

2

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

52610

Patent dodatkowy
do patentu

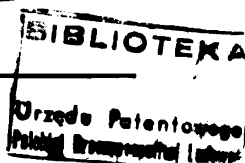
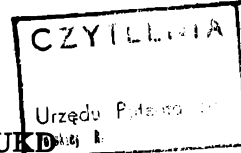
Zgłoszono: 03.IV.1964 (P 104 208)

Pierwszeństwo: 05.IV.1963 Szwajcaria

Opublikowano: 5.I.1967

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52



Współtwórcy wynalazku: dr Roger Boissonnas, dr Rene Huguenin

Właściciel patentu: SANDOZ A. G., Bazyleja (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1. Polipeptyd o wzorze 1 otrzymuje się według wynalazku przez utlenienie nonapeptydu o wzorze 5.

Polipeptyd o wzorze 1 można otrzymać, jeżeli pochodną heksapeptydu o wzorze 2, w którym R' oznacza grupę ochronną stosowaną w syntezie peptydów dla ochrony grupy merkaptu a R'' oznacza grupę stosowaną w syntezie peptydów do ochrony grupy aminowej, kondensuje się ze zdolną do reakcji pochodną wolnego kwasu o wzorze 3, w którym R' i R'' mają wyżej podane znaczenie, w celu otrzymania pochodnej nonapeptydu o wzorze 4, którą przez odszczepienie grup ochronnych R' i R'' na drodze redukcji za pomocą metalu alkalicznego w ciekłym amoniaku przeprowadza się w nonapeptyd o wzorze 5, a ten z kolei przez utlenianie w roztworze wodnym w produkt końcowy o wzorze 1.

Do przejściowego zablokowania grup aminowych można stosować na przykład grupę karbobenzoksylową, karbo-p-chloro-benzoksylową, p-toluenosulfonową lub trójfenyłometylową natomiast dla ochrony grupy merkaptu można stosować grupę fenylową, benzylową, p-bromo-benzylową, p-chloro-benzylową, p-nitro-benzylową lub p-ksylilową.

Stwierdzono, że związek o wzorze 1 wykazuje również silne działanie zwężające naczynia krwionośne, jak naturalne wazopresyny, od których nowy związek różni się tym, że zamiast lizyny (wazopresyna świni o wzorze 6a) lub argininy (wazopresyna wołu o wzorze 6b) zawierają ornitynę. Związek

2

o wzorze 1 nie wykazuje tak silnego działania na skutek czego związek o wzorze 1 może być stosowany w terapii jako substancja o doskonałym działaniu zwężającym naczynia krwionośne. Specyficzne działanie zwężające naczynia występuje na skutek bezpośredniego wpływu na umięśnienie naczyń, dlatego też związek o wzorze 1 w przeciwieństwie do adrenaliny i noradrenaliny nie wywołuje objawów ubocznych ze strony wegetatywnego układu nerwowego. Selektynego, zwężającego naczynia działania związku o wzorze 1 nie można było przewidzieć, ponieważ struktura reszty ornitynowej jest strukturą pośrednią między lizyną a arginina i z tego względu należałoby się spodziewać, że właściwości nowego związku o wzorze 1 powinny być zbliżone do właściwości obydwu naturalnych hormonów.

Związek o wzorze 1 może być stosowany profilaktycznie i przy leczeniu krwotoków tkankowych przy czym infiltracja tkanki związkiem o wzorze 1 powoduje silną jej anemizację. Związek o wzorze 1 może być zwłaszcza stosowany przy zabiegach chirurgicznych w laryngologii, ginekologii, położnictwie, urologii, stomatologii. Stosuje go się bądź to przy preparatach do znieczulania miejscowego lub przy operacjach pod narkozą ogólną wraz z fizjologicznym roztworem soli i do infiltracji.

W celu uzyskania produktu wyjściowego dla wytwarzania nonapeptydu o wzorze 5 można postępować na przykład następująco: N- α -karbobenzylloksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitynę kondensuje się

z estrem etylowym glicyny i otrzymuje ester etylowy N - α - karbobenzoksy - N - δ - p - toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny. Po odszczepieniu grupy karbobenzoksylowej otrzymany ester etylowy N - δ - p - toluenosulfonylo - L - ornitylo - glicyny kondensuje się z N-karbobenzoksy-L-proliną otrzymując ester etylowy N-karbobenzoksy-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny, który przekształca się w odpowiedni amid. Po odszczepieniu grupy karbobenzoksylowej kondensuje się otrzymany amid L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny z azydkiem N-karbobenzoksy-L - glutaminylo - L - asparaginylo - S - benzylo-L-cysteiny i otrzymuje amid N-karbobenzoksy-L-glutaminylo - L - asparaginylo - S - benzylo - L - cysteinylo - L - prolilo - N - δ - p - toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny. Po odszczepieniu grupy karbobenzoksylowej kondensuje się otrzymany amid L - glutaminylo - L - asparaginylo - S - benzylo - L - cysteinylo - L - prolilo - N - δ - p - toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny z azydkiem N-karbobenzoksy - S - benzylo - L - cysteinylo - L - tyrozylo - L - fenylo - alaminy otrzymując amid N - karbobenzoksy - S - benzylo - L - cysteinylo - L - tyrozylo - L - fenylo - alanilo - L - glutaminylo - L - asparaginylo - S - benzylo - L - cysteinylo - L - prolilo - N - δ - p - toluenosulfonylo - L - ornitylo-glicyny.

Otrzymaną w powyższy sposób pochodną nonapeptydu odpowiadającą wzorowi 4 traktuje się metalem alkalicznym, zwłaszcza sodem lub potasem w ciekłym amoniaku, na skutek czego powstaje liniowy nonapeptyd o wzorze 5.

Według wynalazku nonapeptyd o wzorze 5 przeprowadza się przez utlenianie, zwłaszcza powietrzem, tlenem lub nadtlenkiem wodoru w roztworze wodnym lub wodno-organicznym przy wartości pH = 4-9 w biologicznie aktywny, cykliczny polipeptyd o wzorze 1. Wytworzony sposobem według wynalazku dotychczas nieznanym polipeptyd o wzorze 1 może być stosowany jako lek w postaci wolnej zasady, lub też w postaci soli z organicznym lub nieorganicznym kwasem, można go stosować w postaci czystej, lub też w postaci odpowiednich preparatów do stosowania jelitowego, pozajelitowego lub donosowego. W celu wytworzenia odpowiednich postaci leków nonapeptyd miesza się z nieorganicznymi lub organicznymi farmakologicznie obojętnymi substancjami pomocniczymi. Jako substancje pomocnicze można stosować dla tabletek i drażetek cukier mleczny, skrobię, talk, stearynę i tp.; dla syropów: cukier trzcinowy, cukier inwertowany, roztwory glukozy i inne; dla preparatów iniekcyjnych wodę, alkohole, glicerynę, oleje roślinne itp; dla czopków — naturalne lub utwardzane oleje, woski i inne. Ponadto do preparatów takich można dodawać odpowiednie środki konserwujące, stabilizujące, powierzchniowe czynne, ułatwiające rozpuszczalność, słodzące, barwiące, aromatyzujące i tp.

W niżej podanych przykładach podano temperatury w stopniach Celsjusza.

Przykład I a) Ester etylowy N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

Rozpuszcza się 104 g N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityny i 27 g estru etylowe-

go glicyny w 450 ml acetonitrylu, ochładza do temperatury 0°, dodaje 51 g dwucykloheksylo-karbo-dwuimidu i wytrząsa się w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Wytrącony dwucykloheksylo-mocznik odsąca się i przemywa acetonitrylem. Cały przesącz odparowuje się pod próżnią. Pozostałość krystalizuje po dodaniu eteru naftowego. Po przekrystalizowaniu z N-propanolu otrzymuje się 93 g estru etylowego N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny o temperaturze topnienia 136°, $[\alpha]_D^{25} = -6,5^\circ$ (96% etanol).

b) amid N-karbobenzoksy-L-prolilo-N- α -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

90 g estru etylowego N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny rozpuszcza się w 800 ml bezwodnego kwasu octowego nasyconego bromowodorem. Pozostawia się na godzinę w temperaturze 20°, odparowuje pod próżnią w temperaturze niższej niż 40° i przemywa pozostałość starannie eterem dwuetylowym. Pozostałość rozpuszcza się w 500 ml acetonitrylu, dodaje 25 ml trójetiloaminy i 43 g N-karbobenzoksy-L-proliny, ochładza do temperatury 0°, dodaje jeszcze 35,5 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i wytrząsa w ciągu nocy w temperaturze 20°. Po odparowaniu dwucykloheksylo-mocznika odparowuje się przesącz pod próżnią w temperaturze 30°, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i roztwór przemywa rozcieńczonym kwasem siarkowym i wodnym roztworem amoniaku. Po wysuszeniu za pomocą siarczanu sodowego odparowuje się ester octowy pod próżnią i pozostałość rozpuszcza się w absolutnym etanolu. Roztwór chłodzi się do temperatury 0° i pozostawia w ciągu nocy w temperaturze 20°. Po odparowaniu pod próżnią w temperaturze 30° przekrystalizowuje się pozostałość z mieszaniny dwumetyloformamidu i octanu etylu. Otrzymuje się 58 g amidu-N-karbobenzoksy - L - prolilo - N - δ - p - toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny o temperaturze topnienia 122° (rozkład $[\alpha]_D^{25} = -46^\circ$ (95% kwas octowy lodowaty).

c) Amid N-karbobenzoksy-L-glutaminylo-L-asparaginylo - S - benzylo-L-cysteinylo-L-prolilo - N - δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

Rozpuszcza się w 100 g amidu N-karbobenzoksy-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny w 500 ml bezwodnego kwasu octowego nasyconego bromowodorem, pozostawia w spokoju w ciągu jednej godziny w temperaturze 20° i odparowuje pod próżnią w temperaturze niższej niż 40°. Pozostałość przemywa się starannie eterem dwuetylowym, po czym dodaje się roztwór 100 g azydku N-karbobenzoksy-L-glutaminylo-L-asparaginylo - S - benzylo-L-cysteiny i 26 ml trójetiloaminy w 1000 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia się w spokoju przez noc w temperaturze 20°, dodaje 3000 ml estru octowego, odsąca osad i przemywa octanem etylu. Otrzymuje się 105 g amidu N-karbobenzoksy-L-glutaminylo-L-asparaginylo - S - benzylo-L-cysteinylo-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny o temperaturze topnienia 193°; $[\alpha]_D^{20} = -38,5^\circ$ (dwumetyloformamid).

d) Amid N-karbobenzoksy-S-benzylo-L-cysteinylo-L-tyrozylo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo - L - aspa-

raginylo-S-benzylo-L-cysteinyl-L-proliło- N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

Rozpuszcza się 50 g amidu N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzylo- L -cysteinyl-L-proliło-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo - glicyny w 250 ml bezwodnego kwasu octowego nasyconego bromowodorem i pozostawia w spokoju w temperaturze 20° w ciągu godziny. Po odparowaniu rozpuszczalnika w próżni w temperaturze niższej niż 40° pozostałość przemywa się starannie eterem dwuetylowym i zadaje roztworem 31,5 g azydku N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinyl- L -tyrozylo-L-fenylalaniny i 7,5 ml trójetyloaminy w 250 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia się przez dwa dni w temperaturze 20°, zadaje następnie 1000 ml octanu etylu i przemywa osad octanem etylu. Po wysuszeniu w próżni w temperaturze 30° produkt przemywa się ciepłym metanolem o temperaturze około 25°. Otrzymuje się 45 g amidu N-karbo-benzoksyl-S-benzylo-L-cysteinyl- L -tyrozylo-L-fenylalanilo-L-glutaminyl-L-asparaginylo- S -benzylo-L-cysteinyl-L-proliło-N- δ -p-toluenosulfonylo- L -ornitylo-glicyny o temperaturze topnienia 224°; $[\alpha]_D^{21} = -41^\circ$ (dwumetyloformamid).

e) Amid L-cysteinyl-L-tyrozylo-L-fenylalanilo-L-glutaminyl-L-asparaginylo- L -cysteinyl- L -proliło-L-ornitylo-glicyny.

Roztwór 5 g amidu N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinyl- L -tyrozylo- L -fenylalanilo- L -glutaminyl- L -asparaginylo- S -benzylo- L -cysteinyl-L-proliło-N- δ -p-toluenosulfonylo- L -ornitylo-glicyny w 1200 ml ciekłego amoniaku zadaje się podczas mieszania w temperaturze wrzenia taką ilością metalicznego sodu lub potasu, aż wystąpi trwałe niebieskie zabarwienie. Po dodaniu 3 g chlorku amonowego odparowuje się roztwór do sucha. Pozostałość zawiera amid L-cysteinyl-L-tyrozylo-L-fenylalanilo- L -glutaminyl- L -asparaginylo- L -cysteinyl-L-proliło-L-ornitylo-glicyny.

f) Polipeptyd o wzorze 1.

Pozostałość otrzymaną według przykładu I e) rozpuszcza się w 5 litrach 0,01 n kwasu octowego i utlenia się przy wartości pH 6,5 8,0 przez wprowadzenie powietrza lub tlenu w ciągu 1 godziny przy temperaturze 0°—40°. Roztwór zawierający substancję zakwasza się do osiągnięcia wartości pH 4,0—5,0 i po dodaniu 50 g chlorku sodowego lub 0,64 g kwa-

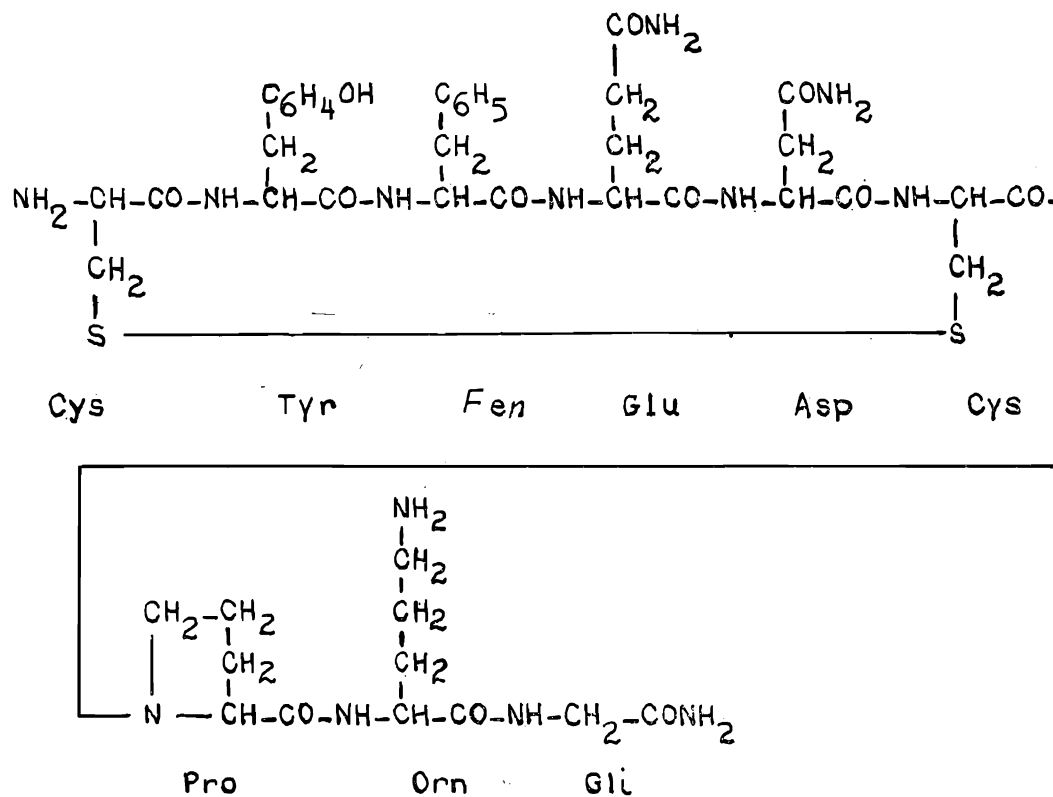
su metanosulfonowego odparowuje do sucha. Otrzymuje się suchy proszek o dobrej trwałości, który można przechowywać; Rozpuszcza się on tworząc klarowny roztwór związku polipeptydowego według wzoru 1. Można jednak roztwór związku polipeptydowego według wzoru 1 stosować bezpośrednio, ewentualnie po rozcieńczeniu wodą lub roztworem soli kuchennej w celu uzyskania roztworu izotonicznego. Przy pomocy chromatografii bibulowej i elektrolizy bibulowej okazało się, że związek o wzorze 1 jest jednorodny. Wartość Rf dla chromatogramu wstępującego (butanol) kwas octowy lodowaty (woda 70:10:20 wynosi 0,05; (metyloetyloketon (pirydyna) woda 65:15:20 wynosi 0,12. Przy wysokojakościowej elektrolizie bibulowej polipeptyd o wzorze 1 migruje przy wartości pH 5,8 (pirydyna) kwas octowy lodowaty (woda 9:1:90/7/10 drogi histydyny ($E_{5,8}^\circ = 0,7$ His); a przy wartości pH 1,9 (kwas mrówkowy) kwas octowy lodowaty (woda 15:10:75) 9/10 drogi tryptofanu ($E_{1,9}^\circ = 0,9$ Try).

Przy całkowitej hydrolizie za pomocą 6 n kwasu solnego podczas 16 godzin w temperaturze 110° bez dostępu powietrza otrzymano mieszaninę aminokwasów w obliczonym stosunku ilościowym.

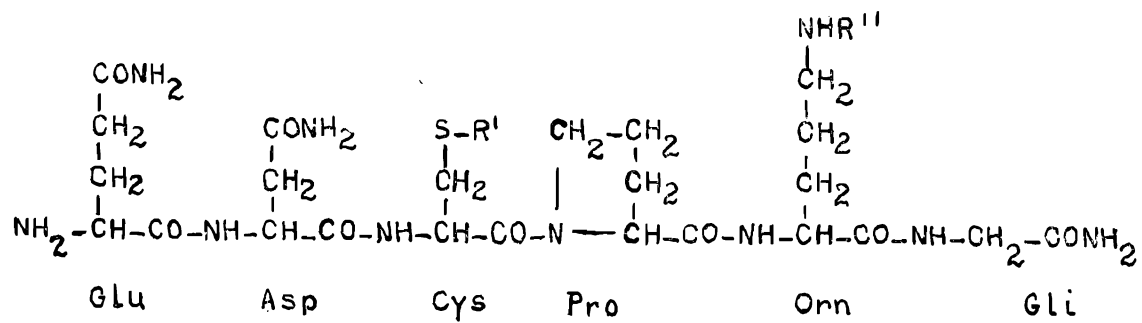
Przykład II. Postępuje się analogicznie jak w przykładzie I, utlenia jednak polipeptyd o wzorze 5 na końcu w temperaturze 0—40° przez dodanie 7,5 ml 1 n roztworu nadtlenu wodoru w roztworze wodnym przy pH 4,0—9,0.

Zastrzeżenia patentowe

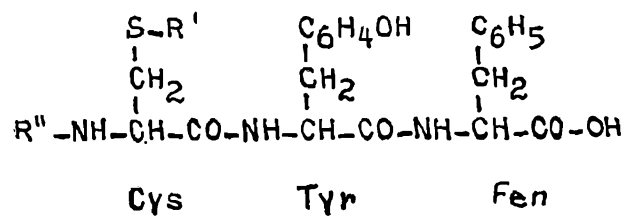
1. Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1, **znamienny tym**, że nonapeptyd o wzorze 5 utlenia się w roztworze wodnym przy wartości pH = 4—9.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utlenianie prowadzi się w roztworze wodnym zawierającym rozpuszczalnik organiczny.
3. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się powietrze.
4. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się tlen.
5. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się nadtlenek wodoru.



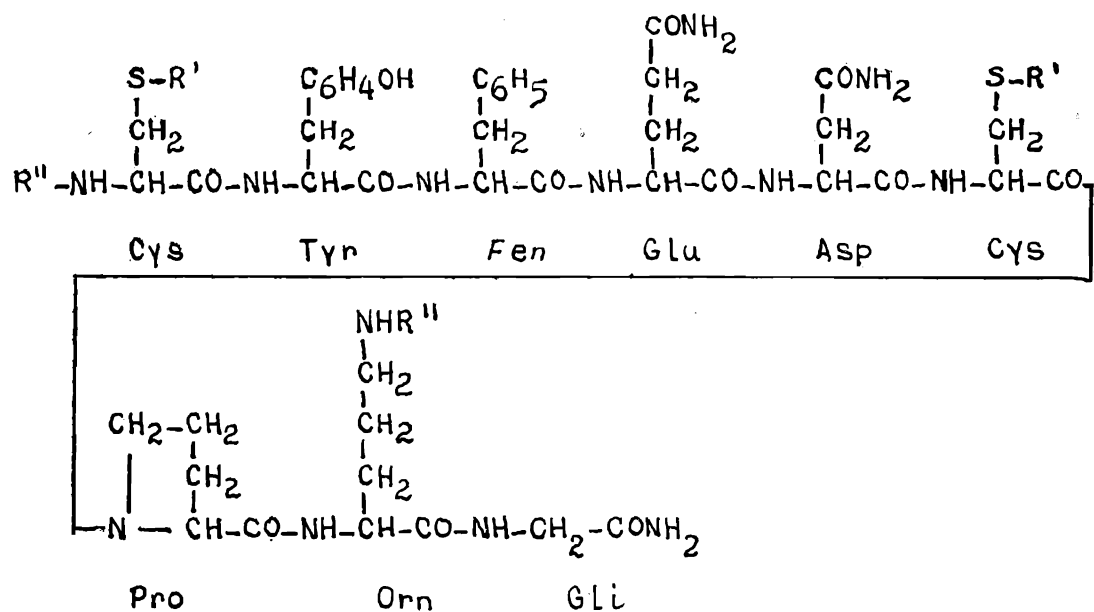
Wzór 1



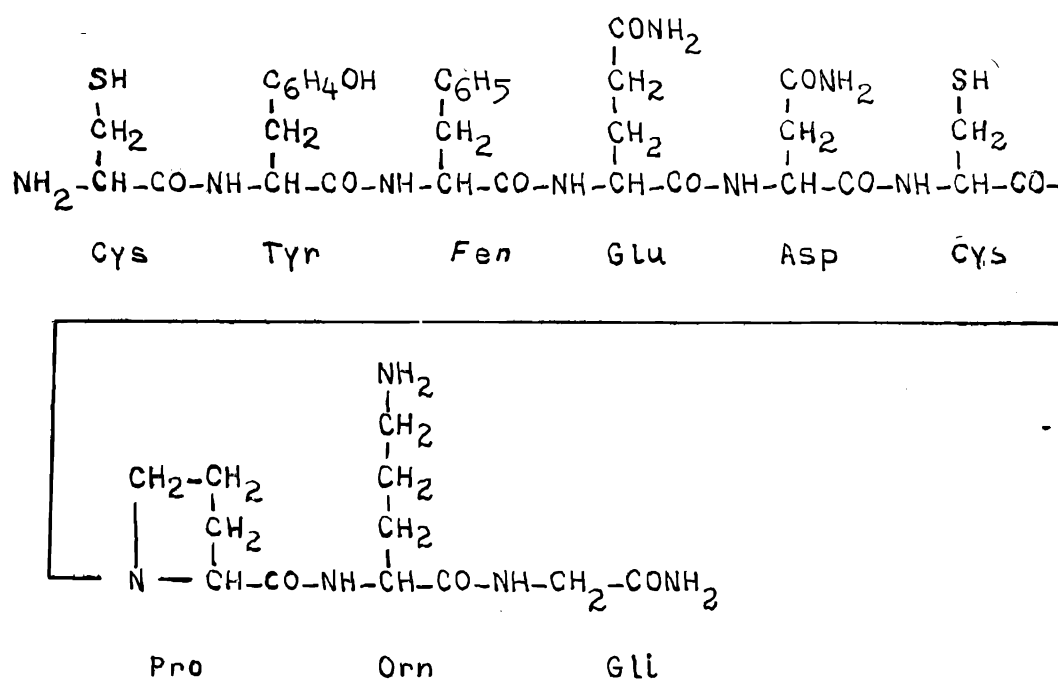
Wzór 2



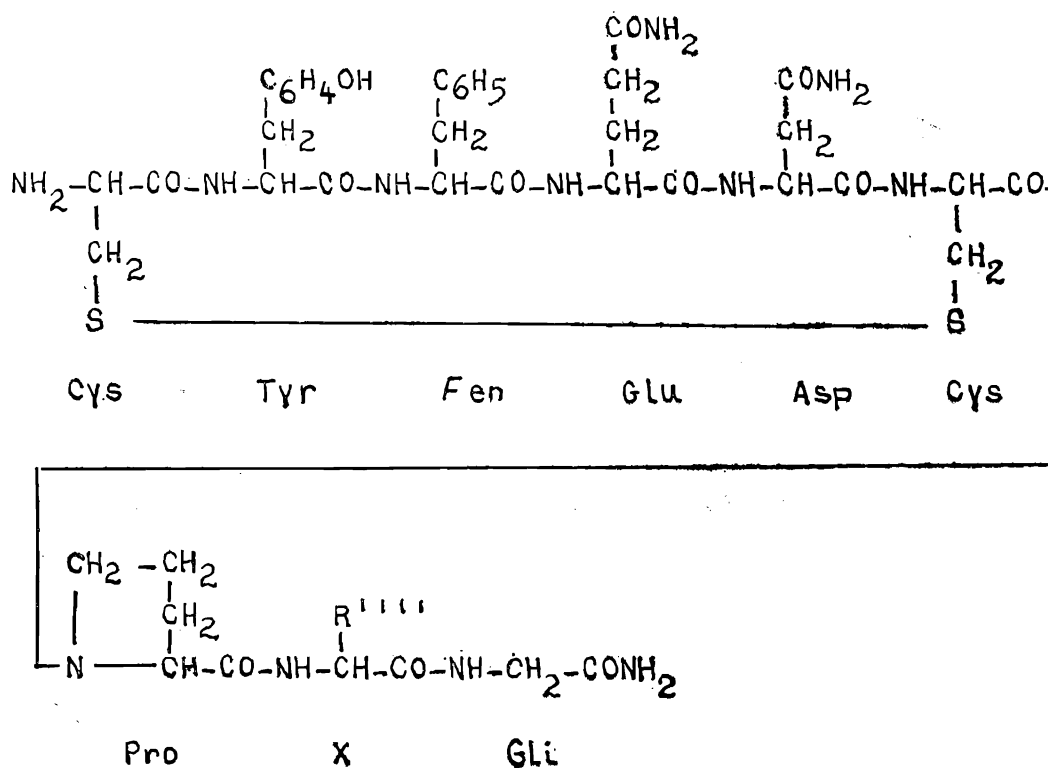
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6

Wzór	R	X
6 a	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Liz
6 b	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$	Arg
6 c=I	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Orn