



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 29.VIII.1964 (P 105 595)

Pierwszeństwo: 30.VIII.1963 Szwajcaria

Opublikowano: 5.I.1967

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

UKD

BIBLIOTEKA

Urzędu Patentowego
Państwa Republiki Ludowej

Współtwórcy wynalazku: dr Rene Huguenin, Fr. Roger Boissonnas, dr
Botond Berde, dr Walter Schlach

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

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1.

Według wynalazku polipeptyd ten otrzymuje się w ten sposób, iż z pochodnej nonapeptydu o ogólnym wzorze 4, w którym R' oznacza resztę stosowaną w syntezie peptydów do ochrony grupy aminowej a R'' oznacza resztę stosowaną w syntezie peptydów do ochrony grupy merkaptu, odszczepia się grupy ochronne R' i R'' jednostopniowo lub wielostopniowo, tak otrzymany nonapeptyd o wzorze 5 utlenia do polipeptydu o wzorze 1 i związek ten przeprowadza ewentualnie w sole addycyjne za pomocą organicznych lub nieorganicznych kwasów.

Pochodną nonapeptydu o ogólnym wzorze 4 można otrzymać według metod znanych w syntezie polipeptydów, przy czym aminokwasy łączy się w kolejności podanej we wzorze 4 osobno albo po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszej częstotliwości.

Według wynalazku pochodne nonapeptydu o ogólnym wzorze 4 można wytwarzać w ten sposób, że pochodną heksapeptydu o ogólnym wzorze 2, w której R' i R'' mają wyżej podane znaczenie, kondensuje się z zdolną do reakcji pochodną wolnego kwasu o wzorze ogólnym 3 w którym R' i R'' mają wyżej podane znaczenie.

Według wynalazku do przejściowego zablokowania grupy aminowej można stosować używane zwykle do tego celu grupy na przykład grupę karbobenzoksylową albo karbo-p-chlorobenzoksylową

2

wą, p-toluenosulfonylową albo trójfenylo-metylową. Do ochrony grupy merkaptu korzystnie stosuje się grupę benzylową, p-chlorobenzylową albo p-ksyliową. Korzystnie jest zwłaszcza stosować reszty benzylowe. Pochodną nonapeptydu o ogólnym wzorze 4 można wytwarzać nie tylko w sposób wyżej opisany, lecz również przez kondensację dwóch innych polipeptydów, lub jednego polipeptydu i jednego aminokwasu w postaci ich chronionych pochodnych.

Produkty wyjściowe do wytworzenia pochodnej nonapeptydu o wzorze 4 otrzymuje się, o ile nie były one jeszcze dotychczas znane, metodami znanymi w chemii peptydów, przy czym łączy się ze sobą poszczególne aminokwasy, ewentualnie po uprzednim wytworzeniu peptydów o mniejszych częstotliwościach.

Utlenienie nonapeptydu o wzorze 5 dożądanego produktu końcowego o wzorze 1 można prowadzić w roztworze wodnym lub wodno-organicznym np. wodno-alkoholowym przy pH 4—9, korzystnie przy pomocy nadtlenu wodoru albo żelazicyjanku potasu albo przez wprowadzenie powietrza lub tlenu.

Otrzymany polipeptyd o wzorze 1 można przeprowadzić znanym sposobem za pomocą kwasów nieorganicznych albo organicznych w sól addycyjną. Jako kwasy stosuje się na przykład kwas solny, kwas bromowodorowy, kwas siarkowy, kwas fumarowy, kwas jabłkowy, kwas maleinowy, kwas octowy i kwas winowy.

Polipeptyd o wzorze 1 otrzymany według wynalazku różni się od naturalnych wazopresyn, tym, iż zamiast lizyny (wazopresyna świni) lub argininy (wazopresyna wołu) zawiera ornitynę, zamiast fenyloalaniny zawiera izoleucynę, a zamiast tyrozyny zawiera fenyloalaninę. Od oksytocyny polipeptyd o wzorze 1 różni się tym, że zamiast tyrozyny zawiera fenyloalaninę i zamiast leucyny ornitynę. Nowy polipeptyd o wzorze 1 można przeto nazwać fen²-orn²-oksytozyną.

Posiada on podobne do naturalnych wazopresyn działanie zwężające naczynia krwionośne, lecz w przeciwieństwie do naturalnych wazopresyn nie zawiera prawie zupełnie składników działających antydiuretycznie, a w odróżnieniu od naturalnej oksytocyny brak jest składnika działającego oksytotycznie tak, iż wytworzony sposobem według wynalazku polipeptyd o wzorze 1 może być stosowany w leczeniu jako substancja o selektywnym działaniu zwężającym naczynia. Efekt ten można osiągnąć przez bezpośrednie oddziaływanie na mięśnie naczyń, dzięki czemu polipeptyd o wzorze 1, w przeciwstawieniu do adrenaliny i noradrenaliny nie powoduje ubocznego działania na wegetatywny układ nerwowy.

Nowy polipeptyd o wzorze 1 stosuje się głównie w profilaktyce i leczeniu krwotoków tkankowych, przy czym infiltracja tkanki przez polipeptyd powoduje silną jej anemizację.

Polipeptyd znajduje zwłaszcza korzystne zastosowanie przy chirurgicznych zabiegach w leczeniu gardła, nosa i uszu, ginekologii, położnictwie, urologii i przy leczeniu zębów. Bardzo dobre własności lecznicze wykazuje mieszanina nowego polipeptydu o wzorze 1 z środkiem lokalnie znieczulającym.

Wiadomo, iż przez połączenie adrenaliny z środkiem znieczulającym o działaniu miejscowym, można osiągnąć dłuższe działanie znieczulające oraz obniżenie miejscowego przekrwienia, a zatem zmniejszenie upływu krwi w czasie chirurgicznego zabiegu. Z uwagi na znane ogólne uboczne działanie adrenaliny na krążenie, na przykład nagły wzrost ciśnienia krwi, podwyższenie częstotliwości rytmu serca, wtórny spadek ciśnienia krwi, zapaść oraz z uwagi na oddziaływanie na centralny układ nerwowy (wzmoczone napięcia i podniecenia), jak również często obserwowane reaktywne hiperemie wskutek zwiększenia lokalnej przemiany materii, zalecono ostatnio stosowanie wazopresyny zamiast adrenaliny albo stosowanie peptydów podobnych do wazopresyny łącznie z środkiem znieczulającym. Na przykład zalecono stosowanie fen²-liz²-wazopresyny, to jest syntetycznego analogu lizyno-wazopresyny, w którym w położeniu 2 znajduje się zamiast tyrozyny reszta fenyloalaniny.

Obecnie stwierdzono, iż przez zmieszanie nowego polipeptydu o wzorze 1 z środkiem znieczulającym działającym miejscowo można znieczulić miejscowo przedłużyć wielokrotnie w porównaniu z dotychczas znanymi mieszaninami adrenaliny, wazopresyny albo peptydów podobnych do wazopresyny z środkami lokalnie znieczulającymi. Potrzebna do tego celu ilość nowego polipeptydu o wzorze 1 jest znacznie mniejsza od innych podobnych do wazo-

presyny peptydów, a nawet mniejsza niż adrenalina.

Dzięki zwiększonej lokalnej aktywności w działaniu zwężającym naczynia nowy polipeptyd o wzorze 1 w połączeniu z środkiem działającym lokalnie znieczulająco jest również szczególnie wskazany do zmniejszenia lokalnego przekrwienia i utraty krwi w czasie zabiegu chirurgicznego. Do powyższych mieszanin stosuje się korzystnie środki lokalnie znieczulające, które wykazują dobrą rozpuszczalność w wodzie i nadają się do przyrządzania stabilnych roztworów, które można sterylizować.

Otrzymany sposobem według wynalazku dotychczas nieznanym polipeptyd o wzorze 1 może mieć postać wolnej zasady albo postać soli z organicznym lub nieorganicznym kwasem. Można go stosować jako środek leczniczy w postaci czystej, albo w postaci nadającej się do podawania jelitowego, pozajelitowego albo donosowego. W celu otrzymania leków w odpowiednich postaciach miesza się go z nieorganicznymi lub organicznymi farmakologicznie obojętnymi środkami pomocniczymi. Jako środki pomocnicze stosuje się na przykład do tabletek i drażetek cukier mlekowy, skrobię, talk, kwas stearynowy itp., do wyrobu syropów roztwory cukru trzcinowego, inwertowanego, glukozy i inne, do preparatów do iniekcji wodę, alkohole, glicerynę, roślinne oleje itp., do czopków stosuje się naturalne lub utwardzone oleje i woski itp. do donosowych inhalacji wodę, glicerynę albo inne ciekłe środki odpowiednie dla błony śluzowej. Ponadto można dodawać do preparatów środki konserwujące, stabilizujące, ułatwiające rozpuszczalność, środki słodzące, barwniki, substancje aromatyzujące itp. W poniższych przykładach podano temperatury w stopniach Celsjusza.

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

104 g N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornityny i 27 g estru etylowego glicyny rozpuszcza się w 450 ml acetonitrylu, chłodzi w temperaturze 0° i dodaje 51 g dwucyklo-heksylokarbodwuimidu i wstrząsa w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Wydzielony dwucykloheksylomocznik odsącza się i przemywa acetonitrylem. Przesącz odparowuje się w próżni. Pozostałość krystalizuje po dodaniu eteru naftowego. Po przekrystalizowaniu z n-propanolu otrzymuje się ester etylowy N- α -karbobenzoksy-N- δ -p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny o temperaturze topnienia 136° [α]_D²² = -7° (96 procentowy etanol).

b) amid N-karbobenzoksy-L-prolino-N- δ -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 przez jedną godzinę w temperaturze 20°, odparowuje w próżni przy temperaturze niższej niż 40° i przemywa pozostałość starannie eterem dwuetylowym. Pozostałość rozpuszcza się w 500 ml acetonitrylu, dodaje 25 ml trójetyloaminy i 43 g N-karbobenzoksy-L-proliny, chłodzi w temperaturze 0°, dodaje jeszcze 35,5 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i wstrząsa przez noc w temperaturze 20°. Po odsączeniu dwucyklo-

heksylomocznika zagęszcza się przesącz w próżni w temperaturze 30°, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i powyższy roztwór przemycia rozcieńczonym kwasem siarkowym i roztworem wodnym amoniaku. Po wysuszeniu nad siarczanem sodowym odparowuje się octan etylu w próżni i pozostałość rozpuszcza w 1 litrze absolutnego etanolu. Roztwór chłodzi się w temperaturze 0°, nasycza amoniakiem i pozostawia przez noc w temperaturze 20°C. Po odparowaniu w próżni w temperaturze 30° rozpuszcza się pozostałość w 100 ml dwumetyloformamidu i przez dodanie 1500 ml octanu etylu poddaje krystalizacji. Otrzymuje się amid N-karbobenzoksyl-L-prolylo-N-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo - glicyny, temperatura topnienia 122° (rozkład). $[\alpha]_D^{22} = -46^\circ$ (95% kwas octowy lodowaty).

c) amid -N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-propyl-L-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

100 g N-karbobenzoksyl-L-propyl-L-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny rozpuszcza się w 500 ml bezwodnego kwasu octowego nasyczonego bromowodorem, pozostawia przez godzinę w temperaturze 20° i odparowuje w próżni w temperaturze niższej niż 40°. Pozostałość przemycia się starannie eterem dwuetylowym i następnie dodaje do roztworu 100 g azydku N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinylowego, i 26 ml trójetylloaminy w 1000 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia się przez noc w temperaturze 20°, dodaje 3000 ml octanu etylu, sączy osad i przemycia octanem etylu. Otrzymuje się amid N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-propyl-L-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny. Temperatura topnienia 188° (rozkład) $[\alpha]_D^{20} = -33$ (dwumetyloformamid).

d) amid N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-propyl-L-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny.

50 g amidu N-karbobenzoksyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolylo-N-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny rozpuszcza się w 250 ml bezwodnego kwasu octowego nasyczonego bromowodorem i pozostawia w ciągu jednej godziny w temperaturze 20°. Po odparowaniu rozpuszczalnika w próżni w temperaturze poniżej 40° przemycia się pozostałość starannie dwuetyletem i zadaje roztworem zawierającym 31,1 g azydku N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyny i 7,5 ml trójetylloaminy w 250 ml dwumetyloformamidu. Całość pozostawia w ciągu 2 dni w temperaturze 20°, zadaje 1000 ml octanu etylu i przemycia osad octanem etylu. Po wysuszeniu w próżni w temperaturze 30° przemycia się produkt ciepłym metanolem. Otrzymuje się amid N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-propyl-L-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny, temperatura topnienia 242° $[\alpha]_D^{21} = -40^\circ$ (dwumetyloformamid).

e) Amid L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izo-

leucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-L-cysteinyl-L-propyl-L-ornitylo-glicyny.

Roztwór 5 g amidu N-karbobenzoksyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolylo-N-δ-p-toluenosulfonylo-L-ornitylo-glicyny w 1200 ml suchego ciekłego amoniaku zadaje się mieszając w temperaturze wrzenia roztworu taką ilością sodu albo potasu, aż powstanie trwałe niebieskie zabarwienie. Po dodaniu 3 g chlorku amonu odparowuje się roztwór do sucha. Pozostałość zawiera amid-L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-L-cysteinyl-L-propyl-L-ornitylo-glicyny.

f) fe²⁺-orn⁸-oksytocyna.

Pozostałość zawierającą amid L-cysteinyl-L-fenyl-L-alanyl-L-izoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-L-cysteinyl-L-prolylo-L-ornitylo-glicyny rozpuszcza się w 5 litrach 0,01 kwasu octowego i przy wartości pH 6,5—8,0 utlenia przez przepuszczanie powietrza albo tlenu w ciągu jednej godziny w temperaturze 0—40°. Roztwór doprowadza się do pH 4,0—5,0 i odparowuje do sucha po dodaniu 50 g chlorku sodu albo 0,64 g kwasu metanosulfonowego albo 0,76 g kwasu trójfluorooctowego, przy czym otrzymuje się suchy proszek, który jest trwały. Można go przechowywać i przy użyciu rozpuścić, otrzymując klarowny roztwór. Można również zastosować roztwór wprost, względnie po rozcieńczeniu wodą albo roztworem soli. W celu usunięcia nieorganicznych soli można wyżej wymieniony proszek po dodaniu kwasu trójfluorooctowego poddać rozdzielni przeciwprądowej w mieszaninie drugorzędowego butanolu, wody i kwasu trójfluorooctowego (120/160/1). Po 200 stopniach przenoszenia substancja znajduje się w rurkach 47—66, przy czym maksimum znajduje się w rurce 56 (K=0,39). Po odparowaniu otrzymuje się z dobrą wydajnością czynny polipeptyd w postaci hygroscopijnego trójfluorooctanu, który migruje przy chromatografii i przy elektroforezie papierowej przy pH 5,8 i 40 V/cm: 49 mm w ciągu 60 minut (histydyna użyta w celach porównawczych wędruje 65 mm). Migracja w elektroforezie papierowej przy pH 1,9 i napięciu 40 V/cm wynosi 68 mm w ciągu 60 minut (w celach porównawczych użyty tryptofan wędruje 66 mm). R_f przy chromatografii papierowej w układzie alkohol izoamylowy (pirydyna) woda 35/33/30 wynosi 0,25. Całkowita hydroliza (16 godzin, 110°, 6N/HCl) daje następujące aminokwasy w równocząsteczkowych ilościach: cystyna, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, prolina, ornityna, glicyna, fenylalanina i izoleucyna. Produkt posiada następujące działanie biologiczne: 120 jednostek międzynarodowych (mg na ciśnienie krwi szczura, 0,6 na zahamowanie diurezy szczura i około 1 jednostki międzynarodowej) mg na macicę szczura.

Przykład II. Postępuje się jak w przykładzie I. Utlenia się jednak pod koniec w temperaturze 0—40°, dodając 7,5 ml 1 normalnego roztworu nadtlenu wodoru w wodzie przy pH 4,0—9,0 (zamiast utleniać w strumieniu powietrza albo tlenu).

Przykład III. Postępuje się jak w przykładzie

dzie I, lecz pod koniec procesu utlenianie prowadzi się w temperaturze 0—35° przez dodanie 6,7 ml 1 normalnego wodnego roztworu żelazocyjanku potasu (pH 5,5—7,5).

Dalsze przykłady dotyczą sposobu otrzymywania preparatów farmaceutycznych z polipeptydów wytwarzanych sposobem według wynalazku.

Przykład IV. Roztwór do znieczulania infiltracyjnego:

fe ² -orn ⁸ -oksytocyna	0,0005 g
chlorowodorek 2-dwuetyloamino-2'6'-acetoksylicydu (chlorek lidokainy)	5,0 g
alkohol trójchloroizobutylový	5,0 g
alkohol etylowy 94%	5,0 g
kwasy octowe lodowate	1,0 g
octan sodowy trójwodny	2,0 g
woda destylowana	ad 1000 ml

Otrzymywanie: kwas octowy lodowaty i octan sodu rozpuszcza się w 900 ml destylowanej wody, dodaje silnie mieszając roztwór alkoholu trójchloroizobutylový w 94 procentowym alkoholu etylowym, miesza aż całość się rozpuści, dodaje chlorek lidokainy i fe²-orn⁸-oksytocynę po uprzednim rozpuszczeniu, dopełnia wodą do 1000 ml, sączy przez filtr bakteryjny i napełnia ampułki.

Przykład V. Roztwór do znieczulania przewodowego:

fe ² -orn ⁸ -oksytocyna	0,001 g
chlorowodorek p-aminobenzoilo-dwuetyloamino-etanolu (chlorowodorek nowokainy)	10,0 g
fosforan dwusodowy bezwodny	2,0 g
kwas cytrynowy jednowodny	3,0 g
woda destylowana	ad 1000 ml

Otrzymywanie: rozpuszcza się podczas mieszania w 900 ml wody kwas cytrynowy, fosforan dwusodowy oraz chlorowodorek nowokainy, dodaje fe²-orn⁸-oksytocynę, dopełnia do 1000 ml, sączy przez filtr membranowy, napełnia ampułki i sterylizuje przez ogrzewanie w ciągu 6 minut do temperatury 120°.

Przykład VI. Roztwór do znieczulania powierzchniowego:

fe ² -orn ⁸ -oksytocyna	0,002 g
metylsulfonian estru β-dwuetyloamino-β-izobutylo-etylowego kwasu p-aminobenzoowego (metylsulfonian leucynokainy)	100 g
kwas octowy lodowaty	20 g

octan sodowy trójwodny	20 g
p-hydroksybenzoesan propylu	1,0 g
p-hydroksybenzoesan metylu	2,0 g
woda destylowana	ad 1000 ml

Otrzymywanie: rozpuszcza się w 800 ml wody destylowanej p-hydroksybenzoesan propylu i p-hydroksybenzoesan metylu jak również kwas octowy lodowaty i octan sodowy, dodaje metylsulfonian leucynokainy i po rozpuszczeniu fe²-orn⁸-oksytocynę. Po dopełnieniu do 1000 ml postępuje się dalej analogicznie jak w przykładzie IV.

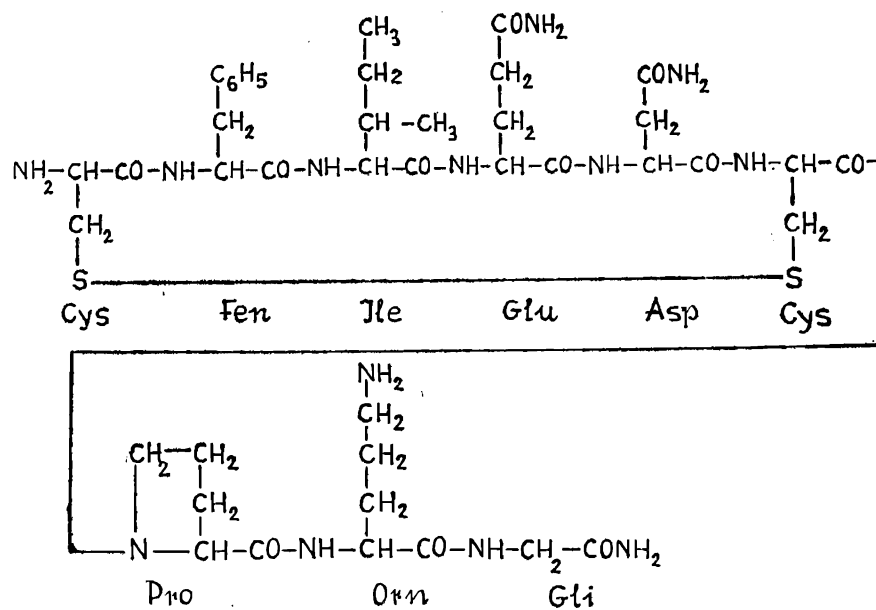
Przykład VII. Roztwór do znieczulania powierzchniowego:

fe ² -orn ⁸ -oksytocyna	0,001 g
chlorowodorek (±/-N-2-propyloaminopropionyl)-2-toluidyny (eksadryna)	30,0 g
chlorek sodowy	8,0 g
octan sodowy trójwodny	1,0 g
kwas octowy lodowaty	0,5 g
p-hydroksybenzoesan metylu	1,0 g
woda destylowana	ad 1000 ml

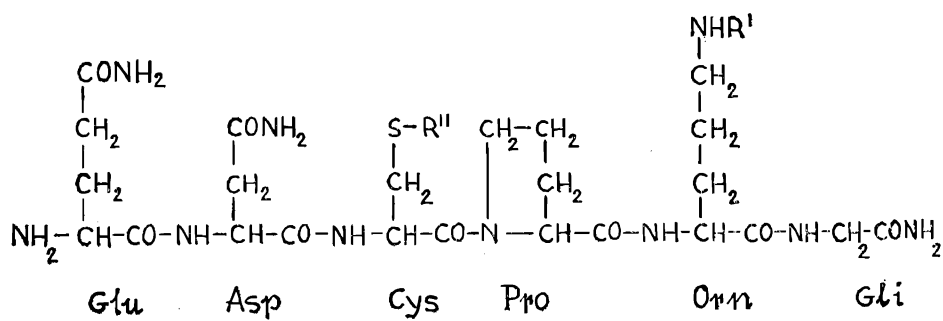
Otrzymywanie: rozpuszcza się w 800 ml wody p-hydroksybenzoesan metylu, dodaje chlorek sodowy i kwas octowy lodowaty oraz octan sodowy, dodaje chlorowodorek (±/-N-2-propyloaminopropionyl)-2-toluidyny, a po rozpuszczeniu fe²-orn⁸-oksytocynę. Po dopełnieniu wodą do 1000 ml postępuje się dalej analogicznie jak w przykładzie IV.

Zastrzeżenia patentowe

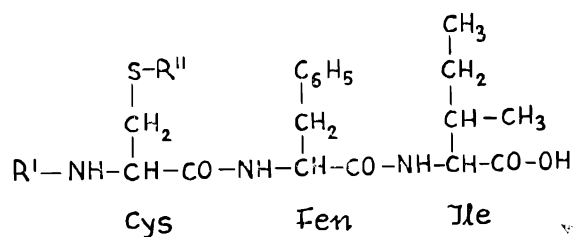
1. Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze 1, **znamienny tym**, że nonapeptyd o wzorze 5 utlenia się w roztworze wodnym lub wodno-organicznym przy wartości pH = 4—9, a otrzymane związki o wzorze 1 ewentualnie przeprowadza się znanym sposobem w sole addycyjne.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się powietrze.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się tlen.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się nadtlenek wodoru.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek utleniający stosuje się żelazicyjanek potasowy.



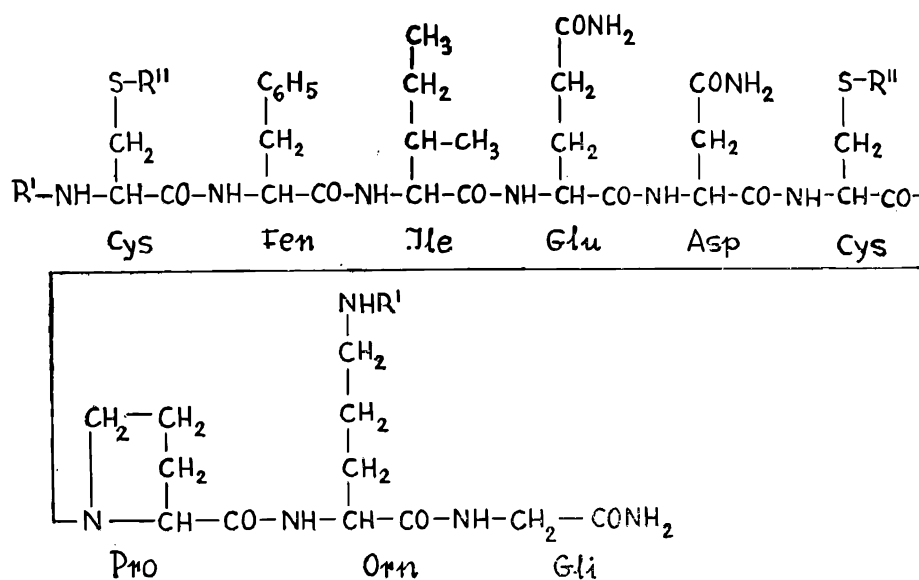
Wzór 1



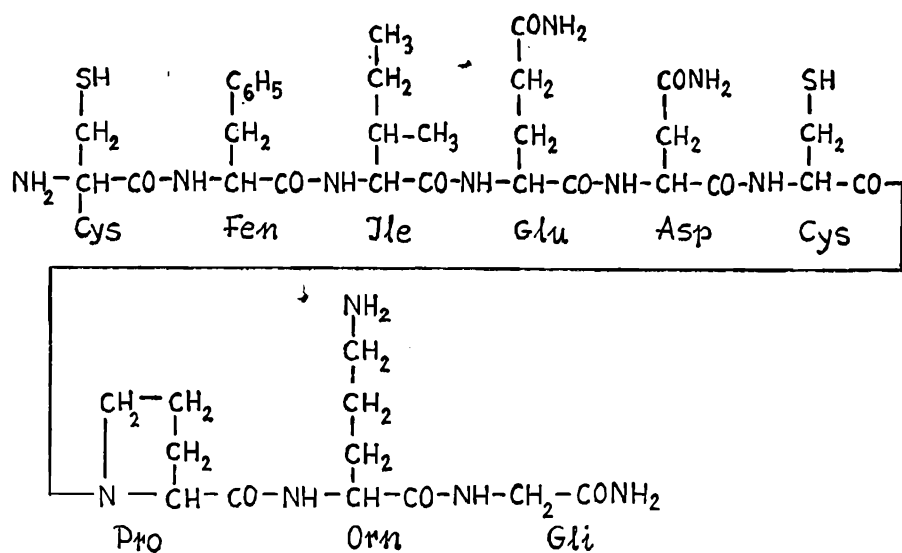
Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5