



ORAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217738  
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 16 04 81  
(21) (PV 2919-81)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 C 103/52

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)  
Autor vynálezu

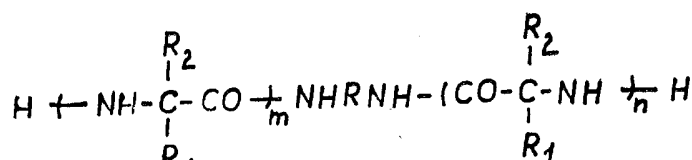
MASAŘ BOHUMIL ing. CSc., ČEFELÍN PAVEL ing. DrSc., PRAHA

## (54) Telechelické oligo- a polypeptidy a způsob jejich přípravy

1

Vynález se týká telechelických oligo- a polypeptidů s lineárním řetězcem a způsobu jejich přípravy.

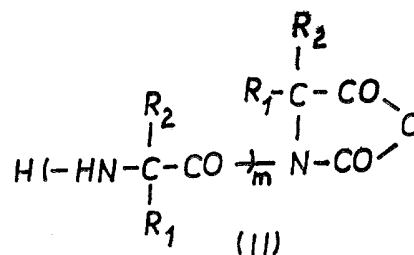
Provede-li se polymerizace N-karboxyanhydridu  $\alpha$ -aminokyseliny (NCA) účinkem primárního nebo sekundárního diaminu, případně i účinkem terciárního aminu, mají vzniklé oligomerní nebo polymerní molekuly v zásadě dvojí koncové skupiny; a to jednak aminoskupiny, a jednak koncové 3-acyl-2,5-dioxo-oxazolidinové struktury (Bamford C. H., Block H.: Non-Radical Polymerization, Elsevier 1976, str. 584 až 607).



(I)

2

Na konci polymerace je přítomen dvojí typ částic bez ohledu na to, s jakým iniciátorem a za jakých podmínek byla polymerace NCA prováděna (Goodman M., Arnon U.: J. Amer. Chem. Soc. 1964, 86, 3384. Kricheldorf H. R.: J. Polymer Sci. Polym. Chem. Ed. 1979, 17, 97. Hashimoto Y., Aoyama A., Imanishi Y., Higashimura T.: Biopolymers 1976, 15, 2407. Hashimoto Y., Imanishi Y.: Biopolymers 1980, 19, 655. Goodman M., Hutchison J.: J. Amer. Chem. Soc. 1966, 88, 3627), vzorce I a II



(II)

kde R<sub>1</sub> jsou alkyly nebo aralkyly, vyskytující se v  $\alpha$ -aminokyselinách, jež tvoří bílkovinné součásti živých organismů, například 3-methylbutyl, benzyl, nebo 2-karbobenzoxyethyl, 2-karboethoxyethyl (v případě poly-

meru obsahujícího jednotky kyseliny glutamové; a R<sub>2</sub> je vodík nebo methylová skupina. Jeden z těchto typů částice (I)-, zakončená dvěma aminoskupinami, je již telechelickým polymerem. Primární a sekundár-



Tímto postupem se převede polymer s různými koncovými skupinami na jednotný typ dvojfunkčního telechelického polymeru nebo oligomeru. Aminolýzu koncových skupin je možno s výhodou provést bez předchozí izolace polypeptidu z reakční směsi. Provedení aminolytické modifikace koncových skupin nevyžaduje žádného dodatečného zařízení ani specifických podmínek — rozpouštědla či katalyzátoru, postačí zahřátí reakční směsi na teplotu nižší než 100 °C po dobu několika hodin. U polypeptidů z aminokyselin obsahujících chráněné reaktivní skupiny v bočním řetězci, jako jsou například poly(glutamová) nebo poly(aspartová) kyselina, jejichž karboxylová skupina v  $\beta$ -( $\gamma$ )-poloze je chráněna esterifikací, nebo poly(lysin) s karbobenzoxymylovanou postranní aminoskupinou — u těchto polypeptidů provádíme aminolýzu diaminem nebo hydrazinem při teplotě nepřesahující 50 °C, abychom zabránili případné aminolýze postranního řetězce. Chránicí skupiny je možno z připraveného telechelického polypeptidu sejmout známými postupy. V části příkladů je tento princip ilustrován na řadě polypeptidů, včetně těch, které jsou v postranním řetězci substituovány. Jedinou operací navíc je zde extrakce telechelického produktu po aminolýze pro odstranění případně nezreagovaného nízkomolekulárního aminu, kterou lze provést různým způsobem, nejčastěji s výhodou vodou, po izolaci telechelického polypeptidu z reakčního roztoku.

Tento nový typ telechelických lineárních oligo- a polypeptidů, zakončených aminoskupinami, představuje cestu k přípravě blokových kopolymerů polypeptidů typu  $(A-B)_n$ , kde výhodou je nejen možnost regulovat délku polypeptidového řetězce a tím i jeho zastoupení v polymeru, ale i možnost získat polymer, který se při mikrobiálním a enzymovém odbourání přeruší na mnoha místech a rychlost odbourání se mnohonásobně zvýší. Použití alkoholátů alkalických kovů nebo kovů žravých zemin k iniciaci polymerace NCA ve spojení s následnou aminolýzou, vedoucí k telechelickým polymerům, je rovněž možné, avšak zde zpravidla vzniká produkt vysoké molekulové hmotnosti a regulace molekulové hmotnosti telechelického peptidu je velmi obtížná. Při užití aminových katalyzátorů k iniciaci polymerace NCA a přípravě telechelických polypeptidů lze molekulovou hmotnost produktu s výhodou ovlivňovat volbou koncentrace katalyzátoru.

Jak plyne z příkladů, uvedených pro ilustraci, obsahují telechelické oligo- a polypeptidy malé množství karboxylových koncových skupin. Dosud nebylo zkoumáno, jakým způsobem dochází k jejich vzniku. Na základě poznatků o mechanismu polymerace N-karboxyanhydridů aminokyselin je možno předpokládat, že vznikají buď uplatněním hydrolýzy koncových cyklických 3-

-acyl-2,5-dioxo-oxazolidinových seskupení účinkem stopové vlhkosti, nebo vedlejší terminační reakcí uvažovanou Bamfordem a Blockem. Podle našich dat je však množství těchto nežádoucích koncových skupin nízké, v průměru kolem 3 % celkového obsahu všech koncových skupin. Hodnoty střední funkčnosti získaných telechelických polypeptidů [Iván B., Kennedy J. P.: Polymer Bull. 2,351/1980/], vyjadřující průměrný počet aminoskupin v lineární částici polypeptidu podle vzorce  $\bar{F}_n = 2[-NH_2]/[-NH_2 + -COOH]$  [kde  $[-NH_2]$ ,  $[-COOH]$  označuje koncentrace skupin v mol/kg], leží v rozmezí 1,945 až 1,996. Z těchto hodnot lze vypočítat střední stupeň prodloužení řetězce  $\bar{DE}_n$ , který vyjadřuje dosažitelný průměrný počet dvojbloků  $n$  v blokovém kopolymeru  $(A-B)_n$ , připraveném z daného telechelického polymeru, a takto charakterizuje jeho kvalitu. Pro telechelické polypeptidy v námi uvedených příkladech se hodnoty  $\bar{DE}_n$  pohybují v rozmezí 37—532, což dokládá jejich velmi dobrou kvalitu pro přípravu alternujících blokových kopolymerů.

Při skladování telechelických polypeptidů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, není třeba žádných zvláštních opatření.

#### Příklad 1

2,96 g N-karboxyanhydridu D,L-fenylalaninu a 2,96 g N-karboxyanhydridu L-leucinu bylo rozpuštěno v 370 ml absolutního benzenu a přidáno 0,64 g hexamethylendiaminu v 7,3 ml benzenu. Polymerizační nádobka byla opatřena uzávěrem s čerstvě vysušeným chloridem vápenatým. Reakční roztok byl míchán magnetickým míchadlem při teplotě 25 °C. Po 120 hodinách bylo přidáno 0,32 g hexamethylendiaminu a směs byla zahřívána za vyloučení vzdušné vlhkosti po dobu 4 hodin na 60 °C, pod zpětným chladičem. Pak bylo přidáno 50 ml chloroformu, prostého ethanolu, vody, a kyselých nečistot a zakalená směs byla míchána po dobu dalších 2 hodin. Nerozpuštěný podíl reakční směsi byl odfiltrován přes skleněný filtr a čirý filtrát byl zahuštěn a odpařen k suchu na rotační odparce ve vakuu při teplotě nepřesahující 60 °C. Poté byl extrahován 5krát 100 ml destilované vody při teplotě 40 až 50 °C a vysušen do konstantní váhy při 50 °C a 0,07 Pa. s za 48 hodin. Bílý, kouskovitý a křehký produkt obsahoval 2,558 mol  $-NH_2$  skupin/kg a 0,040 mol  $-COOH$  skupin/kg; střední číselná funkcionálnita tohoto telechelického polymeru činila 1,969, a vnitřní viskozita (z měření v kyselině dichlorooctové) 0,12. Výtěžek činil 3,18 g, obsah fenylalaninu v produktu činil 42,3 váhových procent.  $\bar{F}_n = 1,969$ ,  $\bar{DE}_n = 65$ .

#### Příklad 2

3,00 g N-karboxyanhydridu L-fenylalanini-

nu a 3,00 g N-karboxyanhydridu L-leucinu bylo rozpuštěno v 760 ml absolutního benzenu a polymerizace byla zahájena přidávkem 0,007 g ethylendiaminu v 0,42 ml absolutního benzenu a důkladnou homogenizací. Reakční roztok byl ponechán při 35 °C reagovat po dobu 120 hodin, přičemž byl třepán na třepačce. Potom bylo přidáno 305 ml chloroformu prostého protických a kyselých nečistot a reakční směs třepána po dobu dalších 12 hodin. Nakonec bylo přidáno 0,050 g ethylendiaminu a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za vyloučení vzdušné vlhkosti při 60 °C po dobu 8 hodin. Nerozpuštěný bílý jemný podíl byl odfiltrován, roztok zahuštěn, odpařen k suchu a extrahován vodou a vysušen stejně jako produkt v příkladě č. 1. Nepartně nažloutlý pevný produkt o vnitřní viskozitě 0,31 (kyselina dichloroctová) obsahoval 0,354 mol —NH<sub>2</sub> skupin/kg a 0,010 mol —COOH skupin/kg. Byl rozpustný v chloroformu a dimethylformamidu. Výtěžek činil 3,69 g, obsah fenylanilinu v produktu byl 38,5 váhových procent.  $\overline{F}_n = 1,945$ ,  $\overline{DE}_n = 37$ .

## Příklad 3

5,78 g N-karboxyanhydridu L-fenylalaninu bylo rozpuštěno ve 308 ml dimethylformamidu, vyčištěného azeotropickou destilací s ethanolem, vytřepaného kyslíčnickem fosforečným a rektifikovaného ve vakuu. Polymerizace byla zahájena přidávkem 0,33 g 1,4-bis-aminomethylbenzenu v 2,8 ml dimethylformamidu téže kvality. Reakční směs byla probublávána v průběhu reakce suchým dusíkem nasyceným dimethylformamidem. Po 95 hodinách byl k reakční směsi v množství 0,14 g přidán hexamethylendiamin ve formě 9 % hmot. roztoku v benzenu a reakční směs byla zahřívána po dobu 6 hodin při 60 °C. Potom byla gelovitá frakce oddělena filtrací a produkt byl získán z čirého roztoku přesrážením do 3 l diethylétheru. Vyloučený práškovitý telechelický polymer byl extrahován vodou v Soxhletově extraktoru po dobu 24 hodin. Obsahoval 2,424 mol —NH<sub>2</sub>/kg, a 0,043 mol —COOH/kg a vnitřní viskozita činila 0,12 (kyselina dichloroctová, 25 °C),  $\overline{F}_n = 1,965$ ,  $\overline{DE}_n = 57$ .

## Příklad 4

Polymerizace 4,00 g N-karboxyanhydridu L-leucinu v roztoku směsi 170 ml bezvodých rozpouštědel dioxanu a dimethylacetamidu (1:1 objemově) byla iniciována 0,045 g hexamethylendiaminu za stálého třepání po dobu 72 hodin při 30 °C. Aminolýza byla provedena po přidávku 0,070 g mono-hydrátu hydrazinu po dobu 3 hodin/80 °C. Roztok dvojfunkčního polymeru byl po filtraci přesrážen do 1,7 l diethyletheru a potom

ještě dvakrát ze 100 ml směsi benzen-dimethylacetamid (1:1 objemově) do 1000 ml diethyletheru jako při prvním srážení. Nakonec byl produkt 3krát extrahován 50 ml vody při 50 °C, vždy po dobu 2 hodin a vysušen do konstantní váhy. Telechelický polymer (1,5 g) obsahoval 2,656 mol —NH<sub>2</sub>/kg, 0,005 mol —COOH/kg, vnitřní viskozita (kyselina dichloroctová, 25 °C)  $0,10 \cdot \overline{F}_n = 1,996$ ,  $\overline{DE}_n = 532$ .

## Příklad 5

Polymerizace 6,50 g N-karboxyanhydridu  $\gamma$ -benzyl-L-glutamové kyseliny v roztoku směsi 75 ml absolutního 1,4-dioxanu a 75 ml dichlormethanu, zbaveného nečistot kyselého charakteru a stop vody, byla provedena při 25 °C v přítomnosti 0,491 g oktamethylendiaminu jako iniciátoru za vyloučení vzdušné vlhkosti. K polymerační směsi bylo po 40 hodinách přidáno 0,5 g téhož diaminu a následná aminolýza při 30 °C byla provedena po dobu 25 hodin. Nerozpuštěný podíl reakční směsi byl oddělen centrifugací při 2000 ot./min a telecheuický polymer byl izolován přesrážením do 1200 ml methanolu, proprán na fritě methanolem, vysušen ve vakuu, extrahován bezvodým diethyletherem v Soxhletově extraktoru po dobu 8 hodin a nakonec 2krát 2 hodiny vodou při 40 °C a vysušen při stejné teplotě ve vakuu. Výtěžek 4,1 g, vnitřní viskozita 0,21 (kyselina dichloroctová, 25 °C), obsah aminoskupin 1,015 mol/kg, obsah karboxylových skupin 0,007 mol/kg,  $\overline{F}_n = 1,986$ ,  $\overline{DE}_n = 143$ . Střední číselný průměr molekulové hmotnosti 2020 (osnometrie v parní fázi (VPO), roztok v dimethylformamidu (DMF)).

## Příklad 6

3,2 g N-karboxyanhydridu  $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu bylo za vyloučení vzdušné vlhkosti rozpuštěno v 95 ml dimethylformamidu a polymerace byla iniciována při 25 °C přidávkem 0,20 g čerstvě připraveného diesteru ethylenglykolu a L-fenylalaninu. Reakční směs byla kontinuálně probublávána argonem po dobu 24 hodin, kdy všechen monomer zpolymeroval. Pak bylo v polymeraci pokračováno po přidávku 1,25 g N-karboxyanhydridu L-alaninu po dobu dalších 24 hodin. Po přidávku 0,1 g hexamethylendiaminu byl reakční roztok temperován po dobu 20 hodin na 30 °C. Dvojfunkční prepolymer byl izolován přesrážením po přidávku stejného objemu 3 M kyseliny chlorovodíkové. Sraženina byla odfiltrována, propírána vodou do neutrální reakce, míchána 24 hodin při 25 °C s 500 ml 2%ního roztoku NaHCO<sub>3</sub>, extrahována 4krát 2 hodiny 200 ml vody a vysušena lyofilizací. Obsah aminoskupin činil 0,332 mol/kg, obsah karboxylových skupin 0,009 mol/kg, molekulová hmotnost (os-

mometrie v parní bází VPO) 6400, vnitřní viskozita 0,44 (25 °C, kyselina dichloroctová). Obsah L-alaninu v polymeru byl 20,8 %

váhových procent. Výtěžek polymeru 3,30 g.  
 $\overline{F}_n = 1,947$ ,  $\overline{DE}_n = 38$ .

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Telechelické oligo- a polypeptidy o molekulové hmotnosti 600 až 10 000, s lineárním řetězcem, nesoucí na obou koncích koncové primární nebo sekundární aminoskupiny v množství > 90 % všech koncových skupin, obsahující v řetězci strukturální jednotky jedné  $\alpha$ -aminokyseliny nebo dvou i více aminokyselin, přičemž v těchto případech mohou být jednotlivé jednotky řazeny statisticky nebo v různě uspořádaných sekvencích a blocích, a mající jednotlivé aminokyselinové strukturální jednotky v konfiguraci D nebo L, nebo ve formě jejich ekvimolární racemické směsi nebo směsi obohacené jednou z možných konfigurací.

2. Způsob přípravy telechelických oligo- a polypeptidů podle bodu 1 vyznačený tím, že se oligo- nebo polypeptid, připravený z N-karboxyanhydridu  $\alpha$ -aminokyseliny nebo směsi N-karboxyanhydridů  $\alpha$ -aminokyselin za iniciace diaminy, obsahujícími primární nebo sekundární aminoskupiny, respektive za iniciace terciárními aminy nebo hydrazinem, aminolyzuje za použití diaminů s primárními nebo sekundárními aminoskupinami, které mohou být totožné s těmi, které byly užity jako iniciátory polymerizace nebo mohou být různé, při teplotách nižších než 100 °C.