

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 22.VIII.1966 (P 116 179)

Pierwszeństwo: 24.VIII.1965 Szwajcaria

Opublikowano: 20.II.1971

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c, 103/52

CZYTEŁNIA

UKŁ. Zł. 1. 1971
Urzedu Patentowego
PRL

Współtwórcy wynalazku: Janos Pless, Stephan Guttman, Roger Boissonnas

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

Sposób wytwarzania nowego pentakozapeptydu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego pentakozapeptydu o wzorze amidu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-L-glutamylo-L-histydyl-L-feniloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, nazywanego w dalszym ciągu D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd, jego soli addycyjnych oraz związków kompleksowych z metalami ciężkimi. D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd, jego sole i związki kompleksowe z metalami ciężkimi wykazują silne działanie adrenokortykotropowe.

Znane jest otrzymywanie na drodze syntezy pentakozapeptydu stanowiącego amid L-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-L-glutamylo-L-histydyl-L-feniloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny o działaniu kortykotropowym określonym w dalszym ciągu jako Nle⁴ pentakozapeptyd. W porównaniu z naturalnym ACTH Nle⁴ pentakozapeptyd ma tę zaletę, że nie wykazuje żadnych właściwości antygenowych.

Dalszą zaletą jest to, że w położeniu 4 Nle⁴ pentakozapeptyd nie posiada tak jak naturalny ACTH reszty metioninowej, która łatwo się utlenia, przez co hormon ten przekształca się w formę nieczynną, lecz posiada odporną na utlenianie, resztę norleu-

2

cynową, wykazującą takie same właściwości steryczne jak reszta metioninowa. Ponadto Nle⁴ pentakozapeptyd posiada w położeniu 25 resztę amidu waliny, która w naturalnym ACTH nie występuje w tym położeniu. Reszta amidowa waliny umiejscowiona na końcu grupy karboksylowej chroni łańcuch peptydowy przed enzymami o działaniu destruktywnym.

Jednak tak samo jak naturalny ACTH Nle⁴ pentakozapeptyd ma resztę L-seryny w położeniu 1, która jest bardzo wrażliwa na destruktywne działanie aminopeptydaz. Z tego powodu próbowano resztę L-seryny w Nle⁴ pentakozapeptydzie zastąpić resztą odporną na działanie aminopeptydaz.

Przez zastąpienie w Nle⁴ pentakozapeptydzie reszty L-seryny resztą D-serynową udało się uzyskać D-ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd, niewrażliwy na aminopeptydazy. Ponieważ jednak reszty D-aminokwasów nie występują w naturalnych, biologicznie czynnych hormonach peptydowych, niespodziewane było, że przez zamianę naturalnie występującego rodnika aminokwasu izomerem o przeciwnym znaku, nie występującym w naturze uzyska się związek, który wykazuje nie tylko jakościowo takie same właściwości biologiczne i lecznicze jak naturalny ACTH, lecz nawet pod względem ilościowym, przewyższy naturalny ACTH.

D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd można wytwarzać metodami ogólnie znanymi w syntezie związków tego rodzaju, przy czym aminokwasy połączone są

ze sobą w kolejności ustalonej w powyższym wzorze pojedynczo lub po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach.

Według wynalazku nowy pentakozapeptyd o wzorze amidu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-L-glutamyl-L-histydylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-L-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-L-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, jego sole addycyjne oraz związki kompleksowe z metalami ciężkimi wytwarza się w ten sposób, że od amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo- γ -O-R''-L-glutamyl-L-Im-R'''-L-histydylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-L-glicylo-E-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-waliloglicylo-E-N-R-L-lizylo-E-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-E-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R i R' oznaczają grupy ochronne stosowane w chemii peptydów do ochrony grup aminowych, R'' i R''' oznaczają karboksylowe ewentualnie imidazolowe grupy ochronne lub atom wodoru, a Im oznacza grupę imidazolilową, odszczepia się grupy ochronne w jednym lub w kilku stopniach, a następnie otrzymany pentakozapeptyd ewentualnie przeprowadza się w znany sposób w jego aktywne pod względem terapeutycznym sole addycyjne z kwasami organicznymi lub nieorganicznymi, lub przeprowadza się w związki kompleksowe z metalami ciężkimi.

Sposobem według wynalazku D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd wytwarza się w ten sposób, że amid L-walilo-E-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R oznacza grupę karbo-III rząd. butoksyloową, lub karbo-III rząd. amyloksyloową, grupę toluenosulfonyloową, ftalilową, formylową lub trójfluoroacetyloową, poddaje się kondensacji z N-karbobenzoksy-L-walilo-glicylo-E-N-R-L-lizylo-E-N-R-L-lizylo-L-nitro-L-arginylo-L-nitro-L-arginylo-L-proliną, w której R ma wyżej podane znaczenie, uzyskany amid N-karbobenzoksy-L-walilo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie, po odszczepieniu grupy karbobenzoksylowej i grup nitrowych poddaje się kondensacji z N-trójfenylo-metylo- γ -O-III rząd., butylo-L-glutamyl-L-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-proliną, w której R ma wyżej podane znaczenie, a Im oznacza grupę imidazolilową, po czym uzyskany amid N-trójfenylo-metylo- γ -O-III rząd. butylo-L-glutamyl-L-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo- ϵ -N-R-L-lizylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie, po odszczepieniu grupy α -N-trójfenylo-metylowej poddaje się kondensacji z azydkiem N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucyny, w którym R' oznacza grupę trójfenylo-metyloową, grupę karbo-III rząd. butoksyloową, lub karbo-III rząd. amyloksyloową, karbobenzoksylową,

grupę trójfluoroacetyloową, acetyloową, chloroacetyloową lub formylową, po czym wszystkie grupy ochronne z uzyskanego, nowego, zablokowanego pentakozapeptydu, mianowicie z amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo- γ -O-III rząd. butylo-L-glutamyl-L-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo- ϵ -N-R-L-lizylo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo- ϵ -N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R i R' mają wyżej podane znaczenie, odszczepia się w kwaśnym środowisku w jednej lub w kilku fazach procesu.

Produkty wyjściowe do wytwarzania D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptydu o ile nie są znane otrzymuje się metodami znanymi w chemii peptydów, przy czym aminokwasy można łączyć pojedynczo lub po uprzednim wytworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach.

Przy syntezie nowego pentakozapeptydu, a zwłaszcza do blokowania grupy aminowej reszty seryny stosuje się grupy: trójfenylo-metyloową, karbo-III rząd. butoksyloową, karbo-III rząd. amyloksyloową, można również stosować inne grupy ochronne jak: grupa karbobenzoksylowa, grupy trójfluoroacetyloową, acetyloową, chloroacetyloową, formylową. Do ochrony grupy ϵ -aminowej reszty lizynowej stosuje się grupy karbo-III rząd, butoksyloową i karbo-III rząd. amyloksyloową, oraz inne odpowiednie grupy ochronne, jak grupa karbobenzoksylowa, grupa toluenosulfonyloową, ftalilową, formylową i trójfluoroacetyloową.

Do blokowania grupy γ -karboksylowej w rodniku kwasu glutaminowego stosuje się szczególnie grupę III-rząd. butyloksyloową oraz inne odpowiednie grupy ochronne, jak grupa metoksyloową, etoksyloową, III-rząd. amyloksyloową, grupa amidowa lub benzylksyloową.

Dla blokowania grupy imidazylowej reszty histydynowej stosuje się zwłaszcza grupę trójfenylo-metyloową, oraz inne odpowiednie grupy ochronne, jak: grupa karbo-III rząd. butoksyloową, karbo-III rząd. amyloksyloową, karbo-benzoksylową, lub grupa benzylowa. Dla blokowania grupy guanidynowej w rodniku argininowym stosowano grupę nitrową, jednak można stosować również inne odpowiednie grupy ochronne, jak grupa tozylowa, grupa p-nitrokarbobenzoksy lub grupa 2-/izopropylksykarbonylo-3,4,5,6-czterochlorobenzoylo. Można również w syntezie stosować efekt ochronny, wynikający z działania protonami na grupę guanidynową.

Syntezę polipeptydu objaśniono na rysunkach, na których fig. 1 ilustruje sposób wytwarzania H-Val-Gly-/R/Lys-/R/Lys-/Arg-Arg-Pro-Val-/R/Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, a fig. 2 sposób wytwarzania H-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.

Przytoczone skróty mają następujące znaczenie:

CBO = grupa karbobenzoksylowa

Tri = grupa tritylowa = trójfenylo-metyloową

CTB = grupa karbo-III-rząd. butyloksyloową

OCP = grupa 2,4,5-trójklorofenoksyloową

OTB	= grupa III rzęd. butyloksylowa
OMe	= grupa metoksykowa
OEt	= grupa etoksykowa
Arg	= reszta arginylowa
Glu	= reszta L-glutamylowa
Gly	= reszta glicylowa
His	= reszta L-histydylowa
Lys	= reszta L-lizylowa
Nle	= reszta L-norleucylowa
Phe	= reszta L-fenylalaninowa
Pro	= reszta L-prolinowa
Ser	= reszta L-serylowa
D-Ser	= reszta D-serylowa
Try	= reszta L-tryptofanowa
Tyr	= reszta L-tyrozylowa
Val	= reszta walilowa
Im	= reszta imidazolilowa

Otrzymany sposobem według wynalazku D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd można następnie przeprowadzić w sole. Mogą to być sole z kwasami organicznymi takimi, jak kwas octowy, propionowy, glikolowy, mlekowy, pirogronowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy, fumarowy, winowy, cytrynowy, benzoowy, cynamonowy, salicylowy, 2-fenoksy- lub 2-acetoksybenzoowy, migdałowy, metanosulfonowy, etanosulfonowy, hydroksytanosulfonowy, benzeno- lub toluenosulfonowy, naftalenosulfonowy, sulfanilowy, jak również kwasy polimeryczne, jak tanina, kwas alginowy, poligalakturnowy, fosforan polifloretyny lub karboksymetyloceluloza, oraz sole z kwasami nieorganicznymi, jak kwas chlorowodorowy, na przykład kwas solny lub bromowodorowy, kwas azotowy, rodanowodorowy, siarkowy i kwas fosforowy. Jako związek kompleksowy z metalami ciężkimi stosuje się na przykład związek kompleksowy z cynkiem.

Otrzymany sposobem według wynalazku D-Ser¹-Nle⁴-pentakozapeptyd, jego sole i związki kompleksowe z metalami ciężkimi posiadają takie same właściwości biologiczne i terapeutyczne jak naturalny ACTH. Można go więc stosować przy leczeniu następujących schorzeń: ostry i chroniczny reumatyzm stawowy, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, nerczyca, kalagenozy jak na przykład tocznia rumieniowata, sklerodermia itd. schorzenia alergiczne różnych organów jak astma oskrzelowa, egzema, pokrzywki, złuszczone zapalenie skóry, wstrząs anafilaktyczny itd., zatrucia różnego pochodzenia, na przykład przy chronicznym alkoholizmie, nowotwory jak na przykład białaczka, rak gruczołów limfatycznych, rak układu siateczkowo-śródbłonkowego itd., dla zapobiegania zanikowi kory nadnercza przy leczeniu kortikosterydami, przy objawach niedoczynności przysadki mózgowej.

Dużą zaletą w porównaniu z naturalnym wyekstrahowanym z materiału zwierzęcego hormonem jest fakt, że syntetyczny pentakozapeptyd nie posiada właściwości antygenowych. Można go stosować bez zastrzeżeń przy wyżej wymienionych schorzeniach również wtedy, gdy u pacjenta wystąpiły objawy alergiczne przy poprzednim leczeniu naturalnym ACTH.

W testach zwykle stosowanych do standaryzacji, D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd posiada działanie bio-

logiczne, wynoszące 625 ± 130 międzynarodowych jednostek kortikotropiny na mg niezwiązanego peptydu. W celu ustalenia zmian biologicznych wytworzonego sposobem według wynalazku 25-cio peptydu służyła trzecia międzynarodowa standardowa próbka dla kortikotropiny, która jest do dyspozycji pod nazwą „International Standard for Corticotropin” i umożliwia zmierzanie preparatów ACTH w jednostkach międzynarodowych.

Okazało się, że nowy pentakozapeptyd ma po podaniu dożylnym dłuższe działanie niż znane dotychczas naturalne i syntetyczne preparaty ACTH, co stanowi duży postęp techniczny. Dozowanie pentakozapeptydu wytworzonego sposobem według wynalazku waha się w granicach 40–60 jednostek międzynarodowych dziennie, a w przypadkach szczególnych 10–100 jednostek międzynarodowych dziennie. Stwierdzona w czasie standaryzacji wysoka skuteczność nowego pentakozapeptydu znalazła w pełni potwierdzenie w jego praktycznym zastosowaniu w terapii, a działanie pentakozapeptydu jest o wiele silniejsze niż działanie naturalnych i syntetycznych preparatów ACTH.

D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd może znaleźć zastosowanie jako lek na przykład w postaci preparatów farmaceutycznych. Preparaty te zawierają wymieniony związek w mieszaninie z organicznym lub nieorganicznym nośnikiem odpowiednim do stosowania pozajelitowego. Do tego celu stosuje się substancje, które nie wchodzi w reakcję z nowym związkiem na przykład: żelatynę, cukier mlekowy, skrobię, stearynian magnezu, talk, oleje roślinne, alkohole benzytowe, gumę arabską, glikole polialkilenowe, wazelinę, cholesterol lub inne znane nośniki leków. Preparaty farmaceutyczne mogą być przygotowane na przykład w postaci płynnej jako roztwory, zawiesiny lub emulsje. W razie potrzeby są one sterylizowane i/lub zawierają substancje pomocnicze, jak środki konserwujące, stabilizujące, zwilżające lub emulgujące. Mogą one także zawierać i inne terapeutycznie wartościowe składniki. Nowy związek można podawać tak jak naturalny ACTH również w postaci preparatów o przedłużonym działaniu.

Otrzymany sposobem według wynalazku D-Ser¹-Nle⁴ pentakozapeptyd i jego sole mogą znaleźć zastosowanie również jako produkt pośredni do wytwarzania preparatów farmaceutycznych.

Poniższe przykłady objaśniają wykonanie sposobu według wynalazku, nie ograniczając jego zakresu. Wszystkie temperatury podano w stopniach Celsjusza.

Przykład I. Otrzymywanie amidu L-walilo-glicylo-karbo III, rzęd. butoksy-L-lizylo-karbo-III rzęd. butoksy-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-karbo-III rzęd. butoksy-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny. /H-Val-Gly-/CTB/Lys-CTB/Lys-Arg-Arg-Pro-Val/CTB/Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂/.

88 g CBO-/NO₂/Arg-/NO₂/Arg-Pro-OMe rozpuszcza się w 90%-owej mieszaninie dioksan-woda, po czym dodaje 220 ml 2-n ągu sodowego. Po upływie 2 godzin rozcieńcza się 1 litrem wody, po czym dwukrotnie wymywa octanem etylu. Następnie wodny roztwór zakwasza się 4 n kwasem solnym, wytrącony produkt rozpuszcza się w mieszaninie

metanol-aceton 1:1 po czym wytrąca dodatkiem eteru etylowego. Uzyskuje się 70 g CBO-/NO₂/Arg-/NO₂/Arg-Pro-OH o temperaturze topnienia 108° (z rozkładem). (alfa)_D²⁰ = -19°C w dwumetyloformamidzie. Otrzymany jak wyżej trójpeptyd rozpuszcza się w 400 ml 33%-owego roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym, pozostawia w ciągu 1 godziny w temperaturze 20°, podgęszcza do objętości 200 ml, wytrąca eterem etylowym, przesącza, wymywa octanem etylu i suszy.

Uzyskuje się 72 g H-/NO₂/Arg-/NO₂/Arg-Pro-OH. 3 HBr o temperaturze topnienia 84° (z rozkładem). (alfa)_D²¹ = -19° w 95%-owym kwasie octowym. Do roztworu złożonego z 72 g bromowodoru H-/NO₂/Arg-/NO₂/Arg-Pro-OH w 600 ml dwumetyloformamidu i w 56 ml trójetyloaminy wprowadza się w temperaturze 0°C 84 g CBO-Val-Gly-/CTB/Lys-/CTB/Lys-N₃/ sporządzonego z 85 g odpowiadającego mu hydrazidu/. Powstały roztwór pozostawia się na 16 godzin w spokoju, po czym odparowuje rozpuszczalnik. Pozostałość po odparowaniu rozpuszcza się w mieszaninie n-butanol/octan etylu jak 2:8 po czym wymywa dwukrotnie rozcieńczonym kwasem siarkowym. Roztwór zagęszcza się w próżni, po czym wytrąca eterem. Uzyskuje się 90 g CBO-Val-Gly-/CTB/Lys-/CTB/Lys-/NO₂/Arg-/NO₂/Arg-Pro-OH o temperaturze topnienia 151° (z rozkładem) (alfa)_D²⁰ = -38° w metanolu.

56 g CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(NO₂)Arg-(NO₂)Arg-Pro-OH rozpuszcza się w 900 ml dwumetyloformamidu i w 900 ml czterohydrofuranu. Po dodaniu 6,2 ml trójetyloaminy roztwór oziębia się do temperatury -10°C, po czym w tej temperaturze dodaje się 4,2 ml estru etylowego kwasu chloromrówkowego. Po 10 minutach dodaje się 36 g H-Val(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ w 160 ml dwumetyloformamidu, po czym miesza dalej w temperaturze 20° w ciągu 16 godzin. Rozpuszczalnik odparowuje się w próżni, a pozostałość wymywa wodą. Uzyskany peptyd rozpuszcza się w gorącym etanolu, po czym wytrąca octanem etylu. Po odsączeniu pod zmniejszonym ciśnieniem i po wysuszeniu uzyskuje się 72 g CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(NO₂)Arg-(NO₂)Arg-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ o temperaturze topnienia 190° (z rozkładem). (alfa)_D²⁰ = -36° w dwumetyloformamidzie.

72 g CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(NO₂)Arg-(NO₂)Arg-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ rozpuszcza się w 1,5 litra 80%-owego kwasu octowego, dodaje palladu jako katalizatora, uwodarnia do momentu, aż roztwór przestanie pochłaniać wodór, po czym odsącza katalizator. Po odparowaniu pozostałość rozpuszcza się w 500 ml metanolu, oziębia do temperatury -5°, dodaje 4,1 g kwasu toluenosulfonowego, po czym wytrąca eterem. Uzyskuje się 66 g H-Val-Cly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Arg-Arg-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ w postaci trój-toluenosulfonianu o temperaturze topnienia 185° (z rozkładem). (alfa)_D²⁰ = -42° w dwumetyloformamidzie.

Przykład II. Otrzymywanie Amidu-O-III rząd. butylo-L-glutamyl-L-tritylo-L-histydyl-L-fenyl-L-alanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-L-glicylo-N-karbo III rząd. butoksy-L-lizylo-L-proli-

lo-L-walilo-glicylo-N-karbo III rząd. butoksy-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-proli-L-walilo-N-karbo III rząd. butoksy-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-proli-

lo-L-waliny. (H-)OTB(Glu-(Trit)-His-Phe-Arg-Try-

-Gly-(CTB) Lys-Pro-Val-Gly(CTB)Lys-(CTB)-Lys-

-Arg-Arg-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂).

62 g H-Val-Cly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Arg-Arg-

-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ 3 Tos-

-OH rozpuszcza się w 300 ml pirydyny i w 300

ml acetonitrylu. Następnie dodaje się 57 g Trit-

(OTB)Glu-Trit-/His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-

-Pro-OH i po całkowitym rozpuszczeniu oziębia

się do temperatury 0°, po czym dodaje 28,6 g

karboduimidu dwucykloheksylu. Po 24 godzin-

nym wytrząsaniu w temperaturze 20° odsącza się

mocznik po czym wytrąca eterem. Wytrącony

produkt dwukrotnie rozpuszcza się w metanolu

i wytrąca octanem etylu. Uzyskuje się 90 g trój

(toluenosulfonianu)Trit-(OTB)Glu-(Trit)His-Phe-

-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-Gly-(CTB)Lys-

-(CTB)Lys-Arg-Arg-Pro-Val(CTB)Lys-Val-Tyr-

-Pro-Val-NH₂.

Temperatura topnienia 184°C (z rozkładem).

(alfa)_D²⁰ = -51° w metanolu. (45 g Trit-(OTB)

Glu-Trit(His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-

-Gly-(CTB)-Lys-(CTB)-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-(CTB)

Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. 3 Tos-OH rozpuszcza się

w 500 ml 80% kwasu octowego, po czym pozostawia

w temperaturze 30° w ciągu 2 godzin, dodaje

się 50 ml Amberlitu IRA 410 w postaci

octanowej, przesącza, odparowuje w próżni, a pozostłość

po odparowaniu rozpuszcza w metanolu. Po wytrąceniu eteru

uzyskuje się 40 g H-(OTB)Glu-(Trit)His-Phe-Arg-Try-

Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)-Lys-(CTB)Lys-Arg-Arg-

-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. Rozkład następuje

w temperaturze 170°. (Alfa)_D²⁰ = -49° w metanolu.

Przykład III. Otrzymywanie estru metylo-

wego L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucyny. (H-Tyr-Ser-Nle-OMe).

54 g H-Ser-Nle-OMe. HCl i 63 g CBO-Tyr-OH

rozpuszcza się w 860 ml acetonitrylu, oziębia do

temperatury 0°, dodaje 28 ml Trójetyloaminy,

oziębia do temperatury -10°C po czym dodaje

41 g karboduimidu dwucykloheksylu.

Mieszaninę miesza się w ciągu 16 godzin w tem-

peraturze 0°, po czym odsącza. Osad wymywa się

1400 ml pirydyny. Połączone przesącze odparowuje

się, a pozostałość wykryształizowuje z octanu etylu.

Uzyskuje się 101 g CBO-Tyr-Ser-Nle-OMe o temperaturze

topnienia 140-142°; (alfa)_D²⁰ = -15° w dwumetyloformamidzie).

51 g otrzymanego produktu rozpuszcza się w 2

litrach 1 n roztworu HCl w metanolu, po czym uwodarnia

w obecności 10 g węgla osadzonego na palladzie. Po upływie

około 2 godzin pobór wodoru przez roztwór zostaje

ukończony. Odsącza się, odparowuje, a pozostałość

wykryształizowuje z mieszaniny metanol/eter (3:1).

Uzyskuje się 42 g N-Tyr-Ser-Nle-OMe-HCl. Temperatura topnienia

227° (alfa)_D²⁰ = -7° w dwumetyloformamidzie.

Przykład IV. Otrzymywanie hydrazidu kar-

bo-III rząd. butoksy-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucyny. (CTB)-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-NHNH₂).

60 g chlorowodoru estru metylowego D-seryny rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i 54 ml trójetiloaminy, oziębia do temperatury 0°, po czym chlorowodorek trójetiloaminy odsąca się. Dwumetyloformamid odparowuje się w wysokiej próżni a pozostałość rozpuszcza w 150 ml pirydyny. Wkrapla się 100 g azydku III rząd. butyloksy-karbonylu, po czym pozostawia w temperaturze 20° na przeciąg 2 dni. Rozpuszczalnik odparowuje się, a pozostały produkt rozpuszcza w octanie etylu. Po wymyciu wodą rozcieńczonego kwasem solnym oraz roztworem kwaśnego węgla potasu, suszy się nad siarczanem sodu. Po odparowaniu octanu etylu pozostaje CTB-D-Ser-OMe w postaci oleju. Ester ten rozpuszcza się w 500 ml metanolu, po czym pozostawia z 50 ml wodzianu hydrazyny w temperaturze 20° na przeciąg 2 dni. Po odparowaniu metanolu wykrystalizowuje hydrazyd. Przekryształizowany z gorącego octanu etylu wyodrębnia się 53 g CTB-D-Ser-NHNH₂ o temperaturze topnienia 114°. (alfa)_D²¹ = -3° w dwumetyloformamidzie.

10 g hydrazidu CTB-D-seryny rozpuszcza się w temperaturze -10°C w 136 ml 1 n kwasu solnego, zawierającego 15 g chlorku sodu. W tej temperaturze dodaje się 160 ml octanu etylu, a następnie w trzech porcjach 38 g azotynu sodu. Mieszaninę pozostawia się do przereagowania, podczas mieszania w temperaturze -10°C jeszcze w ciągu 5 minut. Warstwę octanu etylu oddziela się, przemywa zimnym 10% roztworem kwaśnego węgla potasu, po czym suszy nad siarczanem sodu. Do osuszonego roztworu dodaje się roztwór złożony z 13 g chlorowodoru H-Tyr-Ser-Nle-CMe w 60 ml dwumetyloformamidu i w 6 ml trójetiloaminy.

Następnie octan etylu odparowuje się w próżni, a pozostałość pozostawia w temperaturze 20° w ciągu 16 godzin. Rozpuszczalnik odparowuje się w próżni, a pozostałość rozpuszcza w octanie etylu. Roztwór ten wymywa się rozcieńczonym kwasem fosforowym i roztworem kwaśnego węgla potasu, po czym suszy nad siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika i wytrąceniu eterem otrzymuje się 15 g CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Mle-OMe o temperaturze topnienia 135°. (alfa)_D²⁰ = -6° w metanolu.

11 g CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-OMe rozpuszcza się w 100 ml metanolu, po czym dodaje 45 ml wodzianu hydrazyny. Roztwór pozostawia się w temperaturze 20° przez noc, w wyniku czego produkt wykrystalizowuje. Wykrystalizowany produkt sączy się i przemywa metanolem i eterem naftowym. Otrzymuje się 7,7 g hydrazidu CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Nle o temperaturze topnienia 210° (alfa)_D²⁰ = +6,4° w dwumetyloformamidzie.

Przykład V. Otrzymywanie amidu D-Serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-L-glutamyl-L-histydyl-L-fenylalanilo-L-arginylo-L-tryptofanylo-Glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny. (D-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Try-

-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂) (Fig.2).

2,0 g CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-NHNH₂ (przykład IV) rozpuszcza się w 12 ml dwumetyloformamidu, dodaje 4 ml wody, oziębia do temperatury -10°, dodaje 2 ml 6 n kwasu solnego, po czym dodaje 280 mg azotynu sodu, miesza w ciągu 5 minut w temperaturze -5°, następnie dodaje 300 ml, 0,2 n roztworu kwaśnego węgla potasu i odwirowuje. Otrzymany CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-N₃ octanu rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu, dodaje 10,5 g H-Glu-(OTB)-Trit-His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, pozostawia w spokoju, w temperaturze 0° w ciągu 12 godzin, dodaje dalszą ilość azydku cztero-peptydu, wytworzonego z 2,0 g CTB-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-NHNH₂, pozostawia w spokoju w temperaturze 0° w ciągu 6 godzin, odparowuje, miesza z octanem etylu, wymywa gorącym acetonem i octanem etylu po czym suszy w próżni.

Uzyskany produkt rozpuszcza się w 100 ml 90% kwasu trójfluorooctowego, pozostawia w atmosferze azotu w temperaturze 20° przez 1 godzinę, odparowuje, miesza z octanem etylu, odsąca i suszy. Uzyskany produkt rozpuszcza się w 500 ml 0,2 n kwasu octowego, przepuszcza roztwór przez amberlit IRA-410 w postaci octanowej, sączy i liofilizuje. Po wysuszeniu nad wodorotlenkiem sodu otrzymuje się 7,5 g 10-cio wodnego siedmiooctanu H-D-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, który przy przeprowadzaniu oznaczeń chromatograficznych w czasie elektroforezy zachowuje się jak substancja homogeniczna. (W wyniku całkowitej hydrolizy ustala się następujący skład aminokwasów: Ser_{1,9}, Tyr_{1,9}, Nle_{1,1}, Glu_{1,0}, His_{1,0}, Phe_{1,1}, Arg_{3,1}, Gly_{2,0}, Lys_{2,1}, Pro_{3,0}, Val_{3,9}).

Wyniki mikroanalizy:

obliczono: C 51,9 H 7,5 N 16,2 O 24,4%

znaleziono: C 52,1 H 7,5 N 15,6 O 24,8%

Temperatura topnienia: 209° z rozkładem

(alfa)_D²⁰ = -80° w 1 n kwasie octowym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego pentakozapeptydu o wzorze amidu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-L-glutamyl-L-histydyl-L-fenylalanilo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, ewentualnie w postaci jego spli addycyjnych lub związków kompleksowych z metalami ciężkimi, znamienny tym, że od amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-γ-O-R"-L-glutamyl-L-histydyl-L-fenylalanilo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R i R' oznaczają grupy ochronne stosowane w chemii

peptydów do ochrony grup aminowych, R" i R'" oznaczają karboksylowe ewentualnie imidazolowe grupy ochronne lub atom wodoru, a Im oznacza grupę imidazolilową, odszczepia się grupy ochronne w jednym lub w kilku stopniach, a następnie otrzymany pentakozapeptyd ewentualnie znanym sposobem przeprowadza w jego aktywne pod względem terapeutycznym sole addycyjne z kwasami organicznymi lub nieorganicznymi, lub przeprowadza w związki kompleksowe z metalami ciężkimi.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne w jednym lub kilku stopniach odszczepia się od amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-γ-O-III rząd. butylo-L-glutamylo-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenyloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R i R' oznaczają grupy ochronne stosowane w chemii peptydów do ochrony grup aminowych.

3. Sposób według zastrz. 1, 2 **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się od amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-γ-O-III rząd. butylo-L-glutamylo-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenyloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanyloglicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R i R' mają znaczenie wyżej podane, wytworzonego na drodze kondensacji amidu L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie z N-karbобензоксы-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-nitro-L-arginylo-nitro-L-arginylo-L-prolina, w której R ma wyżej podane zna-

czenie i następnej kondensacji otrzymanego amidu N-karbобензоксы-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-nitro-L-arginylo-nitro-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie, po odszczepieniu grupy nitrowej oraz grupy karbобензоксыlowej z N-trójfenylo-metylo-γ-O-III rząd. butylo-L-glutamylo-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenyloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolina, w której R ma wyżej podane znaczenie i kondensacji otrzymanego amidu N-trójfenylo-metylo-γ-O-rząd. butylo-L-glutamylo-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenyloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanylo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie, po odszczepieniu grupy α-N-trójfenylo-metylowej z azydkiem N-R'-D-Serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucyny w którym R' ma wyżej podane znaczenie.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się od amidu N-R'-D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-norleucylo-γ-O-III rząd. butylo-L-glutamylo-Im-trójfenylo-metylo-L-histydylo-L-fenyloalanylo-L-arginylo-L-tryptofanyloglicylo-ε-N-R-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-ε-N-R-L-lizylo-ε-N-R-L-lizylo-L-arginylo-L-arginylo-L-prolilo-L-walilo-ε-N-R-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-waliny, w którym grupę ochronną R stanowi grupa karbo-III rząd. butoksylo-wa, karbo-III rząd., amyloksylo-wa, karbобензоксыlo-wa, grupa toluenosulfonylo-wa, ftalilo-wa, formylo-wa i trójfлуoroacetylo-wa, a grupę ochronną R' grupa trójfenylo-metylo-wa, karbo-III-rząd. butoksylo-wa, karbo-III rząd. amyloksylo-wa, karbобензоксыlo-wa, grupa trójfлуoroacetylo-wa, acetylo-wa, chloroacetylo-wa i formylo-wa.

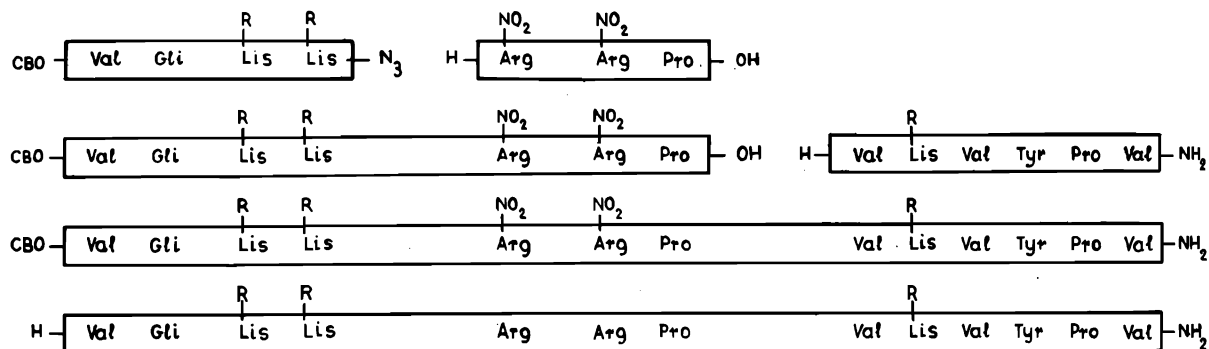


Fig 1

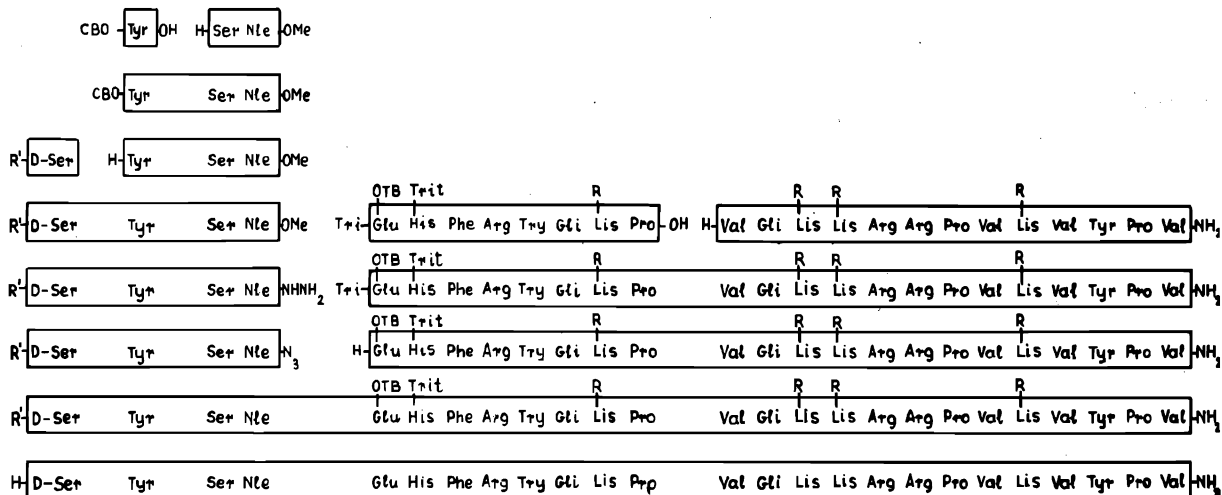


Fig. 2