

2

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

48555

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 31.V.1961 (P 96 632)

Pierwszeństwo: 02.VI.1960 Szwajcaria

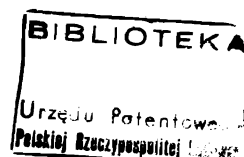
Opublikowano: 28.IX.1964

Kl 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

UKD

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



Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1

Stwierdzono, że można wytwarzać nowy polipeptyd o wzorze 1, obniżający ciśnienie krwi, jeżeli pochodną nonapeptydu o wzorze 4, w którym R oznacza grupę ochronną nadającą się do ochrony grupy aminowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną za pomocą bezwodnej hydrolizy kwasowej lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę toluenosulfonylową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, trzeciorzędową grupę karbobutoksylową odszczepialną przez hydrolizę kwasową w bezwodnych rozpuszczalnikach, w rozpuszczalnikach zawierających wodę lub w wodzie, grupę ftalilową odszczepialną przez kwaśną alkoholizę lub kwaśną hydrolizę, grupę p-nitro-karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową lub traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, R' oznacza atom wodoru lub grupę nadającą się do ochrony grupy guanidowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową, lub toluenosulfonylową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, trzeciorzędową grupę karbobutoksylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę w bezwodnych rozpuszczalnikach, w rozpuszczalnikach uwodnionych lub w wodzie, grupę ftalilową odszczepialną przez traktowanie hydrazyną, grupę formylową odszczepialną przez kwaśną alkoholizę, lub kwaśną

2

hydrolizę, grupę p-nitrokarbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową, lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, R'' oznacza atom wodoru lub grupę nadającą się do ochrony grupy guanidowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę toluenosulfonylową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, resztę nitrową odszczepialną przez uwodornienie, R''' oznacza atom wodoru lub grupę nadającą się do ochrony grupy karboksylowej, zwłaszcza grupę benzylową odszczepialną przez uwodornienie, przez bezwodną hydrolizę kwasową albo przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę p-nitrobenzylową odszczepialną przez hydrolizę, przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku albo przez zmydlenie, grupę metylową odszczepialną przez zmydlenie, trzeciorzędową grupę butylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę w bezwodnym lub uwodnionym rozpuszczalniku, poddaje się traktowaniu środkami odszczepiającymi odpowiednie grupy ochronne, przy czym proces ten prowadzi się jednostopniowo lub ewentualnie w kilku stopniach.

Pochodną nonapeptydu o wzorze 4 można otrzymywać przez kondensację na przykład nowego czteropolipeptydu w postaci wolnego kwasu lub

zdolnej do reakcji pochodnej o wzorze 2, w którym R oznacza jedną z wyżej opisanych grup wprowadzoną dla ochrony grupy aminowej, a R' oznacza atom wodoru lub jedną z wyżej opisanych grup wprowadzoną dla ochrony grupy guanidowej z pięciopeptydem o wzorze 3, w którym R'' oznacza atom wodoru lub jedną z wyżej opisanych grup wprowadzoną dla ochrony grupy guanidowej, R''' oznacza atom wodoru lub jedną z wyżej opisanych grup wprowadzoną dla ochrony grupy karboksylowej.

Stwierdzono, że związek o wzorze 1 posiada silne działanie obniżające ciśnienie krwi oraz, że również jego właściwości biologiczne są podobne do właściwości bradykininy. Ta ostatnia jest w stanie czystym trudno dostępna. Nonapeptyd, o wzorze 1 jest pierwszym syntetycznym peptydem, który posiada wartościowe właściwości bradykininy. Przejawia on wysoką aktywność naczyniową i może znaleźć na przykład zastosowanie w terapii przy leczeniu obwodowych zakłóceń obiegu krwi jak również przy nadciśnieniu.

W celu wytworzenia nonapeptydu korzystnie jest, gdy na przykład N-karbобензоксы-nitro-L-argininę poddaje się kondensacji z eterem metylowym L-proliny, a otrzymany ester dwupeptydu zmydla się do odpowiedniego kwasu. Kwas ten kondensuje się z estrem III-rzęd. butylowym L-proliloglicyny i otrzymany ester czteropeptydu zmydla się do wolnego kwasu o wzorze 2 przez traktowanie chlorowodem. Ester nitro-L-arginylo-p-nitrobenzylowy poddaje się kondensacji z N-karbобензоксы-L-fenylaloalaniną, grupę karbобензоксылową odszczepia się selektywnie za pomocą bromowodoru w kwasie octowym, otrzymany dwupeptyd poddaje się kondensacji z N-karbобензоксы-L-proliną, grupę karbобензоксылową odszczepia się w podobny jak wyżej sposób i otrzymany trójepeptyd kondensuje się z L-azydkiem N-karbобензоксы-L-fenylaloalanino-L-serylu. Ten ostatni otrzymuje się przez kondensację N-karbобензоксы-L-fenylaloalaniny z estrem metylowym l-seryny i przeprowadzenie otrzymanego estru dwupeptydu w azydek poprzez hydrazyd. Odszczepienie grupy karbобензоксылowej otrzymanego pentapeptydu działaniem bromowodoru w kwasie trójfluorooctowym daje pięciopeptyd o wzorze 3, który poddaje się kondensacji z trójepeptydem o wzorze 2 do chronionego nonapeptydu o wzorze 4. Przez hydrogenolityczne odszczepienie grup ochronnych otrzymuje się biologicznie czynny nonapeptyd, o wzorze 1.

Możliwe jest również odszczepienie grup ochronnych R'' i R''' pięciopeptydu przed kondensacją z czteropeptydem. Do kondensacji może być również stosowany czteropeptyd, w którym R' oznacza atom wodoru.

W następnych przykładach, które wyjaśniają przeprowadzenie sposobu, nie ograniczając wynalazku, podane są wszystkie warunki temperaturowe w stopniach Celsjusza.

Przykład I. a) N-karbобензоксыnitro-L-arginylo-L-prolina. 35,5 g N-karbобензоксыnitro-L-argininy, 12,9 g estru metylowego L-proliny i 24,8 g dwucykloheksylokarbodwuimidu rozpuszcza się w temperaturze -10° w 250 ml dwumetyloforma-

midu i 100 ml acetonitrylu, pozostawia się na noc w temperaturze 20° , odparowuje w próżni, uciera pozostałość z eterem naftowym, rozpuszcza w octanie etylu, pozostałość krystalizuje przy dosem solnym i rozcieńczonym amoniakiem. Octan etylu odparowuje się w próżni, pozostałość rozpuszcza w 300 ml metanolu i 300 ml l-n ługu sodowego, pozostawia na 1 godzinę, dodaje 500 ml wody, przesącza, zakwasza rozcieńczonym kwasem solnym i ekstrahuje octanem etylu. Po odparowaniu octanu etylu, pozostałość krystalizuje przy dodaniu metanolu. Otrzymuje się 23 g N-karbобензоксыnitro-L-arginylo-L-proliny. Temperatura 119° $[\alpha]_{D^{21}} = -47^{\circ}$ ($c = 2$ w lodowatym kwasie octowym).

b) N-karbобензоксыnitro-L-arginylo-L-proliloliglicyna.

Do roztworu 24,9 g N-karbобензоксы-L-proliny i 14,0 ml trójetiloaminy w 300 ml chloroformu dodaje się w temperaturze -10° 9,6 ml estru etylowego kwasu chloromrówkowego i dolewa po 10 minutach 11,3 g estru III-rzęd. butylowego glicyny. Po dwu godzinach pozostawienia w temperaturze pokojowej przemywa się rozcieńczonym amoniakiem i rozcieńczonym kwasem fosforowym, odparowuje w próżni, rozpuszcza w metanolu i odszczepia grupę karbобензоксылową przez katalityczne uwodornienie. Roztwór odparowuje się, pozostałość rozpuszcza 250 ml dwumetyloformamidu i 100 ml acetonitrylu i dodaje 40,0 g N-karbобензоксыnitro-L-arginylo-L-proliny i 22,0 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Pozostawia się na noc w temperaturze 20° , odparowuje w próżni, uciera pozostałość z eterem naftowym, rozpuszcza w chloroformie, przemywa rozcieńczonym kwasem fosforowym i rozcieńczonym amoniakiem, suszy siarczanem sodowym i przepuszcza w ciągu 4 godzin w temperaturze 35° suchy chlorowódór. Po odparowaniu w próżni i dodaniu eteru etylowego otrzymuje się 30,2 g N-karbобензоксыnitro-L-arginylo-L-prolilo-L-proliloglicyny. Temperatura topnienia 115° z rozkładem. Ciężar równoważnikowy 605, znaleziono 602.

c) Azydek N-karbобензоксы-L-fenylaloalanilo-L-serylu.

30,0 g N-karbобензоксы-L-fenylaloalaniny, 15 g chlorowodorku estru metylowego L-seryny, 14 ml trójetiloaminy i 24,8 g dwucykloheksylokarbodwuimidu rozpuszcza się w 1500 ml acetonitrylu w temperaturze -10° , pozostawia na noc w temperaturze 20° , przesącza, odparowuje w próżni, pozostałość uciera z eterem naftowym, rozpuszcza w octanie etylu, przemywa rozcieńczonym kwasem solnym i rozcieńczonym amoniakiem, suszy siarczanem sodowym i wytrąca eterem naftowym. Następnie rozpuszcza się w 300 ml metanolu, dodaje 12 ml wodzianu hydrazyny, pozostawia na noc w temperaturze 20° , przesącza i przemywa metanolem i eterem. Otrzymuje się 28,2 g hydrazynu, o temperaturze topnienia 193° , który rozpuszcza się w 100 ml lodowatego kwasu octowego i 100 ml 2n kwasu solnego. Po ochłodzeniu do temperatury -5° dodaje się 15 ml 5n azotynu sodowego i po 10 minutach 450 ml wody z lodem. Osad odsącza się, przemywa wodą i szybko suszy w próżni.

6

5

10

15

20

25

40

6

63

muje się 28 g N-karbobenzoksy-L-arginino-L-proliny, którą rozpuszcza się w 250 ml dwumetyloformamidu i 100 ml acetonitrylu. Dolewa się w temperaturze -10° 18 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, 16,5 g estru III-rzęd. butylowego L-proliloglicyny i 12 g kwasu toluenosulfonowego, pozostawia na 16 godzin w temperaturze pokojowej, wytrąca eterem etylowym, rozpuszcza w 200 ml lodowatego kwasu octowego, przepuszcza w ciągu 2 godzin suchy chlorowódór, odparowuje, dodaje 100 ml 1-n lugu sodowego i 100 ml metanolu, zobojętnia kwasem solnym, przesącza i przemywa wodą i izopropanolem. Otrzymuje się 32,5 g N-karbobenzoksy-L-arginylo-L-prolilo-L-proliloglicyny (ciężar cząsteczkowy 560, znaleziono 557), którą rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i 50 ml acetonitrylu w obecności 9,9 g kwasu toluenosulfonowego. Dodaje się 20 g p-nitrofenolu i 20 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, pozostawia na noc w temperaturze pokojowej i dolewa 32,6 g L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-L-argininy (otrzymanej na przykład przez uwodornienie estru p-nitrobenzylowego N-karbobenzoksy-L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-L-argininy), 100 ml wody i 7 ml trójetiloaminy. Po 16 godzinach stania w temperaturze pokojowej odparowuje się w próżni i pozostałość krystalizuje z mieszaniny izopropanol/woda. Otrzymuje się 41 g N-karbobenzoksy-L-arginylo-L-prolilo-L-proliloglicylo-L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-L-argininy, którą rozpuszcza się w 500 ml lodowatego kwasu octowego i 500 ml 1-n kwasu solnego i uwodarnia w ciągu 1 godziny pod normalnym ciśnieniem w obecności katalizatora paladowego. Dalej postępuje się jak w przykładzie I.

Przykład IV. Postępuje się jak w przykładzie III. W celu odszczepienia grupy karbobenzoksylowej rozpuszcza się nonapeptyd w 4 literach ciekłego amoniaku i traktuje, mieszając metalicznym sodem aż do wystąpienia niebieskiego zabarwienia. Po odparowaniu amoniaku postępuje się dalej jak w przykładzie I.

Przykład V. Rozpuszcza się 39 g N-karbobenzoksytylo-L-argininę, 36 g bromowodoru estru etylowego L-prolilo-proliloglicyny i 19 g karbodwuimidu dwucykloheksyloвого w temperaturze -10° w 240 ml pirydyny i 240 ml acetonitrylu. Następnie postępuje się jak to opisano w przykładzie III. Otrzymuje się 35 g N-karbobenzoksytylo-L-arginylo-L-prolilo-L-proliloglicyny, która rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i 50 ml acetonitrylu. Do tego roztworu dodaje się 20 g karbodwuimidu dwucykloheksyloвого i 20 g o-nitrofenylu i pozostawia w spokoju przez noc, po czym dodaje się 32,6 g L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-L-argininy, 100 ml wody i 7 ml trójetiloaminy. Po 16 godzinach odparowuje się mieszaninę reakcyjną w temperaturze pokojowej pod próżnią i przekrystalizowuje pozostałość z mieszaniny izopropanolu i wody. Otrzymuje się 47 g N-karbobenzoksytylo-L-arginylo-L-prolilo-L-proliloglicylo-L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-L-argininę, której grupy ochronne odszczepia się w sposób opisany w przykładzie IV.

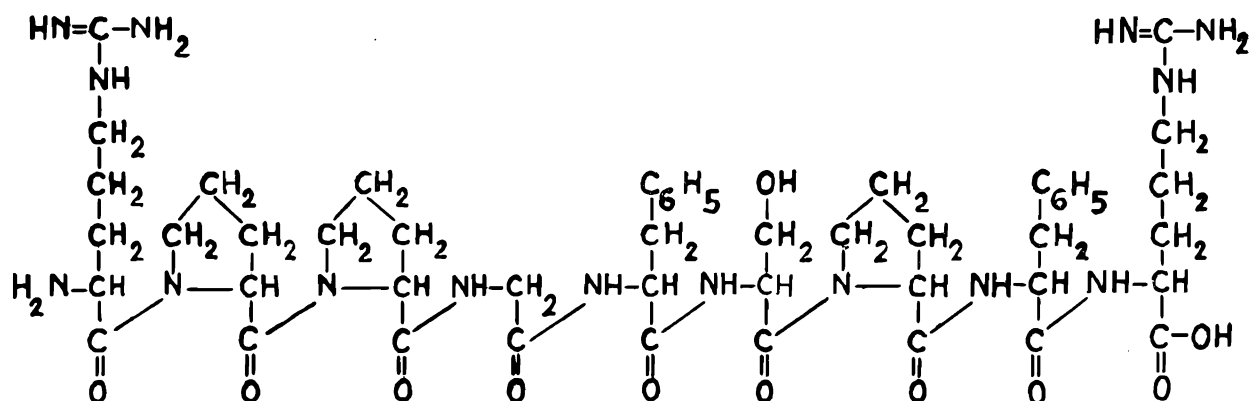
Przykład VI. Rozpuszcza się 32 g N-karbobenzoksy-L-arginylo-L-prolilo-L-prolilo-glicyny i 9,9 g kwasu toluenosulfonowego w 200 ml dwumetyloformamidu i 50 ml acetonitrylu, dodaje 20 g karbodwuimidu dwucykloheksyloвого i 38,1 g estru p-nitrobenzylowego L-fenylalanilo-L-prolilo-L-fenylalanilonitro-L-argininy. Po 5 godzinach utrzymywania mieszaniny reakcyjnej w temperaturze pokojowej sącza się ją, odparowuje pod próżnią i krystalizuje pozostałość z mieszaniny izopropanolu i wody. Otrzymuje się 48 g estru p-nitrobenzylowego N-karbobenzoksy-L-arginylo-L-prolilo-L-prolilo-glicylo-L-fenylalanilo-L-serylo-L-prolilo-L-fenylalanilo-nitro-L-argininy, który uwodarnia się w sposób opisany w przykładzie Ie.

Zastrzeżenie patentowe

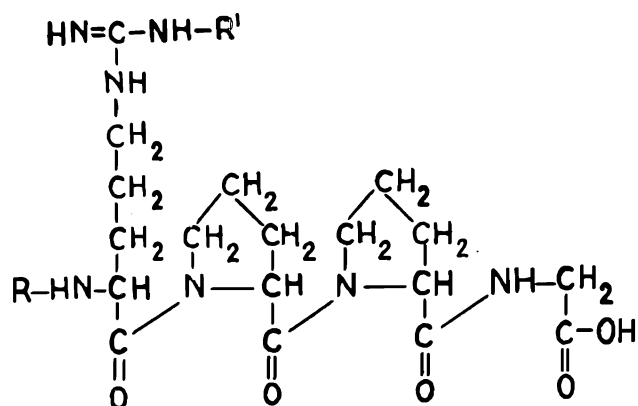
Sposób wytwarzania nowego polipeptydu, obniżającego ciśnienie krwi, o wzorze 1, znamienny tym że pochodną nonapeptydu o wzorze 4, w którym R oznacza grupę ochronną nadającą się do ochrony grupy aminowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną za pomocą bezwodnej hydrolizy kwasowej lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę toluenosulfonową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, trzeciorzędową grupę karbobutoksylową odszczepialną przez hydrolizę kwasową w bezwodnych rozpuszczalnikach, w rozpuszczalnikach zawierających wodę lub w wodzie, grupę ftalilową odszczepialną przez traktowanie hydrazyną, grupę formylową odszczepialną przez kwaśną alkoholizę lub kwaśną hydrolizę, grupę p-nitro-karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową lub traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, R' oznacza atom wodoru lub grupę nadającą się do ochrony grupy guanidowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową, odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową, lub traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę toluenosulfonową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, trzeciorzędową grupę karbobutoksylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę w bezwodnych rozpuszczalnikach, w rozpuszczalnikach uwodnionych lub w wodzie, grupę ftalilową odszczepialną przez traktowanie hydrazyną, grupę formylową odszczepialną przez kwaśną alkoholizę, lub kwaśną hydrolizę, grupę p-nitro-karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, R'' oznacza atom wodoru lub grupę nadającą się do ochrony grupy guanidowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, bezwodną hydrolizę kwasową lub przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, grupę toluenosulfonową odszczepialną przez traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, resztę nitrową odszczepialną przez uwodornienie, R''' oznacza atom wodoru, lub grupę nadającą się do ochrony grupy karboksylowej, zwłaszcza grupę benzylową odszczepialną przez uwodornienie

nie, przez bezwodną hydrolizę kwasową, albo przez traktowanie metalem alkalicznym w cieplem amoniaku, grupę p-nitrobenzylową odszczepialną przez hydrolizę, przez traktowanie metalem alkalicznym w cieplem amoniaku albo przez zmydlenie, grupę metylową odszczepialną przez zmydlenie, grupę etylową odszczepialną przez zmydlenie,

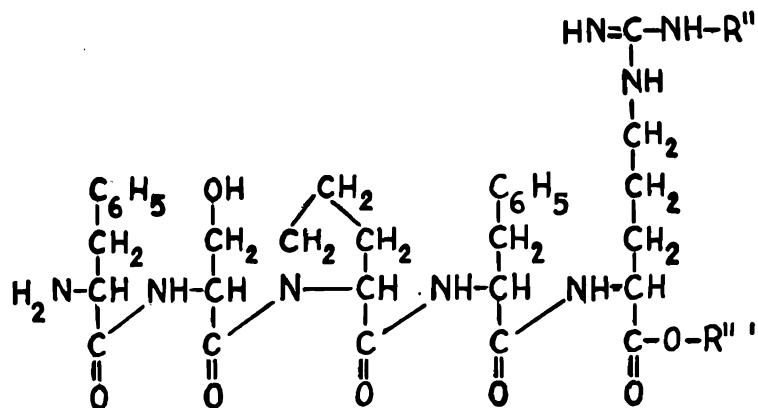
trzeciorzędową grupę butylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę w bezwodnym lub uwodnionym rozpuszczalniku, poddaje się traktowaniu środkami odszczepiającymi odpowiednie grupy ochronne, przy czym proces ten prowadzi się jednostopniowo lub ewentualnie w kilku stopniach.



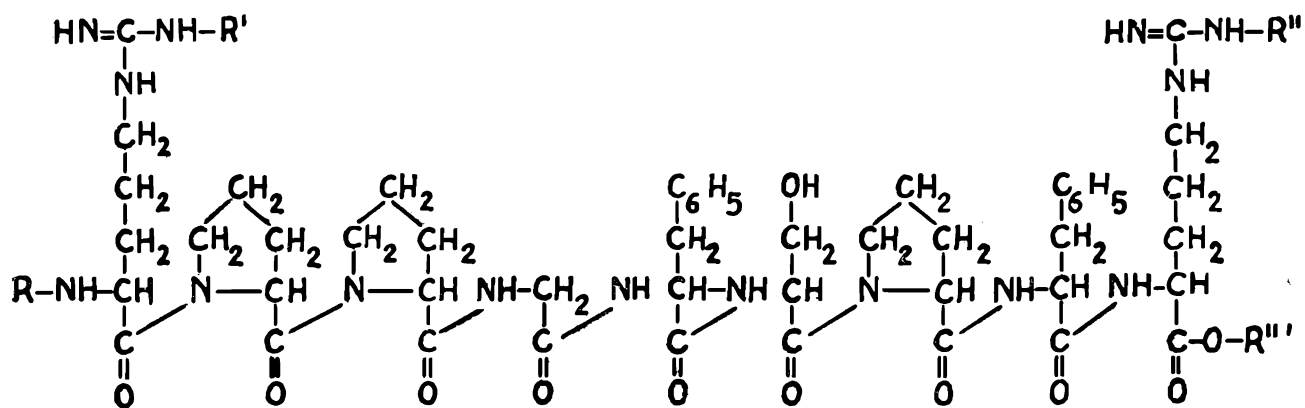
Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4

