



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

215276

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 31 05 79
(21) (PV 3736-79)

(40) Zveřejněno 30 10 81

(45) Vydáno 30 04 84

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52
A 61 K 37/02

(75)

Autor vynálezu

ZAORAL MILAN ing. DrSc., BRTNÍK FRANTIŠEK ing. CSc., KRCHŇÁK
VIKTOR RNDr. CSc. a FLEGEL MARTIN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Polypeptidy s vysokou a specifickou antidiuretickou aktivitou a způsob jejich přípravy

Vynález se týká polypeptidů s vysokou a specifickou antidiuretickou aktivitou a způsobu jejich přípravy.

Pro vasopresiny, hormony zadního laloku hypofýzy, je typická antidiuretická a presorická aktivita. Těchto účinků je využíváno v lékařské praxi, prvého při potřebě snížit vylučování moče, druhého při udržování krevního tlaku. Při substituční terapii diabetes insipidus a adjuvantní terapii enuresis nocturna a Bratterova syndromu je žádoucí pouze účinek antidiuretický, poměrně vysoká presorická aktivita vasopresinů má za následek jejich špatnou snášenlivost. Od objevení vasopresinu bylo vynaloženo značné úsilí na přípravu analogů s antidiuretickou aktivitou vysokou a současně specifickou.

Podstatou tohoto vynálezu jsou tedy nové, dosud neznámé polypeptidy s vysokou a specifickou antidiuretickou aktivitou obecného vzorce I:

$\text{Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-X-Gly-NH}_2$ I,
kde X = L-Agp nebo D-Agp.

Těchto účinků bylo dosaženo tím, že v molekule arginin-vasopresinu byl cystein v poloze 1 nahrazen kyselinou β -merkaptopropionovou (Mpr) a arginin v poloze 8 kyselinou L- nebo D- α -amino- β -guanidopropionovou (Agp).

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy těchto peptidů, jehož podstatou je, že se amid obecného vzorce II:

$\text{Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-Pro-Y-Gly-NH}_2$ II,

kde Y = L-A₂pr(Z) nebo D-A₂pr(Z), nechá reagovat s 15—40 % roztokem bromovodíku v kyselině octové a získaný volný amid se nechá reagovat s nitrátem l-guanyl-3,5-dimethylpyrazolu na guanidovaný peptid, u něhož se benzylové chránicí skupiny odštěpí působením alkalických kovů v kapalném amoniaku, načež produkt odštěpení se oxiduje roztokem ferrikyanidu draselného.

Vedle uvedeného způsobu přípravy těchto polypeptidů je možno je získat tím, že se azid β -benzylthiopropionyl-tyrosylfenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinu kondenzuje s amidem obecného vzorce III:

$\text{H-Pro-X}_1\text{-Gly-NH}_2$ III,
kde X₁ je L-Agp(NO₂) nebo D-Agp(NO₂), na lineární peptid, ze kterého se odštěpí chránicí skupiny působením kapalného fluórovodíku za přítomnosti anisolu.

Bylo zjištěno, že tato vasopresinová analoga /1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-kyselina α -amino- β -guanidopropionová/vasopresin a /1-kyselina β -merkaptopropionová 8-D- α -amino- β -guanidopropionová/vasopresin mají vysoký a při tom specifický antidiuretický účinek, což je překvapivé zvláště u prvé z uvedených látek, v jejíž molekule jsou obsaženy pouze aminokyseliny konfigurace L. Druhá sloučenina je souměřitelná s /1-kyselina- β -merkaptopro-

pionová, 8-D-arginin/vasopresinem (DDAVP), jak co do velikosti antidiuretického účinku, tak co do jeho specifčnosti. Obě analoga mají význam jako možná náhrada DDAVP v případech, kdy proti tomuto preparátu vznikne u pacientů rezistence a jako výchozí látky pro přípravu vasopresinových analogů.

K přípravě peptidů podle vynálezu bylo použito dvou metod, A a B. Metoda A spočívá v zavedení guanidinové skupiny do parciálně chráněného lineárního prekursoru, metoda B v přípravě chráněného lineárního prekursoru za použití kyseliny α -amino- β -nitroguanidopropionové.

Metoda A („guanidační“).

Znáмым způsobem se připravil amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl-N- β -benzyloxykarbonyl- α ; β -diaminopropionyl-glycinu Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-Pro-A₂pr(Z)-Gly-NH₂. (Flegel M., kandidátská disertační práce: Vasopresinové a oxytocinové peptidy, str. 108, knihovna Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV, rok 1972; Praha).

Benzilyloxykarbonylový zbytek byl odštěpen reakcí s bromovodíkem v kyselině octové a získaný produkt Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-Pro-A₂pr-Gly-NH₂ se guanidoval nitrátem 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolu (Habeeb tem 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolu [Habeeb A. F. S. A. Biochim. Biophys. Acta 34, (1959), 294]. Z amidu benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-Pro-A₂pr-Gly-NH₂ se odštěpily benzylové — chránicí skupiny sodíkem v kapalném amoniaku a získaný lineární peptid s volnými thiolovými skupinami Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-A₂pr-Gly-NH₂ se bez izolace cyklizoval oxidací ferikyanidem draselným, čímž se získalo žádané vasopresinové analogon Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-A₂pr-Gly-NH₂, které se čistí kontinuální beznosičovou elektroforézou, gelovou filtrací na Sephadexu G-25 apod.

Metoda B.

Znáмым způsobem se připravil azid Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-N₃ [Zaoral M., Kolc J., Šorm F., Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 32, (1967), 1250], který se kondenzoval s amidem prolyl- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu [Brtník F., Zaoral M., Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 41, (1976) 2965] na amid Mpr (Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (Bzl)-Pro-A₂pr(NO₂)-Gly-NH₂. Z tohoto amidu se odštěpily chránicí skupiny kapalným fluorovodíkem a získaný dithiol se oxidoval na analog vzorce I, kde X = -L-A₂pr, který se čistí jak je uvedeno sub A.

Peptidové sloučeniny podle vynálezu, tj. 1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-kyselina α -amino- β -guanidopropionová/vasopresin a /1-kyselina α -merkaptopropionová, 8-kyselina D- α -amino- β -guanidopropionová/vasopresin mohou být užity jako volné báze nebo ve formě soli s vhodnými kyselinami (např. kyselinou octovou, citrónovou, vinnou, chlorovodíkovou, boritou) i s přísádkem pomocných látek (např. stabilizačních a konzervačních přísad jako

chloridem sodným, taninem nebo sladidel, aromatizujících látek, smáček apod. jako např. laktózou, maltózou, metanolem atd.) pro přípravu lékových forem vhodných pro parenterální, intranasální, intramuskulární a intravenosní použití při substituční terapii diabetes insipidus, adjuvantní terapii enuresis nocturna a Bratterova syndromu.

Níže jsou popsány příklady zmíněných způsobů přípravy obou polypeptidů podle vynálezu.

Je užito zkratk a symbolů obvyklých v chemii peptidů, jež jsou ve shodě s mezinárodním chemickým názvoslovím. Jiné užité zkratky jsou: Mpr, kyselina β -merkaptopropionová A₂pr kyselina α , β -diaminopropionová, Agp kyselina α -amino- β -guanidopropionová.

Příklad 1

Amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu.

Amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl- β -benzyloxykarbonyl- α , β -diaminopropionyl-glycinu (1 g, 0,76 mmol) byl rozpuštěn ve 2 ml kyseliny octové, k roztoku přilýty 2 ml 35 % bromovodíku v kyselině octové. Reakční směs byla udržována při 60 °C 15 min, odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl protřen nasyceným roztokem NaHCO₃. Výtěžek 0,5 gramu (56 %). Vysušený produkt (0,425 g, 0,36 mmol) byl rozpuštěn v 7 ml dimethylformamidu, k roztoku přidáno za míchání 0,55 g (2,7 mmol) nitrátu 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolu. pH roztoku bylo nastaveno triethylaminem na 9 a reakční směs ponechána 4 dny při laboratorní teplotě. Po neutralizaci kys. octovou a odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku bylo získáno 0,36 g (85 %) amidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu o t. t. 189 až 191 °C a $[\alpha]_D^{25}$ až 35,8° (c 1, dimethylformamid).

Příprava /1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-kyselina α -amino- β -guanidopropionová/vasopresinu působením sodíku v kapalném amoniaku.

350 g amidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-l-asparaginy-l-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu bylo rozpuštěno v 500 ml kapalného amoniaku. K roztoku byl přidáván sodík do vzniku modrého zbarvení, trvajícího 30 s. Roztok byl odbarven přísádkem ledové kyseliny octové a amoniak odpařen za sníženého tlaku. Odparek rozpuštěn v 500 ml 2,5 % kyseliny octové a roztok extrahován etherem prostým peroxidů, pH nastaveno hydroxidem amonným na pH 6,75 a oxidováno roztokem 0,01 M ferikyanidu draselného, pH reakční směsi nastaveno na 4 kyselinou octovou, roztok odsolen filtrací sloupcem Amberlitu IRC 50 (25 ml) a promytím kolony 260 ml 0,25 % kyseliny octové. Surový produkt byl vymyt ze sloupce kyselinou octovou a efluenty lyofilizovány. Lyofilizát byl čistěn kontinuální beznosičovou elektroforézou (3500 V, 180 mA). Roztok lyofilizátu byl čerpán do pracovního prostoru přístroje rychlostí 0,6 ml/h. Přítomnost čisté látky byla zjištěna spektrofot-

metrickou kontrolou (275 mm) a papírovou elektroforézou.

Frakce obsahující čistou látku byly spojeny a lyofilizovány. Bylo získáno 30 mg lyofilizátu $[\alpha]_D^{20} -14,6$ (c 0,05 voda).

Příklad 2

Amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-D- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu.

Stejným postupem jako předešlé bylo získáno z 1 g (0,76 mmol) amidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-N- β -benzyloxykarbonyl-D- α , β -diaminopropionylglycinu 0,5 g amidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu o t. t. 191–193 °, $[\alpha]_D^{25} -26,8$ ° (c 1, dimethylformamid).

Příprava (1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-D- α -amino- β -guanidopropionová) vasopresinu působením sodíku v kapalném amoniaku.

Z 0,5 g (0,37 mmol) β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-D- α -amino- β -guanidopropionyl-glycinu bylo získáno jako v příkladu 1 34 mg čistého analogu s $[\alpha]_D^{20}$ až 44 ° (c 0,05 voda).

Příklad 3

Amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu.

1,43 g (1,5 mmol) hydrazidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinu [Zaoral M., Kolc J., Šorm F., Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 32, (1967), 1250] bylo rozpuštěno v 15 ml dimethylformamidu a přidáno 0,8 ml 4N HCl v dioxanu. Roztok byl ochlazen na –20 °, přidáno 0,175 g (1,5 mmol), amylnitritu v 1 ml dimethylformamidu. Po 20 min (průběh reakce kontrolován reakcí s Griessovým činidlem) byla reakční směs ochlazená na –40 °, neutralizována triethylaminem a přidán předchlazený (–10 °) roztok 0,753 g (2,25 mmol) hydrobromidu amidu prolyl- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu v 5 ml dimethylformamidu s 0,32 ml triethylaminu. Reakční směs byla ponechána 3 dny při 0 ° a 3 h při pokojové

teplotě, odpařena za vakua a destilační zbytek přelit 200 ml 1 % kyselinou chlorovodíkovou. Po 30 min stání při 3 ° byla vyloučená sraženina odfiltrována, promyta a 2 × 50 ml 5 % kyselého uhličitanu sodného a 50 ml teplé vody. Po vysušení nad kyslíkem fosforečným bylo získáno 2 g surového produktu, který byl krystalován z dimethylformamidu-vody a získáno 1,8 g okta-peptidu a t. t. 201 až 203 ° a $[\alpha]_D^{23} -38,1$ (c 0,9 dimethylformamid).

Příprava (1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-kyselina α -amino- β -guanidopropionová) vasopresinu působením kapalného fluorovodíku.

Ke 400 mg β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu bylo přidáno 20 ml bezvodého fluorovodíku a 0,4 ml anisolu a mícháno 30 min za laboratorní teploty. Fluorovodík byl odpařen za vakua vodní vývěvy a destilační zbytek evakuován olejovou vývěvou 2 h. Poté byl rozpuštěn v 500 ml 2,5 % ní kyselině octové, extrahován 5 × 50 ml éteru a pH upraveno roztokem amoniaku na 6,75. Oxidace a čištění bylo provedeno jak je popsáno v příkladě 1. Bylo získáno 27 mg čistého analogu s vlastnostmi identickými jak je uvedeno v příkladě 1.

Příklad 4

Amid β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-D- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu.

Z 1,43 g (1,5 mmol) hydrazidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinu a 0,175 g (1,5 mmol) hydrobromidu amidu prolyl-D- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu bylo získáno stejným způsobem jak je uvedeno v příkladu 3 1,7 g produktu o t. t. 200 až 204 ° a $[\alpha]_D^{20}$ až 30,2 ° (c 1, dimethylformamid).

Příprava /1-kyselina β -merkaptopropionová, 8-kyselina D- α -amino- β -guanidopropionová/ vasopresinu působením kapalného fluorovodíku.

Ze 180 mg amidu β -benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-D- α -amino- β -nitroguanidopropionyl-glycinu bylo stejným způsobem jako v příkladu 3 připraveno 18 mg čistého analogu s vlastnostmi stejnými, jak je popsáno v příkladě 2.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Polypeptidy s vysokou a specifickou antidiuretickou aktivitou obecného vzorce I:

$\text{Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Prb-X-Gly-NH}_2$ I
kde X je L-Agp nebo D-Agp.

2. Způsob přípravy polypeptidů podle bodu 1, vyznačený tím, že se amid obecného vzorce II: $\text{Mpr(Bzl)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Y-Gly-NH}_2$ II

kde Y je L-A₂pr(Z) nebo D-A₂pr(Z), nechá reagovat s 15 až 40 % ním roztokem bromovodíku v kyselině octové, čímž dojde k odštěpení benzyloxykarbonylové skupiny a získaný volný amid se nechá reagovat s nitrátem 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolu na guanidovaný peptid,

u něhož se benzylové chránicí skupiny odštěpí působením alkalických kovů v kapalném amoniaku, načež produkty odštěpení se oxidují vodným roztokem ferikyanidu draselného.

3. Způsob přípravy polypeptidů podle bodu 1, vyznačený tím, že se azid β-benzylthiopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu kondenzuje s amidem obecného vzorce III:

$\text{H-Pro-X}_1\text{-Gly-NH}_2$ III

kde X₁ je L-Agp(NO₂) nebo D-Agp(NO₂) na lineární peptid, ze kterého se odštěpí chránicí skupiny působením kapalného fluorovodíku za přítomnosti anisolu.