

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

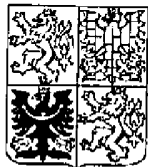
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2627-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09. 09. 96**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 9/00

(71) Přihlašovatel:

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A
BIOCHEMIE AV ČR, Praha, CZ;

(72) Původce:

Tichá Marie RNDr. Prof. CSc., Praha, CZ;
Trnka Tomáš RNDr. Doc. CSc., Praha, CZ;
Pacáková Věra RNDr. Doc. CSc., Praha, CZ;
Barth Tomislav RNDr. DrSc., Roztoky, CZ;
Pospíšek Jan Ing. CSc., Praha, CZ;
Kašíčka Václav RNDr. CSc., Praha, CZ;

(74) Zástupce:

Patentové a licenční služby KAV ČR,
Politických vězňů 7, Praha 1, 11121;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Glykosylované N-chráněné analogy dalarginu a způsob jejich přípravy

(57) Anotace:

X-Tyr(OY)-D-Ala-Gly-Phe-Leu-ArgOH(Z), kde X znamená fenylacetyl nebo terc. butyloxy-karbonyl; Y je vodík v případě, že Z je 4-(O-beta-D-galaktopyranosyl-D-deoxy-1-N-aminoglucitol (látky I, II) nebo thiogalaktosyl, jestliže Z je vodík (látky III, IV). Látky obecného vzorce I se připraví tak, že na N-chráněné analogy dalarginu se působí redukujícím cukrem v přítomnosti kyanborohydridu sodného (látky I a II) nebo chlorethylthiogalaktopyranosidem (látky III a IV).

CZ 2627-96 A3

č.j.	065143
DOŠLO	09. IX. 96
URAD PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

- 1 -

Glykosylované N-chráněné analogy dalarginu a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká glykosylovaných N-chráněných analogů dalarginu a způsobu jejich přípravy.

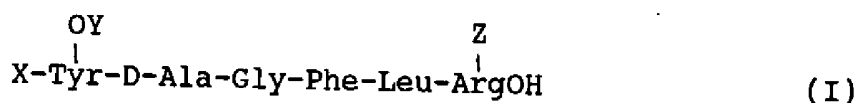
Dosavadní stav techniky

Funkční skupiny dalarginu jako hydroxyl tyrosinu, jeho koncová amino skupina a guanidylová skupina argininu jsou cílem glykosylačních modifikací. Možnosti modifikace dalarginu cukernými zbytky nejsou zdaleka vyčerpány a to nejen s ohledem na přítomnost karboxylu (Š.Horvát et. al. Helv.Chim.Acta 74, 951-955, 1991) a jeho modifikace glykosidy či insercí aminokyseliny s další modifikovatelnou funkční skupinou do původní struktury peptidu (R.Polt et al. J.Amer.Chem. Soc. 114, 10249- 1992). Použitím reduktivní aminace, přístupu který je zacílen na modifikace NH_2 či NH skupiny v guanidylové skupině argininu se sice nezměňuje počet možných produktů na (ve srovnání s glykosylací provedenou v dalarginu s halogenalkylthioglykosidem), dva monoglykosylované a jeden diglykosylovaný a ani separace jednotlivých produktů nemusí být především po preparativní stránce jednoduchou záležitostí. Ve snaze po jednoznačnosti reakce byly autory připraveny dva N-chráněné analogy dalarginu, Boc-dalargin a Pac-dalargin. Boc- (Benzyloxykarbonyl) a Pac (Fenylacetyl)-deriváty dalarginu účinně blokují primární amino skupinu tyrosinu a jsou odstranitelné za různých podmínek, kyselinou trifluorvodíkovou skupina Boc a enzymově katalysovanou hydrolysou (penicilinamidohydrolasa) skupina Pac

z tyrosinu. Tento přístup dává možnost přípravy derivátů dalarginu glykosylovaných na guanidylové skupině argininu v posici 6.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou glykosylované N-chráněné analogy dalarginu obecného vzorce I



kde X znamená fenylacetyl nebo terc.butyloxykarbonyl;

Y je vodík v případě, že Z je

4- (O-beta-D-galaktopyranosyl-D-deoxy-1-N-aminoglucitol (látky I,II), nebo thiogalaktosyl, jestliže Z je vodík (látky III, IV).

Látky obecného vzorce I se připraví tak, že se na N-chráněné analogy dalarginu působí redukujícím cukrem v přítomnosti kyanborohydridu sodného (látky I a II) nebo chloroethylthiogalaktopyranosidem (látky III a IV).

S výhodou se látky I a II připraví tak, že na Pac dalargin, prekursor látky I, či na Boc dalargin, prekursor látky II, rozpuštěné v koncentraci 1-20 mM (v 50% EtOH) v pufru o neutrálním pH se působí redukujícím cukrem (10-50 mg/ml) v přítomnosti kyanborohydridu sodného (10 mg/ml) při 37°C po dobu 24 hodin. Po ukončení glykosylace se reakce zastaví okyselením, například 50% kyselinou octovou. Látky III a IV se připraví tak, že na prekursory Fenylacetyl- či terc.butyloxykarbonyl dalargin se působí chloroethylthiogalaktopyranosidem. Isolace reakčních produktů se provádí s výhodou separací na molekulovém síti.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1.

N-Fenylacetyl dalargin (5mg) byl rozpuštěn v 1 ml fyziologického roztoku obsahujícího 50% EtOH 0,05 M Na-fosfát, pH 7,5. K roztoku bylo přidáno 30 mg laktosy a 10 mg kyanborohydridu sodného. Směs byla ponechána 24 hod při 37°C a reakce poté zastavena okyselením 50% kys. octovou. Reakční směs byla dělena na koloně Biogelu P-2 (1,5 x 45cm), který byl v rovnováze s 0,05M NH_4HCO_3 . Kolona byla eluována stejným roztokem kyselého uhličitanu amonného rychlostí 8 ml/hod, frakce byly jímány po 2 ml. Během eluce byla monitorována přítomnost peptidů (280 nm) a volného cukru (Dubois et al. Anal.Chem. 18, 350, 1956). Glykosylované deriváty dalarginu byly separovány HPLC a jejich přítomnost sledována hmotovou spektroskopií, kapilární elektroforesou a biol. testem GPI.

Příklad 2.

N-terc.butyloxykarbonyl dalargin (5 mg) byl zpracován postupem uvedeným v příkladě 1. Separální a analytické metody byly identické s příkladem 1.

Příklad 3.

N-Fenylacetyl dalargin (5 mg) byl rozpuštěn ve 2 ml 0,1 M NaHCO_3 (obsahujícím 50% EtOH) a smíchán se 2 ml roztoku 2-chloroethyl 1-thio- β -D-galaktopyranosidu (50 mg ve 2 ml 0,1 M NaHCO_3) a reakční směs ponechána inkubovat při 37°C po 18 hodin. Po skončení inkubace bylo pH roztoku upraveno přidáním pevného NaHCO_3 na hodnotu 6,0. Reakční směs byla dělena a analysována, jak je uvedeno v příkladě 1.

Příklad 4.

N-terc.butyloxykarbonyl dalargin (5 mg) byl zpracován jak je uvedeno v příkladě 3.

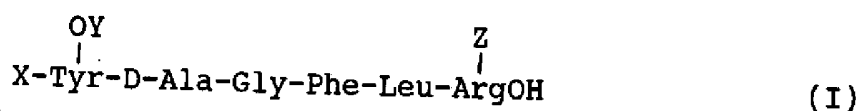
Průmyslová využitelnost

Látky podle vynálezu lze využít v základním výzkumu, ve farmaceutickém průmyslu a ve zdravotnictví.

- 5 -

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Glykosylované N-chráněné analogy dalarginu obecného vzorce I.



kde X znamená fenylacetyl nebo terc.butyloxykarbonyl;

Y je vodík v případě, že Z je

4- (O-beta-D-galaktopyranosyl)-D-deoxy-1-N-aminoglucitol (látky I,II), nebo thiogalaktosyl, jestliže Z je vodík (látky III, IV).

2. Způsob přípravy glykosylovaných N- chráněných analogů dalarginu podle nároku 1, vyznačující se tím, že na N-chráněné analogy dalarginu se působí redukujícím cukrem v přítomnosti kyanborohydridu sodného (látky I a II) nebo chloroethylthiogalaktopyranosidem (látky III a IV).