



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 11.IX.1964 (P 105 697)

Pierwszeństwo: 13.IX.1963 Szwajcaria

Opublikowano: 18.III.1967

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

UKD
CZYTELNIĄ

Urzędu Patentowego
1. q. 12. 1967

Współtwórcy wynalazku: dr Roger Boissonnas, dr Stephan Guttman,
dr Janos Pless

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

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego tetrakozapeptydu 1-serylo-1-tyrozylo-1-serylo-1-norleucylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - 1 - lizylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolilo - 1 - walilo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny i jego soli addycyjnych z kwasami.

Polipeptyd ten można otrzymać metodami znanymi przy syntezie polipeptydów, przy czym aminokwasy można łączyć pojedynczo w kolejności podanej w wymienionym wzorze lub po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach.

Według wynalazku nowy tetrakozapeptyd można otrzymać na przykład w ten sposób, że pochodną heptapeptydu N - karbobenzoiloksy - 1 - walilo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - N - tozylo - 1 - arginylo - N - tozylo - 1 - arginylo - 1 - prolinę traktuje się sodem w roztworze suchego ciekłego amoniaku otrzymaną 1 - walilo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolinę kondensuje z N - R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - O - III-rzęd. butylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolina, w której R oznacza odpowiednią grupę ochronną, naj-

2

lepiej grupę karbobenzoiloksyloową, acetyloową, formyloową, karbo-III rząd. butoksyloową, p-nitrokarbobenzoiloksyloową lub trójfenyloformyloową, po czym powstałą R - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - O - III rząd. butylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolinę, w której R posiada wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji z estrem III rząd. butylowym 1 - walilo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny, a następnie w jednym lub w kilku stopniach odszczepia się w kwaśnym środowisku wszystkie grupy ochronne nowego zabezpieczonego tetrakozapeptydu o wzorze estru III rząd. butylowego R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - O - III rząd. butylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginylo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolilo - 1 - walilo - ε - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny, w którym R posiada wyżej podane znaczenie.

Produkty wyjściowe do wytworzenia nowej pochodnej tetrakozapeptydu o wyżej podanym wzorze, o ile dotychczas nie były znane, można otrzy-

mać metodami znanymi w chemii peptydów, przy czym aminokwasy łączy się ze sobą pojedynczo lub po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach. Otrzymany sposobem według wynalazku nowy tetrakozopeptyd można przeprowadzić w sole. Jako sole wchodzi w rachubę sole z kwasami organicznymi takimi jak kwas octowy, propionowy, glikolowy, mlekowy, pirogronowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy, fumarowy, winowy, cytrynowy, benzoesowy, cynamonowy, salicylowy, 2-fenoksy- lub 2-acetoksybenzoesowy, migdałowy, metanosulfonowy, hydroksyetasulfonowy, benzeno- lub toluenosulfonowy, naftalenosulfonowy, sulfanilowy oraz kwasy wysokocząsteczkowe jak kwas garbnikowy, alginowy, poligalakturonowy lub karboksymetyloceluloza, a także sole z kwasami nieorganicznymi jak kwas chlorowodorowy, na przykład solny lub bromowodorowy, siarkowy, azotowy, tiocyjanowy i fosforowy.

Otrzymany według wynalazku tetrakozapeptyd i jego sole posiadają takie same biologiczne i terapeutyczne właściwości jak naturalna kortikotropina (ACTH). Można go więc na przykład stosować przy leczeniu gośdca stawowego, astmy oskrzelowej, zapalenia stawów, alergii, skazy moczanowej, pokrzywki, wstrząsu anafilaktycznego, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, tocznia rumieniowatego, oparzeń, złuszczonego zapalenia skóry, bliznowatki limfatycznej, twardziny skóry, egzem, stanów zatrucia, przy chronicznym alkoholizmie oraz do zapobiegania atrofii kory nadnerczy przy stosowaniu pochodnych kortizonowych. Posiada on tę samą siłę działania jak naturalna kortikotropina (pomiar metodą Sayera).

Podczas gdy naturalną kortikotropinę można oczyścić tylko uciążliwymi i drogimi metodami i praktycznie zawsze jeszcze zawiera wysokocząsteczkowe białkowe zanieczyszczenia, które mogą spowodować groźne reakcje anafilaktyczne, to nowy syntetyczny związek może być otrzymany bezpośrednio w stanie bardzo czystym bez jakichkolwiek zanieczyszczeń ciałami o charakterze białkowym. Poza tym wytwarzanie nowego syntetycznego związku jest niezależne od dysponowania gruczołami przysadki mózgowej, których otrzymanie jest ograniczone i drogie.

Szczególną zaletą jest fakt, że nowy tetrakozapeptyd w pozycji 4 nie zawiera reszty metioniny tak jak znany już związek 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - metionylo - 1 - glutamilo - 1 - histydylo - 1 - fenylalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - 1 - glicylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - 1 - glicylo - 1 - lizylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolilo - 1 - walilo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - prolina i naturalne ACTH.

Reszta metioniny jak wiadomo łatwo się utlenia i wskutek tego wymienione substancje przekształcają się w postać nieaktywną. Nowy polipeptyd otrzymany według wynalazku zawiera resztę norleucyny, która posiada te same steryczne właściwości jak reszta metioniny, natomiast jest odporna na utlenienie. Nowy związek może być podobnie jak naturalne ACTH podany w postaci preparatu o przedłużonym działaniu, na przykład z żelatyną, karbometoksylocelulozą, kwasem poligalak-

turonowym lub innymi wysokocząsteczkowymi związkami, zawierającymi grupy kwasowe.

W poniższych przykładach objaśniających sposób według wynalazu zastosowano następujące skróty:

cbo = karbobenzoiloksy

tri = trityl = trójfenyloetyl

(fcr) = formyl (przy grupie α-aminowej lizyny)

(toz) = tozyl = p-toluenosulfonyl (przy grupie guanidynowej argininy)

ctb = III rząd. butyloksy

ocp = 2, 4, 5-trójklorofenoksy

arg = l-arginil

glu = l-glutamyl

gli = glicyl

his = l-histydył

liz = l-lizyl

nle = l-norleucyl

fe = l-fenylalanil

pro = l-prolil

ser = l-seryl

try = l-tryptofanyl

tyr = l-tyrozyl

wal = l-walil

leu = l-leucyl

ala = l-alanil

Przykład I. Syntezę objaśniono na rysunku

a) H-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-OH

12 g cbo-wal-gli-(for) liz-(for)liz-(toz)arg-(toz) arg-pro-OH rozpuszcza się w 5 litrach suchego ciekłego amoniaku i podczas silnego mieszania dodaje kawałki sodu aż do trwałego, ciemnoniebieskiego zabarwienia. Następnie dodaje się 2 g chlorku amonowego, odparowuje amoniak, suszy pozostałość w wysokiej próżni i rozpuszcza w 250 ml 0,2 n kwasu octowego. Nieorganiczne sole usuwa się według Dixona (Biochem. Biophys. Acta 34, 251 (1959)), odparowuje uwolniony od soli roztwór, rozpuszcza pozostałość w metanolu i wytrąca przy pomocy eteru etylowego. Otrzymuje się octan H-wal-gli-(for)

liz-(for)liz-arg-arg-pro-OH [α] $D^{22} = -49$ w 1-n kwasie octowym.

b) H-glu-(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-OH
10 g cbo-his-fe-(toz)arg-try-gli-(for) liz-pro-OH

rozpuszcza się w 5 litrach suchego, ciekłego amoniaku, dodaje kawałki sodu aż do trwałego niebieskiego zabarwienia. Następnie zadaje się całość chlorkiem amonowym, odparowuje roztwór, rozpuszcza pozostałość w 0,2 n kwasie octowym, usuwa nieorganiczne sole według Dixona (Biochem. Biophys. Acta 34, 251 (1959)), odparowuje pozostawiony soli roztwór, rozpuszcza pozostałość w metanolu i wytrąca za pomocą eteru etylowego. Otrzymuje się jednooctan H-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-

-pro-OH (temperatura topnienia 180°C; [α] $D^{22} = -25^\circ$ w 1 n kwasie octowym), który rozpuszcza się z 4 g cbo-glu-(otb)-ocp w 50 ml dwumetyloformamidu. Pozostawia się przez dwa dni w temperaturze pokojowej, zadaje eterem etylowym, sączy i otrzymuje 7,1 g cbo-glu-(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for)liz-pro-OH, którą rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i uwodornia w obecności

katalizatora palladowego. Po odsączeniu i przemyciu eterem etylowym otrzymuje się octan H-glu(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-OH (temperatura topnienia 190°C; $[\alpha]_D^{22} = -19^\circ$ w 1 n kwasie octowym).

c) tri-ser-tyr-ser-nle-glu-(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-OH. 6 g octanu H-glu(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-OH i 6 g tri-ser-tyr-ser-nle-N₂ rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu, pozostawia w ciągu 16 godzin, odparowuje i krystalizuje pozostałość z gorącego metanolu. Otrzymuje się 5,1 g octanu tri-ser-tyr-ser-nle-glu(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-OH (temperatura topnienia 220°C; $[\alpha]_D^{22} = -23^\circ$ w dwumetyloformamidzie), który rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu i zadaje 1 g kwasu trójmetylooctowego.

W wysokiej próżni odparowuje się do połowy objętości, chłodzi do -5° i zadaje 0,36 g chlorku trójmetyloacetylenu i 0,3 g trójetyloaminy. Po 10 minutach zadaje się roztworem 2,8 g octanu H-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-OH i 0,3 ml trójetyloaminy w 200 ml dwumetyloformamidu.

Pozostawia się w ciągu 4 godzin i wytrąca acetonem. Otrzymuje się trójmetylooctan tris-ser-tyr-ser-nle-glu-(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-OH, który można oczyścić przez sączenie przez kolumnę z żelalem krzemionkowym w 50% wodnym roztworze metanolu.

Przykład II. 4 g tri-ser-tyr-ser-nle-glu(otb)-his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-OH rozpuszcza się w 40 ml dwumetyloformamidu, dodaje 40 ml pirydyny i 0,6 g kwasu toluenosulfonowego, odparowuje w wysokiej próżni do połowy objętości, chłodzi do -5° i zadaje roztworem 4 równoważników H-wal-(for)-liz-wal-tyr-pro-otb i 1 g dwucykloheksylokarbodiimidu. Pozostawia się przez noc i zadaje acetonem.

Następnie sący się, suszy w wysokiej próżni i otrzymuje 4 g tri-ser-tyr-ser-nle-glu(otb)his-fe-arg-try-gli-(for) liz-pro-wal-gli-(for) liz-(for) liz-arg-arg-pro-wal-(for) liz-wal-tyr-pro-otb, które ogrzewa się w 3 litrach 0,1 n kwasu solnego podczas 3 godzin w temperaturze 100° bez dostępu tlenu.

Odparowuje się w próżni, przemycia się pozostałość acetonem i eterem etylowym i suszy w próżni. Po rozdziale przeciwprądowym w układzie kwas trójfluorooctowy (II rzędowy butanol) woda (1:120:160) otrzymuje się 2,5–3,0 g głównej frakcji, która wykazuje aktywność kortikotropiny i która zachowuje się jak substancja jednorodna przy chromatografii i elektroforezie. Migracja przy elektroforezie bibułowej przy pH 5,8 i 40 v/cm wynosi 60 mm (użyta jako substancja wzorcowa histydy-na wędruje 70 mm).

Migracja przy elektroforezie bibułowej przy pH 1,9 i 40 v/cm wynosi 93 mm (użyty jako substancja wzorcowa kwas glutaminowy wędruje w tych

samych warunkach 81 mm). Otrzymuje się polipeptyd o wzorze H-ser-tyr-ser-nle-glu-his-fe-arg-try-gli-liz-pro-wal-gli-liz-liz-arg-arg-pro-wal-liz-wal-tyr-pro-OH. Po kwasnej hydrolizie w temperaturze 110° podczas 16 godzin daje on następujący skład aminokwasów: ser_{2,9} tyr_{2,0} nle_{1,1} glu_{0,9} his_{1,1} fe_{1,0} arg_{3,1} gli_{1,0} liz_{3,9} pro_{2,9} wal_{3,1}.

Otrzymany produkt może być używany jako taki lub po przeprowadzeniu w inną sól. Przechowywany może być w stanie stałym w roztworze lub jako adsorbat.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego polipeptydu 1-serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - 1 - lizylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolilo - 1 - walilo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny, **znamienny tym**, że od estru III rzęd. butylowego R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - o - III rzęd butylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - prolilo - 1 - walilo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny, w którym R oznacza grupę zabezpieczającą wolną grupę aminową, odszczepia się grupy ochronne w kwaśnym środowisku w jednym lub kilku stopniach.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się od pochodnej, w której grupę ochronną R stanowi grupa karbobenzoiloksylova, acetylova, formylowa, karbo- III rzęd. butoksylova, p-nitrokarbobenzoiloksylova lub trójfenylometylova.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się od estru III rzęd. butylowego N - R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - o - III rzęd. butylo - 1 - glutamylo - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 - prolilo - 1 - walilo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny, w którym R ma wyżej podane znaczenie, wytworzonego na drodze reakcji estru III rzęd. butylowego 1 - walilo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - walilo - 1 - tyrozylo - 1 - proliny z N - R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - serylo - 1 - norleucylo - γ - o - III rzęd. butylo - 1 - glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 - arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - prolilo - 1 - walilo - glicylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 -

arginilo - 1 - prolina, w której R ma wyżej po-
dane znaczenie, otrzymaną na drodze konden-
sacji N - R - 1 - serylo - 1 - tyrozylo - 1 - sery-
lo - 1 - norleucylo - γ - o - III rząd. butylo - 1 -
glutamylo - 1 - histydylo - 1 - fenyloalanilo - 1 -
arginilo - 1 - tryptofanylo - glicylo - ϵ - N - for-
mylo - 1 - lizylo - 1 - proliny, w której R ozna-
cza grupę ochronną, korzystnie grupę benzoilo-
ksylową, acetylową, formylową, karbo - III -
rząd. butoksylo - 1 - nitrokarbobenzoiloksylo- 10

wą lub trójfenyloformylową, z 1 - walilo - glicy-
lo - ϵ - N - formylo - 1 - lizylo - ϵ - N - formy-
lo - 1 - lizylo - 1 - arginilo - 1 - arginilo - 1 -
proliną, którą z kolei wytwarza się przez reak-
cję pochodnej heptapeptydu o wzorze N - kar-
bobenzoiloksy - 1 - walilo - glicylo - ϵ - N -
formylo - 1 - lizylo - ϵ - N - formylo - 1 - lizy-
lo - N - tozylo - 1 - arginilo - N - tozylo - 1 -
arginilo - 1 - proliny z sodem w suchym ciek-
łym amoniaku.

