



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

197667

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(51) Int. Cl.³
C 07 G 15/00

(22) Přihlášeno 18 10 77

(21) (PV 6763-77)

(40) Zveřejněno 31 08 79

(45) Vydáno 20 10 81

(75)
Autor vynálezu

LEBL MICHAL, Ing., PRAHA,
BARTH TOMISLAV, RNDr., CSc., ROZTOKY U PRAHY a
JOŠT KAREL, RNDr., DrSc., PRAHA

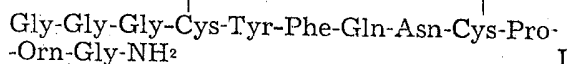
(51) Analog vasopresínu a způsob jeho výroby

Předmětem vynálezu je nový analog vasopresínu a způsob jeho výroby.

Jedná se o nový analog vasopresínu, který je typicky neštěpitelný a má specifický presorický účinek.

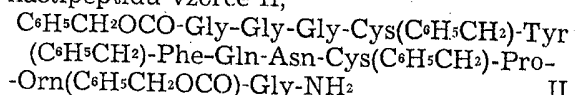
Přírodní hormon vasopresín má v organismu velmi krátký poločas, daný hlavně rychlou enzymovou degradací. Jedním z nejexponovanějších míst je peptidická vazba mezi basicou aminokyselinou v poloze 8 a glycinovým zbytkem v poloze 9, která je štěpena v organismu trypsinem nebo enzymy trypsinové povahy. Zjistili jsme nyní, že záměna lysinu případně argininu za ornithin toto štěpení vylučuje. Kromě toho způsobuje i disociaci mezi antidiuretickou a presorickou aktivitou ve prospěch presorické aktivity, což je velmi výhodné v případech, kdy se klinicky využívá presorického účinku vasopresínu a antidiuretický efekt je na závadu. Protrahovaný účinek připraveného analogu podle vynálezu je ještě zvýšen tím, že struktura analogu je založena na tzv. hormonogenném principu (Cort J. H., Jošt K., Kasafírek E., Rudinger J., Šorm F., Zaoral M.: čs. patent č. 123 273).

Analog vasopresínu- N^{α} -glycyl-glycyl-glycyl-8-ornithin vasopresín (t.j. cyklický disulfid N^{α} -glycyl-glycyl-glycyl-cysteinyltyrosyl-fenyl-alanyl-glutaminyl-asparaginyl-cysteinyl-prolyl-ornithyl-glycinamidu) má vzorec I



kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

Podstatou způsobu výroby nového analogu vasopresínu podle vynálezu je, že se z dvánáctipeptidu vzorce II,



ve kterém všechny aminokyseliny jsou L-řady, který se připraví reakcí amidu prolyl- N^{α} -benzyloxykarbonylornithylglycinu, získaného z jeho o-nitrobenzensulfenyl derivátu působením chlorovodíku v dimethylformamidu, s azidem benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzyl-cysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-S-glutaminyl-asparaginyl-S-benzyl-cysteinu, získaného z odpovídajícího hydrazidu působením butylnitritu v přítomnosti chlorovodíku, přičemž tento hydrazid byl získán z odpovídajícího methylesteru působením hydrazinu, odštěpí všechny chránící skupiny působením roztoku sodíku v kapalném amoniaku a vzniklá disulfhydriolová látka je oxidována na konečný produkt roztokem ferrikyanidu draselného.

Připravený nový analog má následující farmakologickou účinnost: antidiuresa 0,7 I.U./mg, tlak despalinisovaná krysa — 1,33 I.U./mg (ve srovnání s glypressinem v daném testu 0,5 I.U./mg), děloha in vitro 0,008 I.U./

/mg. Ve srovnání s dříve popsanou látkou, N^α-glycyl-glycyl-glycyl-8-Lysin-vasopresinem (Cort J. H., Jošt K., Kasafírek E., Rudinger L., Šorm F., Zaoral M.: čs. patent č. 123 273) 2,5krát vyšší presorický účinek a 3krát nižší antidiuretický účinek, což je zejména výhodné pro potenciální klinické využití analogů vasopresinu, kde je žádoucí disociace uvedených biologických účinků. Obě aktivity mají silně prodlouženou dobu trvání účinku.

Příklady provedení:

Příklad 1

Methylester N^α-benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu.

K roztoku 1,3 g methylesteru benzyloxykarbonylglutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu (Katsoyannis P. G., Gish G. T., Hess P. G., du Vigneaud V.: J. Am. Chem. Soc. 80, 2558 (1958); Boissonnas R. A., Guttmann S., Jaquenoud P. A., Waller J. P.: Helv. Chim. Acta 38, 1491 (1955); Zaoral M.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 30, 1853 (1965) v kyselině octové (3,5 ml) byl přidán HBr v kyselině octové (35%, 3,5 ml), směs byla zahřívána 10 min. na 55 °C a zředěna etherem. Produkt byl několikrát rozetřen s etherem, vysušen a rozpuštěn v dimethylformamidu (7 ml). K roztoku 1,86 g chráněného hexapeptidu-hydrazidu benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylsysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalaninu (Procházka Z., Krejčí I., Kupková B., Slaninová J., Bojanovská V., Prusík Z., Vosekalna I. A., Maloň P., Barth T., Frič I., Bláha K., Jošt K.: Collection Czechoslov. Chem. Commun., 43, 1285 (1978) ve směsi dimethylformamidu (20 ml) a 6 M-HCl v tetrahydrofuranu (1,7 ml), ochlazenému na -30 °C, byl přidán n-butylnitrit (0,34 ml) a po 4 min. míchání při -30 °C roztok hydrobromidu tripeptidu, ochlazený na -30 °C. Ke směsi byl přidán N-ethylpiperidin do pH 8,5 až 9,0 (vlhký pH papírek). Po 4 dnech stání při 0 °C byla reakční směs odpařena, odparek byl rozetřen s 1 M-HCl, odsát a promyt 1 M-HCl, vodou a methanolem. Po přesrážení z kyseliny octové etherem bylo získáno 2,66 g (98 %) produktu o t.t. 239 až 243 °C. Vzorek pro analýzu byl přesrážen stejným způsobem, t.t. zůstala beze změny. $[\alpha]_D^{20}$ -30,1° (c 0,2, dimethylformamid). Pro C₈₈H₇₉N₁₀O₁₅S₂·C₄H₄O₂·3H₂O (1480) vypočteno: 57,59 % C, 6,06 % H, 10,40 % N; nalezeno: 57,45 % C, 5,87 % H, 10,25 % N.

Příklad 2

Hydrazid N^α-benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu

K roztoku výše připraveného esteru (1,0 g) v dimethylformamidu (11 ml) byl přidán hydrát hydrazinu (2 ml). Směs byla míchána při teplotě místnosti 92 hod., zředěna vodou (70

ml) a po ochlazení na 0 °C byl produkt odsát a promyt vodou. Bylo získáno 0,96 g (96 %) látky o t.t. 230 až 235 °C. Vzorek k analýze byl krystalován z dimethylformamidu a vody bez změny bodu tání $[\alpha]_D^{20}$ -31,8° (C 0,2, dimethylformamid). Pro C₈₈H₇₉N₁₀O₁₅S₂·2H₂O (1402) vypočteno: 58,23 % C, 5,96 % H, 12,98 % N; nalezeno: 57,97 % C, 5,85 % H, 13,11 % N.

Příklad 3

Amid N^α-benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-N^δ-benzyloxykarbonylornithyl-glycinu

K roztoku 0,40 g amidu o-nitrobenzensulfonylpropyl-N^δ-benzyloxykarbonylornithyl-glycinu (Jošt K., Procházka Z., Cort J. H., Barth T., Škopková J., Prusík Z., Šorm F.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 39, 2835 (1974)) v dimethylformamidu (3 ml) byl přidán 2 M-HCl v etheru (0,77 ml). Po 4 min. při teplotě místnosti byl hydrochlorid vysrážen etherem, vysušen a rozpuštěn v dimethylformamidu (3,5 ml). K roztoku výše popsaného hydrazidu (0,47 g) ve směsi dimethylformamidu (10 ml) a 4,5 M-HCl v tetrahydrofuranu (0,78 ml), ochlazenému na -30 °C, byl přidán n-butylnitrit (60%) a po 4 min. míchání roztok hydrochloridu tripeptidu a N-ethylpiperidin (na pH 8,5; vlhký pH papírek). Po 70 hod. stání při 0 °C byla směs odpařena, odparek byl rozetřen s 1 M-HCl, odfiltrován, promyt 1 M-HCl a vodou. Po přesrážení z kyseliny octové vodou bylo získáno 0,51 g (84 %) látky o t.t. 175 až 182 °C. Část produktu (50 mg) byla filtrována přes sloupec gelu (Sephadex LH-20) v dimethylformamidu. Eluční frakce s žádaným produktem byly odpařeny a přesráženy z dimethylformamidu etherem. Bylo získáno 37 mg (74 %) látky o t.t. 183 až 187 °C. $[\alpha]_D^{20}$ -34,4° (c 0,2 dimethylformamid). Aminokyselínová analýza: Orn 0,94, Asp 1,01, Glu 1,00, Pro 1,00, Gly 3,72, Tyr 0,99, Phe 1,03, Cys (Bzl) 1,74. Pro C₈₈H₁₀₄N₁₆O₁₉S₂·2H₂O (1808) vypočteno: 58,46 % C, 6,13 % H, 12,39 % N; nalezeno: 58,23 % C, 5,92 % H, 12,28 % N.

Příklad 4

N -Glycyl-glycyl-glycyl-8-ornithin-vasopresin
Amid N^α-benzyloxykarbonylglycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-N^δ-benzyloxykarbonylornithyl-glycinu (300 mg) byl rozpuštěn v čerstvě destilovaném kapalném amoniaku (30 ml) a redukován sodíkem. Když byla modrá barva stálá 60 sek., byla směs odbarvena chlořidem amonným a lyofilisována. Lyofilisát byl rozpuštěn v 0,1 M-HCl (16 ml), roztok byl zředěn vodou (30 ml) a extrahován ethylacetátem a etherem. Po zředění vodou (250 ml) bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,0 a za míchání byl k němu během 30 min. při-

dán roztok $K_3Fe(CN)_6$ (105 mg) ve vodě (30 ml). Směs byla míchána dalších 30 min. při teplotě místnosti, její pH bylo upraveno kyselinou octovou na 4,1 a roztok byl nanesen na kolonu karboxylátového katexu (Amberlit CG-50I; 15 ml). Kolona byla promyta 0,25% kyselinou octovou (do negativní reakce na chloridové ionty) a produkt byl vymyt 50% kyselinou octovou. Lyofilisací bylo získáno 190 mg látky, která byla rozpuštěna v 20% kyselině octové (4 ml) a roztok byl vnesen do přístroje pro beznosičovou elektroforesu (2800 V, 2,03 ml/hod.). Lyofilisací frakcí obsahujících žádaný produkt bylo získáno 108 mg (52 %) látky, jejíž část (50 mg) byla podrobena gelové filtraci. Bylo získáno 36 mg (37 %, počítáno na chráněný dodekapeptid). $[\alpha]_D^{25} - 84,6^\circ$ (c 0,1, voda). Aminokyselinová analýsa: Orn 1,02, Asp 0,98, Glu 0,98, Pro 1,01, Gly 4,02, Cys 1,88, Tyr 0,97, Phe 1,04. Pro $C_{51}H_{74}N_{16}O_{18}S_2 \cdot 3C_2H_4O_2 \cdot 4H_2O$ (1468) vypočteno: 46,65 % C, 6,45 % H, 15,27 % N; nalezeno: 46,68 % C, 6,14 % H, 15,02 % N.

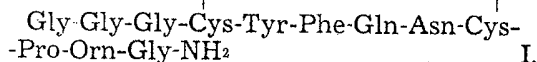
Zkouška štěpení připraveného analogu trypsinem:

K roztoku analogu (50 η g) ve směsi vody (0,7 ml) a Tris-HCl pufru (200 η l; 0,2 M; pH 7,8) byl přidán roztok trypsinu (0,1 mg) v Tris-HCl pufru (0,1 ml), obsahujícího 10^{-4} M $CaCl_2$. Směs byla inkubována 60 min. při 37 °C. Jako slepý pokus (blank) byl inkubován vzorek bez trypsinu. Biologická aktivita, stanovená presorickým testem, byla stejná jako u vzorku neobsahujícího trypsin. Aktivita použitého trypsinu byla kontrolována

rychlostí hydrolysy p-nitranilidu N^α -benzoyl-argininu.

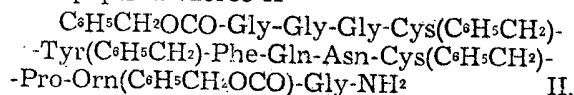
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Analog vasopresínu - N^α -glycyl-glycyl-glycyl-8-ornithin vasopresin vzorce I



kde všechny aminokyseliny jsou L-řady.

2. Způsob výroby analogu vasopresínu podle bodu 1, vyznačený tím, že se z dodekapeptidu vzorce II



ve kterém všechny aminokyseliny jsou L-řady, který se připraví reakcí amidu prolyl- N^3 -benzyloxykarbonylornithylglycinu, získaného z jeho o-nitrobenzensulfenyl derivátu působením chlorovodíku v dimethylformamidu, s azidem benzyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-glycyl-S-benzylcysteinyl-O-benzyltyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginy-S-benzylcysteinu, získaného z odpovídajícího hydrazidu působením butylnitritu v přítomnosti chlorovodíku, přičemž tento hydrazid byl získán z odpovídajícího methylesteru působením hydrazinu, odštěpí všechny chránící skupiny působením roztoku sodíku v kapalném amoniaku a vzniklá disulfhydrilová látka je oxidována na konečný produkt roztokem ferrikyanidu draselného.