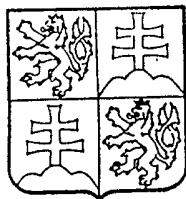


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 051

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴
C 07 K 7/16

(21) PV 3844-88.F

(22) Přihlášeno 03 06 88

(40) Zveřejněno 13 10 89

(45) Vydáno 27 02 91

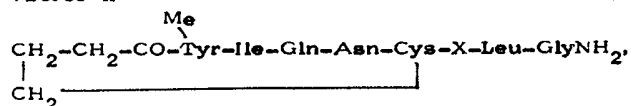
(75)
Autor vynálezu

LEBL MICHAL ing. CSc., PRAHA,
BARTH TOMISLAV RNDr. DrSc., ROZTOKY
u PRAHY (CS),
EICHLER JUTTA dr., BERLIN (DD),
ČERNÝ BOHUSLAV RNDr. CSc.,
SLANINOVÁ JIŘINA RNDr. CSc.,
HRBAS PAVEL RNDr. CSc., PRAHA (CS)

(54)

Analogy oxytocinu

(57) Řešení se týká nových analogů oxytocinu
vzorce II



kde X značí (3,4)dehydroprolin (IIa), nebo

3,4- [³H₂]prolin (IIb)

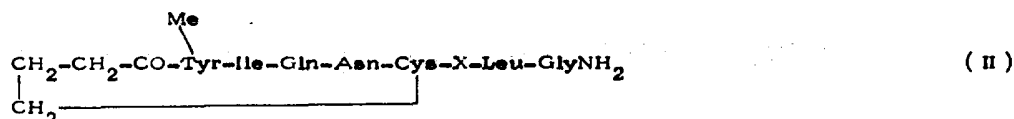
a chirální aminokyseliny mají konfiguraci L. Analog
IIa se připraví výstavbou peptidu na pevné fázi a
jeho odštěpením pomocí kapalného fluorovodíku. Ana-
log IIb se připraví katalytickou redukcí látky IIa plyn-
ným triciem. Látka IIa slouží jako prekursor látky IIb,
která je využívána ve studiu distribuce a metabolismu
klinicky využívané látky I (X=Pro).

Vynález se týká syntetických analogů oxytocinu, přirozeného peptidového hormonu ze zadního laloku hypofýzy. Z více jak jednoho tisíce syntetických analogů tohoto peptidu se jen zloemek uplatnil pro výhodnější vlastnosti v praxi (Jošt K. a spol. v knize Handbook of neurohypophyseal hormone analogs, CRC Press, USA, 1987). Mezi analogy oxytocinu využívané v praxi pro výhodné vlastnosti se zařadil i [2-O-methyltyrosin]deamino-1-karba-oxytocin (autorské osvědčení č. 149028) vzorec I, který pro snížené vedlejší nepříznivé účinky a prodloužení doby účinku na děložní stahy a vylučování mléka (AO 187829) byl uveden do využívání ve veterinární praxi. Pro rozšíření indikačních oblastí, jakož i případný vývoj nových analogů brání zatím malé znalosti o jeho metabolismu a distribuci v živočišných tkáních a tekutinách po jejím podání do organismu. Jednou z účinných cest poznání metabolismu a distribuce je využití vhodně značené látky, jejíž metabolické produkty a změny hladin intaktní látky je možné sledovat vhodněji než samotné nezačtené látky.



[2-O-methyltyrosin]deamino-1-karba-oxytocin

Předmětem tohoto vynálezu jsou dva nové analogy [2-O-methyltyrosin]deamino-1-karba-oxytocinu a to [2-O-methyltyrosin, 7-(3,4)dehydroprolin]deamino-1-karba-oxytocin (vzorec IIa) a [2-O-methyltyrosin, 7-(3,4-[³H₂]-prolin)]deamino-1-karba-oxytocin (vzorec IIb) a způsob jejich přípravy. V dalším je příprava obou látek a jejich charakteristika přiblížena na příkladech.



IIa, X = (3,4)dehydroprolin; IIb, X = 3,4-[³H₂]-prolin

Příklad 1

Syntéza [2-O-methyltyrosin, 7-(3,4)dehydroprolin]deamino-1-karba-oxytocinu byla provedena na p-methylbenzhydrylaminové pryskyřici (0,4 g, 0,8 mmol NH₂/g). Po navázání karboxyterminální aminokyseliny (Boc-Gly) byly postupně navázány Boc-Leu, Boc-Δ^{3,4}-Pro, Fmoc-Cys(C₃H₆COOBu^t), Fmoc-Asn, Fmoc-Gln, Fmoc-Ile, Boc-Tyr standardním postupem uvedeným v tabulce 1. Po připojení poslední aminokyseliny byla Boc-ochranná skupina odštěpena kyselinou trifluoroctovou, pryskyřice byla neutralizována roztokem triethylaminu a peptid byl cyklizován účinkem 10 ekvivalentů dicyklohexylkarbodilimidu a N-hydroxybenztriazolu v 2,2,2-trifluoethanolu. Po dosažení negativního výsledku v ninhydrinovém testu byla pryskyřice důkladně promyta dimethylformamidem a dichlormethanem. Pryskyřice s navázaným peptidem byla vysušena ve vakuu, suspendována v teflonové aparatuře s 20 ml kapalného fluorovodíku, 1 ml anisolu a 0,5 ml ethandithiolu. Po 1 hod míchání při 0 °C byl fluorovodík odpařen, suspenze promyta ethylacetátem na fritě a po vysušení ve vakuu byl produkt eluován 30% kyselinou octovou. Získaný roztok byl lyofilizován.

Příklad 2

Část (50 mg) lyofilizátu byla rozpuštěna v 3 mol/l (4 ml) AcOH a nanášena na kolonu Bio-Gelu P-4 (70x1 cm). Frakce obsahující žádaný produkt byly spojeny a lyofilizovány. Produkt

byl rozpuštěn v 3 ml/1 AcOH 2 ml a nanesen na kolonu Separonu SI C-18 (25 x 0,4 cm). Elucí 50% methanolem v 0,05% kyselině trifluoroctové byla frakce obsahující 2-O-methyltyrosin, 7-(3,4)dehydroprolin deamino-1-karba-oxytocin zahuštěna ve vakuu a lyofilizována. Bylo získáno 6,2 mg chromatograficky jednotného produktu, jehož biologické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 2, který hydrogenací na čerstvě vyredukovaném paladiu v dimethylacetátu přechází v [2-O-methyl-tyrosin] deamino-1-karba-oxytocin (srovnání pomocí HPLC a biol. aktivit).

Tabulka 1

Výstavba peptidového řetězce na pryskyřici s použitím Fmoc-aminokyseliny nebo Boc-aminokyseliny. Obecné schéma.

Fmoc-aminokyseliny			Boc-aminokyseliny		
krok	reagencie (15 ml)	min	krok	reagencie (15 ml)	min
1	CH ₂ Cl ₂ (2x)	3	1	CH ₂ Cl ₂ (4x)	7
2	DMF (2x)	3	2	45% TFA v CH ₂ Cl ₂	2
3	DMF:piperidin (1 : 1) (2x)	20	3	- " -	20
4	DMF (2x)	3	4	CH ₂ Cl ₂ (3x)	5
5	dioxan: H ₂ O (2 : 1) (2x)	10	5	8% TEA v CH ₂ Cl ₂ (2x)	3
6	DMF (3x)	5	6	CH ₂ Cl ₂ (4x)	7
7	CH ₂ Cl ₂ (či DMF) (3x)	5	7	HOBT ester Boc-Ak či symetrický anhydrid (3 ekv.) v CH ₂ Cl ₂	40 i více
8	HOBT ester Fmoc AK či symetrický anhydrid (3 ekv.) v CH ₂ Cl ₂ či CH ₂ Cl ₂ : DMF	15 i více	8	ninhydrinový test	5
9	ninhydrinový test	5	9	CH ₂ Cl ₂ (3x)	5
10	v případě potřeby opakovat kondenzaci (krok 7 až 9)		10	2-propanol (3x)	5
11	DMF (5x)	8	11	CH ₂ Cl ₂ (4x)	7
12	1-propanol (5x)	8	12	v případě potřeby opakovat kondenzaci (krok 7 až 11)	
13	CH ₂ Cl ₂ (5x)	8			

Pozn. TEA - triethylamin
AK - aminokyselina
DMF - dimethylformamid

Tabulka 2

Biologické vlastnosti [2-O-methyltyrosin]deamino-1-karba-oxytocinu a derivátu s 3,4 dehydroprolinem v poloze 7

Látka	Děloha krysy		Galaktogogický test
	test in vitro	in vivo	in vivo (intenzita účinku,
	IU/mg	IU/mg	IU/mg)
[2-O-Methyltyrosin]-17 deamino-1-karba-oxytocin	17,1	45	35
[2-O-Methyltyrosin, 7-(3,4) dehydroprolin]-deamino-1- -karba-oxytocin	36,2	169,3	91,0

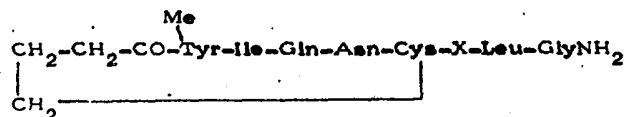
Příklad 3

19,0 mg PdO bylo předredukováno H_2 v methanolu, který byl následně odpařen. Ke katalyzátoru bylo přidáno 0,5 mg [2-O-methyltyrosin, 7-(3,4)dehydroprolin]deamino-1-karba-oxytocinu a 1 ml dimethylacetamidu. Směs byla redukována 60% plynným triciem 2,5 h při tlaku 84 kPa.

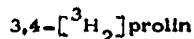
Po odlyofilizování DMAA a odcentrifugování katalyzátoru byl produkt izolován pomocí HPLC na Separonu SX 18, 250 x 8 mm 53% vodným roztokem methanolu. Výtěžek byl 150 MBq. Biologickým testem na izolované krysí děloze in situ bylo ukázáno, že bylo získáno celkem 150 μ g (0,15 μ molu) biologicky účinného triclovaneého [2-O-methyltyrosin]deamino-1-karba-oxytocinu, jehož specifická reaktivita byla (0,99 TBq/mmol).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Analogy oxytocinu obecného vzorce II



kde X značí (3,4)dehydroprolin nebo



a chirální aminokyseliny mají konfiguraci L.