



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255616

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 7/64
C 07 K 1/06

(22) Přihlášeno 18 07 86

(21) PV 5461-86.L

(40) Zveřejněno 16 07 87

(45) Vydáno 15 12 88

(75)

Autor vynálezu

ŠIMEK PETR prom. chem. CSc., JAREŠ VÁCLAV ing., LEPŠA LUDĚK RNDr.,
GEISLER ADOLF ing., KRCHNÁK VIKTOR RNDr. CSc.,
KROJIDLO MILAN pro. chem. CSc., KOLÍNSKÝ JIŘÍ ing.,
LÉBL MICHAL ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby (2-0-metyltirosin)deamino-1-karboxytocinu

Řešení se týká výroby (2-0-metyltirosin)deamino-1-karboxytocinu. Nejprve se syntézou na pevném nosiči připraví heptapeptid vzorce I

Z-Ile-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-O-(P) (I),

kde Z je benzyloxykarbonyl, který se převede do roztoku odštěpením z nosiče působením metanolického roztoku amoniaku za vzniku chráněného heptapeptidu II

Z-Ile-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂ (II),

ze kterého se odštěpí chránicí skupiny roztokem sodíku v kapalném amoniaku, alkyluje se sulfhydrylová skupina cysteinu etylesterem kyseliny 3'-brommásečné a esterová skupina se hydrolyzuje roztokem hydroxidu sodného, čímž se připraví volný heptapeptidamid III

H-Ile-Gln-Asn-Cys(C₃H₆COOH)-Pro-Leu-Gly-NH₂ (III),

ke kterému se přikondenzuje derivát tyrosinu IV

X-Tyr(Me)-OH (IV),

kde X je terc:butyloxykarbonylová nebo o-nitrofenylsulfenyllová skupina, za vzniku oktapeptidamidu V

X-Tyr(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys(C₃H₆COOH)-Pro-Leu-Gly-NH₂ (V),

kde X má již uvedený význam, načež se odštěpí chránicí skupina a volný oktapeptidamid se cyklizuje rozpuštěním v pufrovaném roztoku dimetylformamidu s přídavkem difenylfosforazidu nebo pomocí N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenzotriazolu. Produkt je používán ve veterinární medicíně.

255616

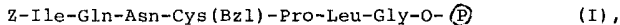
Vynález se týká způsobu výroby (2-0-metyltirosin)deamino-1-karbaoxytocinu, analoga přírodního hormonu oxytocinu, jenž je metabolicky odolnější, tzn. že má ve srovnání s oxytocinem několikanásobně prodloužený účinek, což je při klinické aplikaci vítanou vlastností.

Tento analog, který má charakter cyklického peptidu, je známý a rovněž jeho příprava byla popsána (čs. pat. spis. č. 149 028, čs. AO č. 230 542). Nověji byla jeho tradiční syntéza v roztoku nahrazena tzv. syntézou v pevné fázi, tj. na vhodném nosiči (čs. autor-ské osvědčení č. 237 944). Obě jmenované metody neposkytují dostatečné výtěžky a kromě toho jsou při převádění do většího měřítka neúnosně pracné. Metoda s použitím pevného nosiče poskytuje sice mnoho výhod, včetně zkrácení jednotlivých stupňů, ovšem výtěžky při posledním stupni, tj. při cyklizaci oktapeptidamidu jsou nízké, produkt nemá potřebnou čistotu a dostatečné čištění znamená opět ztráty a zdržení, čímž jsou výhody předcházejících stupňů znehodnoceny.

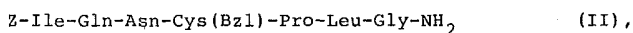
Ve snaze odstranit tyto nevýhody byly hledány optimální podmínky syntézy (2-0-metyl-tyrosin)deamino-1-karbaoxytocinu, při nichž by bylo možno využít osvědčené přednosti známých metod. I když mnoho strukturně blízkých derivátů bylo možno na pevném nosiči cyklizovat s uspokojujícími výtěžky, nebylo tomu tak v případě (2-0-metyltirosin)deamino-1-karbaoxytocinu, kdy zejména izolace konečného produktu po cyklizaci se ukázala mimo očekávání jako velice pracná, časově náročná a ztrátová, což byly základní překážky, které bránily jejímu přenesení do žádoucího většího, tj. provozního měřítka.

Zmíněné nevýhody se s překvapením podařilo odstranit účelným využitím obou známých metod a nověji popsaných výhodných činidel pro cyklizaci, především difenylfosforazidu.

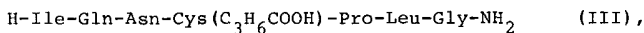
Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby (2-0-metyltirosin)deamino-1-karbaoxytocinu, jehož podstata spočívá v tom, že se nejprve syntézou na pevném nosiči připraví hepta-peptidamid vzorce I



kde Z je benzyloxykarbonyl, Bzl je benzyl a $\textcircled{P}$ je nosič, který se převede do roztoku odštěpením z nosiče působením metanolickeho roztoku amoniaku za vzniku chráněného hepta-peptidu II



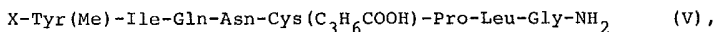
ze kterého se odštěpí chránicí skupiny roztokem sodíku v kapalném amoniaku, alkyluje se sulfhydrylová skupina cysteinu etylesterem kyseliny N'-brommaselné a esterová skupina se hydrolyzuje roztokem hydroxidu sodného, čímž se připraví volný heptapeptidamid III



ke kterému se přikondenzuje derivát tyrosinu IV



kde X je terc.butyloxykarbonylová nebo o-nitrofenylsulfenylová skupina a Me je metyl, za vzniku oktapeptidamidu V



kde X a Me mají již uvedený význam, načež se odštěpí chránicí skupina a volný oktapeptidamid se cyklizuje rozpuštěním v pufrovaném roztoku dimetylformamidu s přidávkou difenylfosfor-azidu, nebo pomocí N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenztriazolu.

Při provedení způsobu podle vynálezu se nejprve na vhodném nosiči, zpravidla chlor-metylovaném kopolymeru styren-1,8-divinylbenzenu, fixuje chráněný derivát glycinu a postupným připojováním potřebných chráněných derivátů aminokyselin se vytvoří heptapeptidamid vzorce I, který se z nosiče uvolní a se kterým se potom až do konce syntézy pracuje v roztoku podle některého ze známých postupů. V závěru syntézy, tj. při cyklizaci oktapeptidamidu vzorce V (po odštěpení chránicí skupiny) na žádaný (2-0-metyltirosin)deamino-1-karboxy-tocin, se výhodně osvědčilo použití difenylfosforazidu.

Jak z uvedeného vyplývá, spojuje způsob podle vynálezu výhody obou známých metod. Rozhodujícím momentem bylo nalezení vhodného stupně, kdy přerušit syntézu na pevném nosiči a přijít na provedení zbývajících stupňů v roztoku, k němuž přispěly systematické srovnávací pokusy. Způsobem podle vynálezu došlo ke zvýšené výrobě žádaného peptidu při současném snížení materiálových nákladů, úspore surovin i pracovních sil, přičemž získaný peptid má vynikající kvalitu.

Způsob podle vynálezu je blíže popsán v následujících příkladech provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nikterak neomezuje.

P ř í k l a d 1

a) Amid benzyloxykarbonyl-isoleucyl-glutaminyl-asparaginyln-S-benzylcysteinyl-propyl-leucyl-glycinu (látko II)

100 g chlorometylovaného kopolymeru (styren-1,8-divinylbenzenu), na který byl navázán Boc-Gly v množství 1 mmol/g, se postupně kondenzuje pomocí třímolárního přebytku N,N'-di-cyklohexylkarbodiimidu, N-hydroxybenztriazolu a vhodného derivátu aminokyseliny s těmito aminokyselinami: Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Cys(Bzl), Boc-Asn, Boc-Gln a Z-Ile, za vzniku látky I. K odštěpování terc.butyloxykarbonylové skupiny se používá roztok kyseliny tri-fluoroctové v metylenchloridu, resp. v dimetylformamidu.

Po ukončení syntézy se pryskyřice oddělí, vysuší a suspenduje se ve 3 litrech absolutního metanolu. Suspenze se ochladí na -10°C a nasatí se plynným amoniakem. Po 24 h stání se pryskyřice odfiltruje a extrahuje se třikrát třemi litry dimetylformamidu o teplotě 80°C . Extrakt se zahustí ve vakuu na objem cca 200 ml a z odparku se přidávkem 2 litrů éteru vysráží produkt. Po odfiltrování a vysušení se získá 70 g (tj. 72% teorie) látky II, která je identická s produktem připraveným metodou v roztoku. Tato shoda byla potvrzena aminokyselinovým složením, chromatografií na tenké vrstvě a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

b) Amid isoleucyl-glutaminyl-asparaginyln-S- γ -karboxypropionylcysteinyl-propyl-leucyl-glycinu (látko III)

60 g látky II se rozpustí v roztoku 0,5 g amidu sodného v 6 litrech vroucího kapalného amoniaku a redukuje se sodíkem (asi 12 g) do vzniku modrého zbarvení roztoku stálého po dobu 20 sekund. Roztok se odbarví přidáním asi 16 g chloridu amonného a přidá se 75 ml (101,3 g) etylesteru kyseliny -bromásebné. Amoniak se odpaří ve vakuu a odparek se rozpustí v 1,5 l 0,2 N hydroxidu sodného. Po 45 minutách míchání se roztok odfiltruje, nanese se na kolonu katexu v H^{+} -cyklu (DOWEX 50) a produkt se vytěsni 10% vodným roztokem pyridinu. Pyridinový eluát se odpaří do sucha, odparek se rozpustí ve 230 ml 90% vodného metanolu a produkt se vysráží 7,5 litru éteru. Po odfiltrování a vysušení se získá 44 g (tj. 85% teorie) látky III, která je identická s produktem připraveným metodou v roztoku.

c) Amid o-nitrofenylsulfenyl-0-metyltirosyl-isoleucyl-glutaminyl-asparaginyln-S- γ -karboxypropionyl-propyl-leucyl-glycinu (látko V)

K roztoku 38,3 látky III v 500 ml dimetylformamidu se přidá 7,9 g N-hydroxybenztriazolu

a 22,7 g p-nitrofenylesteru o-nitrobenzensulfenyl-0-metyltirosinu. Po 24 hodinách se přidá dalších 13,3 g aktivního esteru a ponechá se stát do druhého dne. Po vysrážení směsí éteru (2,7 l) s etylacetátem (1,13 l) se získá 46 g (tj. 86% teorie) látky V, identické s produktem připraveným metodou v roztoku.

d) (2-0-metyltirosin)deamino-1-karbaoxytocin

40 g látky V se za tepla rozpustí ve 300 ml dimetylformamidu a ochladí se na teplotu místnosti, přičemž látka V se znovu vyloučí z roztoku. K suspenzi se přidá 50 ml 2 N roztoku chlorovodíku v dioxanu. Po 15 minutách stání při teplotě místnosti se vzniklý roztok vlije do 4 l éteru. Vyloučená sraženina se odsaje a rozpustí ve 4 l dimetylformamidu. Roztok se ochladí na 0 °C, za míchání se přidají 4 g hydrogenfosforečnanu draselného a 11,5 g difenylfosforazidu. Průběh reakce se sleduje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a v reakci se pokračuje do vymizení výchozí látky. Reakční směs se zfiltruje, filtrát se zahustí ve vakuu do vydestilování většiny dimetylformamidu. Zbytek se rozpustí v cca 1 000 ml 20% kyseliny octové, roztok se zfiltruje a přímo se použije k čištění surového produktu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Získá se 8 g (2-0-metyltirosin)-deamino-1-karbaoxytocinu (vztaženo na 100% látku), která svými vlastnostmi odpovídá produktu získávanému klasickým způsobem syntézy v roztoku.

P ř í k l a d 2

Podle postupu v příkladě 1 se postupuje až do látky V, načež se 60 g látky V rozpustí za tepla v 900 ml koncentrované kyseliny octové, ochladí se na teplotu místnosti a přidá se 75 ml 8 N roztoku chlorovodíku v dioxanu. Po 20 minutách stání při teplotě místnosti se roztok vlije do 10 l absolutního éteru. Vyloučená sraženina se odsaje, vysuší a rozpustí se v 940 ml dimetylformamidu a 670 ml dioxanu, přidá se 79 g N-hydroxybenzotriazolu a roztok se vychladí na -10 °C. Přidá se roztok 86 g N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu ve 100 ml dimetylformamidu a míchá se 2 hodiny při teplotě místnosti. Potom se reakční směs přikape do roztoku 150 ml triethylaminu v 6 l metanolu zahřátého na teplotu 40 °C rychlostí kolem 1 l za hodinu. Reakční směs se ponechá stát přes noc, okyselí se kyselinou octovou a rozpouštědla se odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí v 1 l 20% kyseliny octové, roztok se zfiltruje a přímo se použije k čištění surového produktu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Získá se 10 g (2-0-metyltirosin)deamino-1-karbaoxytocinu (vztaženo na 100% látku), který svými vlastnostmi odpovídá produktu získávanému klasickým způsobem syntézy v roztoku.

P ř í k l a d 3

Podle postupu v příkladech 1 a 2 bylo dosaženo stejných výsledků, jestliže pro oktapetidamid vzorce V byla místo o-nitrofenylsulfenylové skupiny použita skupina terc.butyloxykarbonylová.

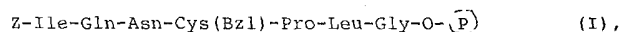
Seznam zkratk použitých v textu

Z-	benzyloxykarbonylová skupina
Boc-	terc.butyloxykarbonylová skupina
Ⓟ-	kopolymer (styren-1% divinylbenzenu)
Bzl-	benzylová skupina
Me-	metylová skupina
Tyr	tyrosin
Ile	isoleucin
Gln	glutamin
Asn	asparagin
Cys	cystein
Pro	prolin

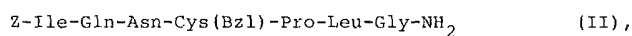
Leu	leucin
Gly	glycin
-C ₃ H ₆ COOH	-karboxypropionylová skupina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

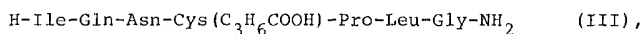
Způsob výroby (2-0-metyltirosin)deamino-1-karboxytocinu vyznačující se tím, že se nejprve syntézou na pevném nosiči připraví heptapeptid vzorce I



kde Z je benzyloxykarbonylová skupina, (P) je nosič, Bzl je benzyl, který se převede do roztoku odštěpením z nosiče působením metanolického roztoku amoniaku za vzniku chráněného heptapeptidu II



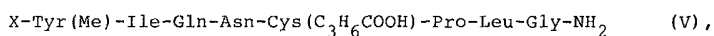
kde Z a Bzl mají již uvedený význam, ze kterého se odštěpí chránící skupiny roztokem sodíku v kapalném amoniaku, alkyluje se sulfhydrylová skupina cysteinu etylesterem kyseliny *p*-brommásečné a esterová skupina se hydrolyzuje roztokem hydroxidu sodného, čímž se připraví volný heptapeptidamid III



ke kterému se přikondenzuje derivát tyrosinu IV



kde X je terc.butyloxykarbonylová nebo o-nitrofenylsulfenylová skupina a Me je metyl, za vzniku oktapeptidu V



kde X a Me mají již uvedený význam, načež se odštěpí chránící skupina a volný oktapeptidamid se cyklizuje rozpuštěním v pufrovaném roztoku dimetylformamidu s přidávkou difenylfosforazidu nebo pomocí N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a N-hydroxybenzotriazolu.