



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 05 07 79
(21) (PV 4741-79)

(40) Zveřejněno 15 09 83

(45) Vydáno 15 04 86

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52//
A 61 K 37/34

(75)
Autor vynálezu

LEBL MICHAL ing. CSc., JOŠT KAREL RNDr. DrSc.,
MACHOVÁ ALENA MUDr. CSc., HRBAS PAVEL RNDr.,
ŠKOPKOVÁ JANA MUDr. CSc., SLANINOVÁ JIŘINA RNDr. CSc., PRAHA,
BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY u Prahy

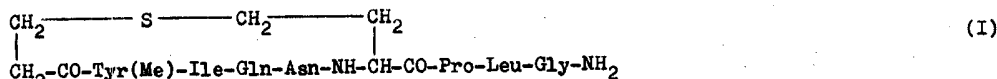
(54) [2-O-Methyltyrosin]deamino-6-karba-oxytocin a způsob jeho výroby

Předmětem vynálezu je analog oxytocinu, [2-O-methyltyrosin]deamino-6-karba-oxytocin, a způsob jeho výroby.

Jde o nový analog oxytocinu, který má vysoký a selektivní natriuretický účinek.

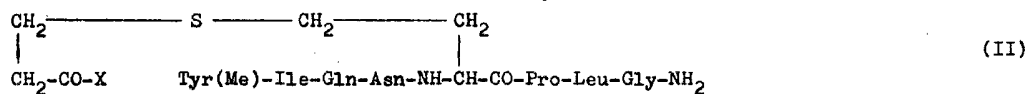
Přírodní hormon oxytocin má řadu biologických účinků, z nichž některé, např. uterotonický a galaktogogický, jsou využívány v lékařství. Kromě toho má další účinky, typické pro hormon vasopresin, a to antidiuretický a presorický. U oxytocinu byly zjištěny i další biologické aktivity, hydroosmotická, natriferická, natriuretická atd. Při praktickém využití v lékařství je toto široké spektrum biologických účinků nevýhodné a vede někdy až ke kontraindikaci. Autoři vynálezu zjistili nyní, že jestliže se provedou v molekule oxytocinu tři strukturální změny, a to, že se zamění alfa-aminoskupina cysteinu za vodík, tyrosin za O-methyltyrosin a disulfidová vazba za skupinu $-S-CH_2-$, získá se látka s vysokým natriuretickým účinkem (dvakrát vyšším než má oxytocin), přičemž ostatní aktivity jsou podstatným způsobem sníženy. Uvedené strukturální změny zvyšují také chemickou i metabolickou stabilitu látky podle vynálezu, která se pak projevuje v prodlouženém biologickém účinku.

Analog oxytocinu [2-O-methyltyrosin]deamino-6-karba-oxytocin (tj. cyklický laktam O-methyltyrosylisoleucylglutaminylasparaginyln-S-(beta-karboxyetyl)homocysteinylprolyl-leucylglycinamidu) má vzorec I,



kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

Podstatou způsobu výroby nového analogu oxytocinu vzorce I podle vynálezu je, že se lineární peptid vzorce II,



kde X znamená skupinu aktivující karboxylovou skupinu, s výhodou aktivovaný ester, podrobí cyklizaci pro vytvoření peptidové vazby mezi aminoskupinou O-metyltirosinu a karboxylovou skupinou S-karboxyethylhomocysteinového zbytku.

Připravený nový analog oxytocinu má 200 % natriuretické aktivity oxytocinu, přičemž jeho uterotonická aktivita je 3 m.j. na mg a galaktogická 18 m.j./mg (pro oxytocin jsou tyto aktivity 500 m.j./mg).

Způsob výroby analogu oxytocinu se dále objasňuje v příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

O-metyltirosylisoleucylglutaminylasparaginyl-S-(beta-p-nitrofenoxykarbonyletyl)homocysteinyl-prolylleucylglycinamid

K suspenzi isoleucylglutaminylasparaginyl-S-(beta-karboxyetyl)homocysteinylprolylleucylglycinamidu (0,40 g) (Jošt K., Šorm F.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 36, 234 /1971/) v dimethylformamidu (10 ml) byl přidán N-etylpiperidin (30 µl) a 2,4,5-trichlorfenylester terc.butylloxykarbonyl-O-metyltirosinu (0,3 g). K reakční směsi byl po 2 h přidán ještě též aktivní ester (0,15 g) a N-etylpiperidin (60 µl). Po 44 h byla reakční směs odpařena, odparek byl roztírán s petroléterem a získaný krystalický produkt byl odfiltrován a promyt éterem, etylacetátem, vodou a éterem. Bylo získáno 0,55 g (95 %) produktu o teplotě tání 224 až 230 °C; $[\alpha]_D = -23,2^\circ$ (c = 0,2, dimethylformamid).

Pro $\text{C}_{50}\text{H}_{79}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1 178)

vypočteno: 50,96 % C, 7,44 % H, 13,07 % N;
nalezeno: 51,14 % C, 7,01 % H, 12,86 % N.

Další reakce byly prováděny v atmosféře dusíku. K roztoku výše připraveného chráněného oktapeptidu (250 mg) ve směsi dimethylformamidu (8 ml) a pyridinu (8 ml) byl za míchání přidán bis-(p-nitrofenyl)sulfit (0,8 g) a po 7 h další podíl sulfitu (0,8 g). Po dalších 16 h byl přidán další podíl sulfitu (0,4 g) a po 6 h byla reakční směs odpařena a odparek byl rozetřen s éterem, pevný podíl byl odfiltrován a promyt vodou a éterem (do negativní reakce na nitrofenol). Po vysušení bylo získáno 210 mg produktu, který byl rozpuštěn v kyselině trifluoroctové (8 ml) a po 70 min stání při teplotě místnosti byl k roztoku přidán toluen (8 ml) a roztok byl odpařen. Po rozetření s éterem byl produkt vysušen a pokud možno nejdříve použit k další reakci (produkt je nestálý).

P ř í k l a d 2

[2-O-metyltirosin]deamino-6-karba-oxytocin

Aktivní ester oktapeptidu připravený v příkladu 1 byl rozpuštěn v dimethylformamidu (8 ml) a roztok byl přidán během 3 h do směsi pyridinu (200 ml) a N-etylpiperidinu (40 µl), zahříván na 50 °C, za míchání a probublávání dusíkem. Reakční směs byla zahřívána ještě 4 h a poté stála 14 h při teplotě místnosti. Po odpaření byl produkt rozetřen s éterem a vysušen. Čištění bylo provedeno dvěma různými způsoby. Pokud bylo použito ionexové chroma-

tografie a gelové filtrace, byla přímo získána žádaná látka. Pokud byla reakční směs čištěna protiproudým roztřepáváním, vznikal odpovídající sulfoxid, který bylo nutno redukovat bromovodíkem a acetonem (Lebl M., Barth T., Jošt K.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 43, 1 538 /1978/). V obou případech byl produkt získáván v 30 až 40% výtěžku. Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu (detekce chloračným činidlem): $R_F = 0,17$ (2-butanol - 98% kyselina mravenčí - voda, 75:13,5:11,5), 0,12 (2-butanol - 25% amoniak - voda, 85:7,5:7,5), 0,20 (1-butanol - kyselina octová - voda, 4:1:1), 0,62 (pyridin - 1-butanol - kyselina octová - voda, 10:15:3:6); $[\alpha]_D = -78,3^\circ$ ($c = 0,1$, 1M kyselina octová). Aminokyselinová analýza (po 20 h hydrolýze 6M-HCl ve vakuu 150 Pa): Asp = 1,03, Glu = 1,01, Pro = 0,98, Gly = 1,02, Ile = 1,02, Leu = 1,05, Tyr + Tyr(Me) = 0,97, Hcy($C_2H_4CO_2H$) = 0,94.

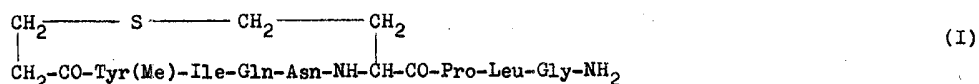
Pro $C_{45}H_{69}N_{11}O_{12}S \cdot 2 C_2H_4O_2 \cdot H_2O$ (1 126)

vypočteno: 52,25 % C, 7,07 % H, 13,68 % N;

nalezeno: 51,88 % C, 6,76 % H, 13,42 % N.

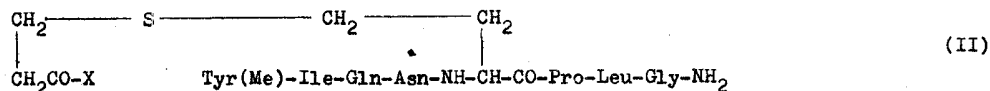
P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. [2-O-metyltirosin]deamino-6-karba-oxytocin vzorce I,



kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

2. Způsob výroby sloučeniny vzorce I podle bodu 1, vyznačený tím, že se lineární peptid vzorce II,



kde X znamená skupinu aktivující karboxylovou skupinu, s výhodou aktivovaný ester, podrobí cyklizaci pro vytvoření peptidové vazby mezi aminoskupinou O-metyltirosinu a karboxylovou skupinou S-karboxyethylhomocysteinového zbytku.