



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217633

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 G 15/00

(22) Přihlášeno 23 03 81
(21) [PV 2099-81]

(40) Zveřejněno 30 04 82

(45) Vydáno 15 09 84

(75)
Autor vynálezu

BRTNÍK FRANTIŠEK ing. CSc., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc.,
ROZTOKY, BUREŠOVÁ OLGA doc. MUDr. DrSc., HRBAS PAVEL RNDr.,
KREJČÍ IVAN RNDr. CSc., KUPKOVÁ BĚLA PhMr. CSc., ŠKOPKOVÁ JANA
MUDr. CSc. a JOŠT KAREL RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Analog vasopresinu a způsob jeho výroby

1

Předmětem vynálezu je analog vasopresinu, cyklický disulfid β -merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-cysteinyl-prolyl-D-argininu a způsob jeho výroby.

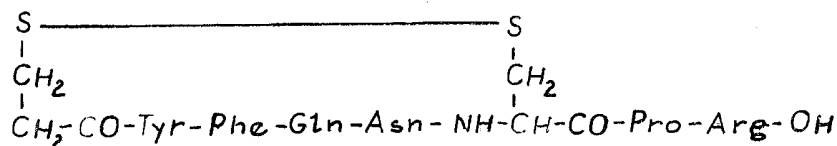
Jde o látku, která má významné účinky na centrální nervový systém.

Bylo prokázáno, že neurohypofysární hormony a některé jejich analogy ovlivňují paměť, spánek a učení u pokusných zvířat (viz např. Krejčí I., Kupková B., Kasafírek E., Barth T., Jošt K.: Effects of Neurohypophyseal Hormone Analogues and Fragments on Learning and Memory Processes in Behavioral Tests, v knize Neuropeptides and Neural

2

Transmission, Raven Press 1980, str. 301). Nevýhodou při používání těchto látek jsou však jejich endokrinní účinky, jako aktivita oxytocická, galaktogogická, presorická, antidiuretická a jiné. Dále bylo prokázáno, že chemickou modifikací neurohypofysárních hormonů lze některé aktivity snížit nebo i zcela eliminovat. Vhodnou chemickou modifikací byl získán analog vasopresinu prakticky prostý endokrinních aktivit, ale se zachovanými účinky na centrální nervový systém.

Analog vasopresinu podle vynálezu má vzorec I,

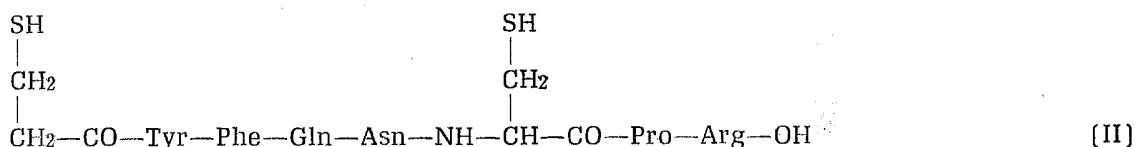


(I)

kde všechny aminokyseliny jsou L-řady, pouze arginin (Arg) je D-řady.

Podstatou způsobu výroby nového analo-

gu vasopresinu vzorce I podle vynálezu je, že se lineární peptid vzorce II



oxiduje za vzniku disulfidové vazby známým postupem.

Některé endokrinní biologické účinky jsou uvedeny v tabulce I.

TABULKA I

Látka	Presorická	Biologická aktivita ^a Uterotonická	Galaktogogická
Oxytocin	3	500	500
Vasopresin	450	5	5
Analog vzorce I	0,01	0,08	0,01

^a mezinárodní jednotky na 1 mg

Vliv analogu vzorce I na ovlivnění centrálního nervového systému byl zkoušen ve dvou experimentálních uspořádáních:

1. V testu tzv. pasivního obranného reflexu, kdy se krysy vyhýbají prostoru, v němž obdržely mírný elektrický šok do tlapek. Hodnotí se doba trvání pasivního obranného reflexu; prodloužení této reakce se interpretuje jako příznivý vliv na paměťovou stopu. Analog vzorce I byl podáván v dávce 5 µg/kg podkožně buď okamžitě po tom, co zvířata obdržela šok do tlapek, nebo 30 min před testem retence vyhýbavé reakce. Test retence byl prováděn za 24 nebo 48 hod. po aplikaci šoku. V obou případech došlo ke statisticky významnému prodloužení sledované reakce.

2. Byl zkoušen vliv analogu vzorce I na krátkodobou pracovní prostorovou paměť krys v 24ramenném radiálním bludišti. V každém ramenu tohoto bludiště je kousek potravy, jímž je krysa odměněna, vstoupí-li do něj. Navštíví-li některé rameno dvakrát, odměnu podruhé nenajde. Účelem pokusu je zjistit, jak si krysa pamatuje, které kanály už navštívila a ve kterých ještě může najít potravu. Pokus ukázal, že analog vzorce I zlepšuje paměť signifikantně. Jestliže krysa bez podaného analogu vzorce I udělá v průměru 3,49 chyb, pak po podání látky vzorce I (1 µg/300 g subkutánně) se incidence chyby zmenší o 0,82.

Způsob výroby analogu vasopresinu se dále objasňuje v příkladu provedení.

Příklad

Benzylester o-nitrobenzensulfenylprolyl-N^G-toluensulfonyl-D-argininu

K roztoku hydrobromidu benzylesteru N^G-p-toluensulfonyl-D-argininu (2,5 g) v dimethylformamidu (5 ml) byl přidán N-ethylpiperidin (0,8 ml) a 2,4,5-trichlorfenylester o-nitrobenzensulfenylprolinu (2,24 g) v dimethylformamidu (5 ml). Po 40 hod. míchání při teplotě místnosti byl dimethylform-

amid odpařen, odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a tento roztok byl postupně vytřepán roztokem kyselého uhličitanu sodného, vodou, roztokem KHSO₄/K₂SO₄ (pH 2) a opět vodou, vysušen a odpařen. Po trojnásobné krystalisaci ze směsi ethylacetát-petrolether byly získány 3 g (90 %) produktu o b. t. 90 — 92 °C [α]_D —40,4° (c 0,4, methanol).

Pro C₃₁H₃₆N₆O₇S₂ (668,8)

vypočteno:

55,67 % C, 5,43 % H, 12,57 % N, 9,59 % S;

nalezeno:

55,92 % C, 5,38 % H, 12,68 % N, 9,38 % S.

Benzylester S-benzyl-β-merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyl-S-benzylcysteinyl-prolyl-N^G-n-toluensulfonyl-D-argininu

K roztoku hydrazidu S-benzyl-β-merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyl-S-benzylcysteinu [239 mg; Zavoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. **32**, 1250 (1967)] v dimethylformamidu (3 ml) byl přidán 2H-HCl v dioxanu (0,26 ml), reakční směs byla ochlazená na —20 °C a byl k ní přidán butylnitrit (25,8 mg) v dimethylformamidu (0,8 ml). Po 20 min. byla směs ochlazená na —40 °C, neutralisována N-ethylpiperidinem a k roztoku byl přidán roztok hydrochloridu benzylesteru prolyl-N^G-P-toluensulfonylargininu (předem připravený z 250 mg chráněného dipeptidu odštěpením o-nitrobenzensulfenylové chránicí skupiny chlorovodíkem v etheru). Po třech dnech stání při 0 °C byl dimethylformamid odpařen, odparek byl rozetřen s 1% kyselinou solnou, dofiltrován a na filtru promyt vodou, nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou. Surový produkt byl čištěn gelovou filtrací v dimethylformamidovém roztoku. Po přesrážení z dimethylformamidu

vodou bylo získáno 280 mg (78 %) produktu o b. t. 174 — 175 °C, $[\alpha]_D -27,6$ (c 0,15, dimethylformamid).

Pro $C_{72}H_{86}N_{12}O_{14}S_3 \cdot 0,5 H_2O$ (1148)

vypočteno:

59,69 % C, 6,05 % H, 11,60 % N, 6,64 % S;

nalezeno:

59,49 % C, 6,15 % H, 11,52 % N, 6,58 % S.

Aminokyselinová analýza: Cys(Bzl) 1,03, Tyr 0,97, Phe 1,04, Glu 1,00, Asp 0,98, Pro 1,03, Arg 0,95.

Cyklický disulfid 3-merkaptopropionyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginylyl-cysteinyl-prolyl-D-argininu

Chráněný oktapeptid připravený výše (100 miligramů) byl za míchání rozpuštěn v kapalném amoniaku (300 ml) a redukován sodíkem 15 s. Po přidání NH_4Cl byl amoniak odpařen, odparek byl rozpuštěn za ochlazení v 0,01 M-HCl (200 ml) a jeho pH bylo upraveno na hodnotu 6,75. Roztok, obsahující lineární peptid vzorce II, byl extra-

hován etherem, doplněn na objem 300 ml a byl k němu po kapkách přidáván roztok 0,01 M ferrokyanidu draselného do trvalého žlutého zabarvení. Roztok byl potom filtrován přes kolonu slabě basického anexu v Cl-cyklu, eluáty byly lyofilisovány a surový produkt byl čištěn gelovou filtrací. Bylo získáno 10 mg čistého produktu o $[\alpha]_D -56,7^\circ$ (c 0,1, 1M kyselina octová). R_f 0,32 (2-butanol—98% kyselina mravenčí—voda, 75:13,5:11,5), 0,54 (1-butanol—kyselina octová—pyridin—voda, 15:3:10:6), 0,71 (1-butanol—kyselina octová—ethyl-acetát—voda, 1:1:1:1), 0,71 (ethylacetát—pyridin—kyselina octová—voda, 5:5:1:3). Produkt byl elektroforeticky čistý ve dvou pufoch o různých hodnotách.

Pro $C_{44}H_{60}N_{12}O_{12}S_2 \cdot C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$ (1109).

vypočteno:

49,81 % C, 6,18 % H, 15,15 % N,

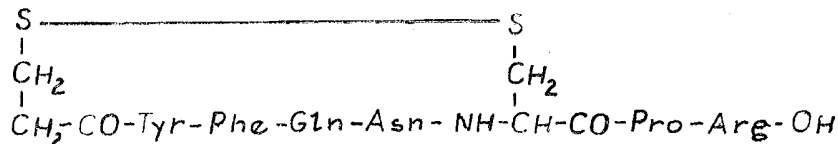
nalezeno:

49,85 % C, 5,97 % H, 15,09 % N.

Aminokyselinová analýza: Tyr 0,96, Phe 1,06, Glu 1,03, Asp 0,98, Pro 1,02, Arg 0,94.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

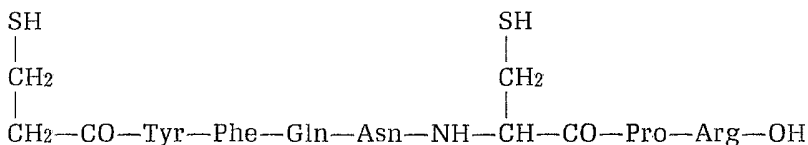
1. Analog vasopresinu vzorce I,



(I)

kde všechny aminokyseliny jsou L-řady, pouze arginin je D-řady.

2. Způsob výroby nového analogu vaso-



oxiduje za vzniku disulfidové vazby.

presinu vzorce I, vyznačený tím, že se lineární peptid vzorce II