



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

212246

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

C 07 C 103/52//
A 61 K 37/43

(22) Přihlášeno 21 04 78
(21) (PV 6664-79)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 21 04 77
(789472) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 06 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72) Autor vynálezu SHIELDS JAMES EDWIN, INDIANAPOLIS, IND. (Sp. st. a.)
(73) Majitel patentu ELI LILLY & COMPANY, INDIANAPOLIS, IND. (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy tetradekapeptidu

Vynález se týká způsobu přípravy tetra-
dekapeptidu vzorce I
H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-
-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-
-OH

(I)

působením fluorovodíku na derivát obecného
vzorce II

R-D-Val-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-
-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-L-
-Phe-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X

(II),

kde
R, R₁, R₂, R₃, a R₄ jsou ochranné skupiny,
R₅ je vodík nebo formyl-
skupina a
X představuje skupinu
vzorce



kde je pryskyřicí polystyren. Sloučenina
vzorce I je analogem somatostatinu.

Somatostatin (rovněž známý jako inhibiční faktor uvolňování somatotropinu) je tetradeka-peptid vzorce

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH.

Tento tetradeka-peptid byl izolován z extraktů hypothalamu ovcí a zjistilo se, že je účinný při inhibici sekrece růstového hormonu, rovněž známého jako somatotropin /viz P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. River a R. Guillemin, Science, 179, 77 (1973)/.

Kromě toho patent USA č. 3 904 594 uvádí přírodní somatostatin a generickou třídu jiných sloučenin s dodekapeptidovou sekvencí, odpovídající polohám 3 až 14 přírodního hormonu.

Sloučenina účelně označovaná jako D-Ala¹-somatostatin byla kromě toho popsána v práci Ferland a další, Molecular and Cellular Endocrinology, 4, 79 až 88 (1976). D-Ala¹-somatostatin, ačkoli je strukturně stereoisomerním přírodním L-Ala¹-somatostatinem, je přibližně polovičně účinný ve srovnání s přírodním somatostatinem při in vivo inhibici sekrece žaludeční kyseliny. Sloučenina podle vynálezu, D-Val¹-somatostatin, se liší od D-Ala¹-somatostatinu substitucí dvou vodíkových atomů methylskupinami. Při úvahách o potenciální farmakologické účinnosti D-Val¹-somatostatinu by se mělo dojít k závěru, že jeho účinnost by měla být podobná jako účinnost D-Ala¹-somatostatinu. Teoreticky by tedy bylo možno předpokládat, že D-Val¹-somatostatin bude méně účinný než přírodní hormon, jako in vivo inhibitor sekrece žaludeční kyseliny. D-Val¹-somatostatin má však účinnost poněkud vyšší, než je účinnost přírodního hormonu. Tento výsledek ukazuje, že účinnost D-Val¹-somatostatinu nebylo možno předpokládat na základě srovnání se strukturně podobnými známými sloučeninami.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy tetradeka-peptidu vzorce I,

H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH

(I)

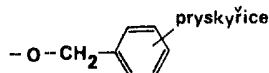
který se provádí tak, že se na sloučeninu obecného vzorce II,

R-D-Val-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-L-Phe-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X

(II)

kde představuje

R ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny,
R₁ ochrannou skupinu thioskupiny,
R₂ ochrannou skupinu epsilon-aminoskupiny,
každý ze symbolů
R₃ a R₄ ochrannou skupinu hydroxyskupiny,
R₅ vodík nebo formylskupinu a
X skupinu vzorce

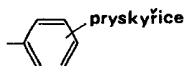


kde pryskyřicí je polystyren,

působí fluorovodíkem.

Jako příklad výchozí látky obecného vzorce II lze uvést sloučeninu vzorce

N-(BOC)-D-Val-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-(For)Trp-L-(CBzOC)-Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-CH₂-



kde je pryskyřicí polystyren.

Ochranné skupiny obsažené ve sloučeninách obecného vzorce II musí mít vlastnosti splňující dvě hlediska. Jednak musí ochranné skupiny zabránovat tomu, aby reaktivní seskupení přítomné v určité molekule nepodlehlo reakci během vystavení molekuly podmínkám, které by jinak měly za následek zánik tohoto reaktivního seskupení. Ochranná skupina však musí mít na druhé straně takovou povahu, aby ji bylo možno snadno odštěpit za současné regenerace původní reaktivní skupiny, a to za takových podmínek, které by neměly nežádoucí vliv na jiné části molekuly. Skupiny vhodné k těmto účelům, tj. k ochraně amino-, hydroxy- a thioskupiny jsou odborníkovi dobře známe. Popisu těchto ochranných skupin a jejich použití byly věnovány celé svazky. Jedním z nich je práce Protective Groups in Organic Chemistry, red. J. F. W. Mc Omie, vyd., Plenum Press, New York, 1973.

Ve shora uvedených vzorcích definujících intermediární sloučeniny představuje R ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny. Ochranné skupiny aminoskupiny jsou dobře známe všem odborníkům v chemii peptidů a mnohé z nich jsou uvedeny ve shora citované Mc Omieově práci v kapitole 2, jejímž autorem je J. W. Barton. Jako ilustrativní příklady takových ochranných skupin lze uvést benzyloxykarbonyl-, p-chlorbenzyloxykarbonyl-, p-brombenzyloxykarbonyl-, o-chlorbenzyloxykarbonyl-, 2,6-dichlorbenzyloxykarbonyl-, 2,4-dichlorbenzyloxykarbonyl-, o-brombenzyloxykarbonyl-, terc.butyloxykarbonyl-(BOC), terc.amyloxykarbonyl-, 2-(p-bifenyl)-isopropoxykarbonyl-(BpOC), adamantyloxykarbonyl-, cyklohexyloxykarbonyl-, cykloheptyloxykarbonyl-, trifenylmethyl-/trityl) a p-toluensulfonylskupinu. Přednostní ochrannou skupinou alfa-aminoskupiny ve významu R je terc.butyloxykarbonylskupina.

R₁ představuje ochrannou skupinu sulfhydrylového substituentu. Mnohé tyto ochranné skupiny jsou popsány v Mc Omieově práci citované shora v kapitole 7, jejímiž autory jsou R. G. Eickey, V. R. Rao a W. G. Rhodes. Jako ilustrativní příklady těchto ochranných skupin lze uvést p-methoxybenzyl-, benzyl-, p-tolyl-, benzhydryl-, acetamidomethyl-, trityl-, p-nitrobenzyl-, terc.butyl-, isobutyloxymethylskupinu a jakékoliv z velkého počtu tritylových derivátů. Další příklady lze nalézt například v encyklopedii Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, "Synthese von Peptiden", sv. 15/1 a 15/2, (1974). Stuttgart, NSR. Přednostní ochrannou skupinou sulfhydrylskupiny ve významu R₁ je p-methoxybenzylskupina.

R₂ představuje vhodnou ochrannou skupinu epsilon-aminoskupiny. Jako ilustrativní příklady mohou sloužit skupiny uvedené shora jako skupiny vhodné pro ochranu alfa-aminoskupiny, jako typické skupiny vhodné k tomuto účelu lze uvést benzyloxykarbonyl-, terc.butyloxykarbonyl-, terc.amyloxykarbonyl-, cyklopentyloxykarbonyl-, adamantyloxykarbonyl-, p-methoxybenzyloxykarbonyl-, p-chlorbenzyloxykarbonyl-, p-brombenzyloxykarbonyl-, o-chlorbenzyloxykarbonyl-, 2,6-dichlorbenzyloxykarbonyl-, 2,4-dichlorbenzyloxykarbonyl-, o-brombenzyloxykarbonyl-, p-nitrobenzyloxykarbonyl-, isopropoxykarbonyl-, cyklohexyloxykarbonyl-, cykloheptyloxykarbonyl- a p-toluensulfonylskupinu.

Jak bude zřejmé z dalšího popisu, způsob přípravy tetradeka-peptidů obecného vzorce I zahrnuje periodické odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny z terminální aminokyseliny přítomné v peptidovém řetězci. Jediným omezením, pokud se týče totožnosti ochranné skupiny epsilon-aminoskupiny lysinového zbytku, spočívá tedy v tom, že ochranná skupina musí mít takovou povahu, aby se neodštěpovala za podmínek používaných pro selektivní odštěpování alfa-aminoskupiny. Vhodná volba ochranných skupin alfa-amino a epsilon-aminoskupin je pro běžného odborníka v chemii peptidů snadná, je pouze třeba uvážit relativní snadnost, s jakou lze jednotlivé ochranné skupiny odštěpit. Tak například skupiny jako je 2-(p-bifenyl)-isopropoxykarbonylskupina (BpOC) a tritylskupina jsou velmi labilní a lze je odštěpovat i v přítomnosti slabé kyseliny. Středně silné kyseliny, jako kyseliny chlorovodí-

kové, trifluoroctové nebo fluoridu boritého v kyselině octové, je zapotřebí pro odštěpení jiných skupin, jako terc.butyloxykarbonyl-, terc.amyloxykarbonyl-, adamantyloxykarbonyl- a p-methoxybenzyloxykarbonylskupiny. Pro odštěpení jiných ochranných skupin je nutno použít ještě silnějších kyselin, tak například odštěpování benzyloxykarbonyl-, halo-genbenzyloxykarbonyl-, p-nitrobenzyloxykarbonyl-, cykloalkyloxykarbonyl- a isopropoxykarbonylskupiny vyžaduje silně kyselé podmínky, tj. použití bromovodíku, fluorovodíku nebo trifluoracetátu boritého v kyselině trifluoroctové.

Samozřejmě se za použití silnějších kyselin rovněž odštěpí i všechny labilnější skupiny. Při volbě ochranných skupin aminoskupin je tedy třeba zajistit, aby skupina na alfa-aminoskupině byla labilnější než ochranná skupina epsilon-aminoskupiny, a podmínky odštěpování musí být selektivnější, aby docházelo jen k odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny.

Předností kombinace ochranných skupin vyhovující těmto podmínkám je kombinace o-chlorbenzyloxykarbonyl- nebo cyklopentyloxykarbonylskupiny ve významu R_2 a terc.butyloxykarbonylskupiny jako ochranné skupiny alfa-aminoskupiny používané u každé aminokyseliny adované na řetězec polypeptidu.

Skupiny R_3 a R_4 představují ochranné skupiny alkoholické hydroxyskupiny threoninu a serinu. Mnohé takové ochranné skupiny jsou popsány ve shora citované Mc Omieově práci, kapitole 3, jejímž autorem je C. B. Reese. Jako typické příklady takových ochranných skupin lze uvést C_1 - C_4 alkylskupiny, jako methyl-, ethyl- a terc.butylskupinu, benzylskupinu, substituovanou benzylskupinu, jako je p-methoxybenzyl-, p-nitrobenzyl-, p-chlorbenzyl- a o-chlorbenzylskupina, C_1 - C_3 alkanoylskupiny, jako je formyl-, acetyl- a propionylskupina, trifenylmethylskupinu (tritylskupinu). Když jsou R_3 a R_4 ochranné skupiny, s výhodou se v obou případech jako tyto skupiny volí benzylskupiny.

Skupina R_5 představuje vodík nebo formylskupinu a definuje skupinu



tryptofanového zbytku. Formylskupina slouží jako ochranná skupina. Použití této ochranné skupiny není obligatorní, a proto může R_5 představovat buď vodík (skupina nechráněná na dusíku), nebo formylskupinu (skupina chráněná na dusíku).

V popisu je používáno dále uvedených zkratk, z nichž většina jsou zkratky v tomto oboru běžně zavedené:

Ala	- alanin
Asn	- asparagin
Cys	- cystein
Gly	- glycin
Lys	- lysin
Phe	- fenylalanin
Ser	- serin
Thr	- treonin
Trp	- tryptofan
Val	- valin
DCC	- N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
DMF	- N,N -dimethylformamid
BOC	- terc.butyloxykarbonyl
PMB	- p-methoxybenzyl
CBzOC	- o-chlorbenzyloxykarbonyl
CPOC	- cyklopentyloxykarbonyl
Bzl	- benzyl

For - formyl

BpOC - 2-(p-bifenyl)isopropoxykarbonyl.

I když volba konkrétních ochranných skupin, kterých se má použít při přípravě sloučenin obecného vzorce I, je v rozsahu zkušeností odborníka v syntéze peptidů, je samozřejmé, že sekvence reakcí, které musí být provedeny, ovlivňuje volbu konkrétních ochranných skupin.

Jinými slovy, zvolená ochranná skupina musí být stálá jak vůči použitým reakčním složkám, tak za podmínek následujících reakčních stupňů. Tak například, jak již bylo v určitém rozsahu uvedeno, musí zůstat konkrétně použitá ochranná skupina netknuta za podmínek použitých při odštěpování ochranné skupiny alfa-aminoskupiny terminálního zbytku aminokyseliny peptidového fragmentu při přípravě pro kondenzaci následujícího aminokyselinového fragmentu na peptidový řetězec. Je rovněž důležité zvolit jako ochrannou skupinu takovou skupinu, která zůstane netknuta během budování peptidového řetězce a kterou lze snadno odštěpit po skončení syntézy požadovaného tetradekapeptidového produktu. Všechny tyto faktory jsou však v rozsahu zkušeností odborníka v tomto oboru.

Jak je ze shora uvedené diskuse zřejmé, mohou se tetradekapeptidy obecného vzorce II připravovat syntézou v pevné fázi. Tato syntéza spočívá v postupném budování peptidového řetězce, počínaje na terminálním uhlíkovém konci peptidu. Většinou se postupuje tak, že se nejprve cystein váže prostřednictvím své karboxylové funkční skupiny k pryskyřici, reakcí cysteinu s chráněnou aminoskupinou a chráněnou sulfhydrylovou skupinou s chlormethylovou nebo hydroxymethylovanou pryskyřicí. Příprava hydroxymethylované pryskyřice je popsána v práci Bodanszky a další, Chem. Ind. (Londýn), 38, 1597 až 1598 (1966). Chlormethylovaná pryskyřice je obchodně dostupná.

Při provádění vazebné reakce karboxylové funkční skupiny cysteinu a pryskyřice se nejprve chráněný cystein převede na cesnou sůl. Tato sůl se pak nechá reagovat s pryskyřicí způsobem popsaným v práci B. F. Gisin, Helv. Chim. Acta, 56, 1476 (1973). Alternativně se může cystein vázat k pryskyřici tak, že se jeho karboxylová funkční skupina nejprve běžným způsobem aktivuje. Tak například se může nechat cystein reagovat s pryskyřicí v přítomnosti sloučeniny aktivující karboxyskupinu, jako je N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC).

Po navázání volné karboxyskupiny cysteinu na pryskyřičný nosič se začne postupně budovat peptidový řetězec, postupnou kondenzací jednotlivých aminokyselin k N-terminální části peptidového řetězce. Přitom je tedy zapotřebí v každém stupni odštěpit ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny z aminokyseliny v terminální části peptidového fragmentu a pak se připojí k volnému a reaktivnímu N-konci terminální aminokyseliny následující aminokyselinový zbytek.

Odštěpení ochranné skupiny alfa-aminoskupiny se může provádět v přítomnosti kyseliny, jako kyseliny bromovodíkové, chlorovodíkové, trifluoroctové, p-toluensulfonové, benzensulfonové, naftalensulfonové a octové, za vzniku odpovídající adiční soli produktu s kyselinou.

Jinou metodou odštěpování ochranné skupiny aminoskupiny je působení fluoridem boritým. Tak například se působením diethyletherátu fluoridu boritého v ledové kyselině octové fragment peptidu s chráněnou aminoskupinou převede na komplex s fluoridem boritým, který se pak převede na volný peptidový fragment působením zásady, jako vodného hydrogenuhličitanu draselného. Může se použít kterékoli z těchto metod za předpokladu, že se jí dosáhne odštěpení ochranné skupiny N-terminální alfa-aminoskupiny bez porušení jakýchkoli dalších ochranných skupin přítomných v peptidovém řetězci. S ohledem na tento požadavek se přednostně odštěpuje N-terminální ochranná skupina za použití kyseliny trifluoroctové. Obvykle se štěpení provádí při teplotě asi od 0 °C do teploty místnosti.

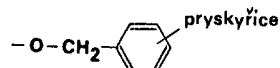
Po odštěpení ochranné skupiny v N-terminální poloze je získaný produkt obvykle ve formě adiční soli s kyselinou, které bylo použito pro odštěpování ochranné skupiny. Tento pro-

dukt se pak může převést na sloučeninu s volnou aminoskupinou působením slabé zásady, typicky terciárního aminu, jako pyridinu nebo triethylaminu.

Nyní je řetězec peptidu připraven pro reakci s následující aminokyselinou. Reakce s aminokyselinou se může provádět kteroukoli z několika známých technik. Pro připojování následující aminokyseliny k N-konci řetězce peptidu se používá aminokyseliny, která má volnou karboxyskupinu, ale která má vhodně chráněnou alfa-aminoskupinu a všechny ostatní popřípadě přítomné reaktivní skupiny. Aminokyselinu je pro reakci s N-koncem řetězce peptidu třeba aktivovat. Jedním ze způsobů aktivace, kterého lze při syntéze použít, je převedení aminokyseliny na směsný anhydrid. Přitom se volná karboxylová funkční skupina aminokyseliny aktivuje reakcí s jinou kyselinou, typicky s derivátem kyseliny uhličitě ve formě chloridu kyseliny. Jako příklady takových chloridů kyselin, kterých lze použít pro tvorbu směsných anhydridů, lze uvést ethylchlorformiát, fenylchlorformiát, sek.butylchlorformiát, isobutylchlorformiát a pivaloylchlorid.

Jiným způsobem aktivace karboxylové funkční skupiny aminokyseliny pro kondenzaci s řetězcem peptidu je převedení aminokyselin na reaktivní esterový derivát. Jako příklady takových reaktivních esterů lze uvést 2,4,5-trichlorfenylester, pentachlorfenylester, p-nitrofenylester, ester vzniklý z 1-hydroxybenzotriazolu a ester vzniklý z N-hydroxysukcinimidu.

Jiným způsobem připojení C-terminální části aminokyseliny k peptidovému fragmentu je způsob, při kterém se kondenzace provádí v přítomnosti alespoň ekvimolárního množství N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC). Posledně uvedeného způsobu se přednostně používá při přípravě tetradeka-peptidu obecného vzorce II, kde X představuje skupinu vzorce



Po připravení řetězce peptidu s požadovaným sledem aminokyselin se může výsledný peptid odstranit z pryskyřičného nosiče. To se provádí působením fluorovodíku na tetradeka-peptid vázaný k pryskyřici s chráněnými reaktivními skupinami. Působením fluorovodíku se odštěpí peptid od pryskyřice, kromě toho se jím však odštěpí všechny ostatní ochranné skupiny přítomné na reaktivních skupinách peptidového řetězce, stejně tak jako ochranná skupina alfa-aminoskupiny terminální aminokyseliny. Když se peptid odštěpuje od pryskyřice za současného odštěpení ochranných skupin působením fluorovodíku, přednostně se reakce provádí v přítomnosti anisolu. Zjistilo se, že přítomnost anisolu inhibuje potenciální alkylaci určitých zbytků aminokyselin přítomných v řetězci peptidu. Kromě toho se odštěpování přednostně provádí v přítomnosti ethylmerkaptanu. Ethylmerkaptan slouží k ochraně indolového kruhu tryptofanového zbytku a kromě toho usnadňuje převedení chráněných cysteinových zbytků do thiolové formy. Rovněž v případě, že R₅ představuje formylskupinu, usnadňuje přítomnost ethylmerkaptanu odštěpení formylskupiny fluorovodíkem.

Po shora popsaném štěpení se získá jako produkt peptid s přímým řetězcem obsahujícím 14 zbytků aminokyselin.

Následující příklady provedení blíže objasňují přípravu sloučenin obecného vzorce II a meziproductů. Příklady mají pouze ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

P ř í k l a d 1

N-terc.butyloxykarbonyl-L-cysteiny-(S-p-methoxybenzyl)methylovaná polystyrenová pryskyřice

K 500 ml N,N-dimethylformamidu (DMF) obsahujícímu cesnou sůl N-terc.butyloxykarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)cysteinu [připravenou z 9,06 g (26,5 mmolu) zvolené kyseliny] se přidá 51,0 g chlormethylované polystyrenové pryskyřice (0,75 mmolu/g). Směs se míchá 6 dnů při

teplotě místnosti. Pryskyřice se odfiltruje a postupně promyje třikrát směsí 90 % DMF a 10 % vody, třikrát 95% ethanolem a třikrát DMF. K pryskyřici suspendované v 500 ml DMF se přidá roztok 10,5 g octanu cesného. Směs se míchá 6 dnů při teplotě místnosti. Pryskyřice se odfiltruje a postupně promyje jednou vodným DMF, třikrát směsí 90 % DMF a 10 % vody, třikrát 95% ethanolem, třikrát methylenchloridem, třikrát 95% ethanolem a třikrát chloroformem. Prachové částice se odstraní tím, že se pryskyřice čtyřikrát suspenduje v chloroformu a kapalina se vždy oddělí. Pak se pryskyřice suší za vakua při 40 °C přes noc. Získá se 44,8 g titulního produktu. Analýza minokyselin ukazuje, že produkt obsahuje 0,25 mmolu cysteinu na gram pryskyřice. Cystein se stanovuje jako kyselina cysteinová v produktu hydrolýzy prováděné za použití směsi dioxanu a koncentrované kyseliny chlorovodíkové 1:1, ke které bylo přidáno malé množství dimethylsulfoxidu.

Příklad 2

N-terc.butyloxykarbonyl-D-valyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)cysteinyl-L-(N-epsilon-o-chlorbenzyloxykarbonyl)-lysyl-L-asparaginy-L-fenylalanyl-L-fenylalanyl-L-(formyl)tryptofyl-L-(N-epsilon-o-chlorbenzyloxykarbonyl)lysyl-L-(O-benzyl)threonyl-L-fenylalanyl-L-(O-benzyl)threonyl-L-(O-benzyl)seryl-L-(S-p-methoxybenzyl)cysteinylmethylovaná polystyrenová pryskyřice

Produkt z příkladu 1 (7,0 g) se umístí do reakční nádoby automatického syntetizátoru peptidů (Beckman 990) a v tomto zařízení se k produktu připojí dvanáct ze zbývajících třinácti aminokyselin. Výsledný chráněný tridekapeptid vázaný k pryskyřici se rozdělí na dva stejné díly a k produktu obsaženému v jednom z těchto dílů se připojí koncový zbytek. Použité aminokyseliny a jejich pořadí jsou:

1. N-terc.butyloxykarbonyl-(O-benzyl)-L-serin,
2. N-terc.butyloxykarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin,
3. N-terc.butyloxykarbonyl-L-fenylalanin,
4. N-terc.butyloxykarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin,
5. N^α-terc.butyloxykarbonyl-N-epsilon-o-chlorbenzyloxykarbonyl-L-lysin,
6. N^α-terc.butyloxykarbonyl-N-formyl-L-tryptofan,
7. N-terc.butyloxykarbonyl-L-fenylalanin,
8. N-terc.butyloxykarbonyl-L-fenylalanin,
9. p-nitrofenylester N-terc.butyloxykarbonyl-L-asparaginu,
10. N^α-terc.butyloxykarbonyl-N-epsilon-o-chlorbenzyloxykarbonyl-L-lysin,
11. N-terc.butyloxykarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)-L-cystein,
12. N-terc.butyloxykarbonylglycin a
13. N-terc.butyloxykarbonyl-D-valin.

Sled operací, kterými se provádí odštěpení ochranné skupiny, neutralizace a připojení aminokyselin v případě každé z aminokyselin zaváděných do peptidu, je tento:

1. trojnásobné promytí chloroformem (vždy 10 ml/g pryskyřice), vždy po dobu 3 minut,
2. odštěpení BOC skupiny dvacetiminutovým působením směsí 29 % kyseliny trifluoroctové, 48 % chloroformu a 6 % triethylsilanu v množství 10 ml/g po dobu 20 minut, postup se opakuje dvakrát,
3. dvojnásobné promytí chloroformem (vždy 10 ml/g pryskyřice), vždy po dobu 3 minut,
4. jedno promytí methylenchloridem (vždy 10 ml/g pryskyřice), po dobu 3 minut,
5. trojnásobné promytí směsí 90 % terc.butyloalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (vždy 10 ml/g pryskyřice), vždy po dobu 3 minut,
6. trojnásobné promytí methylenchloridem (vždy 10 ml/g pryskyřice), vždy po dobu 3 minut,
7. neutralizace 3% triethylaminem v methylenchloridu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
8. Promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,

9. promývání směsí 90 % terc.butylalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
10. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
11. přidání 1,0 mmol/g pryskyřice chráněné aminokyseliny a 1,0 mmolu/g pryskyřice N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v 10 ml/g pryskyřice methylenchloridu a mísení po dobu 120 minut,
12. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
13. Promývání směsí 90 % terc.butylalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
14. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
15. neutralizace působením 10 ml/g pryskyřice 3% triethylaminu v methylenchloridu po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
16. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
17. promývání směsí 90 % terc.butylalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
18. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
19. promývání 10 ml/g pryskyřice dimethylformamidem po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
20. přidání 1,0 mmolu/g pryskyřice chráněné aminokyseliny a 1,0 mmolu/g pryskyřice N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v 10 ml/g pryskyřice směsi DMF a methylenchloridu 1:1 a mísení po dobu 120 minut,
21. promývání 10 ml/g dimethylformamidem po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
22. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
23. promývání směsí 90 % terc.butylalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
24. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
25. neutralizace působením 10 ml/g pryskyřice 3% triethylaminu v methylenchloridu po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
26. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
27. promývání směsí 90 % terc.butylalkoholu a 10 % terc.amylalkoholu (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát a
28. promývání methylenchloridem (10 ml/g pryskyřice) po dobu 3 minut - opakuje se třikrát.

Shora uvedeného sledu operací se používá pro připojení každé z aminokyselin, s výjimkou glycinu a asparaginu. Připojení glycinu se provádí pouze za použití stupňů 1 až 18. Asparaginový zbytek se zavádí prostřednictvím reaktivního p-nitrofenylesteru. Přitom se stupně 11 nahradí těmito třemi stupni:

- a) promývání 10 ml/g pryskyřice dimethylformamidem po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,
- b) přidání 1,0 mmolu/g pryskyřice p-nitrofenylesteru N-terc.butyloxykarbonyl-L-asparaginu v 10 ml/g pryskyřice směsi dimethylformamidu a methylenchloridu 1:3 a míchání po dobu 720 minut a
- c) promývání 10 ml/g pryskyřice dimethylformamidem po dobu 3 minut - opakuje se třikrát,

Rovněž stupeň 20 se modifikuje tak, že se přidá p-nitrofenylester N-terc.butoxykarbonyl-L-asparaginu ve směsi dimethylformamidu a methylenchloridu 3:1 a směs se míchá 720 minut.

Výsledný peptid vázaný k pryskyřici se za vakua vysuší. Produkt se hydrolyzuje za varu pod zpětným chladičem ve směsi koncentrované kyseliny chlorovodíkové a dioxanu po dobu 72 hodin. Analýza aminokyselin výsledného produktu poskytuje tyto výsledky (jako standardu se používá lysinu): Asn 1,04, 2Thr 2,68, Ser 1,08, Val 1,12, Gly 1,04, 3Phe 3,87, 2Lys 2,00, Trp 0,75.

Tryptofan se stanoví 21hodinovou hydrolyzou vzorku produktu v přítomnosti dimethylsulfoxidu a thioglykolové kyseliny. Cystein se neurčuje, poněvadž při analýze touto metodou dochází k jeho rozkladu.

P ř í k l a d 3

D-valyl-glycyl-L-cysteiny-L-lysyl-L-asparaginy-L-fenylalanyl-L-fenylalanyl-L-tryptofyl-L-lysyl-L-threonyl-L-fenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein

Ke směsi 5 ml anisolu a 5 ml ethylmerkaptanu se přidá 2,828 g (při úrovni substituce 0,150 mmol/g) chráněného tetradeka-peptidu, vázaného k pryskyřici z příkladu 2. Směs se ochladí v kapalném dusíku a přidestituje se 56 ml kapalného fluorovodíku. Výsledná směs se nechá ohřát na 0 °C a míchá se po dobu 2 hodin. Fluorovodík se pak oddestiluje. Ke zbylé směsi se přidá ether a vzniklá směs se ochladí na 0 °C. Vzniklá pevná látka se odfiltruje a promyje etherem. Produkt se vysuší a tetradeka-peptid zbavený ochranných skupin se extrahuje ze směsi s pryskyřicí za použití 1 M kyseliny octové a malého množství ledové kyseliny octové.

Roztok v kyselině octové se pak ihned ve tmě lyofilizuje do sucha. Výsledná bílá pevná látka se suspenduje ve směsi 10 ml odplyněné 0,2 M kyseliny octové a 4 ml ledové kyseliny octové. Suspenze se zahřívá, ale všechna pevná látka se úplně nerozpustí. Nerozpustný podíl se odfiltruje a neprůhledný bezbarvý filtrát se nanese na sloupec Sephadexu G-25F. Chromatografie se provádí za těchto podmínek:

rozpouštědlo: odplyněná 0,2 M kyselina octová
rozměry sloupce: 75 x 1 500 mm,
teplota: 26 °C,
průtoková rychlost: 629 ml/h,
objem frakce: 22,0 ml.

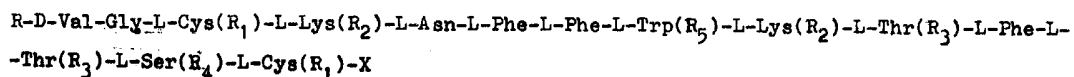
Absorbance při 280 nm každé frakce se vynese do grafu oproti číslu frakce. Získá se křivka s velkým širokým maximem a přilehlým ramenem (inflexí). UV-spektroskopie ukazuje, že hlavní část maxima tvoří produkt. Spojí se frakce 224 až 240 (tj. eluát od 4,906 do 5 280 ml, maximum odpovídá průtoku celkem 5 054 ml eluátu).

Spojené frakce neobsahují produkt odpovídající rameni křivky. UV-spektroskopie ukazuje, že ve spojených frakcích je obsaženo 175 mg produktu (výtěžek 24,8 %). Ellmanovou titrací alikvotního vzorku se zjistí, že obsah sulphydrylových skupin je 93,6 % teorie.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy tetradeka-peptidu vzorce I,
H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH
(I)

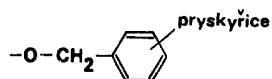
vyznačený tím, že se na sloučeninu obecného vzorce II,



(II)

kde představuje

- R ochrannou skupinu alfa-aminoskupiny,
 R₁ ochrannou skupinu thioskupiny,
 R₂ ochrannou skupinu epsilon-aminoskupiny,
 každý ze symbolů
 R₃ a R₄ ochrannou skupinu hydroxyskupiny,
 R₅ vodík nebo formylskupinu a
 X skupinu vzorce



kde je pryskyřicí polystyren,
 působí fluorovodíkem.