

COYC 103/52



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 46291

Kl. 12 p, 16
Kl. internat. C 07 g

Sandoz A. G.

Bazyleja, Szwajcaria

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o działaniu zwężającym naczynia

Patent trwa od dnia 23 lipca 1960 r.

Pierwszeństwo: 24 lipca 1959 r. (Szwajcaria).

Stwierdzono, że w celu otrzymania dotychczas nieznanego polipeptydu o wzorze 1 o działaniu zwężającym naczynia pochodną nonapeptydu o wzorze 2, w którym R i R' oznaczają grupy wprowadzone dla ochrony grup merkaptu, a R'' i R''' grupy wprowadzone dla ochrony grupy aminowej, przekształca się przez redukcję metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku w pochodną nonapeptydu o wzorze 3 i ten liniowy nonapeptyd przeprowadza się przez utlenienie w wodnym roztworze w produkt końcowy, o wzorze 1.

Stwierdzono, że związek o wzorze 1 posiada również silne działanie zwężające naczynia jak naturalna wazopressyna (wzór 4), która tym odróżnia się od wyżej podanego wzoru 1, że zamiast fenyloalaniny wbudowana jest tyrozyna. Nie przewidziano jednak, że działanie przeciwmoczołpędne związku o wzorze 1 wynosi tylko mniej więcej 1/3 działania związku o wzorze 4. Również działanie uterotoniczne związ-

ku o wzorze 1 wynosi tylko 2% słabego już działania uterotonicznego wazopressyny.

Związek o wzorze 1 odróżnia się więc od wazopressyny specyficznym działaniem zwężającym naczynia. Te nieoczekiwane właściwości związku o wzorze 1 przedstawiają znaczną korzyść przy zwalczaniu szoków dla osiągnięcia lokalnego niedokrwienia przy operacjach, szczególnie w ginekologii przy operacjach waginalnych, w otorinolaryngologii przy wycinaniu migdałów i operacjach ucha, wycinaniu wola i cięższych krwawiących operacjach urologicznych, jak również w dentystyce jako dodatek do środków znieczulających lokalnie. Związek o wzorze 1 wykazuje w stosunku do adrenaliny szczególne korzyści. Podczas, gdy adrenalina powoduje z reguły znaczne podwyższenie ciśnienia krwi i tętna zjawisko to nie występuje przy stosowaniu związku o wzorze 1, przy co najmniej takim samym lokalnym niedokrwieniu.

Sposób według wynalazku można przeprowadzić następująco: Azydek N-karbobenzoksyl-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo [Boissonnas i współpracownicy, Helv. chim. Acta 38 1491 (1955)] o wzorze 5 kondensuje się z amidem L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny o wzorze 6, który otrzymuje się przez odszczepienie grupy karbobenzoksylowej od amidu N-karbobenzoksyl-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny [du Vigneaud i współpracownicy J. amer. chem. Soc. 78 5884 (1956)]. Otrzymamy heksapeptyd o wzorze 7 po odszczepieniu grupy karbobenzoksylowej kondensuje się z azydkiem N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilu o wzorze 8. Ten ostatni otrzymuje się znaną metodą przez kondensację N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalaniny [(Jaquenoud i Boissonnas, Helv. Chim. Acta 42 788 (1959)] z estrem metylowym L-fenylalaniny i następnie przeprowadzenie w azydek. Powstały nonapeptyd o wzorze 2 traktuje się metalem alkalicznym, przede wszystkim sodem lub potasem w ciekłym amoniaku tak, że tworzy się liniowy nonapeptyd o wzorze 3. Ten przez utlenienie najczęściej powietrzem, tlenem lub nadtlenkiem wodoru w wodnym roztworze, przeprowadza się w biologicznie czynny polipeptyd o wzorze 1.

Przykład I. Amid N-karbobenzoksyl-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny.

200 g amidu N-karbobenzoksyl-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny [du Vigneaud i współprac., J. Amer. chem. Soc. 78 5884 (1956)] rozpuszcza się w 1000 ml nasyconego bromowodorem bezwodnego kwasu octowego, pozostawia na 1 godzinę w temperaturze 20°C i odparowuje w próżni w temperaturze poniżej 40°C. Pozostałość starannie przemywa się eterem dwuetylowym po czym dodaje do roztworu 185 g azydku N-karbobenzoksyl-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo [Boissonnas i współprac., Helv. chim. Acta 38 1491 (1955)] i 48 ml trójetyleaminy w 1500 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia się na noc w temperaturze 20°C, a następnie mieszaninę wlewa do dwóch objętości acetonu. Wytrącony osad odsącza się, przemywa wodą i przekrystalizowuje z mieszaniny dwumetyloformamidu i acetonu. Otrzymuje się 190 g N-karbobenzoksyl-L-glutaminylo-L-asparaginylo-

S-benzylo-L-cysteinylo L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny. Temperatura topnienia 165°C (rozkład) $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -38^{\circ}$ (c = 2, dwumetyloformamid).

b) Azydek N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilu.

Do mieszaniny 111 g N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-fenylalaniny [Jaquenoud i Boissonnas, Helv. Chim. Acta 42 788 (1959)] 54 g chlorowodzianu estru metylowego L-fenylalaniny i 35 ml trójetyleaminy w 1250 ml acetonitrylu i 1000 ml pirydyny dodaje się 57 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i pozostawia na noc w temperaturze 20°C. Mieszaninę reakcyjną przesącza się i przesąc odparowuje następnie w próżni. Pozostałość przemywa się eterem naftowym i przekrystalizowuje z gorącego metanolu. Otrzymuje się 110 g estru metylowego N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalaniny (temperatura topnienia 163°C), który ogrzewa się w ciągu 2 godzin w temperaturze 60°C w roztworze 3500 ml metanolu i 88 ml wodzianu hydrazyny. Osad odsącza się i starannie przemywa wodą i metanolem. Otrzymuje się 91 g hydrazidu N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilu (temperatura topnienia 210°), który rozpuszcza się w mieszaninie 1100 ml dwumetyloformamidu, 830 ml izopropanolu i 69 ml 12-n wodnego roztworu kwasu solnego. Ochłodzony roztwór traktuje się 30 ml 5-n roztworu azotynu sodowego i po 10 minutach 4300 ml 0,2-n wodnego roztworu węglanu sodowego. Osad odsącza się, przemywa wodą i szybko suszy w próżni. Otrzymuje się 90 g azydku, który przerabia się natychmiast dalej.

c) Amid N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny.

50 g amidu N-karbobenzoksyl-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzylo-L-cysteinylo-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny rozpuszcza się w 400 ml nasyconego bromowodorem bezwodnego kwasu octowego i pozostawia w ciągu 1 godziny w temperaturze 20°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika w próżni w temperaturze poniżej 40°C pozostałość przemywa się starannie eterem dwuetylowym i traktuje roztworem 32 g azydku N-karbobenzoksyl-S-benzylo-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenyl-

loalanilu i 70 ml trójetiloaminy w 500 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia się na dwie doby w temperaturze 20°C, po czym zadaje się dwiema objętościami octanu etylu i przemycła starannie osad gorącym metanolem. Otrzymuje się 45 g amidu N-karbobenzoksy-S-benzyl-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylo-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny. Temperatura topnienia 222

$$^{\circ}\text{C} [\alpha]_{\text{D}}^{21} = -50^{\circ} \quad (c = 1; \text{dwumetyloformamid}).$$

Obliczono dla C ₇₅ H ₉₁ O ₁₅ N ₁₃ S ₃	C 59,6%
	H 6,1%
	O 15,9%
	N 12,1%
	S 6,4%
Znaleziono	C 59,4%
	H 6,4%
	O 16,0%
	N 11,7%
	S 6,5%

d) Amid L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-L-cysteinylo-L-prolilo-L-lizyloglicyny.

Roztwór 10 g amidu N-karbobenzoksy-S-benzyl-L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylo-L-prolilo-ε-N-p-toluenosulfonylo-L-lizyloglicyny w 2500 ml suchego ciekłego amoniaku zadaje się mieszając w temperaturze wrzenia roztworu taką ilością metalicznego sodu lub potasu, aż wystąpi trwałe niebieskie zabarwienie. Po dodaniu 1,8 g chloru amonowego roztwór odparowuje się do suchości. Pozostałość zawiera amid L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-L-dysteinylo-L-prolilo-L-lizyloglicyny.

e) Związek polipeptydowy o wzorze 1.

Pozostałość zawierająca amid L-cysteinylo-L-fenylalanilo-L-fenylalanilo-L-glutaminylo-L-asparaginylo-L-cysteinylo-L-prolilo-L-lizyloglicyny rozpuszcza się w 20 l 0,01-n kwasu octowego i przy wartości pH 6,5 — 9,0 utlenia za pomocą powietrza lub tlenu w ciągu godziny. Roztwór, który zawiera substancję o wzo-

rze 1 doprowadza się do wartości pH 4,0 — 5,0 i po dodaniu 100 g chlorku sodowego odparowuje się do suchości, przy czym otrzymuje się suchy trwały proszek. Może być on przechowywany i przy użyciu klarownie się rozpuszcza. Można jednak stosować roztwór bezpośrednio ewentualnie po rozcieńczeniu wodą lub roztworem kwasu solnego.

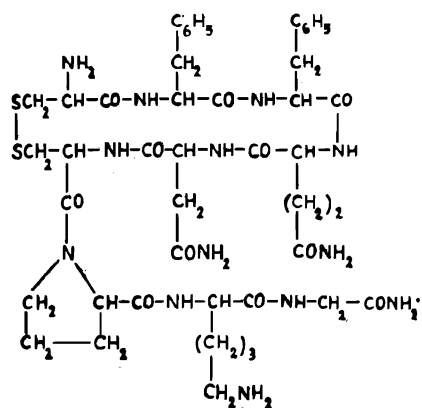
Przykład II. Postępuje się jak w przykładzie I, z tą różnicą, że utlenianie prowadzi się za pomocą 15 ml 1-n roztworu nadtlenu wodoru w wodzie przy wartości pH 4,0 — 6,0 zamiast utleniania za pomocą powietrza.

Zastrzeżenia patentowe

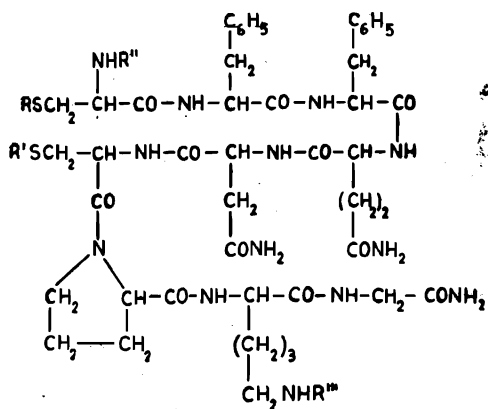
1. Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o działaniu zwężającym naczynia o wzorze 1, znamieny tym, że pochodną nonapeptydu o wzorze 2, w którym R i R' oznaczają grupy wprowadzone dla ochrony grup merkaptu, a R'' i R''' grupy wprowadzone dla ochrony grup aminowych, przekształca się przez redukcję metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku w liniowy nonapeptyd o wzorze 3, który następnie przeprowadza się w produkt końcowy o wzorze 1 przez utlenienie w wodnym roztworze.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że utlenienie nonapeptydu o wzorze 3 do polipeptydu o wzorze 1 prowadzi się za pomocą powietrza.
3. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że utlenienie nonapeptydu o wzorze 3 do polipeptydu o wzorze 1 prowadzi się za pomocą tlenu.
4. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że utlenienie nonapeptydu o wzorze 3 do polipeptydu o wzorze 1 prowadzi się za pomocą nadtlenu wodoru.
5. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że do redukcji w ciekłym amoniaku jako metal alkaliczny stosuje się potas.

SANDOZ A. G.

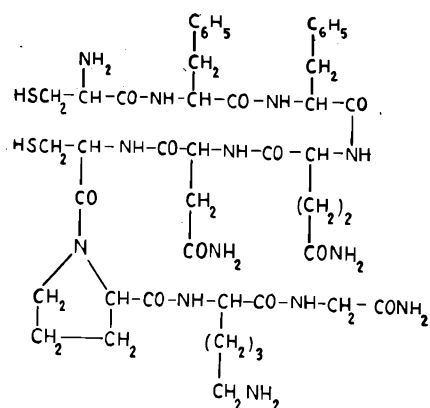
Zastępca: dr Andrzej Au
rzecznik patentowy



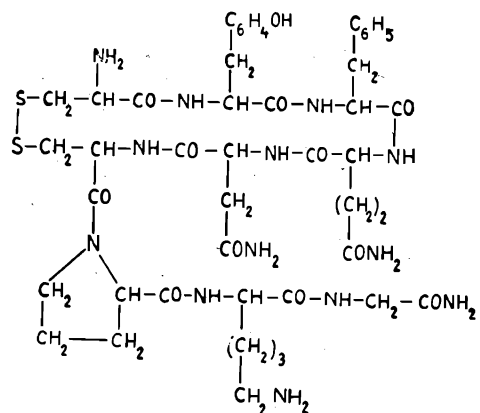
Wzór 1



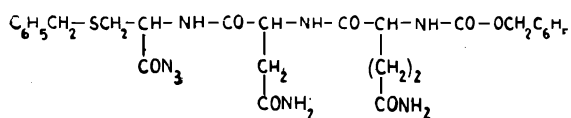
Wzór 2



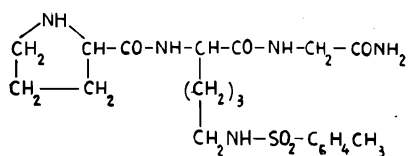
Wzór 3



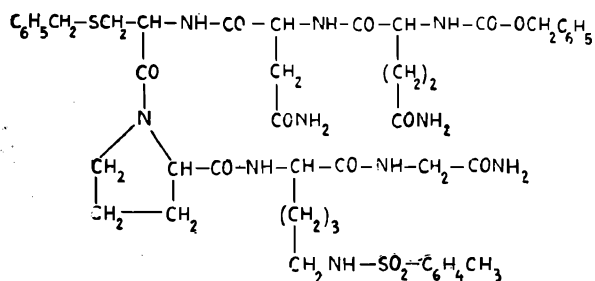
Wzór 4



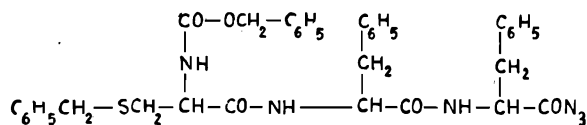
Wzór 5



Wzór 6



Wzór 7



Wzór 8