



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 5.VI.1964 P(104769)

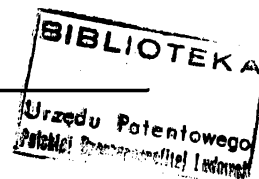
Pierwszeństwo: 6.VI.1963 (Szwajcaria)

Opublikowano: 30.XI.1966

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

UKD



Współtwórcy wynalazku: dr Roger Boissonnas, dr Rene Huguenin

Właściciel patentu: Sandoz AG Bazyleja (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1 Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1.

Polipeptyd o wzorze 1 może być otrzymany metodami ogólnie znanymi dla syntezy tego rodzaju związków, przy czym aminokwasy łączy się ze sobą w podanej we wzorze kolejności, pojedynczo lub po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszej cząsteczce.

Według wynalazku polipeptyd o wzorze 1 można otrzymać przez utlenienie nonapeptydu o wzorze 2. Produkty wyjściowe do otrzymania pochodnej nonapeptydu o wzorze 2, o ile dotychczas nie są znane, otrzymuje się metodami znanymi w chemii polipeptydów, przy czym aminokwasy łączy się ze sobą pojedynczo lub po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach.

Utlenienie nonapeptydu o wzorze 2 dożądanego produktu końcowego o wzorze 1 może być prowadzone w roztworze wodnym lub alkoholowo-wodnym przy wartości pH 4—9. Utlenienie prowadzi się korzystnie za pomocą powietrza, tlenu, nadtlenu wodoru lub żelazicyjanku potasowego.

Otrzymany polipeptyd o wzorze 1 można w znany sposób przeprowadzić w sole addycyjne przez reakcję z nieorganicznymi lub organicznymi kwasami. Jako kwasy stosuje się na przykład: kwas solny, bromowodorowy, siarkowy, fumarowy, jabłkowy, maleinowy, octowy i winowy. Związek o wzorze 1 wykazuje równie silne działanie zwężające

2
żające naczynia krwionośne jak naturalne wazopresyny o ogólnym wzorze 3, od których nowy związek różni się tym, że zamiast lizyny (wazopresyna świni o wzorze 3a), względnie argininy (wazopresyna bydła o wzorze 3b) — zawiera ornitynę, a zamiast tyrozyny — fenyloalaninę. Związek o wzorze 1 nie wykazuje tak silnego działania zmniejszającego wydzielanie moczu, jak naturalne wazopresyny tak, że związek o wzorze 1 może być wprowadzony do terapii jako substancja o selektywnym działaniu zwężającym naczynia krwionośne. Specyficzne działanie zwężające naczynia krwionośne występuje na skutek bezpośredniego wpływu na mięśnie naczyń, dlatego też związek o wzorze 1 w przeciwieństwie do adrenaliny i noradrenaliny, nie wywołuje objawów ubocznych ze strony wegetatywnego układu nerwowego.

Selektywnego, zwężającego naczynia krwionośne działania związku o wzorze 1 nie można było przewidzieć, ponieważ struktura reszty ornitynowej podobna jest do struktury lizyny i argininy i dlatego można było oczekiwać, że również właściwości nowego związku o wzorze 1 będą odpowiadać właściwościom obydwóch naturalnych hormonów. Głównym zakresem zastosowania nowego związku o wzorze 1 jest profilaktyka i terapia krwotoków tkankowych, przy czym infiltracja tkanki związkiem o wzorze 1 powoduje silną jej anemizację.

Związek o wzorze 1 znajduje zastosowanie szczególnie przy chirurgicznych zabiegach w laryngologii i położnictwie, urologii i stomatologii. Dodaje się go przy tym do środków miejscowo znieczulających albo przy operacjach z narkozą ogólną, rozcieńcza fizjologicznym roztworem soli kuchennej i stosuje do infiltracji. Związek o wzorze 1 może być też stosowany doustnie przy leczeniu pewnych przypadków hypotonii lub stanach zapści i szoku.

Otrzymany sposobem według wynalazku, dotychczas nieznany polipeptyd o wzorze 1 w postaci wolnej zasady lub jako sól organicznego lub nieorganicznego kwasu może być stosowany jako lek sam lub wraz z innymi substancjami doustnie, dojelitowo, pozajelitowo lub donosowo. Do sporządzenia odpowiednich form leku używa się nieorganicznych lub organicznych, farmakologicznie obojętnych środków pomocniczych. Jako środki pomocnicze stosuje się na przykład do tabletek i drażetek cukier mlekowy, skrobię, talk, kwas stearynowy i podobne; do syropów: roztwory cukru trzcinowego inwertowanego, glukozy i inne; do preparatów iniekcyjnych wodę, alkohole, glicerynę, oleje roślinne i podobne; do czopków naturalne lub utwardzone oleje, woski i inne. Preparaty mogą również zawierać odpowiednie środki konserwujące, stabilizujące, zwilżające, ułatwiające rozpuszczanie, słodzące i barwiące, aromatyzujące i inne.

W poniższych przykładach podano sposób otrzymania nonapeptydu o wzorze 2 i następnie jego utlenianie do polipeptydu o wzorze 1. W przykładach temperatury podano w stopniach Celsjusza.

Przykład I.

a) Ester etylowy N- α -karbobenzoksyl-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny. 104 g N- α -karbobenzoksyl-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityny i 27 g estru etylowego gliceryny rozpuszcza się w 450 ml acetonitrylu, chłodzi do temperatury 0°, dodaje 51 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i wytrząsa w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Wytrącony dwucykloheksylomocznik odsącza się i przemywa acetonitrylem. Przesącz odparowuje się w próżni. Pozostałość krystalizuje po dodaniu eteru naftowego. Po przekrystalizowaniu z n-propanolu otrzymuje się 93 g estru etylowego N- α -karbobenzoksyl-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny: temperatura topnienia 135° [α]_D²² = - 7° (96% etanol).

b) Amid N-karbobenzoksyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny.

90 g estru etylowego N- α -karbobenzoksyl-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny rozpuszcza się w 800 ml bezwodnego kwasu octowego, nasyconego bromowodorem. Całość pozostawia się w ciągu godziny w temperaturze 20°, odparowuje w próżni w temperaturze 40°C i przemywa pozostałość starannie eterem dwuetylowym. Pozostałość rozpuszcza się w 500 ml acetonitrylu, dodaje 25 ml trójetyloaminy i 43 g N-karbobenzoksyl-L-proliny, chłodzi do temperatury 0°, dodaje jeszcze 35,5 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i wytrząsa przez noc w temperaturze 20°. Po odsącze-

niu dwucykloheksylomocznika odparowuje się przesącz w próżni w temperaturze 30°, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i przemywa ten roztwór rozcieńczonym kwasem siarkowym i wodnym roztworem amoniaku. Po osuszeniu nad siarczanem sodowym odparowuje się octan etylu w próżni i pozostałość rozpuszcza w 1 litrze absolutnego etanolu. Roztwór chłodzi się do temperatury 0°, nasyca amoniakiem i pozostawia przez noc w temperaturze 20°. Po odparowaniu w próżni w temperaturze 30° przekrystalizowuje się pozostałość z acetonitrylu. Otrzymuje się 58 g amidu N-karbobenzoksyl-L-prolilo-N-p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny, temperatura topnienia 122° (z rozkładem) [α]_D²² = - 46° (95% kwas octowy).

c) Amid-N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny.

100 g amidu N-karbobenzoksyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny rozpuszcza się w 500 ml bezwodnego kwasu octowego nasyconego bromowodorem, pozostawia przez godzinę w temperaturze 20° i odparowuje w próżni przy temperaturze poniżej 40°. Pozostałość przemywa się starannie eterem dwuetylowym i dodaje do roztworu 100 g azydku N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylu i 26 ml trójetyloaminy w 1000 ml dwumetyloformamidu. Pozostawia się przez noc w temperaturze 20°, dodaje 3000 ml octanu etylu, odsącza od osadu i przemywa octanem etylu. Otrzymuje się 105 g amidu N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny, temperatura topnienia 193° [α]_D²⁰ = - 39° (dwumetyloformamid).

d) Amid N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenylalanil-L-fenylalanil-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny.

50 g amidu N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny rozpuszcza się w 250 ml bezwodnego kwasu octowego nasyconego bromowodorem i pozostawia w ciągu godziny w temperaturze 20°. Po odparowaniu rozpuszczalnika w próżni w temperaturze poniżej 40° przemywa się pozostałość starannie eterem dwuetylowym i zadaje roztworem 31,5 g azydku N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenylalanil-L-fenylalanilu i 7,5 ml trójetyloaminy w 250 ml dwumetyloformamidu. Pozostawia się przez 2 dni w temperaturze 20°, następnie zadaje 1000 ml octanu etylu i przemywa osad octanem etylu. Po wysuszeniu w próżni w temperaturze 30° przemywa się produkt ciepłym metanolem. Otrzymuje się 45 g amidu N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenylalanil-L-fenylalanil-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolilo-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny, temperatura topnienia 224° [α]_D²¹ = - 40° (dwumetyloformamid).

e) Amid L-cysteinyl-L-fenylalanil-L-fenylalanil-L-glutaminyl-L-asparaginylo-L-cysteinyl-L-prolilo-L-ornityloglicyny.

Roztwór 5 g amidu N-karbobenzoksyl-S-benzyl-

-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo-L-proliło-N-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornityloglicyny w 1200 ml bezwodnego ciekłego amoniaku zadaje się podczas mieszania w temperaturze wrzenia roztworu taką ilością metalicznego sodu lub potasu, aż wystąpi trwale niebieskie zabarwienie. Po dodaniu 3g chlorku amonowego odparowuje się roztwór do sucha. Pozostałość zawiera amid L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-L-cysteinylo-L-proliło-L-ornityloglicyny.

f) Polipeptyd o wzorze 1.

Pozostałość otrzymaną według przykładu I e) rozpuszcza się w 5 litrach 0,01 n kwasu octowego i utlenia przy wartości pH 6,5 — 8,0 przez wprowadzenie powietrza lub tlenu w ciągu jednej godziny w temperaturze 20°. pH roztworu doprowadza się przy pomocy rozcieńczonego kwasu solnego do wartości 4,0 — 5,0 i po dodaniu 50 g chlorku sodowego lub 0,64 g kwasu metanosulfonowego lub 0,76 g kwasu trójfluoro-octowego odparowuje się do sucha, przy czym otrzymuje się suchy trwały proszek w postaci mieszaniny polipeptydu i soli. Może on być przechowywany i jest całkowicie rozpuszczalny w wodzie. Można jednak również bezpośrednio stosować otrzymany roztwór, ewentualnie po rozcieńczeniu wodą lub roztworem soli. Celem usunięcia nieorganicznych soli można wyżej wymieniony proszek otrzymany po dodaniu kwasu trójfluorooctowego poddać rozdzielaniu przeciwpładowemu w układzie rozpuszczalników — drugorzędowy butanol (woda) kwas trójfluorooctowy 120(160)1. Po 200 elementach rozdzielających substancja znajduje się w elementach 57 do 77, z maksimum w elemencie 67/K = 0,50. Po odparowaniu otrzymuje się z dobrą wydajnością czynny polipeptyd w postaci higroskopijnego trójfluorooctanu, który jest chromatograficznie i elektroforetycznie jednorodny. Prędkość migracji przy elektroforezie bibułowej przy pH 5,8 i napięciu 40 v/cm wynosi 50 mm/godzinę (użyta jako wzorzec histydyna wędruje w ciągu godziny 65 mm).

Migracja przy elektroforezie bibułowej, przy pH 1,9 i napięciu 40 v/cm wynosi 69 mm w ciągu jed-

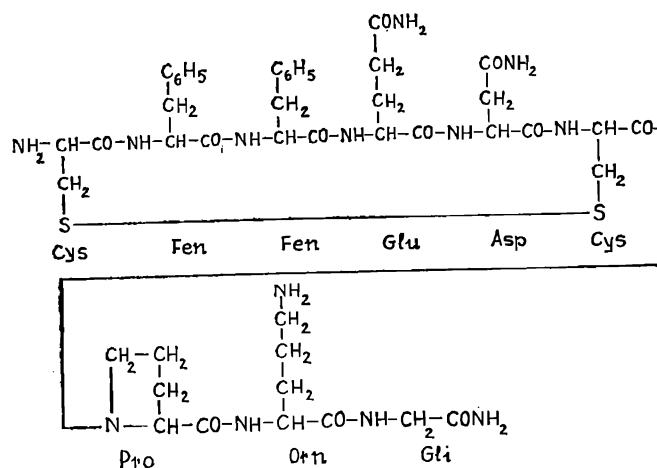
nej godziny (użyty jako wzorzec tryptofan wędruje w tym czasie 66 mm). Rf przy chromatografii bibułowej w systemie alkohol izoamylowy/pirydyna/woda 35/35/30 wynosi 0,28. Hydroliza całkowita (16 godzin, temperatura 110°, 6 n HCl) daje następujące aminokwasy w ilościach ekwimolarnych: cystynę, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, prolinę, ornitynę i glicynę, oraz w ilościach podwójnie ekwimolarnych fenylalaninę. Otrzymany produkt posiada następujące biologiczne działanie: 150 jednostek międzynarodowych/mg na zahamowanie diurezy u szczura i mniej niż 3 jednostek międzynarodowych/mg na macicę u szczura.

Przykład II. Postępuje się jak w przykładzie I. Na końcu utlenia się jednak produkt w temperaturze 0—40° przez dodanie 7,5 ml 1 n roztworu nadtlenu wodoru w wodzie przy pH 7,5—8,0.

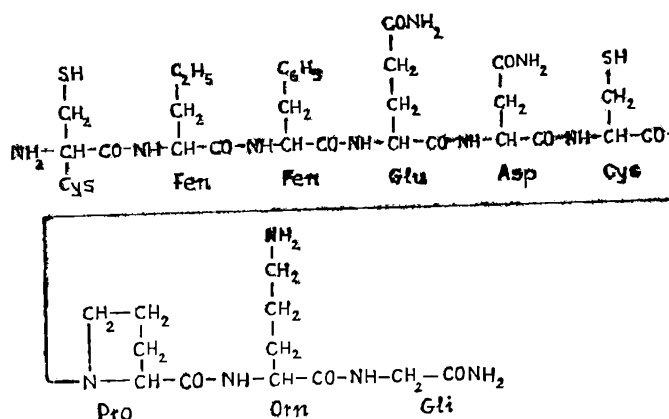
Przykład III. Postępuje się jak w przykładzie I. Na końcu utlenia się jednak produkt w temperaturze 0—35° przez dodanie 6,7 ml 1 n roztworu żelazicyjanku potasowego w wodzie przy pH 5,5—7,5.

Zastrzeżenia patentowe

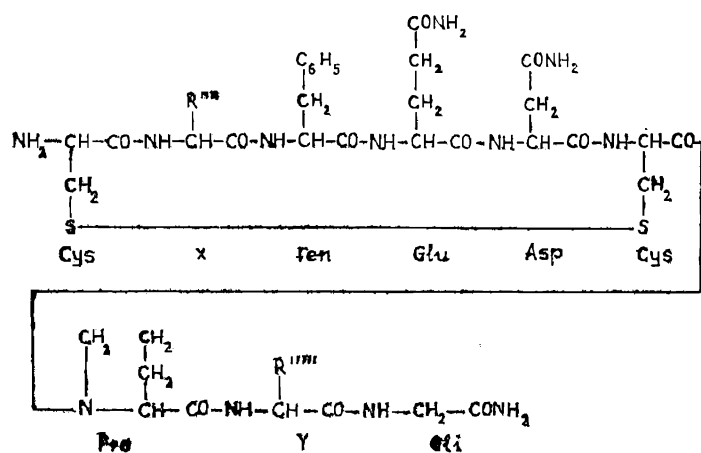
1. Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1 i jego soli addycyjnych z kwasami **znamienny tym**, że nonapeptyd o wzorze 2 utlenia się w roztworze wodnym lub alkoholowo-wodnym przy wartości pH 4—9, po czym uzyskany produkt ewentualnie przeprowadza się w sole addycyjne z kwasami.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się powietrze.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się nadtlenek wodoru.
4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się tlen.
5. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się żelazicyjanek potasu.



Wzór 1



Wzór 2



Nzón 3

H_2Z^{IV}	R^{III}	X	R^{IIIV}	Y
<i>Názor 2a</i>	$-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-OH$	Tyr	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	Liz
<i>Názor 3b</i>	$-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-OH$	Tyr	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{C}}-NH_2$	Arg
<i>Názor 3c</i>	$-CH_2-\text{C}_6\text{H}_5$	Fen	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	Orn