



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254 850

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 06 86
(21) PV 4664-86.U

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 21/02

(40) Zveřejněno 11 06 87
(45) Vydáno 01 05 89

(75)
Autor vynálezu

POSPÍŠEK JAN ing. CSc., FLUGEL MARTIN RNDr. CSc.,
KRCHNÁK VIKTOR RNDr. CSc., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY U PRAHY,
KOUŘIL JAN ing., VODNANY, TREFIL PAVEL ing. CSc., PRAHA,
PÍCHA JOSEF ing. CSc., PÍCHOVÁ DRAHOMÍRA MUDr. CSc., JÍLOVÉ,
KROJIDLO MILAN CSc., PRAHA

(54)

Druhově specifické analogy gonadoliberinů
/GnRH/ a způsob jejich přípravy

Předmětem řešení jsou druhově specifické analogy gonadoliberinů /GnRH/ obecného vzorce I

Glp-His-Trp-Ser-X-Pro-Gly-NH₂ ,

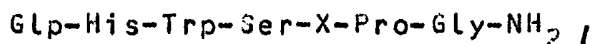
kde x značí His-D-Tle-Trp-Tyr
nebo Tyr-D-Tle-Leu-Gln
nebo Tyr-D-Tle-Trp-Leu.

Dále je předmětem řešení způsob přípravy těchto látek, spočívající v tom, že na polymerní nosič polystyrenového typu s benzhydrylaminovými skupinami se zakotví karboxyterminální aminokyselina připravovaného peptidu a postupnou kondenzací se vystaví peptidický řetězec, načež se chráněný peptid odštěpí z polymerního nosiče a přečistí se. Tyto analogy se podle biologických pokusů vyznačují selektivním a vyšším účinkem na reprodukční funkce než mají přirozené faktory.

254 850

Vynález se týká synthetických analogů gonadoliberinů /dále jen GnRH/ a způsobu jejich přípravy. Je známo, že sekvence přírodních GnRH je závislá na druhu živočicha. Byly např. izolovány GnRH z hypothalamů kuřete a lososa /King. J.A., Millar R.P: S.afr.J.Sci. 78, 1982, str. 124-125; Sherwood N. a kol.:Proc. Natl.Acad Sci USA, 80, 1983, 2794-2798/. Některé analogy těchto hormonů našly uplatnění v humánní i veterinární medicíně, zejména při ovlivnění reprodukčních funkcí /např. regulaci porodnosti/.

Předmětem vynálezu jsou druhově specifické analogy GnRH obecného vzorce I



kde X značí His-D-Tle-Trp-Tyr
nebo Tyr-D-Tle-Leu-Gln
nebo Tyr-D-Tle-Trp-Leu

Dále je předmětem vynálezu způsob přípravy těchto analogů, jehož podstatou je, že na polymerní nosič polystyrenového typu s benzhydrylaminovými skupinami se zakotví karboxyterminální aminokyselina připravovaného peptidu a postupnou kondensací se vystaví peptidický řetězec, načež chráněný peptid se odštěpí z polymerního nosiče a přečistí se.

Tímto způsobem byly připraveny analogy druhově specifických GnRH /kuřete a lososa/, přičemž do polohy α byla zavedena neproteinogenní hydrofobní aminokyselina konfigurace D, t-leucin. Tyto analogy se dle předběžných biologických pokusů vyznačují selektivním a vyšším účinkem na reprodukční funkce než mají přirozené faktory.

Peptidy obecného vzorce I byly připraveny Merrifieldovou metodou syntézy peptidu v pevné fázi. Jako polymerní nosič byl použit polystyren síťovaný divinylbenzenem, s výhodou jedním procentem, s funkčními skupinami chlormetylovými nebo benzhydrylamínovými. N'-aminoskupiny byly chráněny acidolabilní chránicí skupinou, s výhodou tere butyloxykarbonylovou /dále jen Boc/ skupinou, jejíž odštěpování v jednotlivých fázích syntézy bylo provedeno acidolyticky, s výhodou směsí trifluoroctovou kyselinou /dále jen TFA/ a dichlormethanu /dále jen DCM/. Postranní funkční skupiny vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Kondenzace chráněných aminokyselin byly provedeny vhodně aktivovanými deriváty, s výhodou symetrickými anhydridy nebo hydroxybenztriazolové /HOBt/ estery. Po ukončené syntéze byly peptidy z pryskyřice odštěpeny a současně byly odstraněny chránicí skupiny vícefunkčních aminokyselin acidolyticky, s výhodou působením kapalného HF nebo trifluormethansulfonovou kyselinou /TMSA/ ve směsi s trifluoroctovou kyselinou /TFA/ a thioanisolem. Surové produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie na nosičích používaných v chemii peptidu, s výhodou silikagelu, potaženém hydrofobními uhlikatými řetězci nebo nosičů fungujících jako molekulární síta. Peptidy byly charakterizovány aminokyselinovou analýzou a elektroforetickými metodami.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu podle vynálezu.

Příklad 1

Do reakční nádoby syntetizátoru peptidů bylo umístěno 1,4 g benzhydrylamínové polystyrenové pryskyřice síťované 1% divinylbenzenem /obsah NH_2 0,7 mmol/g pryskyřice/. Syntéza zahrnovala 10 cyklů, sestávajících z následujících kroků: /1/ štěpení chránicích skupin. TFA:DCM /1:1/, 1x5 min. 1x30 min; /2/ promývání, DCM, 6x1 min; /3/ promývání, 2-propanol, 2x1 min; /4/ promývání, DCM, 2x1 min; /5/ neutralizace triethylaminem /TEA/:DCM /1:1/, 1x1 min. 1x3 min; /6/ promývání, DCM, 6x1 min; /7/ kondenzace pomocí předem připravených HOBt esteru /3 násobný přebytek/, do negativní reakce na aminoskupiny; /8/ promývání, DCM, 3x1 min.

První cyklus začínal krokem č. /5/. V jednotlivých cyklech byly kondenzovány následující chráněné aminokyseliny: Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Trp/For/, Boc-D-Tle, Boc-Tyr/Z/, Ser/Bzl/, Boc-Trp/For/, Boc-His/Boc/ a Glp. Po ukončení syntézy bylo získáno 3,1 g peptidyl-pryskyřice. Chránicí skupiny byly odstraněny a peptid byl odštěpen z pryskyřice v 30 ml kapalného HF obsahující 2 g p-tiokresolu, 1 h při 0°C. Po oddestilování HF byla reakční směs extrahována suchým eterem a peptid extrahován do 50%ní kyseliny octové a lyofilizován. Výtěžek 0,94 g surového peptidu. 200 mg surového peptidu bylo čištěno na koloně /25x2 cm/ naplněné silikagelovým sorbentem s návázanými hydrofobními uhlikatými zbytky, mobilní fáze 45 - 55 % methanolu, 55 - 45 % vody obsahující 0,1 % TFA. Frakce odpovídající homogennímu produktu byly spojeny, zahuštěny a lyofilizovány. Produkt měl vyhovující aminokyselinovou analýzu a byl jednotný při chromatografii na tenké vrstvě, elektroforéze na papíře při pH 2,5. Výtěžek 65 mg Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Ile-Trp-Leu-Pro-Gly-NH₂.

Příklad 2

Postupem podle příkladu 1 byly na benzhydrylaminovou polystyrenovou pryskyřici kondenzovány následující aminokyseliny: Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Gln, Boc-Leu, Boc-D-Tle, Boc-Tyr/Z/, Ser/BZL/, Boc-Trp/For/, Boc-His/Boc/ a Glp. Po ukončené syntéze bylo získáno 2,9 g peptidyl-pryskyřice. Chránicí skupiny byly odstraněny a peptid byl odštěpen z pryskyřice v 30 ml kapalného HF obsahující 2 g p-tiokresolu, 1 h při 0°C. Po oddestilování HF byla reakční směs extrahována suchým eterem a peptid extrahován do 50%ní kyseliny octové a lyofilizován. Výtěžek 0,94 g surového peptidu. 500 mg surového peptidu bylo čištěno na koloně /25x2 cm/ naplněné silikagelovým sorbentem s návázanými hydrofobními uhlikatými zbytky, mobilní fáze 45 - 55 % metanolu, 55 - 45 % vody obsahující 0,1 % TFA. Frakce odpovídající homogennímu produktu byly spojeny, zahuštěny a lyofilizovány. Produkt měl vyhovující aminokyselinovou analýzu a byl jednotný při chromatografii na tenké vrstvě a elektroforéze na papíře při pH 2,5. Výtěžek 180 mg Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Tle-Leu-Gln-Pro-Gly-NH₂.

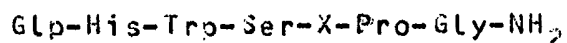
Příklad 3

254 850

Postupem podle příkladu 1 byly na benzhydrylaminovou polystyrenovou pryskyřici kondenzovány následující aminokyseliny: Boc-Pro, Boc-Tyr/Z/, Boc-Trp/For/, Boc-D-Tle, Boc-His/Boc/, Ser/Blz/, Boc-Trp/For/, Boc-His/Boc/ a Glp. Po ukončené syntéze bylo získáno 2,9 peptidyl-pryskyřice. Chránící skupiny byly odstraněny a peptid byl odštěpen z pryskyřice v 30 ml kapalného HF obsahující 2 g p-tiokresolu, 1 h při 0°C. Po oddestilování HF byla reakční směs extrahována suchým eterem a peptid extrahován do 50%ní kyseliny octové a lyofilizován. Výtěžek 0,94 g surového peptidu. 100 mg surového peptidu bylo čištěno na koloně /25x2 cm/ naplněné silikagelovým sorbentem s návazanými hydrofóbními uhlíkatými zbytky, mobilní fáze 45 - 55 % metanolu, 55 - 45 % vody obsahující 0,1 % TFA. Frakce odpovídající homogennímu produktu byly spojeny, zahuštěny a lyofilizovány. Produkt měl vyhovující aminokyselinovou analýzu a byl jednotný při pH 2,5. Výtěžek 31 mg Glp-His-Trp-Ser-His-Tle-Trp-Tyr-Pro-Glv-NH₂.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Druhově specifické analogy gonadoliberinů /GnRH/ obecného vzorce I



/I/,

kde X značí His-D-Tle-Trp-Tyr
nebo Tyr-D-Tle-Leu-Gln
nebo Tyr-D-Tle-Trp-Leu

2. Způsob výroby analogů gonadoliberinů podle bodu 1, vyznačující se tím, že na polymerní nosič polystyrenového typu s benzhydrylaminovými skupinami se zakotví karboxyterminální aminokyselina připravovaného analogu a postupnou kondenzací se vystaví peptidický řetězec, načež chráněný analog se odštěpí z polymerního nosiče a přečistí se.