



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

ВСЕСОЮЗНАЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА

- 1
- (21) 4027997/13
 - (22) 22.08.86
 - (31) 770683
 - (32) 29.08.85
 - (46) 23.05.91. Бюл. № 19
 - (33) US
 - (71) Дзе Саак Институт фор Биолоджи-
кал Стадиз (US)
 - (72) Эмиль Томас Кайзер (US)
и Гонал Зелиселеби (TR)
 - (53) 575.224.2; 577.2/048/(088.8)
 - (56) Vale et al. Endocrinology,
1972, 91, 562-572.
Vale et al. Endocrinology, 1953-
1955 (1983), 112.
 - (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА,
ОБЛАДАЮЩЕГО СВОЙСТВАМИ ФАКТОРА ВЫСВО-
БОЖДЕНИЯ ГОРМОНА РОСТА
 - (57) Изобретение относится к биохимии,
а именно синтезу полипептидов,
стимулирующих высвобождение гипо-
физического гормона роста у животных.

2

Цель изобретения - упрощение способа. Способ заключается в том, что проводят твердофазный синтез пептида формулы H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Gln-Leu-Ala-Ser-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-Leu-Ala-Arg-Y, где Y - представляет собой OH или H₂ группу путем соединения ВОС-замещенных аминокислот с подложкой из смолы. Для образования пептида проводят последовательно блокирование и деблокирование боковой цепи, причем для блокирования выбирают защитную группу в зависимости от аминокислоты на конце боковой цепи. Отщепление защитных групп и отрыв полипептида от смолы проводят смесью 1,5 мл анизола, 0,5 мл метилэтилсульфида и 15 мл фтористого водорода в расчете на 1 г системы пептид-смола в течение 0,5 ч при 0-20°С.

Изобретение относится к биохимии, а именно к синтезу пептидов, оказывающих влияние на функцию гипофиза у людей и животных, главным образом к пептидам, стимулирующим высвобождение гормона роста гипофизом.

Целью изобретения является упрощение способа.

Такие пептиды могут быть синтезированы твердофазным методом.

Способ заключается в том, что лабильные группы боковой цепи различных

аминокислотных фрагментов защищают с помощью подходящих защитных групп, которые препятствуют протеканию на данном участке химической реакции до тех пор, пока защитная группа не будет полностью удалена. Традиционным приемом является защита альфа-аминогруппы аминокислоты или фрагмента во время реакции системы по карбоксильной группе, после чего осуществляют селективное удаление альфа-аминозащитной группы для про-

ведения последующих реакций, в соответствии с этим получают промежуточные соединения, которые включают аминокислотные остатки, расположенные в требуемой последовательности в пептидной цепи, где к соответствующим остаткам присоединены защитные группы боковой цепи, где ВОС - трет-бутил-оксикарбонил; МВНА - смола; OBZl - эфир-образующая защищающая группа для карбоксильной группы, такая как Asp или Glu; Bzl - бензил, гидроксизащищающая группа для Ser; Xan - защищающая группа для амидо-группы, такой как ксантил; TOS - защитная группа для имидазольного азота.

Пример 1. Синтез пептида Ser 7, 8, 19 Ala 9, 15, 18, 28, Arg 12, 21, Leu 13, 26, 27 - hGRF (1-29)-NH₂, отвечающего формуле H-Tyr-Ala, Asp-Ala-Ile-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Ser-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-Leu-Ala-Arg-NH₂, осуществляют ступенчато с использованием Beckman 990 пептидного синтеза на смоле МВНА, имеющей интервал замещения 0,35-0,5 ммоль/г смолы. Соединение ВОС-Arg (TOS) со смолой осуществляют по общей методике, описанной в патенте США № 4292313 (Vale), с использованием КР в среде ДМФ при 60°C в течение 24 ч при перемешивании. В результате достигают замещение, равного 0,35 ммоль Arg на 1 г смолы.

После деблокирования и нейтрализации пептидную цепь постадийно выстраивают на смоле. Деблокирование, нейтрализацию и добавление каждой аминокислоты осуществляют в соответствии с общей методикой. Все используемые растворители тщательно дегазируют путем продувки инертным газом, например гелием или азотом, с тем, чтобы обеспечить отсутствие кислорода.

Деблокирование проводят в соответствии с режимом А, мин:

60% ТФА/20% этандитиол	10
60% ТФА/2% этандитиол	15
1РА/1% этандитиол	0,5
Et ₃ N (10%) в CH ₂ Cl ₂	0,5
MeOH	0,5
Et ₃ N (10%) в CH ₂ Cl ₂	0,5
MeOH (дважды)	0,5
CH ₂ Cl ₂ (дважды)	0,5

Операции сочетания проводят в соответствии с режимом В, мин:

ДСС1	-
ВОС-аминокислота	50-90
MeOH (дважды)	0,5
CH ₂ Cl ₂ (дважды)	0,5
Ac ₂ O (3М) в CH ₂ Cl ₂	15,0
CH ₂ Cl ₂	0,5
MeOH	0,5
CH ₂ Cl ₂ (дважды)	0,5

10 Описанные операции сводятся к следующему: 1-2 ммоль ВОС-защищенной аминокислоты в среде хлористого метилена используют на 1 г смолы, добавляют 1 экв, 1,0 М раствора ДСС1 в хлористом метилена в течение 2 ч. В том случае, когда сочетанию подвергают ВОС-Arg (TOS), используют смесь 50% ДМФ и хлористого метилена. В качестве защитной группы гидроксила боковой цепи Ser и Thr используют бензиловый эфир. Амидогруппу Asp и Gln защищают с помощью Xan в том случае, когда применяют ДСС сочетания, это является предпочтительным.

25 п-Нитрофениловый эфир (ONp) можно использовать для активации карбоксильного конца Asp или Gln и, например, ВОС-Asp (ONp) можно подвергать конъюгированию в течение ночи с использованием 1 экв. НОВт в 50%-ной смеси ДМФ и хлористого метилена, и в этом случае ДСС не добавляют. Для боковой цепи Lys в качестве защитной группы используют 2-хлорбензилоксикарбонил (2Cl-Z). Tos используют для защиты гуанидиногруппы Arg, а также имидазольного азота His, а карбоксильную группу боковой цепи Glu или Asp защищают с помощью OBZl. Фенольную гидроксильную группу Tyr защищают 2,6-дихлорбензилом (ДСВ). К концу синтеза получают следующую композицию: ВОС-Tyr (X¹)-Ala-Asp(X²)-Ala-Ile-Phe-Ser-(X³)-Ser-(X³)-Ala-Tyr(X¹)-Arg(X⁵)-Arg(X⁵)-Leu-Leu-Ala-Gln(X⁴)-Leu-Ala-Ser(X³)-Arg(X⁵)-Arg(X⁵)-Leu-Leu-Gln-(X⁴)-Glu(X²)-Leu-Leu-Ala-Arg(X⁵)-X⁹,

где X¹ - ДСВ;

X² - OBZl;

X³ - Bzl;

X⁴ - Xan;

X⁵ - TOS;

X⁹ - подложку - НН-смолы.

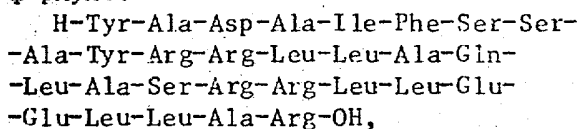
55 Xan полностью или частично удаляют обработкой ТФА, используемой для деблокирования α-амино защитной группы.

Для расщепления и снятия защитной группы с системы пептид-смола последнюю обрабатывают 1,5 мл анизола, 0,5 мл метилэтилсульфида и 15 мл фтористого водорода в расчете на 1 г системы пептид-смола в течение 0,5 ч при -20°C и в течение 0,5 ч при 0°C . После удаления HF в высоком вакууме оставшуюся систему пептид-смола попеременно промывают сухим диэтиловым эфиром и хлороформом и затем пептид экстрагируют дегазированной 2N уксусной кислотой и отделяют от смолы фильтрацией.

Затем отщепленный и лишенный защитной группы пептид растворяют в 0-5%-ном растворе уксусной кислоты и подвергают очистке, которая может включать стадию фильтрации через мелкозернистый гель Сефадекс С-50.

Затем пептид подвергают дополнительной очистке методом препаративной или полупрепаративной жидкостной хроматографии при высоком давлении (НРИС). Состав хроматографических фракций тщательно регулируют с помощью НРИС и сливают лишь те фракции, которые имеют достаточную чистоту. Обессоливание очищенных фракций независимо проверенных на частоту достигается с использованием градиента CH_3CN в 0,1%-ной ТФА. Затем центрифугальный разрез подвергают лиофилизации с образованием желаемого пептида, имеющего чистоту выше 98%.

Пример 2. Синтез пептида, имеющего ту же последовательность аминокислотных остатков, но в виде свободной кислоты, т.е. Ser 7,8,19, Ala 9,15,18,28, Arg 12,21, Leu 13, 26,27 - GPF (1-29)-OH, отвечающего формуле:



проводят ступенчатым методом с использованием пептидного синтезатора Beckman 990 на хлорметилованной смоле, имеющей интервал замещения 0,35-0,5 ммоль/г смолы. Соединение Boc-Arg (TOS) со смолой проводят согласно общей методике, используя в качестве растворителя хлористый метилен, в течение 2 ч при перемешивании, добавляют 1 экв. 2M раствора DCC1 в хлористом метиле. В результате достигают степень замещения

порядка 0,35 ммоль Arg на 1 г смолы. Остальные операции синтеза, включающие расщепление, снятие защитной группы и очистку, проводят согласно примеру 1.

В соответствии с анализом, выполненным методом тонкослойной хроматографии и НРИС, установлено, что получен практически чистый пептид нового типа.

X^1 может представлять собой подходящую защитную группу для фенольной гидроксильной группы тирозина (Tyr), например, такую как тетрагидропиранил, трет-бутил, тритил, BzI, CBz, 4-Br-CBz и 2,6-дихлорбензил (DCB). Предпочтительной защитной группой является 2,6-дихлорбензил.

X^2 может представлять собой водород, что означает отсутствие защитной группы в боковой цепи аминокислотного остатка в этом положении. X^2 представляет собой водород или подходящую эфиробрующую защитную группу для карбоксильной группы аспаргина (Asp) или глутамина (Glu), такую как бензил (OBzI), 2,6-дихлорбензил, метил или этил.

X^3 может представлять собой подходящую защитную группу для гидроксильной группы треонина (Thr) или серина (Ser), например BzI, 2,6-дихлорбензил и CBz. Предпочтительной защитной группой является BzI.

X^4 может представлять собой водород, что подразумевает отсутствие защитной группы на гидроксильной группе. X^4 представляет собой водород или подходящую защитную группу для амидогруппы боковой цепи Аш или глицина (Gln). Предпочтительно, такая группа представляет собой ксантил (Xan).

X^5 представляет собой подходящую защитную группу для гуанидино-группы аргинина (Arg), такую как нитро-TOS, CBz, адамантилоксикарбонил, а также ВОС или водород.

Выбор группы для защиты аминокислотной группы боковой цепи не имеет решающего значения за исключением того, что обычно выбирают такую группу, которая не удаляется в ходе операции по снятию защитной группы у аминокислот в ходе синтеза. Однако для некоторых аминокислот, например гистидина (His), обычно нет необходимости в защите после завершения соединения

и в этом случае защитные группы могут быть одинаковыми.

X⁹ представляет собой подходящую защитную группу для C-терминальной карбоксильной группы или представляет собой якорную связь, используемую в твердофазном синтезе для присоединения к подложке из твердой смолы, или представляет собой des-X⁹ в том случае, когда осуществляют амидирование Arg остатка по C-окончанию. В том случае, когда используется такая подложка из твердой смолы, она рассматривается как защитная группа и, соответствующие защитные группы такого типа могут быть выбраны из следующих систем: O-CH₂-синтетическая подложка, -NH-бензгидриламин (ВНА)-синтетическая подложка, или -NH-пара-метилбензгидриламин (МВНА) - синтетическая подложка. В том случае, когда на C-окончании желателен наличие незамещенной амидной группы используют ВНА или МВНА, поскольку расщепление непосредственно приводит к образованию амидной группы.

Твердофазный синтез начинается с C-терминального конца пептида путем конъюгации защищенной α-аминокислоты с подходящей смолой. Такой исходный материал может быть получен путем присоединения α-аминозащитной аминокислоты посредством эфирной связи к хлорметилированной смоле или гидроксиметилированной смоле, или посредством амидной связи к ВНА смоле или МВНА смоле.

C-Терминальная аминокислота, защищенная BOC и TOS, может быть вначале конъюгирована с хлорметилированной смолой или с ВНА или МВНА смолой. После конъюгации BOC-защищенной аминокислоты с подложкой из смолы α-аминозащитную группу удаляют, например, путем использования трифторуксусной кислоты (TFA) в среде хлористого метилена или только TFA. Снятие защитной группы проводят при температуре от 0°C до комнатной температуры.

Каждая защищенная аминокислота или аминокислотная последовательность вводится в твердофазный реактор в, примерно четырехкратном или более избытке и конъюгирование может осуществляться в среде, представляющей собой смесь диметилформамида (DMF) и CH₂Cl₂ (1:1), или каждое из

указанных веществ в отдельности. В тех случаях, когда имеет место не-полное конъюгирование, операцию повторяют до удаления α-аминозащитной группы перед присоединением следующей аминокислоты. Степень протекания реакции сочетания на каждой стадии синтеза, если реакцию проводят вручную, предпочтительно регистрируется нингидриновой реакцией. Реакции сочетания могут проводиться в автоматическом режиме, например, в Бекмановском автоматическом синтезаторе 990.

После завершения желаемой последовательности аминокислот промежуточный пептид может быть удален с подложки из смолы в результате обработки таким реагентом, как жидкий фтористый водород, который не только отщепляет пептид от смолы, но также отщепляет все оставшиеся защитные группы боковой цепи X¹, X², X³, X⁴, X⁵, а также α-аминозащитную группу, с получением амидированного пептида. BOC-защитную группу удаляют вначале с использованием системы трифторуксусная кислота - этандитиол до отщепления пептида от смолы с помощью HF. При использовании для расщепления фтористого водорода в реакционный сосуд в качестве акцепторов вводят анизол и метилэтилсульфид.

35 Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения полипептида, обладающего свойствами фактора высвобождения гормона роста, включающий очистку конечного продукта, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа, осуществляют твердофазный синтез пептида формулы

45 H-Tyr-Ala-Ala-Ile-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Gln-Leu-Ala-Ser-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-Leu-Ala-Arg-Y,

где Y - OH или H₂-группа, путем соединения BOC-защищенных аминокислот с МВНА или хлорметилированной смолой для образования пептида, имеющего одну защитную группу BOC:
 50 -Tyr(X¹)-Ala-Asp(X²)-Ala-Ile-Phe-Ser(X³)-Ser(X³)-Ala-Tyr(X¹)-Arg(X⁵)-Arg(X⁵)-Leu-Leu-Ala-Gln(X⁴)-Leu-Ala-Ser(X³)-Arg(X⁵)-Arg(X⁵)-Leu-Leu-Gln(X⁴)-Glu(X²)-Leu-Leu-Ala-Arg(X⁵)-X⁹,

где X_1 - 2,6-дихлорбензил,
 X_2 - OBz1;
 X_3 - Bz1;
 X_4 - Xap;
 X_5 - TO3;
 X_9 - связь с полимерным носителем,
 с последующим отщеплением защитных

5 групп и отрывом пептида от полимерного носителя с помощью смеси, содержащей 1,5 мл анизола, 0,5 мл метилэтилсульфида и 15 мл фтористого водорода в расчете на 1 г системы пептид - смола в течение 0,5 ч при 0-20°C.

Редактор Н. Гунько Составитель Н. Кузенкова
 Техред М. Дидык Корректор Н. Ревская

Заказ 1612 Тираж 235 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101