



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218777
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 27 08 80

(21) [PV 5839-80]

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52
C 12 P 21/00

(40) Zveřejněno 30 07 82

(45) Vydáno 15 04 85

(75)

Autor vynálezu

BRTNÍK FRANTIŠEK ing. CSc., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc.,
ROZTOKY u Prahy, JOŠT KAREL RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob výroby peptidů obsahujících lysin

1

2

Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů obsahujících ve své molekule zbytek lysinu. Tento způsob se vyznačuje tím, že se pro chránění ϵ -aminoskupiny lysinu používá fenylacetylová skupina, která se z vybudovaného peptidu odštěpí působením penicilinamidohydrolasy E. C. 3.5.1.11.

Vynález by měl nalézt uplatnění ve farmaceutické chemii, zabývající se přípravou biologicky aktivních peptidů obsahujících lysin, kdy pro jejich přípravu lze aplikací uvedeného způsobu očekávat výrobu lysinových peptidů s vyššími technickými parametry a nižší výrobní náklady.

Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů obsahujících ve své molekule zbytků kyseliny.

Většina dosud popsaných a používaných způsobů syntézy peptidů je založena na použití chránicích skupin [Schröder E., Lübke K.: *The Peptides*. Academic Press, New York 1966; Jakubke H. D., Jeschkeit H.: *Aminosäuren-Peptide-Proteine*, Akademie-Verlag, Berlin 1969; *Synthese von Peptiden* (E. Wunsch, Ed.), *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl), svazek XV/1. Thieme, Stuttgart 1974]. Principiálně můžeme rozdělit chránicí skupiny na pohyblivé (mnohokrát odstraňované během výstavby peptidového řetězce) a stabilní, které chrání funkční skupiny v postranních řetězcích aminokyselin a které procházejí všemi syntetickými stupni a odštěpují se v posledním stádiu syntézy. Požadavkem kladeným na stabilní chránicí skupinu je z jedné strany dostatečná odolnost v průběhu jednotlivých syntetických stupňů, z druhé strany ovšem možnost takového způsobu jejich odštěpení, který by žádným způsobem nenařušil již vybudovaný peptidový řetězec. Tyto dva požadavky jsou ve vzájemném rozporu a žádná z dosud popsaných chránicích skupin pro ϵ -aminoskupinu lysinu je zcela nesplňuje.

Novost předmětu vynálezu spočívá ve zjištění, že fenylacetylová skupina jako chránicí skupina ϵ -aminoskupiny lysinu je dostatečně stabilní za běžných podmínek používaných při syntéze peptidů, a že se dá odstranit působením enzymu penicilinamidohydrolasy E. C. 3.5.1.11., který prakticky neštěpí peptidové vazby.

Podstatou způsobu výroby peptidů obsahujících lysin je, že se pro chránění ϵ -aminoskupiny lysinu používá fenylacetylová skupina, která se z vybudovaného peptidu odštěpí působením penicilinamidohydrolasy E. C. 3.5.1.11.

Způsob výroby peptidů obsahujících lysin se dále objasňuje v příkladech provedení.

Chromatografie v tenké vrstvě byla prováděna na destičkách se silikagelem (Silufol) v systémech:

2-butanol — 98% kyselina mravenčí — voda (75 : 13,5 : 11,5; S1),

2-butanol — 25% vodný amoniak — voda (85 : 7,5 : 7,5; S2),

1-butanol — kyselina octová — voda (4 : 1 : 1; S3),

1-butanol — kyselina octová — pyridin — voda (15 : 3 : 10 : 6; S4),

1-butanol — kyselina octová — ethylacetát — voda (1 : 1 : 1 : 1; S7),

chloroform — methanol — kyselina octová — voda (32 : 8 : 2 : 1,2; S11).

Papírová elektroforesa byla prováděna ve vlhké komůrce v 1 M kyselině octové (pH 2,4) a v pyridin-acetátovém pufru (pH 5,7) na papíru Whatman 3MM při potenciálovém

spádu 20 V/cm po dobu 1 hodiny. Hodnoty E udávají relativní pohyblivost látek vzhledem ke glycinu či histidinu. V případě chromatografie i elektroforesy byla detekce látek prováděna ninhydrinem nebo chlorační metodou. Vzorky pro aminokyselinové analýzy byly hydrolyzovány 20 hodin při 105 °C v 6 M HCl (v ampulích zatavených při 105 Pa). Analýzy byly prováděny na automatickém analyzátoru. Presorická aktivita byla stanovena způsobem popsaným v literatuře (Krejčí I., Kupková B., Vávra I.: *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 30, 497 [1967]).

Příklad 1

N^ε-fenylacetyllysin

K roztoku hydrochloridu lysinu (9,2 g) ve vroucí vodě (125 ml) byl přidán zásaditý uhlíkatý měďnatý (čerstvě připravený z 12,5 g CuSO₄ · 5 H₂O a 9 g NaHCO₃) během 30 min. Reakční směs byla 2 hodiny zahřívána k varu za občasného promíchání. Nerozpuštěný podíl byl odfiltrován a k roztoku byl za míchání po částech přidáván fenylacetylchlorid (13 ml) a 2 M NaOH (pH roztoku bylo udržováno na hodnotě 10). Po 30 min. byl vyloučený měďnatý komplex odfiltrován, na filtru promyt vodou a etherem a suspendován v kyselině chlorovodíkové (pH 2). Suspenze byla zahřívána na 90 °C a 1 hodinu sycena plynným sirovodíkem. Směs byla zfiltrována s aktivním uhlím, nerozpustná část byla na filtru promyta kyselinou chlorovodíkovou (pH 2), filtráty ochlazený na teplotu místnosti a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7. Po ochlazení byl vyloučený podíl odfiltrován a krystalován z 3 M kyseliny octové. Bylo získáno 6,2 g (50 %) produktu o t. t. 232 až 234 °C,

$$[\alpha]_D^{25} = +17,5^\circ \text{ (c = 0,9, 1 M HCl),}$$

$$E_{2,4}^{\text{Gly}} = 0,62,$$

$$E_{5,7}^{\text{Gly}} = 1,0,$$

$$R_F = 0,29 \text{ (S1), } 0,26 \text{ (S3), } 0,33 \text{ (S4).}$$

Pro C₁₄H₂₀N₂O₃ (264,3)

vypočteno:

$$63,62 \% \text{ C, } 7,63 \% \text{ H, } 10,60 \% \text{ N,}$$

nalezeno:

$$63,79 \% \text{ C, } 7,66 \% \text{ H, } 10,51 \% \text{ N.}$$

Ninhydrinová konstanta je 61,0 (za podmínek, kdy leucin má 56,5); začátek píku při aminokyselinové analýze je ve 129. min. (když odpovídající čas pro tyrosin je 133. minuta).

N^α-benzyloxykarbonyl-N^ε-fenylacetyllysin

K suspenzi N^ε-fenylacetyllysinu (4 g) v 1 M NaOH (30 ml) byl za míchání přidán benzyloxykarbonylchlorid (3 ml) a 1 M NaOH (pH udržováno na hodnotě 10) bě-

hem 30 minut. V míchání bylo pokračováno 1 hodinu, směs byla vytřepána etherem, vodná fáze okyselená na pH 3, vyloučený olej byl extrahován do ethylacetátu a ethylacetátový roztok byl vytřepán vodou, vysušen síranem sodným a odpařen. Bylo získáno 6,1 g olejovitého produktu, $R_F = 0,30$ (S2), 0,74 (S3), 0,69 (S4). Dicyklohexylamoniová sůl připravená běžným způsobem, byla krystalována z ethylacetátu: t. t. 134 až 135 °C,

$$[\alpha]_D = +2,4^\circ (c = 1, \text{methanol}), -3,3^\circ (c = 1, \text{dioxan}).$$

Pro $C_{34}H_{49}N_3O_5$ (579,8)

vypočteno:

70,44 % C, 8,52 % H, 7,25 % N,

nalezeno:

70,58 % C, 8,45 % H, 7,52 % N.

Amid N^α -benzyloxykarbonyl- N^ϵ -fenylacetyllysyl-glycinu

K roztoku derivátu lysinu (5,2 g) a 1-hydroxybenztriazolu (1,76 g) v dimethylformamidu (15 ml) byl přidán roztok hydrobromidu amidu glycinu (2,0 g) a N-ethylpiperidinu (1,78 ml) v dimethylformamidu (15 ml). Směs byla ochlazená na -10°C a byl k ní přidán dicyklohexylkarbodiimid (2,7 g). Směs byla míchána 1 hodinu při -5°C a 16 hodin při teplotě místnosti. Dimethylformamid byl odpařen, odparek byl přelit vodou, ochlazen na 0°C a pevný podíl byl odfiltrován a promyt nasyceným roztokem NaHCO_3 , vodnou 0,5 M HCl a opět vodou. Krystalizací z ethanolu bylo získáno 5,2 g (89 %) produktu o t. t. 155,5 až 156°C ,

$R_F = 0,67$ (S1), 0,52 (S2), 0,66 (S3), 0,74 (S4),

$[\alpha]_D = -2,8^\circ (c = 0,3, \text{dimethylformamid})$

Pro $C_{24}H_{28}N_4O_5$ (454,5)

vypočteno:

63,42 % C, 6,65 % H, 12,32 % N,

nalezeno:

63,70 % C, 6,80 % H, 12,30 % N.

Amid lysyl-glycinu

K roztoku chráněného dipeptidu (45 mg) v kyselině octové (0,5 ml) byl přidán 4 M NBr v kyselině octové (0,5 ml) a po 30 min. byl ke směsi přidán ether, vyloučený hydrobromid byl dekantován s etherem a vysušen; $R_F = 0,13$ (S3), 0,45 (S4),

$E_{5,7}^{\text{His}} = 0,65$,

$E_{2,4}^{\text{His}} = 0,68$.

Část produktu (2,6 mg) byla rozpuštěna v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,5 (260 μl) a k roztoku byl přidán roztok penicilinamidohydrolasy (135 μl ; roztok enzymu byl připraven rozpuštěním 10 mg enzymu v 1 ml

fosfátového pufru a roztok byl zcentrifugován] a voda (135 μl). Směs byla inkubována při 37°C a vzorky byly odebrány po 90 minutách a 21 hodinách. Průběh reakce byl vyhodnocován chromatograficky a elektroforeticky ve srovnání s autentickými vzorky: $R_F = 0,02$ (S3), 0,08 (S4),

$E_{5,7}^{\text{His}} = 1,94$,

$E_{2,4}^{\text{His}} = 1,37$.

Příklad 2

Amid N^α -benzyloxykarbonylprolyl- N^ϵ -fenylacetyllysyl-glycinu

K roztoku chráněného dipeptidu (2,26 g) v kyselině octové (10 ml) byl přidán 4 M HBr v kyselině octové (10 ml) a po 30 minutách při teplotě místnosti byl hydrobromid dipeptidu vysrážen etherem, vyloučená sraženina byla odfiltrována, promyta etherem a vysušena. Hydrobromid byl rozpuštěn v dimethylformamidu (10 ml) a pH bylo nastaveno N-ethylpiperidinem na hodnotu 10 a byl k němu přidán roztok benzyloxykarbonylprolinu (1,25 g) a 1-hydroxybenztriazolu (0,68 g) v dimethylformamidu (10 ml). Směs byla ochlazená na -10°C a byl k ní přidán dicyklohexylkarbodiimid (1,1 g). Směs byla míchána 1 hodinu při -10°C a při teplotě místnosti 15 hodin. Vyloučená dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, dimethylformamid byl odpařen a odparek byl rozetřen s 2% HCl , pevný podíl byl odfiltrován a na filtru promyt vodou, nasyceným roztokem NaHCO_3 , vodou a etherem. Krystalizací ze směsi methanol-ether bylo získáno 2 g (72 %) produktu o t. t. 197 až 199°C , $[\alpha]_D = -34,5^\circ (c = 0,2, \text{dimethylformamid})$, $R_F = 0,53$ (S1), 0,40 (S2), 0,50 (S3), 0,67 (S4), 0,77 (S7).

Pro $C_{29}H_{37}N_5O_6$ (551,6)

vypočteno:

63,14 % C, 6,76 % H, 12,69 % N,

nalezeno:

63,41 % C, 6,84 % H, 12,56 % N.

Amid prolyl-lysyl-glycinu

K roztoku chráněného tripeptidu (55 mg) v kyselině octové (0,5 ml) byl přidán 4 M HBr v kyselině octové (0,5 ml). Po 30 minutách při teplotě místnosti byl hydrobromid vysrážen etherem, promyt etherem a vysušen:

$R_F = 0,18$ (S1), 0,50 (S4),

$E_{5,7}^{\text{His}} = 0,60$,

$E_{2,4}^{\text{Gly}} = 0,98$.

Hydrobromid tripeptid-amidu (2,3 mg) byl rozpuštěn v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,5 (260 μl) a k roztoku byl přidán roztok penicilinamidohydrolasy (135 μl ; roztok en-

zymu byl připraven stejným způsobem, jak je popsáno v příkladu 1), a voda [135 μ l]. Průběh reakce byl opět vyhodnocován chromatograficky a elektroforeticky:

$$R_F = 0,08 \text{ (S1)}, 0,05 \text{ (S4)},$$

$$E_{5,7}^{\text{His}} = 1,44,$$

$$E_{2,4}^{\text{His}} = 1,08.$$

Příklad 3

Amid S-benzyl- β -merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-N^ε-fenylacetyl-lysyl-glycinu

K roztoku hydrazidu S-benzylmerkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu [239 mg; Zavoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 32, 1250 [1967]] v dimethylformamidu (2,5 ml) byl přidán 1,6 M HCl v dioxanu (0,33 ml) a po ochlazení na -20°C byl za míchání přidán butylnitrit (25,8 mg) v dimethylformamidu (1 ml). Směs byla míchána při -20°C 20 minut, ochlazená na -40°C a byl k ní přidán N-ethylpiperidin (na pH 7) a roztok hydrobromidu amidu prolyl-N^ε-fenylacetyllysyl-glycinu, předem připravený z chráněného tripeptidu (207 mg) způsobem popsáným v příkladu 2 a N-ethylpiperidinu (0,1 ml) v dimethylformamidu (2 ml), ochlazený na -40°C . Směs byla ohřata na 0°C a při této teplotě nechána 3 dny stát. Dimethylformamid byl odpařen, k odparku byla přidána 2% kyselina chlorovodíková. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a na filtru promyta vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitánu sodného a vodou. Krystalizací z 300 mg produktu, který byl dále čištěn gelovou filtrací v dimethylformamidu. Bylo získáno 280 mg (84 %) produktu o t. t. 223 až 225°C , $[\alpha]_D = -42,6^\circ$ ($c = 0,2$, dimethylformamid). Aminokyselinová analýza: Tyr 1,00, Phe 1,05, Glu 1,01, Asp 0,99, Lys 0,96, Pro 1,00, Gly 1,00, $R_F = 0,53$ (S1), 0,23 (S2), 0,60 (S3), 0,73 (S4), 0,67 (S7), 0,55 (S11).

Pro $\text{C}_{68}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1377)

vypočteno:

59,28 % C, 6,43 % H, 12,20 % N,

nalezeno:

59,32 % C, 6,35 % H, 12,38 % N.

Cyklický disulfid β -merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-cysteinyl-prolyl-N^ε-fenylacetyllysyl-glycinamidu

Chráněný nonapeptid (100 mg) byl rozpuštěn v kapalném amoniaku (100 ml) a za míchání redukován sodíkem do modrého zabarvení přetrvávajícího 15 s. Přebytek sodíku byl rozložen NH_4Cl , kapalným amoniak byl odpařen ve vakuu vodní pumpy a vysušený odparek byl rozpuštěn v 0,01 M HCl

(300 ml). Vodný roztok byl extrahován etherem, pH roztoku bylo nastaveno 0,1 M NaOH na hodnotu 6,75 a k roztoku byl za míchání přidán roztok 0,01 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ během 1 hodiny, přičemž pH roztoku bylo udržováno na hodnotě 6,75. Potom pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 3,8 0,01 M HCl a roztok byl lyofilizován, Lyofilizát byl čištěn protiproudým roztřepáváním v systému 0,05% vodná kyselina octová — 2-butanol (1:1). Bylo provedeno 50 posunů horní fáze, pík o rozdělovacím koeficientu $K_{43} = 6,14$ byl zahuštěn na malý objem a lyofilizován. Produkt byl dále čištěn gelovou filtrací v 3 M kyselině octové. Bylo získáno 22 mg produktu o $[\alpha]_D = -53,8^\circ$ ($c = 0,36$, 50% kyselina octová), $R_F = 0,27$ (S1), 0,15 (S2), 0,31 (S3), 0,73 (S4), 0,66 (S7).

Pro $\text{C}_{54}\text{H}_{70}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1195)

vypočteno:

54,25 % C, 6,23 % H, 14,06 % N,

nalezeno:

54,36 % C, 6,27 % H, 14,07 % N.

Deamino-lysine-vasopresin

Chráněný cyklický nonapeptid (18 mg) byl rozpuštěn v 96% etheanolu (0,7 ml) a roztok byl zředěn vodou (6,3 ml). Penicilinamidohydrolasa (150 mg) byla rozpuštěna v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7 (5 ml), malá část nerozpuštěné látky byla odcentrifugována a roztok enzymu byl přidán k rozpuštěnému peptidu. Reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 37°C , ochlazená na teplotu místnosti a okyselena 0,01 M HCl na pH 3. Denaturovaný enzym byl odcentrifugován a roztok byl odsolen pomocí měniče kationtů. Bylo získáno 25 mg produktu, který byl čištěn beznosičovou elektroforézou v 0,5 M kyselině octové při napětí 2500 V. Bylo získáno 12,25 mg čisté látky o $R_F = 0,10$ (S1), 0,40 (S4) a $[\alpha]_D = -89,8^\circ$ ($c = 0,2$, 1 M kyselina octová). Presorická aktivita, stanovená na nefrektomizované kryse, byla 180 m. j./mg. Literatura uvádí hodnoty 125, 126 a 132 m. j./mg [du Vigneaud V., Winestock G., Murti V. S. S., Hope D. B., Kimbrough R. D.: J. Biol. Chem. 235, PC 64 (1960); Kimbrough R. D., Cash W. D., Branda L. A., Chan W. Y., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. 238, 1411 (1963); Havran R. T.: Experientia 29, 520 (1973)]. Aminokyselinová analýza: Lys 1,00, Asp 0,98, Glu 1,07, Pro 0,99, Gly 0,78, Tyr 1,02, Phe 1,14.

Pro $\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (1101)

vypočteno:

52,35 % C, 6,22 % H, 15,26 % N,

nalezeno:

52,08 % C, 6,18 % H, 15,32 % N.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby peptidů obsahujících lysin, vyznačený tím, že se pro chránění ϵ -aminoskupiny lysinu používá fenylacetylo-

vá skupina, která se z vybudovaného peptidu odštěpí působením penicilinamidohydrolasy E. C. 3.5.1.11.