



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

195123

(II) (B1)

/22/ Přihlášeno 06 10 77
/21/ /PV 6477-77/

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52

(40) Zveřejněno 28 04 79

(45) Vydáno 15 04 82

(75)

Autor vynálezu

PROCHÁZKA ZDENKO ing., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc.,
ROZTOKY u Prahy, KREJČÍ IVAN RNDr. PhMr. CSc.
a JOŠT KAREL RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy cyklického disulfidu glycyl-glycyl-glycyl-cysteiny-
-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-
-cysteiny-
-prolyl-
-lysinu

I

2

Předmětem vynálezu je nový způsob přípra-
vy cyklického disulfidu glycyl-glycyl-gly-
cyl-cysteiny-tyrosyl-fenylalanyl-glutami-
nyl-asparaginy-
-cysteiny-
-prolyl-
-lysinu, kde aminokyseliny jsou L-řady, vzorce I

Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys

/I/,
který pozůstává v tom, že z chráněného li-
neárního undekapeptidu obecného vzorce II
A-Gly-Gly-Gly-Cys/B/-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys/B/-
-Pro-Lys/C/-D /II/,
kde A, B, C, D jsou chránicí skupiny, s vý-
hodou je

A-benzyloxykarbonyl,
B-benzylová skupina,
C-tosylová skupina a
D-p-nitrobenzylová skupina,
se odštěpí tyto skupiny sodíkem nebo jinými
alkalickými kovy v kapalném amoniaku při
bodu varu reakční směsi a vzniklá disulfhy-
drylová látka se oxiduje na cyklický disul-
fid obecného vzorce II, s výhodou pomocí
ferrikyanidu sodného ve vodném roztoku při
neutrálním pH.

Uvedená látka má protrahované účinky na
stabilizaci paměťové stopy. Prodlužuje re-
tenci aktivního úhybového chování u kry-
s a obnovuje schopnost vypracování úhybného
chování u hypofysektovaných kry-
s. /Barth T., Krejčí I., Jošt K., Prusík Z., Slanino-
vá J., Procházka Z., Bojanovská V.: čs.
autorské osvědčení č. 187 829.

Dosavadní způsob přípravy podle čs. au-
torského osvědčení č. 187 829 byl nevýhodný,
protože v sobě zahrnoval chemickou syntesu
látky složitější, než je látka vzorce I.

Vlastnosti látky vzorce I, připravené dále
popsaným způsobem, jsou shodné s vlastnost-
mi téže látky, připravené dříve podle autor-
ského osvědčení č. 187 829 enzymovým ště-
pením.

V dalším je vynález blíže objasněn v pří-
kladech provedení, aniž se tím jakkoliv
omezuje.

P ř í k l a d 1

Methylester benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-
-glycyl-S-benzylcysteinu

K roztoku benzyloxykarbonylglycyl-glycinu
/13,3 g/ a methylesteru hydrobromidu glycyl-
-S-benzylcysteinu /18,2 g/ v dimethylforma-
midu /125 ml/ a chloroformu /75 ml/ byl po
ochlazení na -20 °C přidán N-ethylpiperidin
/7,1 ml/, 1-hydroxybenzotriazol /6,8 g/
a dicyklohexylkarbodiimid /11,6 g/. Reakční
směs byla míchána 1 h při -20 °C a přes noc
v lednici. Vyloučená dicyklohexylmočovina
byla odfiltrována a filtrát byl odpařen.
Odparek byl roztírán v třecí misce postupně
s 1 M-HCl, 0,5 N-NaHCO₃, odfiltrován, pro-
myt vodou a po vysušení krystalován z metha-
nolu /125 ml/ a vody /125 ml/. Bylo získáno
21,4 g /81 %/ produktu o bodu tání 114 až
116 °C. Vzorek pro analýzu byl rekrystalo-
ván stejným způsobem, bod tání 116 až
117 °C. [α]_D²⁵ -20,5° /c 0,5, dimethylforma-
mid/. Pro C₂₅H₃₀N₄O₇S /530,6/ vypočteno:
56,60 % C, 5,70 % H, 10,57 % N; nalezeno:
56,89 % C, 5,92 % H, 10,79 % N.

P ř í k l a d 2

Hydrazid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinu

K roztoku methylesteru benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinu /26,5 g/ v dimethylformamidu /100 ml/ byl přidán 90% hydrazinhydrát /13 ml/. Po 4 dnech byla reakční směs zředěna ethanolém /250 ml/, ochlazená a vyloučený produkt byl odfiltrován, promyt ethanolém, vodou a vysušen. Bylo získáno 23,6 g /89 %/ produktu o bodu tání 220 až 222 °C. Produkt byl suspendován v methanolu /200 ml/, refluxován 15 min, ochlazen na teplotu místnosti, odfiltrován, promyt ethanolém a vodou. Bylo získáno 22,6 g /85 %/ produktu o bodu tání 222 až 224 °C. $[α]_D^{25} -18,60$ /c 0,5, dimethylformamid/. Pro $C_{24}H_{30}N_6O_6S$ /530,6/ vypočteno: 54,30 % C, 5,70 % H, 15,84 % N; nalezeno: 54,26 % C, 5,70 % H, 15,93 % N.

P ř í k l a d 3

Methylester N-o-nitrobenzensulfenyl-O-benzyltyrosyl-fenylalaninu

K roztoku dicyklohexylamoniové soli o-nitrobenzensulfenyl-O-benzyltyrosinu /24,2 g/ a hydrochloridu methylesteru fenylalaninu /8,6 g/ v chloroformu /200 ml/ byl po ochlazení na -15 °C přidán dicyklohexylkarbodiimid /9,2 g/. Reakční směs byla míchána 1 h při -10 °C, 1 h při teplotě místnosti a po ochlazení na 0 °C byla odfiltrována dicyklohexylmočovina. Filtrát byl odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a roztok byl protřepán postupně 0,5 N-H₂SO₄ /0 °C/, vodou, vysušen nad síranem sodným a odpařen. Krystalizací ze směsi etheru a petroletheru bylo získáno 22,45 g /96 %/ produktu o bodu tání 100 až 102 °C. Po rekrystalizaci z methanolu a petroletheru bylo získáno 19,0 g /81 %/ produktu o bodu tání 109 až 112 °C. Vzorek pro analýzu byl rekrystalován stejným způsobem, bod tání 114 až 116 °C. $[α]_D^{25} +81,00$ /c 0,5, dimethylformamid/. Pro $C_{32}H_{31}N_3O_6S$ /585,7/ vypočteno: 65,60 % C, 5,43 % H, 7,19 % N; nalezeno: 65,45 % C, 5,33 % H, 7,25 % N.

P ř í k l a d 4

Methylester benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalaninu

Methylester N-o-nitrobenzensulfenyl-O-benzyltyrosyl-fenylalaninu /17,7 g/ byl rozpuštěn v dimethylformamidu /40 ml/ a k roztoku byl přidán 2 M-HCl v etheru /42 ml/. Po 5 min stání při teplotě místnosti byla reakční směs zředěna etherem /500 ml/, vyloučený hydrochlorid byl odfiltrován, promyt etherem, vysušen v exsikátoru a rozpuštěn v dimethylformamidu /100 ml/. Rostok hydrazidu benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinu /15,9 g/ v dimethylformamidu /300 ml/ a 4,8 M-HCl v tetrahydrofuranu /65 ml/ byl ochlazen na -30 °C. K roztoku byl přidán n-butylinitrit /5,1 ml/ a po 4 min roztok hydrochloridu dipeptidu v dimethylformamidu a N-ethylpiperidinu /50 ml/. Teplota reakční směsi byla po celou dobu v rozmezí -28 až -32 °C. Dalším přídatkem N-ethylpiperidinu bylo pH reakční směsi upraveno na 8,5 až 9,0. Reakční směs byla po 36 hod stání v lednici odpařena do sucha, odparek byl rozetřen s 1 M-HCl, produkt byl odfiltrován, promyt

† M-HCl a vodou a po vysušení suspendován v methanolu /300 ml/, povařen a ochlazen. Produkt byl odfiltrován, promyt chladným methanolem a etherem. Bylo získáno 23,1 g /83 %/ produktu o bodu tání 182 až 185 °C. $[α]_D^{25} -20,70$ /c 0,5, dimethylformamid/. Pro $C_{50}H_{54}N_{10}O_8H_2O$ /949,1/ vypočteno: 63,30 % C, 5,95 % H, 8,86 % N; nalezeno: 63,14 % C, 5,77 % H, 9,00 % N.

P ř í k l a d 5

Hydrazid benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalaninu

K roztoku výše popsaného esteru /23,0 g/ v dimethylformamidu /65 ml/ byl přidán 90% hydrazinhydrát /6,6 ml/. Po 2 dnech byla reakční směs zředěna vodou /250 ml/, ochlazená a vyloučený produkt byl odfiltrován, promyt vodou a po vysušení suspendován v methanolu /230 ml/, povařen, ochlazen na teplotu místnosti a odfiltrován. Bylo získáno 21,8 g /94 %/ produktu o bodu tání 214 až 218 °C. $[α]_D^{25} -25,00$ /c 0,5, dimethylformamid/. Pro $C_{49}H_{54}N_{10}O_8S$ /931,1/ vypočteno: 63,20 % C, 5,85 % H, 12,04 % N; nalezeno: 62,98 % C, 5,80 % H, 12,28 % N.

P ř í k l a d 6

p-Nitrobenzylester-N-benzyloxykarbonyl-N-tosyllysinu

N-Benzyloxykarbonyl-N-tosyllysin /26,1 g/, p-nitrobenzylbromid /19,5 g/, ethylacetát /150 ml/ a triethylamin /12,6 ml/ byly refluxovány 8 h. Poté byla reakční směs ochlazená na teplotu místnosti, hydrobromid triethylaminu byl odfiltrován a filtrát postupně protřepán 1 M-HCl, vodou, 0,5 N-NaHCO₃, vodou, vysušen síranem sodným a odpařen. Odparek byl krystalován ze směsi ethylacetát - petrolether. Bylo získáno 23,6 g /69 %/ produktu o bodu tání 91 až 104 °C. Po rekrystalizaci z methanolu bylo získáno 20,5 g /60 %/ produktu o bodu tání 108 až 109 °C. $[α]_D^{25} -8,30$ /c 0,5, dimethylformamid/. Pro $C_{28}H_{31}N_3O_8S$ /569,6/ vypočteno: 59,03 % C, 5,48 % H, 7,38 % N; nalezeno: 59,58 % C, 5,44 % H, 7,73 % N.

P ř í k l a d 7

Hydrobromid p-nitrobenzylesteru N-tosyllysinu

K chráněnému dipeptid-esteru /19,4 g/ byl přidán roztok HBr v kyselině octové /35%; 20 ml/. Po krátkém zahřátí na 50 °C byla reakční směs ponechána 15 min při teplotě místnosti, zředěna etherem a vyloučený krystalický hydrobromid byl odfiltrován, vysušen v exsikátoru a krystalován z methanolu a etheru. Bylo získáno 15,5 g /89 %/ produktu o bodu tání 153 až 156 °C. Pro $C_{20}H_{26}N_3BrO_6S$ /516,4/ vypočteno: 46,52 % C, 5,07 % H, 8,14 % N; nalezeno: 46,78 % C, 5,00 % H, 8,19 % N.

P ř í k l a d 8

p-Nitrobenzylester benzyloxykarbonylglutaminyl-asparaginyln-S-benzylcysteinyl-prolyl-N-tosyllysinu

K roztoku hydrobromidu p-nitrobenzylesteru N-tosyllysinu /2,6 g/ v dimethylformamidu /15 ml/ se přidá N-ethylpiperidin /0,8 ml/, 1-hydroxybenzotriazol /0,7 g/ a benzyloxykarbonylprolin /1,3 g/. Rostok

se ochladí na -15°C a přidá se dicyklohexylkarbodiimid /1,15 g/. Reakční směs se míchá 1 h při -10°C a přes noc v lednici. Vyloučená dicyklohexylmočovina se odfiltruje a filtrát se odpaří. Odparek se rozpustí v ethylacetátu a protřepe se postupně s 1 M-HCl, nasyceným roztokem Na_2SO_4 , vysuší se nad Na_2SO_4 a odpaří.

K odparku dipeptidu se přidá 35% roztok HBr v kyselině octové /8 ml/ a po 15 min se roztok zředí etherem, vyloučený olej hydrobromidu se přesráží z methanolu etherem a rozpustí v dimethylformamidu /15 ml/.

Roztok hydrazidu benzyloxykarbonylglutaminyl-asparaginyln-S-benzylcysteinu /Zaoral M.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 30, 1853 /1965// /1,5 g/ v dimethylformamidu /25 ml/ a 7,8 M-HCl v tetrahydrofuranu /3,3 ml/ se ochladí na -30°C . K roztoku se přidá n-butylnitrit /0,45 ml/ a po 4 min roztok hydrobromidu dipeptidesteru v dimethylformamidu a N-ethylpiperidin /na pH 8 až 9; vlhký pH papírek/. Teplota reakční směsi je po celou dobu udržována v rozmezí -28 až -32°C . Reakční směs se po 72 hod stání v lednici odpaří, k odparku se přidá 1 M-HCl, vyloučený produkt se odfiltruje, promyje 1 M-HCl, 0,5 N- NaHCO_3 , vodou a po vysušení se překrystaluje z methanolu a etheru. Bylo získáno 1,8 g /65% produktu o bodu tání 175 až 180°C . $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -37,6^{\circ}$ /c 0,19, dimethylformamid/. Pro $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_2$ /1102/ vypočteno: 56,70 % C, 5,76 % H, 11,45 % N; nalezeno: 56,54 % C, 5,90 % H, 11,29 % N.

P ř í k l a d 9

p-Nitrobenzylester benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyln-S-benzylcysteinyl-prolyl-N^ε-tosyllysinu

K roztoku chráněného pentapeptid-esteru /1,45 g/ v kyselině octové /4 ml/ se přidá 35% HBr v kyselině octové /4 ml/. Po 15 min se roztok zředí etherem a vyloučený hydrobromid se odfiltruje, promyje etherem, vysuší v exsikátoru a rozpustí v dimethylformamidu /10 ml/.

Roztok chráněného hexapeptid-hydrazidu /1,22 g/ v dimethylformamidu /10 ml/

a 8,0 M-HCl v tetrahydrofuranu /0,9 ml/ se ochladí na -30°C . K roztoku se přidá n-butylnitrit /0,25 ml/ a po 4 min roztok hydrobromidu pentapeptidesteru v dimethylformamidu a N-ethylpiperidin /pH 8 až 9 na navlhčený pH papírek/. Reakční směs se po 24 hod stání v lednici odpaří, k odparku se přidá 1 M-HCl, vyloučený produkt se odfiltruje, promyje 1 M-HCl, 0,5 N- NaHCO_3 , vodou a trochou studeného ethanolu. Výtěžek 1,95 g /80% produktu o bodu tání 190 až 195°C . $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -34,6^{\circ}$ /c 1,0, dimethylformamid/. Pro $\text{C}_{93}\text{H}_{107}\text{N}_{15}\text{O}_{22}\text{S}_3$ /1910/ vypočteno: 58,48 % C, 5,81 % H, 11,00 % N; nalezeno: 58,46 % C, 5,90 % H, 11,07 % N.

P ř í k l a d 10

Cyklický disulfid glycyl-glycyl-glycid-cysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyln-cysteinyl-prolyl-lysinu

Chráněný undekapeptid /0,94 g/ byl redukován sodíkem v kapalném amoniaku /100 ml/. Po skončení redukce byl modrý roztok odbarven chloridem amonným a amoniak odpařen. Produkt byl rozpuštěn v 0,1 M-HCl /asi 50 ml/, tak aby pH roztoku bylo 3,0 a roztok byl protřepán ethylacetátem a etherem. Vodný roztok byl zředěn na 900 ml, pH bylo upraveno 0,1 M-NaOH na 7,0 a k roztoku byl přidán během 20 min roztok ferrikyanidu sodného /0,33 g ve 100 ml vody; pH bylo udržováno na 7,0 0,1 M-NaOH/. Poté bylo pH roztoku upraveno kyselinou octovou na hodnotu 4,5. Roztok byl filtrován přes kolonu karboxylátového katexu /50 ml/, kolona byla promyta 0,1% kyselinou octovou a produkt byl vytěsněn 50% kyselinou octovou. Po lyofilisaci byl produkt čištěn beznosičovou elektroforezou a gelovou filtrací. Bylo získáno 209 mg /36% produktu, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -76,8^{\circ}$ /c 0,2, 1 M-kyselina octová/. Produkt byl elektroforeticky i chromatograficky čistý. Aminokyselinová analýza /po 20 hod hydrolyze 6M-HCl při 105°C /: Asp 1,01, Glu 1,01, Pro 1,04, Gly 3,02, Cys 1,90, Tyr 0,96, Phe 1,02, Lys 1,00. Pro $\text{C}_{50}\text{H}_{70}\text{N}_{14}\text{O}_{15}\text{S}_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ /1363/ vypočteno: 47,56 % C, 6,36 % H, 14,37 % N; nalezeno: 47,64 % C, 6,27 % H, 13,62 % N.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy cyklického disulfidu glycyl-glycyl-glycyl-cysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyln-cysteinyl-prolyl-lysinu, kde všechny aminokyseliny jsou L-řady, vzorce I,

Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys /I/,

vyznačující se tím, že z chráněného lineárního undekapeptidu obecného vzorce II A-Gly-Gly-Gly-Cys-B/-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-/B/-Pro-Lys/C/-D /II/, kde A, B, C, D jsou chránící skupiny, s výhodou je

A - benzyloxykarbonyl,
B - benzylová skupina,
C - tosylová skupina a
D-p-nitrobenzylová skupina,
se odštěpí tyto skupiny sodíkem nebo jinými alkalickými kovy v kapalném amoniaku při bodu varu reakční směsi a vzniklá disulfhydroláťka se oxiduje na cyklický disulfid obecného vzorce II, s výhodou pomocí ferrikyanidu sodného ve vodném roztoku při neutrálním pH.