



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 198 666

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13 03 78
(21) PV 1568 - 78

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³ A 61 K 37/34
// C 07 G 15/00

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 30 11 82

(75)

Autor vynálezu LEBL MICHAL ing., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY u PRAHY
a JOŠT KAREL RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Analogy oxytocinu a způsob jejich přípravy

1

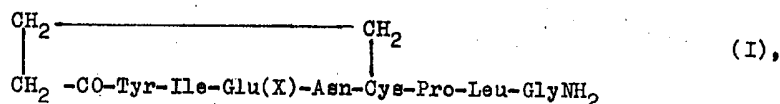
Předmětem vynálezu jsou nové analogy 1-deamino-1-karba-oxytocinu, modifikované v poloze 4, a způsob jejich výroby. Jedná se o analogy oxytocinu, mající specifický galaktogogický (mléko vypuzující) účinek.

Hormon zadního laloku hypofyzy, oxytocin, má dvě hlavní farmakologické účinnosti: uterotonickou a galaktogogickou (mléko vypuzující, "milk-ejecting"); kromě toho se u něho uplatňují v malé míře i typické aktivity vasopressinu: antidiuretická a presorická. Až dosud byly prakticky využívány u neurohypofysárních hormonů antidiuretická, presorická a uterotonická aktivita. Využití galaktogogické aktivity jak u přírodních hormonů, tak i u jejich syntetických analogů bylo omezeno jednak přítomností zbytkových vasopressinových aktivit, jednak tím, že zatím nebyly známy látky s výraznou disociací mezi uterotonickou a galaktogogickou aktivitou (Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides (B. Berde, Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 23; Springer Berlin 1968).

Na základě výzkumu vztahu mezi chemickou strukturou a biologickými aktivitami v oblasti hormonů zadního laloku hypofyzy bylo nyní zjištěno, že výhodné biologické aktivity (ve smyslu kvantitativní i kvalitativní disociace ve prospěch galaktogogické aktivity) mají analogy oxytocinu modifikované vhodným způsobem v postranním řetězci aminokyseliny v poloze 4 (tzn. místo glutaminu v molekule přírodního hormonu oxytocinu). Výhodnější než od oxytocinu samotného je odvozovat tyto látky od analogu oxytocinu, 1-deamino-1-karba-

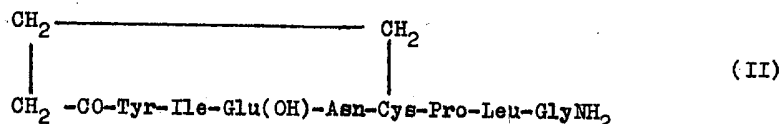
-oxytocinu; částečně změněná struktura tohoto analogu (tzn. vypuštění α -aminoskupiny a náhrada disulfidické vazby skupinou thioetherovou) způsobuje jednak zvýšení specifických aktivit, jednak stabilizaci molekuly v metabolických dějích.

Předmětem vynálezu jsou analogy 1-deamino-1-karba-oxytocinu, jež mají obecný vzorec I



kde X značí skupinu alkoxylovou s jedním až dvěma uhlíky a kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

Podstatou způsobu výroby nových analogů obecného vzorce I podle vynálezu je, že se látka vzorce II



nechá reagovat s diazoalkány s jedním až dvěma uhlíky, nebo s příslušným alkoholem s jedním až dvěma uhlíky a thionylchloridem, nebo s příslušným alkoholem s jedním až dvěma uhlíky v přítomnosti N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenzotriazolu nebo se na jeho cesnou sůl působí alkyljodidy s jedním až dvěma uhlíky. Z uvedených látek má vysokou biologickou aktivitu zejména [4-methylester glutamové kyseliny] deamino-1-karba-oxytocin (vzorec I, X = OCH₃), (v m.j./mg; aktivity přírodního hormonu, oxytocinu, jsou udány v závorce): galaktogogická 1307 (450), uterotonická 26 (450), presorická 0,1 (5), antidiuretická 0,045 (5). Ve srovnání s oxytocinem má tedy [4-methylester glutamové kyseliny] deamino-1-karba-oxytocin asi 3 x vyšší aktivitu galaktogogickou, asi 5% aktivity uterotonické, 2% presorické a 1% aktivity antidiuretické. Je tedy velmi vhodný pro praktické využití jak z důvodu vysokého galaktogogického účinku, tak proto, že ostatní biologické aktivity jsou velmi nízké.

Dále jsou uvedeny příklady provedení.

Příklad 1

K roztoku [4-glutamová kyselina] deamino-1-karba-oxytocinu vzorce II (Lebl M., Jošt K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 43, 523 (1978)) (23 mg) a fenolu (10 mg) v methanolu (0,4 ml) byl přikapán čerstvě připravený roztok diazomethanu v etheru až do vzniku žlutého zabarvení, stálého po dobu 1 min. Pak byla reakční směs odbarvena přidávkou koncentrované kyseliny octové a produkt byl vysrážen etherem. Po přesrážení z methanolu a etheru a vysušení byl produkt rozpuštěn v methanolu (0,3 ml) a 3 M kyselině octové (3 ml) a nanesen na sloupec, obsahující materiál vhodný pro gelovou filtraci (např. Bio-Gel P-4). Lyofilizací píku obsahujícího peptidický materiál (detekce UV světlem při 280 nm) byla získána čistá látka (19 mg); chromatografie v tenké vrstvě silikagelu: R_F 0,32 (2-butanol-

- 98% kyselina mravenčí - voda; 75,0 : 13,5 : 11,5), $R_F = 0,29$ (2-butanol - 25% amoniak - voda; 85,0 : 7,5 : 7,5), $R_F = 0,41$ (1-butanol - kyselina octová - voda; 4 : 1 : 1), $R_F = 0,67$ (pyridin - 1-butanol - kyselina octová - voda; 10 : 15 : 3 : 6). Aminokyselinová analýza (po 20 hod. kyselé hydrolýze) : Asp 1,03, Glu 1,00, Pro 1,02, Gly 0,98, Ile 1,00, Leu 1,02, Tyr 0,98, Cys ($C_3H_6CO_2H$) 0,97. Pro $C_{45}H_{68}N_{10}O_{13}S \cdot 3H_2O \cdot CH_3CO_2H$ (1103) vypočteno: 51,15 % C, 7,12 % H, 12,70 % N; nalezeno: 51,23 % C, 6,84 % H, 12,90 % N. Výsledný produkt byl [4-methylester glutamové kyseliny] deamino-1-karba-oxytocin (vzorec I, X = OCH_3).

Příklad 2

Roztok látky vzorce II (5 mg) a N-hydroxybenzotriazolu (13,5 mg) v absolutním methanolu (0,3 ml) byl ochlazen na 0 °C a po přidání N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (20,6 mg) stál 1 hod. při 0 °C a 20 hod. při teplotě místnosti. Roztok byl filtrován, zředěn 3 M kyselinou octovou (2 ml) a čištěn gelovou filtrací. Byly získány 4 mg látky chromatograficky totožné s produktem připraveným jako v příkladu 1, obsahující asi 10 % vedlejšího produktu s nižší chromatografickou pohyblivostí.

Příklad 3

Látka vzorce II (5 mg) byla rozpuštěna ve směsi methanolu (0,2 ml) a vody (0,1 ml) a roztok byl titrován na pH asi 7 0,16 M hydroxidem cesným (31 μ l). Po odpaření byl produkt ještě dvakrát rozpuštěn v dimethylformamidu (0,2 ml) a odpařen. K roztoku cesné soli v dimethylformamidu (0,25 ml) byl potom přidáván dimethylformamidový roztok methyljodidu (71 mg v 1 ml) po 1 μ l v třiminutových intervalech (celkem 10 μ l) a reakční směs stála potom ještě 90 min. při teplotě místnosti. Po odpaření a přesrážení z methanolu a etheru byl produkt čištěn gelovou filtrací. Byla získána látka vzorce I jako v příkladu 1.

Příklad 4

K roztoku látky vzorce II (5 mg) v absolutním methanolu (0,3 ml) byl při - 60 °C přikapán thionylchlorid (0,1 ml) a roztok byl během 30 min. ohřát na teplotu místnosti, odpařen a přesrážen z methanolickeho roztoku etherem. Výsledný produkt jako v příkladu 3.

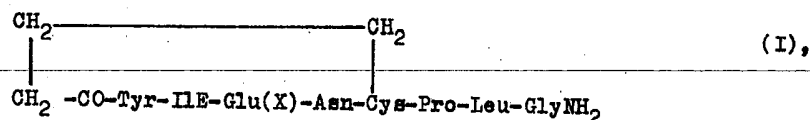
Příklad 5

K roztoku látky vzorce II (7 mg) a fenolu (10 mg) v methanolu (0,4 ml) byl přidán roztok diazoethanu v etheru do vzniku žlutého zabarvení stálého 1 min. Potom byl roztok odbarven kyselinou octovou a produkt byl vysrážen etherem. Po přesrážení z methanolu etherem byl produkt čištěn gelovou filtrací. Chromatografická analýza v tenké vrstvě silikagelu: $R_F = 0,43$ (2-butanol - 98% kyselina mravenčí - voda; 75,0 : 13,5 : 11,5), $R_F = 0,35$ (2-butanol - 25% amoniak - voda; 85 : 7,5 : 7,5), $R_F = 0,45$ (1-butanol - kyselina octová - voda; 4 : 1 : 1), $R_F = 0,68$ (pyridin - 1-butanol - kyselina octová - voda; 10 : 15 : 3 : 6). Aminokyselinová analýza (po 20 hodinové kyselé hydrolýze) : Asp 1,05, Glu 1,03, Pro 0,98, Gly 1,03, Ile 1,01, Leu 1,06, Tyr 0,91, Cys ($C_3H_6CO_2H$) 0,96.

Výsledný produkt byl [4-ethylester kyseliny glutamové] deamino-1-karba-oxytocin (vzorce I, $X = OC_2H_5$)

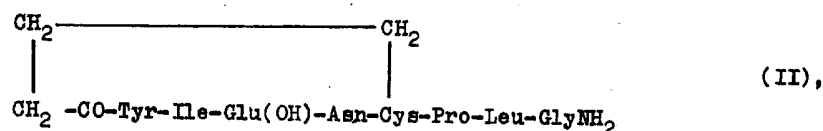
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Analogy oxytocinu [4-methylester glutamové kyseliny] deamino-1-karba-oxytocin, vzorce I



kde X je skupina alkoxylová s jedním až dvěma uhlíky a kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

2. Způsob výroby analogů oxytocinu podle bodu 1, vyznačený tím, že se látka vzorce II



nechá reagovat s diazoalkány s jedním až dvěma uhlíky.

3. Způsob výroby analogů oxytocinu podle bodu 1, vyznačený tím, že se látka vzorce II, nechá reagovat s příslušným alkoholem s jedním až dvěma uhlíky a thionylchloridem.
4. Způsob výroby analogů oxytocinu podle bodu 1, vyznačený tím, že se látka vzorce II, nechá reagovat s příslušným alkoholem s jedním až dvěma uhlíky v přítomnosti N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenzotriazolu.
5. Způsob výroby analogů oxytocinu podle bodu 1, vyznačený tím, že se na cesnou sůl látky vzorce II působí alkyljodidy s jedním až dvěma uhlíky.