NORGE

Utlegningsskrift nr. 115 215

Int. Cl. C 07 c 103/52 Kl. 12 q-6/01

Patentsøknad nr. 154 730 Inngitt 11. september 1964

Søknaden alment tilgjengelig fra 1. juli 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 2. sept. 1968

Prioritet begjært fra: 13/9-63 Sveits, nr. 11 358/63

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Sandoz A.G., Basel, Sveits.

Oppfinnere: Dr. Roger Boissonnas, Bottmingen,
Dr. Stephan Guttmann, Allschwil, og
Dr. Janos Pless, Basel, Sveits.

Fullmektig: Siv.ing. Karsten B. Halvorsen.

Fremgangsmåte for fremstilling av et nytt, terapeutisk aktivt tetracosapeptid.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et nytt terapeutisk aktivt tetracosapeptid med formel: L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenyl-alanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin og dets syreaddisjonssalter med organiske eller uorganiske syrer. Det særegne ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er angitt i den karakteriserende del av patentkravet.

En eksempelvis utførelsesform for fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen går ut på at man fremstiller det beskyttede nye tetracosapeptid med formel R-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-γ-O-tert.-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-N-formyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-tert.-butylester, hvori R betyr en i peptidkjemien for beskyttelse av frie aminogrupper anvendt gruppe, og avspalter beskyttelsesgruppene i ett eller flere trinn i surt miljø, idet det herunder med fordel gås frem på den måte at det som R anvendes en karbobenzoksy-, en acetyl-, en formyl- en karbotert.-butoksy-, en p-nitrokarbobenzoksy- eller en trifenylmetylgruppe.

Eksempelvis kan det nye tetracosapeptid med formel L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-propyl-L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin fremstilles ved at man behandler et heptapeptidderivat med formelen N-karbobenzoksy-L-valyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-ε-N-formyl-L-lysyl-N-tosyl-L-arginyl-N-tosyl-L-arginyl-L-

prolin med natrium i tørr flytende ammoniakk, kondenserer det erholdte L-valyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-pyrolin med N-R-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-γ-O-tert.-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-prolin, hvori R betyr en passsende beskyttelsesgruppe, fortrinnsvis en karbobenzoksy-, en acetyl-, en formyl-, en karbotert.butoksy-en p-nitrokarbobenzoksy- eller en trifenylmetylgruppe, deretter omsetter det oppståtte R-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-γ-O-tert.-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolin, hvori R har den ovennevnte betydning, med L-valyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-tert.-butylester og tilslutt avspalter samtlige beskytelsesgrupper i det beskytede nye tetracosapeptid med formelen R-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-γ-O-tert.-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-ε-N-formyl-L-lysyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-ε-N-formyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-tert.-butylester, hvori R har den ovennevnte betydning, i ett eller flere trinn i surt miljø.

Utgangsproduktene for fremstilling av det tidligere ukjente tetracosapeptidderivat med den ovennevnte formel kan, i den utstrekning de tidligere ikke er kjent, fremstilles etter de i peptidkjemien bekjente metoder, hvori aminosyrene knyttes til hverandre enkeltvis eller etter foregående dannelse av mindre peptidenheter.

Det i henhold til fremgangsmåten erholdte nye tetracosapeptid lar seg også utvinne henhv. anvende i form av dets salter. Som salter kommer på tale salter med organiske syrer, som eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, melkesyre, pyrodruesyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzoesyre, kanelsyre, salicylsyre, 2-fenoksy-eller 2-acetoksybenzoesyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, hydroksyetansulfonsyre, benzen- eller toluensulfonsyre, naftalinsulfonsyre, sulfanilsyre, såvel som polymere syrer som garvesyre, alginsyre, polygalacturonsyre eller karboksymetylcellulose og salter med uorganiske syrer, som halogenhydrogensyrer, f. eks. saltsyre eller bromhydrogensyre, salpetersyre, tiocyansyre, svovelsyre og fosforsyre.

Det ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremstilte tetracosapeptid og dets salter har de samme biologiske og terapeutiske egenskaper som det naturlige corticotropin (ACTH). Således kan det f. eks. anvendes ved behandling av leddreumatisme, bronkialastma, artritis, allergier, gikt, urtikaria, anafylaktisk sjokk, colitis ulcerosa, lupus erytematodes, forbrenninger, dermatitis eksfoliativa, lymfatisk leukomi, sklerodermi, eksem, intoksikasjonstilstander ved kronisk alkoholisme såvelsom for forhindring av binyrebarkatrofi ved behandling med kortisonderivater. Det har den samme virksomhet som naturlig corticotropin målt etter Sayer's metode.

Mens det naturlige corticotropin bare kan renses ved omstendelige og dyre metoder og praktisk talt alltid vil inneholde høymolekylære, eggehvitestoffaktige forurensninger, som kan forårsake farlige anafylaktiske reaksjoner, kan den nye syntetiske forbindelse fås direkte med høy renhetsgrad og uten noen som helst forurensning av eggehvitestoffaktige stoffer. Videre er fremstillingen av den nye syntetiske forbindelse uavhengig av tilgangen på hypofysekjertler, som bare kan fås i begrenset mengde og er meget dyre.

En særlig fordel er det at det nye tetracosapeptid i 4 stillingen til forskjell fra den tidligere kjente forbindelse L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-propyl-L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin og det naturlige ACTH ikke inneholder en metioninrest, som som bekjent er lett oksyderbar og derved overfører de nevnte stoffer i en inaktivert form, men derimot inneholder en norleucinrest som har de samme steriske egenskaper som metioninresten, men som i motsetning til denne er bestandig mot oksydasjon.

Den nye forbindelse kan i likhet med naturlig ACTH tilføres i form av et depotpreparat, f. eks. med gelatin, karboksymetoksycellulose, galakturonsyre eller andre sure grupper inneholdende polymerstoffer.

Det anvendes de følgende forkortelser:

CBO	Carbobenzoksy
Tri	Trityl = Trifenylmethyl
(For)	Formyl (på ε-aminogruppen i lysinet)
(Tos)	Tosyl = p-toluensulfonyl (på guanidogruppen i argininet)
ÓCF	2,4,5-triklorfenoksy
OTB	tert. butyloksy
Arg	L-arginyl
Glu	L-glutamyl
Gly	glycyl
His	L-histidyl
Lys	L-lysyl
Nle	L-norleucyl
Fe	L-fenylalanyl
Pro	L-prolyl
Ser	L-seryl
Try	L-tryptofanyl
Tyr	L-tyrosyl
Val	L-valyl
Leu	L-leucyl
Ala	L-alanyl

Det følgende eksempel 1 angår fremstilling av et mellomprodukt, mens eksempel 2 angår fremstilling av det angitte tetracosapeptid.

Eksempel 1 (se formelen på vedføyde formelblad.)

a) *H-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-OH*

12 g CBO-Val-Gly(For)Lys-(For)Lys-(Tos) Arg-(Tos) Arg-Pro-OH løses i 51 tørr flytende

ammoniakk og tilsettes under kraftig omrøring natriumbiter til varig, dypblå farging. 2 g ammoniumklorid tilsettes, ammoniakken avdampes, resten tørres i høyvakuum og løses i 250 ccm 0,2-n eddiksyre. De uorganiske salter fjernes ved den metode som er kjent fra Dixon (Bikjem. Biofys. Acta, *34*, 251 (1959)), den saltfrie oppløsning inndampes, resten løses i metanol og utfelles med etyleter. Det erholdes H-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-OH-acetat.

$[\alpha]_D^{22}$ = —49° i 1-n eddiksyre.

b) *H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)-Lys-Pro-OH*

10 g CBO-His-Fe-(Tos)Arg-Try-Gly-(For) Lys-Pro-OH løses i 51 tørr, flytende ammoniakk, tilsettes natriumstykker til varig blå farging, tilsettes ammoniumklorid, løsningen inndampes, resten løses i 0,2-n eddiksyre, de uorganiske salter fjernes etter Dixon (Biokjem. Biofys.Aca *34*, 251(1959)), den saltfrie løsning inndampes, resten løses i metanol og utfelles med etylester. Det fås H-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-OH-monoacetat, (smeltepunkt 180° C. $[\alpha]_D^{22}$ = —25° i 1-n eddiksyre) som man løser opp i 50 ccm dimetylformamid sammen med 4 g CBO-Glu(OTB)-OCF. Man lar det hele stå i 2 døgn ved romtemperatur, tilsetter etyleter, filtrerer og får ut 7,1 g CBO-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-OH, som man løser i 200 ccm dimetylformamid og hydrogenerer i nærvær av en palladiumkatalysator. Etter filtrering og vasking med etyleter får man H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-OH-acetat. (Smeltepunkt 190°C. $[\alpha]_D^{22}$ = —19° i 1-n eddiksyre).

c) *Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-OH*

6 g H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For) Lys-Pro-OH-acetat og 6 g Tri-Ser-Tyr-Nle-N_3 løses i 50 ccm dimetylformamid, det hele får stå i 16 t, avdampes og resten krystalliseres fra varm metanol. Det fås 5,1 g Tri-Ser-Tyr-Nle Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-OH-acetat (smeltepunkt) 220°C. $[\alpha]_D^{22}$ = —23° i dimetylformamid). Dette løses i 50 ccm dimetylformamid og tilsettes 1 g trimetyleddiksyre. Det inndampes i høyvakuum til det halve volum, avkjøles til —5°C, tilsettes 0,36 trimetylacetylklorid og 0,3 g trimetylamin. Etter 10 min. tilsettes en oppløsning av 2,8 g H-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-OH-acetat og 0,3 ccm trietylamin i 200 ccm dimetylformamid. Det hele får stå i 4 t og felles med aceton. Det fås Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-Val-Gly-(For)Lys-(For) Lys-Arg-Arg-Pro-OH-trimetylacetat, som kan renses vel filtrering gjennom en kiselsyregel i 50 pst. vandig metanol.

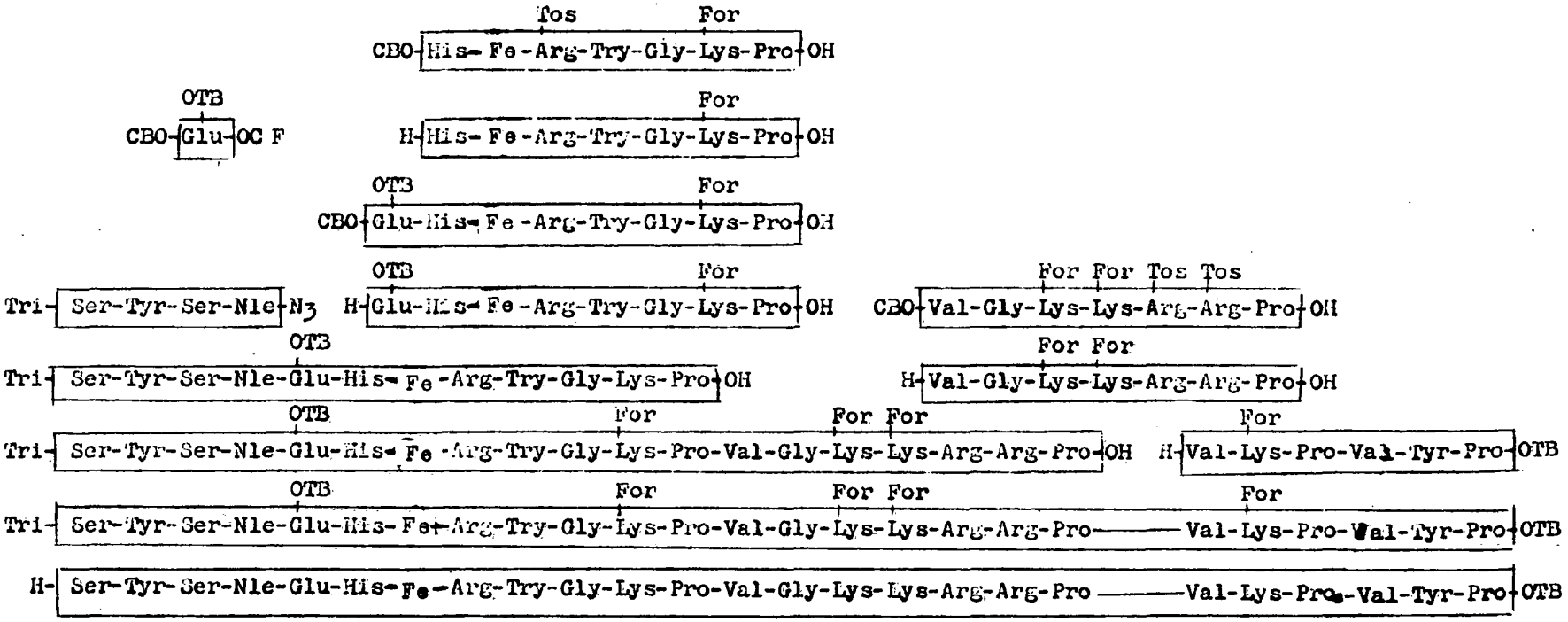
Eksempel 2

4 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-OH løses i 40 ccm dimetylformamid, tilsettes 40 ccm pyridin og 0,6 g toluensulfonsyre, inndampes i høyvakuum til det halve volum, avkjøles til —5°C, tilsettes en oppløsning av 4 ekvivalenter H-Val-(For)Lys-Val-Tyr-Pro-OTB og 1 g dicykloheksylkarbodiimid.

Det hele får stå over natten og tilsettes aceton. Det filtreres, tørres i høyvakuum og fås ut 4 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Try-Gly-(For)Lys-Pro-Val-Gly-(For)Lys-(For)Lys-Arg-Arg-Pro-Val-(For)Lys-Val-Tyr-Pro-OTB, som oppvarmes i 3 l 0,1-n saltsyre i 3 t ved 100°C i fravær av oksygen. Det inndampes i vakuum, resten vaskes med aceton og etyleter og tørres i vakuum. Etter en motstrømfordeling i systemet trifluoreddiksyre/sek.butanol/vann (1:120:160) fås 2,5—3,0 av en hovedfraksjon som fremviser samme virksomhet som corticotropin, og som forholder seg homogen ved kromatografi og elektroforese. Migrasjonen ved papirelektroforese ved pH 5,8 og 40v/cm er 60 mm (det som referanse anvendte histidin vandrer 70 mm). Migrasjonen ved papirelektroforese ved pH 1,9 og 40 V/cm er 93 mm (den som referanse anvendte glutaminsyre vandrer 81 mm under de samme betingelser). Det fås et polypeptid med formelen H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OH. Dette gir ved sur hydrolyse ved 110°C i 16 t den følgende aminosyresammensetning: $Ser_{2,9}Tyr_{2,0}Nle_{1,1}Glu_{0,9}His_{1,1}Fe_{1,0}Arg_{3,1}Gly_{1,9}Lys_{2,9}Pro_{2,9}Val_{3,1}$.

Produktet kan anvendes som sådant eller etter overføring i et annet salt. Det kan oppbevares i fast tilstand, i oppløsning eller som et absorbat.

FORMELBLAD


Tos For
CBO-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-OH
OTB For
CBO-Glu-OC F
H-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-OH
OTB For
CBO-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-OH
OTB For
Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-N3
H-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-OH
For For Tos Tos
CBO-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-OH
OTB
Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-OH
For For
H-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-OH
OTB For For For
Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-OH
For
H-Val-Lys-Pro-Val-Tyr-Pro-OTB
OTB For For For For
Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro——Val-Lys-Pro-Val-Tyr-Pro-OTB
H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro——Val-Lys-Pro-Val-Tyr-Pro-OTB

Patentkrav:

Fremgangsmåte for fremstilling av et nytt, terapeutisk aktivt tetracosapeptid med formel: L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenyl-alanyl-L-arginyl-L-tryptofanyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin og dets syreaddisjonssalter med organiske eller uorganiske syrer, karakterisert ved at aminosyrene L-serin- L-tyrosin-L-serin-L-norleucin, L-glutamin, L-histidin, L-fenylalanin, L-arginin, L-tryptofan, glycin, L-lysin, L-prolin-L-valin, glycin, L-lysin, L-lysin, L-arginin, L-arginin, L-prolin, L-valin, L-lysin, L-valin, L-tyrosin og L-prolin i den angitte rekkefølge og/eller peptidbruddstykker som inneholder disse aminosyrer i den angitte rekkefølge, under anvendelse av i peptidkjemien kjente metoder kondenseres til det angitte tetracosapeptid, idet for den peptidiske sammenknytting enten en endestående karboksylgruppe eller en aminogruppe aktiveres og de øvrige reaktive grupper beskyttes intermediært, og om ønskes dannes de tilsvarende syreaddisjonssalter fra det erholdte tetracosapeptid ved omsetning med uorganiske eller organiske syrer.

Anførte publikasjoner:

— — —

Oscar Andersens Boktrykkeri.