



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 492
(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 4
C 07 K 5/08
C 07 K 5/10
C 07 K 7/06

(21) PV 7761-88.V
(22) Přihlášeno 25 11 88

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 02 01 91

(75) Autor vynálezu

KASAPÍREK EVŽEN ing.CSc.,
ŠTURC ANTONÍN ing.,
ROUBALOVÁ ALENA,
KŘEPELA EVŽEN MUDr.CSc.,
NOVÁK KAREL MUDr.CSc., PRAHA

(54)

Argininové peptidy

(57) Řešení se týká argininových peptidů
vzorce X - A - B - C - Arg - Arg - Y, kde
značí:

X atom vodíku, ω -karboxyalkanoyl s 3 až
5 atomy uhlíku nebo acyl s 2 až 5 atomy
uhlíku,
A zbytek glycinu, alaninu, leucinu nebo
fenylalaninu,
B totéž co A nebo jednoduchou vazbu,
C zbytek alaninu, leucinu, prolinu nebo
jednoduchou vazbu,
Y fluorogenní zbytek 7-amino-4-methylku-
marinu.

Tyto sloučeniny jsou vysoce citlivé fluo-
rogenní substráty pro proteolytické enzymy,
které mohou být použitelné v klinické pra-
xi, zejména k důkazu a/nebo stanovení ka-
thepsinů řady B při diagnostice a/nebo
terapii neoplasií.

Vynález se týká argininových peptidů obecného vzorce



kde značí: X - atom vodíku, (J)-karboxyalkanoyl s 3 až 5 atomy uhlíku nebo acyl s 2 až 5 atomy uhlíku, A - zbytek glycinu, alaninu, leucinu nebo fenylalaninu, B - totéž co A nebo jednoduchou vazbu, C - zbytek alaninu, leucinu, prolinu nebo jednoduchou vazbu, Y - fluorogenní zbytek 7-amino-4-methylkumarinu.

Tyto nové tri- až pentapeptidy představují skupinu vysoce citlivých fluorogenních substrátů pro proteolytické enzymy, použitelných v klinické praxi, zejména k důkazu a/nebo stanovení katepsinů řady B při diagnostice a/nebo terapii neoplasií.

Je známo, že proteolytické enzymy zhoubných nádorů mají efekterové a regulační funkce v pochozech jejich růstu, diferenciaci, invaze a metastasování (Geldfarb R. H. a Liotta L. A.: *Seminars Thromb. Hemostas.*, 12, 294 (1986); Scher W.: *Lab. Invest.*, 57, 607 (1987); Zucker S.: *Cancer Invest.*, 6, 219 (1988); Duffy M. J.: *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 23, 583 (1987)). Katepsin B (EC 3.4.22.1), cysteinová proteinasa, hraje významnou úlohu v proliferaci nádorových buněk (Sylvén B. et al., *Virchows Arch B*, 17, 97 (1974); Pietras R.J. et al., *Histochem. Cytochem.*, 29, Suppl. A3, 440 (1981), v destruktivní komponent extracelulární matrix při invazi nádorových buněk (Sleane B. F. et al., In: *Cysteine Proteinases and their Inhibitors*, Turk V., ed., Gruyter, Berlin 1986, 729) a v agregaci krevních destiček nádorovými buňkami (Honn K. V. et al., *Science* 217, 540 (1982); Cavanaugh P.G. et al., *Clin. Exp. Metastas.*, 1, 297 (1983)). Aktivita katepsinu B sdružená s plazmatickou membránou nádorových buněk koreluje s jejich metastatickým potenciálem (Sleane B. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2483 (1986); Razhin J. et al., *Cancer Res.*, 47, 6620 (1987)). Aktivita katepsinu B v krevní plazmě je zvýšena u nemocných s pregraduujícími a metastasujícími zhoubnými nádory (Assfalg-Machleidt I. et al., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, Suppl., 263 (1988)). Proto argininové peptidy podle vynálezu představují specifické substráty pro katepsin B, a tím vhodné diagnostika nádorů (tabulka 1).

Bližší podrobnosti přípravy argininových peptidů vyplývají z následujících příkladů provedení.

Poznámka k příkladům: Veškeré odpařování roztoků bylo prováděno za sníženého tlaku. Slezení vyvíjecích soustav v chromatografii na tenké vrstvě: S_1 = n-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 1), S_2 = n-butanol - kyselina octová - pyridin - voda (15 : 3 : 10 : 6).

V textové části jsou používány následující symboly aminekyselin, chránících a fluorogenních skupin:

Ala = alanin, Arg = arginin, Arg (NO_2) = N^{G} -nitroarginin, Phe = fenylalanin, Gly = glycin, Leu = leucin, Pro = prolin, Glt = 4-karboxybutanoyl, Ac = acetyl, Z = benzylexykarbonyl, Bec = terc.-butylexykarbonyl, MCU = 7-amino-4-methylkumarin.

Tabulka 1

Aktivita katepsinu B v homogenátu nádorů plic a normální plicní tkáně u nemocných operovaných pro tumor plic

Nemocný (-á)	Histologická diagnosa nádoru ^a	Stadium onemocnění	tkáň nádoru (T)	Aktivita katepsinu B ^b (nkat/g čerstvé tkáně)	
				normální plicní tkáň (P)	Poměr aktivit T/P
2	E	II	19,1	6,2	3,1
3	E	II	68,3	9,8	7,0
6	E	I	51,0	10,4	4,9

pokračování tabulky 1

7	E	III	119,5	6,0	19,9
8	E	I	14,8	5,0	3,0
12	E	III	112,0	19,0	5,9
15	E	I	45,0	14,8	3,0
18	E	II	64,7	9,3	7,0
20	E	I	31,5	5,6	5,6
25	E	I	262,2	20,2	8,7
26	E	I	86,6	15,8	5,5
27	E	III	45,8	18,2	2,5
13	A	I	117,3	46,8	2,5
17	A	III	261,8	34,4	7,6
24	A	II	89,0	16,2	5,5
29	A	I	114,8	41,8	2,7
14	E+A	III	151,0	62,2	2,4
23	B	I	37,3	10,0	3,7
28	S	I	30,3	8,0	3,8
5	mGr	-	91,8	7,7	11,9
21	mCaVU	-	83,0	19,7	4,2

^aE = epidermoidní karcinom plic; A = adenokarcinom plic; E+A = smíšený typ epidermoidního karcinomu plic a adenokarcinomu plic; B = bronchioloalveolární karcinom plic; S = malobuněčný karcinom plic; mGr = solitární plicní metastasa Grawitzova karcinomu ledviny; mCaVU = solitární plicní metastasa karcinomu močového měchýře.

^bAktivita kathepsinu B stanovena kinetickou metodou s fluorogenním substrátem Ac-Leu-Arg-Arg-MCU.

Příklad 1

Z-Arg(NO₂)-MCU

K roztoku MCU (17,6 g; 100 mmolů) v pyridinu (600 ml), ochlazeného na -30 °C, byl přidán předchlazený roztok chloridu fosforitého (4,5 ml) v pyridinu (50 ml). Reakční roztok byl ponechán 30 minut při -30 °C a potom 30 minut při teplotě místnosti. Potom byl k reakčnímu roztoku přidán Z-Arg(NO₂) (35,3; 100 mmolů). Vzniklý reakční roztok byl ponechán 3 dny při teplotě místnosti, odpařen, nekystalický odparek byl rozpuštěn v dimethylformamidu (70 ml) a produkt byl krystalován přidávkem 2-propanolu (720 ml). Bylo získáno 36,6 g (72 %) produktu o 139 až 142 °C.

Arg(NO₂)-MCU

K roztoku Z-Arg(NO₂)-MCU (10,2 g; 20 mmolů) v ledevé kyselině octové (20 ml) byl přidán 36 % (v/o) bromovodíku v ledevé kyselině octové (20 ml). Po 1 hod. stání při teplotě místnosti byl k vzniklé suspenzi přidán ether (150 ml) a vyloučený krystalický hydrobromid edfiltrován, promyt etherem a 12 h sušen ve vakuu nad hydroxydem sodným a kysličníkem fosforečným. Potom byl hydrobromid rozpuštěn v 50% (o/o) vodném 2-propanolu (200 ml); po ochlazení cca na 50 °C byla base uvolněna přidávkem konc. amoniaku (7 ml) a produkt vyloučen přidávkem vody (50 ml). Po 12 h stání při +3 °C byl produkt edfiltrován, promyt vodou a sušen do konstantní váhy. Bylo získáno 6,3 g (89 %) o t. t. 221 až 224 °C.

Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

K roztoku Z-Arg(NO₂)-MCU (3,9 g; 11 mmolů) v dimethylformamidu (25 ml) a N-ethylpiperidinu (1,55 ml; 11 mmolů), ochlazenému na -20 °C, byl přidán chlornaravenčan ethylnatý (1,1 ml; 11 mmolů). Po 10 minutevém míchání a ochlazení (-5 °C) byl k reakčnímu roztoku

přidán roztok $\text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (3,8 g; 10 mmolů) v dimethylformamidu (50 ml). Po 12 h stání při teplotě místnosti byl reakční roztok odpařen, k nekystalickému odparku byla přidána 1M HCl a vyloučený krystalický produkt byl postupně (3krát) rozetírán 5% hydrogen-uhličitanem sodným, nakonec s vodou a krystalován ze směsi dimethylformamidu (30 ml) a 2-propanolu (250 ml). Bylo získáno 3,95 g (56 %) o.t. t. 152 až 155 °C.

Pro $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$ (711,7) bylo vypočteno: 50,63 % C, 5,24 % H, 21,65 % N; nalezeno: 49,96 % C, 5,45 % H a 21,14 % N.

$\text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$

K roztoku $\text{Z-Arg}(\text{NO}_2)\text{-arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (10,7 g; 15 mmolů) v ledové kyselině octové (100 ml) byl přidán 36% bromovodík v ledové kyselině octové (30 ml). Po 3 hodinovém míchání při teplotě místnosti byl vyloučený krystalický hydrobromid odfiltrován, promyt etherem a sušen v exsikátoru nad kysličníkem fosforečným a hydroxydem sodným. Bylo získáno 5,4 g (62 %) o.t. t. 183 až 186 °C. $R_f = 0,46/\text{S}_1$; $0,64/\text{S}_2$.

K roztoku hydrobromidu (3,3 g; 5 mmolů) v dimethylformamidu (10 ml) byl přidán 5% hydrogen-uhličitan sodný (30 ml), vyloučená base byla odfiltrována a promyta vodou. Krystalizací z dimethylformamidu a octanu ehtylnatého bylo získáno 1,9 g (68 %) produktu o.t. t. 178 až 181 °C.

$\text{Boc-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$

K roztoku $\text{Boc-Arg}(\text{NO}_2)$ (4,15 g; 13 mmolů) v dimethylformamidu (30 ml) byl přidán N-hydroxysukcinimid (1,5 g) a N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (4,9 g) při teplotě 0 °C. Po 1 hodinovém míchání při teplotě místnosti byl k reakční suspenzi přidán $\text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (4,9 g; 13 mmolů) v roztoku dimethylformamidu (100 ml). Druhý den byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, filtrát byl odpařen a nekystalický odparek byl vysrážán vodou, postupně rozetírán s 1% kyselinou citronovou, vodou, 5% hydrogen-uhličitanem sodným, vodou a vysušen do konstantní váhy při teplotě místnosti. Bylo získáno 8,6 g (97 %) o.t. t. 171 až 174 °C; natává 165 °C.

$\text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$

K $\text{Boc-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (3,75 g; 5 mmolů) byla přidána kyselina trifluoroctová (5 ml); vzniklá suspenze po 30 minutovém míchání při teplotě místnosti se rozpustila a vzniklý roztok byl dále míchán 2,5 hodiny. Přídavkem etheru (30 ml) vyloučený trifluoroacetát byl odfiltrován, promyt etherem a 12 hodin sušen nad kysličníkem fosforečným a hydroxydem sodným. Uvolnění base bylo provedeno obdobným způsobem jako u odpovídajícího hydrobromidu. Bylo získáno 2,1 g (72 %) produktu o.t. t. 129 až 182 °C.

$\text{Ac-Leu-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$

K roztoku Ac-Leu (257 mg; 1,49 mmolů) v dimethylformamidu (15 ml) a N-hydroxysukcinimidu (170 mg), ochlazenému na 0 °C byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (327 mg) a po 1 hodinovém míchání při teplotě místnosti byl k vzniklé suspenzi přidán roztok $\text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (780 mg; 1,35 mmolů) v dimethylformamidu (15 ml). Po 12 hodinovém stání při teplotě místnosti byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, filtrát byl odpařen a produkt byl vysrážán vodou. Postupným rozetíráním s 1% kyselinou citronovou, vodou, 5% hydrogen-uhličitanem sodným, vodou a krystalizací z kyseliny octové (10 ml) a etheru (100 ml) bylo získáno 650 mg (66 %) produktu o.t. t. 165 až 168 °C.

$\text{Ac-Leu-Arg-Arg-MCU.2AcOH}$

Suspenze $\text{Ac-Leu-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-MCU}$ (2,3 g; 3,1 mmolů) v ledové kyselině octové (100 ml) byla tlakově (5 MPa) hydrogenyzována v přítomnosti 5% Pd/C /FLUKA/ (1,8 g). Po 5 hodinách byl katalyzátor odfiltrován, filtrát byl odpařen a nekystalický odparek byl čistěn gelovou filtrací na Sephadexu G15 v 0,2 M kyselině octové; bylo získáno 620 mg lyofili-

zovaného produktu, elektrofereticky homogenního (pufr pyridin-kyselina octová pH 5,7), při potenciálním spádu 8 V/cm.

Pro $C_{34}H_{54}N_{10}O_{10} \cdot 2AcOH \cdot 2H_2O$ (798,9) bylo vypočteno: 51,12 % C, 7,32 % H, 17,53 % N; nalezeno: 50,90 % C, 7,16 % H a 17,99 % N (d^{20}_D -47,8 ° (c = 0,2; methanol).

Příklad 2

Z-Ala-Ala-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

K roztoku Z-Ala-Ala (294 mg; 1 mmol) v dimethylformamidu (15 ml) a N-hydroxysukcinimidu (115 mg), ochlazenému na 0 °C, byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (220 mg) a po 1 hodinovém míchání při teplotě místnosti byl k vzniklé suspenzi přidán roztok Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (577 mg; 1 mmol) v dimethylformamidu (10 ml). Další zpracování obdobné, jako je uvedeno v příkladu 1. Bylo získáno 560 mg (66 % produktu o t. t. 165 až 168 °C. Pro $C_{36}H_{47}N_{13}O_{12} \cdot H_2O$ (871,9) bylo vypočteno: 49,59 % C, 5,66 % H, 20,88 % N; nalezeno: 49,83 % C, 5,79 % H a 21,12 % N.

Ala-Ala-Arg-Arg-MCU-3AcOH-2H₂O

Suspenze Z-Ala-Ala-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (435 mg; 0,5 mmolu) v kyselině octové byla tlakově hydrogenyzována (5 MPa) a zpracována, jak je uvedeno v příkladu 1. u analogu Ac-Leu-Arg-Arg-MCU. Bylo získáno 220 mg produktu.

$R_f = 0,05/S_1$; $0,40/S_2$.

Příklad 3

Z-Ala-Ala-Ala-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

K roztoku Z-Ala-Ala-Ala (365 mg; 1 mmol) v dimethylformamidu (15 ml) a N-hydroxysukcinimidu (115 mg), ochlazenému na 0 °C byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (220 mg) a po 1 hodině byl přidán roztok Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (577 mg; 1 mmol) a další zpracování bylo obdobné, jak je uvedeno v příkladu 1. Bylo získáno 640 mg (69 %). T. t. 158 až 161 °C.

Pro $C_{39}H_{52}N_{14}O_{13} \cdot 2H_2O$ (961,0) bylo vypočteno: 48,75 % C, 5,87 % H, 20,41 % N; nalezeno: 48,68 % C, 5,51 % H a 21,07 % N.

Ala-Ala-Ala-Arg-Arg-MCU-3AcOH

Suspenze Z-Ala-Ala-Ala-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (480 mg; 0,5 mmolu) v kyselině octové byla tlakově hydrogenyzována (5 MPa), jak je uvedeno v příkladu 1. Bylo získáno 245 mg produktu.

$R_f = 0,05/S_1$; $0,38/S_2$

Příklad 4

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

Byl připraven karbodiimidovou methodou z Boc-Phe a Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU obdobným způsobem jako Boc-derivát uvedený v příkladu 2 ve výtěžku 72 % a t. t. 161 až 164 °C.

Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a 2-propanolu; t. t. byla nezměněna. Pro $C_{36}H_{48}N_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ (824,87) bylo vypočteno: 50,23 % C, 6,09 % H, 19,52 % N; nalezeno: 50,39 % C, 6,17 % H a 19,52 % N.

Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

Rožtek Boc-Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (990 mg; 1,2 mmolů) v kyselině trifluoracetové (2 ml) byl ponechán při teplotě místnosti 1 hodinu a vzniklý trifluoacetát byl vysrážen přidáním etheru, potom byl edfiltrován a sušen ve vakuu nad kyslíčným fosforečným a hy-

droxydem sodným. Base produktu byla získána rozpuštěním trifluoacetátu v dimethylformamidu (5 ml) a vysrážením přidavkem 5% hydrogen-uhličitanu sodného (10 ml). Potom byla base odfiltrována, promyta vodou a přesrážena z dimethylformamidu a 2-propanolu: bylo získáno 520 mg.

$R_f = 0,66/S_1; 0,82/S_2$

Glt-Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU

Roztok Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (435 mg; 0,6 mmolů) a anhydridu kyseliny glutarové (103 mg) v dimethylformamidu (3 ml) byl zahříván 2 hodiny při teplotě 80 °C. Potom byl reakční roztok odpařen, produkt byl vysrážen vodou, odfiltrován a krystalizací z dimethylformamidu a 2-propanolu bylo získáno 510 mg; t. t. 179 až 182 °C.

Glt-Phe-Arg-Arg-MCU.AcOH

Suspenze Glt-Phe-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-MCU (420 mg; 0,5 mmolu) v kyselině octové byla tlakově hydrogenolysována (5 MPa) stejným způsobem, jak je uvedeno v příkladu 1 a 2. Bylo získáno 380 mg produktu elektroforeticky a chromatograficky homogenního.

$R_f = 0,16/S_1; 0,64/S_2$.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Argininové peptidy obecného vzorce

$X - A - B - C - Arg - Arg - Y$,

kde značí: X - atom vodíku, ω -karboxyalkanoyl s 3 až 5 atomy uhlíku nebo acyl s 2 až 5 atomy uhlíku, A - zbytek glycinu, alaninu, leucinu nebo fenylalaninu,
B - totéž co A nebo jednoduchou vazbu, C - zbytek alaninu, leucinu, prolinu nebo jednoduchou vazbu,
Y - fluorogenní zbytek 7-amino-4-methylkumarinu.