

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

64187

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12 q, 6/01

Zgłoszono: 02.VIII.1967 (P 122 027)

Pierwszeństwo: 15.IX.1966 Czechosłowacja

MKP C 07 c, 103/52

Opublikowano: 10.XII.1971

UKD



Współtwórcy wynalazku: Milan Zaoral, Iwan Vávra, Alena Machová,
František Šorm

Właściciel patentu: Československá akademie věd, Praga
(Czechosłowacja)

Sposób wytwarzania polipeptydu o działaniu antydiuretycznym

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania polipeptydu o działaniu antydiuretycznym. Polipeptyd o wzorze podanym na rysunku, w którym Mep oznacza β -merkaptopropionyl, Tyr oznacza tyrozyl, Phe fenyloalanyl, Gln glutaminyl, Asn asparaginył, Cys cysteinył, Pro prolil, Arg arginył, a Gly oznacza glicyl, zawiera w pozycji 1 kwas β -merkaptopropionowy (Mep), a w pozycji 8 D-argininę. Związek ten nadaje się do leczenia diabetes insipidus.

Znane substancje o właściwościach antydiuretycznych wytwarzane są z różnych strukturalnych modyfikacji cząsteczki wazopresyny. Najkorzystniejsze właściwości ze znanych dotąd substancji tego typu wykazuje 1-dezamino-Phe²-Arg⁸-wazopresyna (patrz tabela).

Stwierdzono, że analog wazopresyny wytworzonej sposobem według wynalazku posiada wysokie i przy tym specyficznie antydiuretyczne działanie.

Sposób według wynalazku polega na tym, że azydek β -benzylo-merkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenyloalanylo - L-glutaminilo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteiny kondensuje się z amidem L-prolilo-N^G-tozylo-D-arginylo-glicyny do chronionego oktapeptydu o wzorze Mep (R¹) — Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (R¹) — Pro-D-Arg (R²) — Gly-NH₂, w którym R¹ oznacza grupę benzyłową, a R² grupę p-toluenosulfonyłową, następnie grupy ochronne odszczepia się przez działanie metalami alkalicznymi w ciekłym amoniaku, a otrzymaną zredu-

2

kowaną postać polipeptydu o wzorze Mep (SH) — Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (SH) — Pro-D-Arg-Gly-NH₂ utlenia się korzystnie żelazycyjankiem potasu w wodnym roztworze przy wartości pH = 6,5 — 7,0 do czynnego antydiuretycznego polipeptydu o wzorze podanym na rysunku. Wymieniona pochodna oktapeptydu może być wytworzona również innymi sposobami ogólnie stosowanymi przy otrzymywaniu polipeptydów. Można ją wytwarzać przez stopniową dobudowę zarówno ze strony grupy aminowej jak i karboksylowej, jak również przez sprzęganie wcześniej wytworzonych polipeptydów, które mają kolejność aminokwasów odpowiadającą polipeptydowi o wzorze podanym na rysunku.

Do przejściowej ochrony grup merkaptu, aminowych i grupy guanidynowej można stosować grupy używane w syntezie polipeptydów. Grupy ochronne można ponownie usunąć za pomocą ogólnie stosowanych sposobów w syntezie polipeptydów w jednym stopniu lub w wielu. Także utlenianie zredukowanej postaci polipeptydu do cyklicznego polipeptydu o podanym wzorze przeprowadza się znanymi sposobami zarówno w roztworze wodnym jak i w mieszaninach rozpuszczalników mieszających się z wodą. Syntezę można np. prowadzić w ten sposób, że chlorek kwasu β -benzylomerkaptopropionowego kondensuje się z estrem metylowym tyrozyny otrzymując nowy ester metylowy β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozyny, który przeprowadza się przez działanie wodzianem

hydrazyny w nieznany dotychczas hydrazyd i azydek, który następnie sprzęga się z estrem metylowym L-feniloalaniny. Otrzymaną pochodną dwu-estru dwupeptydu kondensuje się ponownie w postaci azydku z estrem metylowym L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyllocysteiny otrzymując nowy ester metylowy β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-feniloalaniny - L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny, który następnie metodą azydową kondensuje się z amidem L-prolilo-N^G-tozylo-D-arginylo-glicyny otrzymując nową pochodną oktapeptydu.

Grupy ochronne usuwa się przez redukcję za pomocą sodu w ciekłym amoniaku, po czym zredukowany produkt przeprowadza się przez utlenienie żelazicyjankiem potasu w cykliczny biologicznie czynny peptyd o wzorze podanym na rysunku.

Polipeptyd otrzymany sposobem według wynalazku odznacza się podwyższoną i specyficzną aktywnością antydiuretyczną (patrz tabela), w stosunku do naturalnej argininowazopresyny, od której różni się tym, że zawiera w pozycji 1 zamiast cysteiny kwas β -merkaptopropionowy, a w pozycji 8 zamiast L-argininy D-argininę.

Tabela

Związek	Aktywność antydiuretyczna w IM/mg	Aktywność presoryczna w IM/mg	Działanie specyficzne
1-dezamino-D-Arg ⁸ -wazopresyna	16 000 $\pm$ 200	11	1454
1-dezamino-Phe ² -L-Arg ⁸ -wazopresyna	800 $\pm$ 170	29 $\pm$ 7	27,5

Aktywność wyrażono w jednostkach międzynarodowych IM na mg. Specyficzne działanie wyrażono stosunkiem aktywności antydiuretycznej do aktywności presorycznej.

Polipeptyd o wzorze podanym na rysunku, który można określić jako 1-dezamino-8-D-argininowazopresynę, z uwagi na działanie biologiczne jest obecnie najkorzystniejszym preparatem do regulowania poliurii i łagodzenia polidypsji przy diabetes insipidus.

Polipeptyd można stosować zarówno w postaci wolnej zasady jak też w postaci soli z kwasami nieorganicznymi i organicznymi, ewentualnie z dodatkami środków pomocniczych, stabilizujących, konserwujących, słodzących, aromatyzujących i zwilżających w celu wytworzenia postaci leku do stosowania pozajelitowego, doustnego, donosowego, podskórnego, domięśniowego i dożylnego. Jako kwasy nieorganiczne można stosować, np. kwas solny, fosforowy i borowy, a jako kwasy organiczne np. kwas octowy, cytrynowy i winowy, taninę i podobne związki o charakterze kwasowym. Jako związki pomocnicze stosuje się skrobię, laktozę, oleje naturalne i utwardzone, talk, glicerynę itp.

Przykład. 9,2 g kwasu β -benzylomerkaptopropionowego przeprowadzono w chlorek przez działanie nadmiarem chlorku tionylu, następnie

chlorek rozpuszczono w 20 ml octanu etylu. Roztwór wprowadzono przy intensywnym mieszanii i chłodzeniu do temperatury 0°C do mieszaniny 10,9 g chlorowodoru estru metylowego L-tyrozy-
 5 ny, 50 ml wody i 50 ml octanu etylu, przy czym utrzymano słabo alkaliczną wartość pH mieszaniny reakcyjnej przez dodatek wodorowęglanu sodu. Warstwę octanową oddzielono, wysuszone, odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość po odparowaniu przekrystalizowano z układu octan etylu — eter naftowy. Z ługu macierzystego uzyskano przez odparowanie i krystalizację drugą część. Otrzymano ester metylowy β -benzylomerkapto-propionylo-L-tyrozy-
 15 ność ogólna wynosi 16,5 g, to jest 73% wydajności teoretycznej. Temperatura topnienia 89—90°C $[\alpha]_D^{25} - 3,4 \pm 0,5$ ($c = 0,5$ dwumetyloformamid). Dla $C_{26}H_{23}NO_4$ S (373,5) obliczono 64,31% C, 6,21% H, 3,75% N; znaleziono 64,38% C, 6,25% H, 3,71% N.

15,3 g estru metylowego β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozy-
 20 pionylo-L-tyrozy- rozpuszczono w 60 ml etanolu, dodano 6 ml 80% wodzianu hydrazyny i mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w ciągu 2 godzin. Pastowatą mieszaninę reakcyjną rozcieńczone nadmiarem wody, wytrącony produkt odsączono, przemyto na filtrze, przekrystalizowano z wodnego alkoholu. Otrzymano hydrazyd β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozy-
 25 Wydajność 11,95 g (78%); temperatura topnienia 193—194°C; $[\alpha]_D^{25} - 6,0 \pm 0,5$ ($c = 0,5$ dwumetyloformamid). Dla wzoru sumarycznego $C_{19}H_{23}N_3O_3S$ (373,5) obliczono: 61,10% C, 6,21% H, 11,25% N; stwierdzono 61,10% C, 6,11% H, 11,15% N.

5,6 g hydrazidu β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozy-
 35 tyrozy- rozpuszczono w mieszaninie 50 ml dwumetyloformamidu i 4 ml stężonego kwasu solnego. Do roztworu dodano, mieszając i chłodząc w temperaturze -10°C, 1,03 g azotynu sodu w 2 ml wody. Ustalono wartość pH mieszaniny reakcyjnej na 6—7 za pomocą N-etylo-piperydiny i dodano 2,7 g estru metylowego L-feniloalaniny w 3 ml dwumetyloformamidu. Po 12-godzinym staniu w temperaturze 0°C i 2-godzinym przy temperaturze pokojowej odparowano mieszaninę reakcyjną pod
 40 zmniejszonym ciśnieniem, a do mazistej pozostałości po odparowaniu dodano nadmiar wody, wytrącony produkt odsączono i przekrystalizowano z wodnego etanolu.

Otrzymano ester metylowy β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-feniloalaniny. Wydajność 7,6 g (97%); temperatura topnienia 151—152°C; $[\alpha]_D^{25} - 17,5 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,5$ dwumetyloformamid). W literaturze: Huguenin R. L., Boissonnas R. A.; Helv. Chim. Acta 49 (1966), 695 podano temperaturę topnienia 147—148°C i $[\alpha]_D^{25} - 17,5 \pm 1^\circ$ ($c = 1,45$, dwumetyloformamid) dla produktu otrzymanego z 68% wydajnością przez sprzęganie estru tróchlorofenylowego kwasu β -benzylomerkaptopropionowego z estrem metylowym L-tyrozylo-L-feniloalaniny.

14,0 g estru metylowego β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-feniloalaniny ogrzewano w ciągu 2 godzin pod chłodnicą zwrotną z 100 ml metanolu i 6 ml 80% wodzianu hydrazyny. Wy-
 65

trącony produkt odsączono, przemyto w filtrze metanolem i eterem i przekrystalizowano z mieszaniny dwumetyloformamid-woda. Otrzymano hydrazyd β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaniny. Wydajność 10,1 g (72%); temperatura topnienia 248–250°C; $[\alpha]_D^{25}$ — 21,9 $\pm$ 0,5° (c = 0,55 dwumetyloformamid).

W literaturze przytoczonej powyżej podano temperaturę topnienia 251–253°C.

8 g hydrazidu β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaniny skondensowano z 7,2 g estru metylowego L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny znany sposób (Zaoral M. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 30 (1965) 1853). Po przekrystalizowaniu produkt reakcji z dwumetyloformamidem otrzymano 11,3 g (76%) estru metylowego β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny o temperaturze topnienia 253–255°C $[\alpha]_D^{25}$ — 29,6 $\pm$ 0,5 (c = 0,5, dwumetyloformamid).

Dla wzoru sumarycznego $C_{48}H_{57}N_7O_{10}S_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (965,1) obliczono 59,73% C, 6,20% H, 10,17% N; stwierdzono 59,61% C, 6,23% H, 10,23% N.

10,8 g estru metylowego β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny w 160 ml dwumetyloformamidu dodano 12 ml 80% wodzianu hydrazyny i pozostawiono mieszaninę reakcyjną przy temperaturze pokojowej w ciągu 12 godzin. Wytrącony produkt odsączono, przemyto na filtrze metanolem i eterem, następnie wysuszono. Otrzymano hydrazyd β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny. Wydajność 6,7 g (62%). Temperatura topnienia 266–268°C bez zmiany po przekrystalizowaniu z układu dwumetyloformamid-woda; $[\alpha]_D^{25}$ — 33,4 $\pm$ 0,5° (c = 0,5, dwumetyloformamid).

Dla wzoru sumarycznego $C_{47}H_{57}N_9O_9S_2$ (956,1) obliczono: 59,04% C, 6,01% H, 13,19% N; stwierdzono 59,04% C, 6,16% H, 13,25% N.

Wytworzono znany sposób (patrz wyżej podana literatura) z hydrazidu β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny i amidu L-prolilo-NG-tozylo-D-arginylo-glicyny amid β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylo-L-prolilo-NG-tozylo-D-arginyloglicyny z 68% wydajnością. Temperatura topnienia 223–225°C.

Dla wzoru sumarycznego $C_{67}H_{84}N_{14}O_{14}S_3$ (1405,65) obliczono: 57,24% C, 6,02% H, 13,75% N; stwierdzono 57,35% C, 6,01% H, 13,99% N.

0,5 g amidu β -benzylomerkaptopropionylo-L-ty-

rozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylo-L-prolilo-NG-tozylo-D-arginyloglicyny zredukowano znany sposób (według wyżej podanej literatury) za pomocą sodu w ciekłym amoniaku. Po odparowaniu amoniaku otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 800 ml 5% kwasu octowego, nierozpuszczalną część odsączono, wartość pH przesączu ustawiono na 6,5–7 za pomocą wodorotlenku sodu i roztwór znany sposobem utleniono Kimbrough R. D. Jr., Cash. W. D., Brands L. A., Chan W. Y., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. 238 (1963) 1411.

Wartość pH mieszaniny reakcyjnej ustalono na 4,0–4,5 przez dodatek kwasu octowego; peptyd poddano absorpcji w kolumnie wypełnionej karboksylową żywicą kationo-wymienną, eluowano 50% kwasem octowym i wyodrębniono przez liofilizację. Surowy produkt oczyszczono znany sposób (Zaoral M. Šorm. F. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 51 (1966) 310) przy zastosowaniu beznosnikowej wysokonapięciowej elektroforezy. Wydajność liofilizatu wynosi 100–200 mg. Otrzymano 1-dezamino-8-D-arginino-wazopresynę.

$[\alpha]_D^{25}$ — 65 $\pm$ 2° (c = 0,2, M—CH₃COOH). Dla wzoru sumarycznego $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2 \cdot 2CH_3COOH$ (1189,3) obliczono 50,49% C, 6,10% H, 16,48% N; stwierdzono 50,39% C, 6,32% H, 16,45% N.

Analiza składu aminokwasów wykazała w częściach: 1/2 Cys 0,40, Tyr 0,98, Phe 1,03, Gln 1,05, Asn 1,00, Pro 1,03, Arg 0,98, Gly 0,95.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania polipeptydu o działaniu antydiuretycznym o wzorze podanym na rysunku, który zawiera w pozycji 1 kwas β -merkaptopropionowy, a w pozycji 8 D-argininę, przy czym Mep oznacza merkaptopropionyl, Tyr oznacza tyrozylo, Phe fenylalaninylo, Gln glutaminylo, Asn asparaginylo, Cys cysteinylo, Pro prolilo, Arg arginylo, a Gly oznacza glicyl, **znamienny tym**, że azydek β -benzylomerkaptopropionylo-L-tyrozylo-L-fenylalaninylo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteiny kondensuje się z amidem L-prolilo-NG-tozylo-D-arginyloglicyny otrzymując chroniony oktapeptyd o wzorze Mep(R¹)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-(R¹)-Pro-D-Arg(R²)-Gly-NH₂, w którym R¹ oznacza grupę benzylową, R² oznacza grupę p-toluenosulfonylową, po czym odszczepia się grupy ochronne przez działanie metalami alkalicznymi w ciekłym amoniaku, a następnie otrzymany zredukowany polipeptyd o wzorze Mep(SH)Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(SH)-Pro-D-Arg-Gly-NH₂ poddaje się utlenianiu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utlenianie prowadzi się za pomocą żelazicyjanku potasowego w roztworze wodnym przy wartości pH = 6,5–7,0.

