



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

250444
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 11 11 85
(21) [PV 8082-85]

(40) Zveřejněno 18 09 88

(45) Vydáno 15 07 88

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 21/02
C 07 K 7/06

(75)

Autor vynálezu

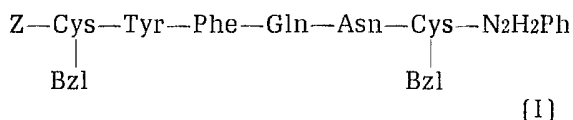
ČEŘOVSKÝ VÁCLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy peptidů na bázi molekuly kyseliny pressinové

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy peptidů na bázi molekuly kyseliny pressinové obecného vzorce I



příčemž Z je benzyloxykarbonylová chránicí skupina, Bzl je benzylová chránicí skupina, $\text{N}_2\text{H}_2\text{Ph}$ je fenyldiazidová chránicí skupina.

Podstatou vynálezu je, že na chráněné aminokyseliny nebo peptidy tvořící fragmenty molekuly kyseliny pressinové, působí proteolytickými enzymy, papainem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Gln—Asn, chymotrypsinem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Phe—Gln a termolysinem pro syntézu peptidové vazby Tyr—Phe.

Tento způsob přípravy poskytuje čistší produkty, je flexibilnější při volbě syntetického postupu a je i ekonomicky výhodnější, než postupy pro tento účel dosud používané.

Vynález se týká způsobu přípravy peptidů na bázi molekuly kyseliny pressinové a je založený na tom, že se pro tvorbu peptidových vazeb používá proteolytických enzymů.

Již dříve bylo zjištěno, že se proteolytické enzymy, jejichž vlastní funkci v živé hmotě je hydrolýza peptidových vazeb, mohou za určitých podmínek používat i k reakci opačné, tzn. k syntéze peptidových vazeb (přehled viz: Brtník F., Jošt K.: Chem. listy **74**, 951 /1980/, Fruton J. S.: Adv. Enzymol. **53**, 239 /1982/), Jakubke II. — D. Kuhl P., Könnicke A.: Angew. Chem. **24**, 85 /1985/).

Syntéza peptidů na bázi molekuly oxytocinu pomocí proteolytických enzymů je známa (čs. autorské ověření č. 244 645). Zde je popsána papainem katalyzovaná syntéza peptidových fragmentů Cys—Tyr a Asn—Cys, které jsou společně pro sekvenci molekuly oxytocinu i kyseliny pressinové.

Nyní bylo zjištěno, že tento způsob syntézy je výhodný i pro syntézu N-koncového chráněného hexapeptidu vasopressinu a dalších strukturních fragmentů kyseliny pressinové. Tento způsob dává chemicky i opticky čisté produkty, provedení reakcí a zpracování vzniklých produktů je jednoduché a ekonomické.

Podstatou přípravy peptidů na bázi molekuly kyseliny pressinové obecného vzorce I je, že se na chráněné aminokyseliny nebo peptidy, tvořící fragmenty kyseliny pressinové, působí proteolytickými enzymy, papainem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Gln—Asn, chymotrypsinem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Phe—Gln a termolysinem pro syntézu peptidové vazby Tyr—Phe.

Způsob přípravy chráněných peptidů sekvence kyseliny pressinové s využitím proteolytických enzymů se dále objasňuje v příkladech provedení.

Příklad 1

Fenylhydrazid terc.butyloxykarbonyl-fenylalanyl-glutaminu

K roztoku methylesteru terc.butyloxykarbonylfenylalaninu (430 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu glutaminu (650 mg) ve směsi methanolu (4 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ karbonát-bikarbonátového pufru pH 10,5 (16 mililitrů) byl po úpravě pH na hodnotu 10 přidán α-chymotrypsin (10 mg) a směs byla míchána 3 hodiny při teplotě místnosti. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 395 mg (52 %) produktu o t. t. 200 až 202 stupňů Celsia. Krystalizací ze směsi methanolu a etheru bylo získáno 324 mg (43 %) o t. t. 202 až 203 °C.

[α]_D —11,4 (c 0,3, methanol).

Aminokyselinová analýza:

Glu 1,00, Phe 1,01,

Pro C₂₅H₃₃N₅O₅ · O · 5H₂O (492,6)

vypočteno:

60,95 % C, 6,96 % H, 14,21 % N;

nalezeno:

61,25 % C, 6,76 % H, 14,39 % N.

Příklad 2

Fenylhydrazid terc.butyloxykarbonyl-fenylalanyl-glutaminylasparaginyl-S-benzylcysteinu

K roztoku terc.butyloxykarbonylfenylalanyl-glutaminu (200 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu asparaginyl-S-benzylcysteinu (320 mg) ve směsi ethanolu (1,5 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ acetátového pufru pH 5,8 (3,5 mililitru) byla přidána kyselina ethylendiaminotetraoctová (3 mg) a hydrochlorid cysteinu (5 mg). pH roztoku bylo 4,8. Po přidání papainu (20 mg) byla směs inkubována 20 hodin při 38 °C. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 345 mg (87 %) produktu o t. t. 228 až 229 °C. Krystalizací ze směsi methanolu a etheru bylo získáno 315 miligramů (80 %) o t. t. 229 až 230 °C.

[α]_D —35,9 (c 0,2, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Asp 1,02, Glu 1,00, Phe 1,00, Cys(Bzl) 0,99.

Pro C₃₉H₅₀N₈O₈Si · O · 5H₂O (799,9)

vypočteno:

58,56 % C, 6,43 % H, 14,01 % N;

nalezeno:

58,43 % C, 6,21 % H, 13,87 % N.

Příklad 3

Fenylhydrazid terc.butyloxykarbonyl-tyrosyl-fenylalaninu

K roztoku terc. butyloxykarbonyltyrosinu (565 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu fenylalaninu (815 mg) ve směsi ethanolu (4 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ acetátového pufru pH 4,8 (16 ml) byla přidána kyselina ethylendiaminotetraoctová (6 mg) a hydrochlorid cysteinu (20 mg). Po úpravě pH na hodnotu 4,8 byl přidán papain (85 mg) a směs byla inkubována 25 hodin při 38 °C. Produkt byl extrahován mnohonásobně do ethylacetátu a ethylacetátový roztok byl promyt HSO₄⁻ pufrem pH 2, vodou, 0,5 mol. l⁻¹ NaHCO₃, vodou, vysušen síranem sodným a odpařen. Odparek byl krystalován ze směsi ethylacetátu a petroletheru. Bylo získáno 370 mg (36 %) produktu o t. t. 203 až 205 °C. Vzorek pro analýzu byl rekrystalován z ethylacetátu, t. t. 207 až 208 °C.

$[\alpha]_D -31,9$ (c 0,3, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Tyr 0,93, Phe 1,07,

Pro $C_{29}H_{34}N_4O_5$ (518,6)

vypočteno:

67,16 % C, 6,61 % H, 10,80 % N;

nalezeno:

66,88 % C, 6,55 % H, 10,56 % N.

Příklad 4

Methylester benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalaninu

K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosinu (51 mg) a hydrochloridu methylesteru fenylalaninu (25 mg) ve směsi dimethylformamidu (0,5 ml) a 0,2 mol.l⁻¹ Tris-maleinanového pufru pH 7 (2 ml) byl přidán chlorid vápenatý (0,5 mg) a pH bylo upraveno na hodnotu 7,0. Po přidání termolysinu (2 mg) byla směs inkubována 24 hodin při 38 °C. Směs byla okyselena 1 mol.l⁻¹ HCl a produkt byl extrahován do ethylacetátu. Ethylacetátový roztok byl promyt 1 mol.l⁻¹ HCl, vodou, 0,5 mol.l⁻¹ vodou, vysušen síranem sodným a odpařen. Odpařek byl rozetřen etherem. Bylo získáno 40 mg (60 %) produktu o t. t. 162 °C.

$[\alpha]_D -36,5$ (c 0,3, methanol).

Aminokyselinová analýza:

Tyr 0,99, Phe 1,03, Cys(Bzl) 0,98.

Literatura uvádí t. t. 154 °C, $[\alpha]_D -33,7$ (c 1,5, methanol). (Boissonnas R. A., Guttmann St., Jaquenoud P. — A., Waller J. — P.: *Helv. Chim. Acta* **39**, 1421/1956/).

Příklad 5

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalaninu

(příprava termolysinem)

K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosinu (51 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu fenylalaninu (47 mg) ve směsi dimethylformamidu (0,5 ml) a 0,2 mol.l⁻¹ Tris-maleinanového pufru pH 7 (2 ml) byl přidán chlorid vápenatý (0,5 mg) a pH bylo upraveno na hodnotu 7,0. Po přidání termolysinu (2 mg) byla směs inkubována 6 hodin při 38 °C. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 70 mg (94 %) produktu o t. t. 243 až 245 °C. Krystalizací z methanolu bylo získáno 63 mg (84 %) produktu o t. t. 244 až 245 °C.

$[\alpha]_D -41,2$ (c 0,3, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Tyr 0,95, Phe 1,11, Cys(Bzl) 0,94.

Pro $C_{42}H_{44}N_{35}O_6S_1 \cdot O \cdot 5H_2O$ (754,9)

vypočteno:

66,82 % C, 5,87 % H, 9,27 % N;

nalezeno:

66,45 % C, 5,73 % H, 9,36 % N.

Příklad 6

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalaninu

(příprava chymotrypsinem)

K roztoku ethylesteru benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosinu (67 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu fenylalaninu (185 mg) ve směsi dimethylformamidu (2,25 mililitru) a 0,2 mol.l⁻¹ karbonát-bikarbonátového pufru pH 10,5 (2,75 ml) byl po úpravě pH na hodnotu 10 přidán α -chymotrypsin (5 mg) a směs byla míchána 1 hodinu při teplotě místnosti. Směs byla naředěna 1 mol.l⁻¹ HCl, vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo obdrženo 62 mg surového produktu, který obsahoval zbytek výchozího dipeptidu. Krystalizací z methanolu bylo obdrženo 50 mg (54 %) homogenního produktu o t. t. 243 až 244 °C.

Aminokyselinová analýza:

Tyr 0,97, Phe 1,11, Cys(Bzl) 0,92.

Příklad 7

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminu

K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosinu (102 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu fenylalanyl-glutaminu (110 miligramů) ve směsi dimethylformamidu (3 mililitry) a 0,2 mol.l⁻¹ Trismaleinanového pufru pH 7,3 (7 ml) byl přidán chlorid vápenatý (5 mg) (pH roztoku bylo 7,0) a termolysin (5 mg). Směs byla inkubována 20 hodin při 38 °C. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 138 mg (79 %) produktu o t. t. 228 až 231 °C. Krystalizací z methanolu bylo získáno 124 mg (71 %) produktu o t. t. 231 až 233 °C.

$[\alpha]_D -27,6$ (c 0,3, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Glu 1,0, Tyr 0,9, Phe 1,0, Cys(Bzl) 0,9.

Pro $C_{47}H_{51}N_7O_8S \cdot 1H_2O$ (892,1)

vypočteno:

63,27 % C, 5,99 % H, 10,99 % N;

nalezeno:

63,36 % C, 5,87 % H, 11,23 % N.

Příklad 8

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinu

(příprava termolysinem 2 + 4)

K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosinu (102 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinu (180 mg) ve směsi dimethylformamidu (3,5 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ Trysmaleinanového pufru pH 7 (6,5 ml) byl přidán chlorid vápenatý (5 mg) (pH roztoku bylo 7,0) a termolysin (5 mg). Směs byla inkubována 20 hodin při 38 °C. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 202 mg (86 %) produktu o t. t. 260 až 261 °C.

[α]_D -35,3 (0,2, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Asp 1,07, Glu 1,10, Tyr 0,92, Phe 1,06, Cys(Bzl) 1,71.

Pro C₆₁H₆₈N₁₀O₁₁S₂ · 3H₂O (1 235)

vypočteno:

59,32 % C, 6,04 % H, 11,34 % N;

nalezeno:

59,38 % C, 5,58 % H, 11,61 % N.

Příklad 9

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinu

(příprava chymotrypsinem 3 + 3)

K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalaninu (13,2 mg) a fenylhydrazidu glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinu (12 mg) ve směsi dimethylformamidu (0,3 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ Trys-maleinanového pufru pH 7,0 (0,7 ml) byl přidán α-chymotrypsin (5 mg) a směs byla inkubována 20 hodin při 38 °C. Produkt byl zpracován stejným způsobem jak uvedeno výše. Bylo získáno 20 mg (85 %) produktu o t. t. 248 až 250 °C. Krystalizací z methanolu bylo získáno 15 mg (64 %) produktu o t. t. 258 až 260 °C.

[α]_D -34,4 (c 0,2, dimethylformamid).

Aminokyselinová analýza:

Asp 1,14, Glu 1,13, Tyr 0,92, Phe 0,95, Cys(Bzl) 1,71.

Příklad 10

Fenylhydrazid benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinu

(příprava papainem 4 + 2)

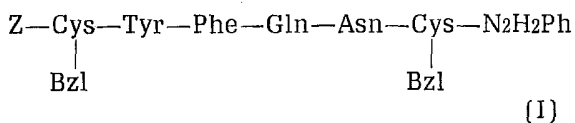
K roztoku benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminu (16 mg) a trifluoracetátu fenylhydrazidu asparaginy-l-S-benzylcysteinu (13 mg) ve směsi dimethylformamidu (0,3 ml) a 0,2 mol. l⁻¹ acetátového pufru pH 4,8 (0,7 ml) byla přidána kyselina ethylendiaminotetraoctová (0,3 mg) a hydrochlorid cysteinu (1 mg). Po úpravě pH na hodnotu 4,8 byl přidán papain (2,1 mg) a směs byla inkubována 20 hodin při 38 °C. Produkt byl zpracován stejným způsobem jak uvedeno výše. Bylo získáno 15 mg (64 %) produktu o t. t. 248 až 251 °C. Krystalizací z methanolu bylo získáno 8 mg (34 %) produktu o t. t. 257 až 259 stupňů Celsia.

Aminokyselinová analýza:

Asp 0,97, Glu 1,08, Tyr 0,96, Phe 0,97, Cys(Bzl) 2,04.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy peptidů na bázi molekuly kyseliny pressinové obecného vzorce I



přičemž Z je benzyloxykarbonylová chránicí skupina, Bzl je benzylová chránicí sku-

pina, N₂H₂Ph je fenylhydrazidová chránicí skupina

význačený tím, že se na chráněné aminokyseliny nebo peptidy tvořící fragmenty molekuly kyseliny pressinové, působí proteolytickými enzymy, papainem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Gln—Asn, chymotrypsinem pro syntézu peptidových vazeb Tyr—Phe, Phe—Gln a termolysinem pro syntézu peptidové vazby Tyr—Phe.