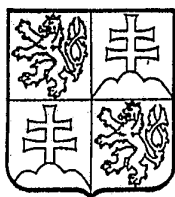


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 678

(21) PV 903-89.N
(22) Přihlášeno 10 02 89

(40) Zveřejněno 14 05 90
(45) Vydáno 25 11 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 9/00

(75) Autor vynálezu

FLEGEI, MARTIN RNDr. CSc.,
CHARVÁTOVÁ JANA RNDr., PRAHA,
KOUŘIL JAN ing.,
HAMÁČKOVÁ JITKA ing., VODŇANY,
BARTH TOMISLAV RNDr. DrSc., ROZTOKY U PRAHY

(54)

Analog lososího hypothalamického GnRH
a způsob jeho přípravy

(57) Řešení se týká nového analogu lososího hypothalamického GnRH vzorce I

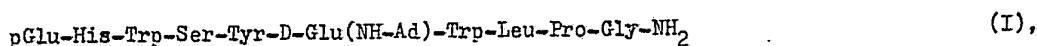
P_{Glu}-His-Trp-Ser-Tyr-/D-Glu/NH-Ad//Trp-Leu-Pro-GlyNH₂,

kde NH-Ad je adamantyl-1-amid, způsobu jeho přípravy vycházejícího ze syntézy peptidového řetězce na polymerním nosiči v pevné fázi, následném uvolnění chránicích skupin, odštěpení nosiče kapalným fluorovodíkem a přečištěním produktu. Tento analog lososího spouštěcího faktoru gonadotropinu je možno použít pro indukovanou ovulaci jikernaček lína v dávce 5 - 25 µg/kg hmotnosti jikernačky při jednorázové aplikaci injekčním podáním intramuskulárně.

Vynález se týká analogu lososího hypothalamického GnRH, způsobu jeho přípravy a použití.

Pro indukovaný výtěr jiker z některých druhů ryb se běžně používají kapří hypofyzy nebo v poslední době také luliberin, což je spouštěcí faktor pro luteinizační a folikuly stimulující hormon savčího původu (viz čs. autorské osvědčení č. 214369). S ohledem na to, že byly postupně izolovány spouštěcí faktory z různých druhů živočichů (N. Sherwood: Trends in Neurosciences 10, 129 /1987/) a ukázalo se, že v jednotlivých vývojových řadách existují strukturně odlišné faktory (struktura lososího LH-RH je odlišná od savčího), zaměřila se pozornost na strukturní obměny rybího faktoru. V rámci studia závislosti struktura účinek se ukázalo již v řadě analogů savčího LH-RH, že změna v poloze 6, tj. substituce glycinu různými neproteinogenními aminokyselinami konfigurace D a jejich zejména lipofilnějšími a stericky silně náročnými deriváty vede k látkám vysoce aktivním s vysokou agonistickou a tedy gonadotropní aktivitou.

Záměnou glycinu v poloze 6 pomocí adamantylamidového derivátu D-glutamové kyseliny, který byl nově připraven a využit mimo jiné také při přípravě peptidu s adjuvantními účinky (čs. autorské osvědčení č. 231221) byl získán nový analog spouštěcího faktoru pro luteinizační hormon podle vynálezu působící při indukovaném výtěru některých druhů ryb obecného vzorce I



kde značí NH-Ad adamantyl-l-amid. Zkratkové symboly pro aminokyseliny mají tento význam:

pGlu	pyroglutamová kyselina
His	histidin
Trp	tryptofan
Ser	serin
Tyr	tyrosin
D-Glu/NH-Ad/	adamantyl-l-amid vázaný na karboxylovou skupinu v poloze 6'-D-glutamové kyseliny
Leu	leucin
Pro	prolin
GlyNH ₂	glycinamid

Tato nová látka - biologicky vysoce účinný dekaeptid - je syntetickým analogem přírodního, tzv. spouštěcího faktoru pro luteinizační hormon.

Způsob přípravy tohoto analogu lososího hypothalamického GnRH vzorce I spočívá v postupné výstavbě peptidového řetězce z vhodně chráněných aminokyselin na polymerním nosiči v pevné fázi, následném uvolnění chráněných skupin a odštěpení řetězce od nosiče kapalným fluorovodíkem.

Pro syntézu peptidu podle vynálezu byla využita metoda v pevné fázi (J.M. Stewart, J.D. Young, Pierce Chem. Comp. 1984). Využili jsme methyl-benzhydrolaminový polymerní nosič /substituce aminoskupinami 0,51 mmol/g. Jako dočasná chráněcí skupina byl použit zbytek tercbutyloxykarbonyl a dále byly použity tyto deriváty:

BOC-Trp/For/, BOC-D-Glu/NH-Ad/, BOC-Tyr/Z/, BOC-Ser/Bzl/, BOC-His/BOC/.

Kondensace byly prováděny ve směsi dimethylformamidu a dichlormethanu 1 : 1, Vo/Vo pomocí dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenztriazolu v tzv. průtokovém uspořádání (V. Krchňák a spol.: Tetrahedron Letters 28, 4469 /1987/. Štěpení terebutyloxykarbonylové skupiny bylo prováděno 35% roztokem trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu, neutralizace 3% roztokem diisopropylethylaminu v dichlormethanu. Po ukončení syntesy byl peptidový řetězec odštěpen z polymerního nosiče kapalným fluorovodíkem metodou "Lowhning" Tam, J.P. a spol., J. Am. Chem. Soc. 105, /442/1983). Analog lososího hypothalamického GnRH byl čistěn metodou gelové chromatografie na dextranovém gelu a pak vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Dále bylo nalezeno použití analogu vzorce I pro indukovanou ovulaci jikerniček lína, kdy se tento analog v dávce 5 až 25 $\mu\text{g/kg}$ hmotnosti jikernačky aplikuje jednorázovým injekčním podáním intramuskulárně.

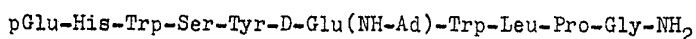
Při zjišťování biologické aktivity byl pozorován významně vyšší výtěžek při nižších dávkách tohoto peptidu ve srovnání s jiným analogem lososího spouštěcího faktoru gonadotropinu. Výsledky jsou ukázány v tabulce 1 a 2.

Příklad 1

Příprava a čistění peptidu:

struktura peptidu:

látko I



polymerní nosič: metylbenzhydrylamin. polymer substituce 0,51 mmol/g-NH₂ množství nosiče v reaktoru: 0,5 g

derivát aminokyseliny	mol. hmotnost	navážka (g)
BOC-Gly	175,19	0,13
BOC-Pro	215,2	0,16
BOC-Leu.H ₂ O	249,3	0,19
BOC-Trp(For)	333,4	0,25
BOC-D-Glu(NH-Ad)	380,5	0,28
BOC-Tyr(Z)	415,5	0,32
BOC-Ser(Bzl)	295,13	0,22
BOC-Trp(For)	333,4	0,25
BOC-His(BOC)DCHA	536,72	0,40
pGlu	111,1	0,10

Všechny kondensace proběhly během 45 min (negativní, ninhydrinový test)

Štěpení terebutyloxykarbonyl. skupiny bylo prováděno 30 min.
neutralizace 5 min.

Ve všech stupních bylo použito 3 ekvivalentů aktivovaných derivátů aminokyselin (0,75 mmol). Bylo použito metodiky průtok. uspořádání (citace uvedena v textu). Jako ochranné látky při štěpení peptidu z nosiče byl použit p-kresol a thioresol v množství odpovídajícím shora uvedené publikaci. Po odsolení na sloupci dextran. gelu (eluze 50% kys. octovou) a lyofilizací bylo získáno 55 mg sur. peptidu, který byl dále čistěn na sloupci silikagelu modifikovaného oktadecylovými skupinami v soustavě - mobilní fázi

obsahující 50 % methanolu a 50 % 0,1% trifluoroctové kyseliny ve vodě. Bylo získáno (pro provedení kontrolní kapal. chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě silikagelu) celkem 10 mg peptidu o odpovídající aminokyselinové a elementární analýse. Podle analytické vysokoúčinné chromatografie na koloně s obrácenou fází typu ODS v mobilním systému obsahujícím stejné složky jako při preparaci látky obsahoval analog spouštěcího faktoru 97% peptidu o aminokys. složení:

pGlu 1,0, His 1,1, Trp 1,7, Ser 0,9, Tyr 1,2, Glu 1,0, Leu 1,2, Pro 1,0, Gly 1,1.

Příklad 2

Indukce ovulace jikernaček lína

Vylovené ryby rybníčního chovu VÚRH-Vodňany byly roztrženy, zváženy, označeny a rozmístěny dle jednotlivých experimentálních podmínek (různé dávky látky I) do laminátových nádrží o objemu vody 70 l s přítokem recirkulované vody. Teplota vody byla do začátku injekce zvýšena na 22 - 24 °C. Látka I byla rozpuštěna ve fyziologickém roztoku a naředěna tak, aby všem jikernačkám byl injikován roztok o objemu 1 ml/kg hmotnosti ryby. Rozmezí dávek se pohybovalo od 0,2 µg až 125 µg na kg hmotnosti ryby. Kontrolní skupina jikernaček nebyla injikována. Srovnávací pokus byl proveden s jiným, dříve popsáním derivátem lososího GnRH - D-Tle GnRH - Kouřil J. a spol. Živočišná výroba 10,901 (1987).

Několik hodin před předpokládaným termínem ovulace bylo započato s kontrolou jikernaček, která probíhala v 1 až 2 hodinových intervalech. Při zjištění ovulace byly jikernačky uměle vytřeny, byla zjištěna hmotnost vytřených jiker (s přesností na 1 kg) a odebrán vzorek jiker pro stanovení průměrné hmotnosti jikry. Na základě zjištěných údajů byla vypočtena relativní hmotnost vytřených jiker a relativní plodnost pro podání látky I a látky II (viz tabulka 1 a 2).

látka II

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Tle-Trp-Leu-Pro-GlyNH₂ ,

kde D-Tle = D - terciální leucín .

T a b u l k a 1

Pracovní plodnost jíkernaček lína po aplikaci látky I

Číslo skupiny	Dávka látky I / $\mu\text{g/kg}$	Hmotnost jíkernaček $\bar{x}$ (g)	Počet jíkernaček injikovaných kusy	vytřeno kusy	%	Relativní hmotnost vyřazených jiker ze všech $\bar{x}$	% z vyřazených $\bar{x} \pm s$	Relativní pracovní plodnost jíkernaček ze všech z vyřazených $10^3 \text{ kusů.kg}^{-1}$
1	125	674 ± 94	5	2	40	4,70	$11,73 \pm 4,25$	94
2	25	698 ± 65	5	4	80	8,91	$11,15 \pm 1,51$	174
3	5	733 ± 49	5	4	80	10,14	$12,68 \pm 1,61$	223
4	1	699 ± 125	5	2	40	3,01	$7,53 \pm 3,35$	48
5	0,2	714 ± 119	5	1	20	0,81	4,07	15
6	$\emptyset$	752 ± 75	5	0	0	$\emptyset$	$\emptyset$	76

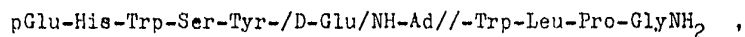
T a b u l k a 2

Pracovní plodnost jikernaček lína po aplikaci látky II

Číslo skupiny	Dávka látky II $\mu\text{g/kg}$	Hmotnost jikernaček $\bar{x} \pm s$ (g)	Počet jikernaček injikovaných kusy	vytřeno kusy %	Relativní hmotnost vytřených jiker % ze všech z vytřených $\bar{x} \pm s$	Relativní pracovní plodnost jikernaček ze všech z vytřených $10^3 \text{ kusů.kg}^{-1}$			
1	200	792 ± 69	6	4	67	9,53	$14,3 \pm 0,6$	122	182 ± 107
2	100	817 ± 109	5	5	100	7,83	$9,4 \pm 2,6$	124	146 ± 41
3	50	750 ± 234	5	2	40	5,36	$13,4 \pm 13,8$	114	284 ± 324
4	20	808 ± 60	6	1	17	3,17	19,0	37	221
5	5	743 ± 166	6	0	0	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
6	$\emptyset$	718 ± 155	5	0	0	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Analog lososího hypothalamického GnRH vzorce I



kde NH-Ad je adamantyl-1-amid.

2. Způsob přípravy analogu vzorce I, vyznačený tím, že se postupně vystaví z vhodné chráněných aminokyselin peptidový řetězec na polymerním nosiči v pevné fázi, načež se chránicí skupiny uvolní, řetězec se odštěpí od nosiče kapalným fluorovodíkem a výsledný produkt se přečistí kombinací gelové a vysoce účinné kapalinové chromatografie.