7,22 % H, 18,51 % N.

Ethylamid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven azidovou metodou z odpovídajícího hydrazidu benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-serinu a ethylamidu asparaginyln-fenylalaninu obdobným způsobem jako odpovídající 2-fenyl-ethyl-derivát ve výtěžku 82 % a t.t. 235 až 237 °C. $R_f = 0,32/S_1, 0,78/S_2$.

Ethylamid glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu katalytickou hydrogenolýzou na Pd-černi v dimethylformamidu jak uvedeno v příkladě 1.ve výtěžku 99 % a t.t. 199 až 200 °C. $R_f = 0,05/S_1, 0,025/S_2$.

Ethylamid benzyloxykarbonylglutaminyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven anhydridovou metodou obdobným způsobem jako odpovídající 2-fenylethyl-derivát z příslušného benzyloxykarbonylglutaminu a odpovídajícího C-koncového ethylaminu ve výtěžku 77 %. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a etheru; t.t. 269 až 271 °C $R_f = 0,20/S_1, 0,69/S_2$.

Pro $C_{35}H_{47}N_9O_{11} \cdot 1/2H_2O$ (778,8)

vypočteno: 53,60 % C, 6,09 % H, 16,26 % N,

nalezeno : 53,97 % C, 6,21 % H, 16,19 % N.

Ethylamid glutaminyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven katalytickou hydrogenolýzou z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu ve směsi dimethylformamid-methanol (9:1) obdobným způsobem jako příslušný ethylamid uvedený v příkladě 1. $R_f = 0,04/S_1, 0,30/S_2$.

Ethylamid pyroglutamyl-glycyl-glycyl-seryl-asparaginyln-fenylalaninu

Byl připraven hydrogenolýzou na Pd-černi z odpovídajícího benzyloxykarbonylderivátu v 10% kyselině octové při zvýšené teplotě (40 °C). Byl získán produkt o t.t. 219 až 221 °C; $R_f = 0,10/S_1, 0,49/S_2$.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Peptidy typu analogů sérového thymického faktoru obecného vzorce I

A - Gly - Gly - Ser - Asn - B - C - NH - R (I),

kde A je pGlu, Gln, anebo zbytek peptidu Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-, pGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-, Ala-Lys-Ser-Gln-,

B je Gly, Phe, Ala nebo nula,

C je totéž co B,

R je atom vodíku nebo alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo 2-fenylethyl.