



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

235151
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 26 08 82
(21) (PV 6207-82)

(40) Zveřejněno 17 09 84

(45) Vydáno 15 02 87

(51) Int. Cl.³
C 07 G 15/00
C 07 C 103/52

(75)

Autor vynálezu

LEBL MICHAL ing. CSc., FLEGEL MARTIN RNDr. CSc.,
KROJIDLO MILAN CSc., PRAHA

(54) Způsob dělení D a L isomerů analogů oxytocinu

1

Předmětem vynálezu je způsob dělení D a L isomerů analogů oxytocinu obsahujících nepřírozenou aminokyselinu v poloze 2.

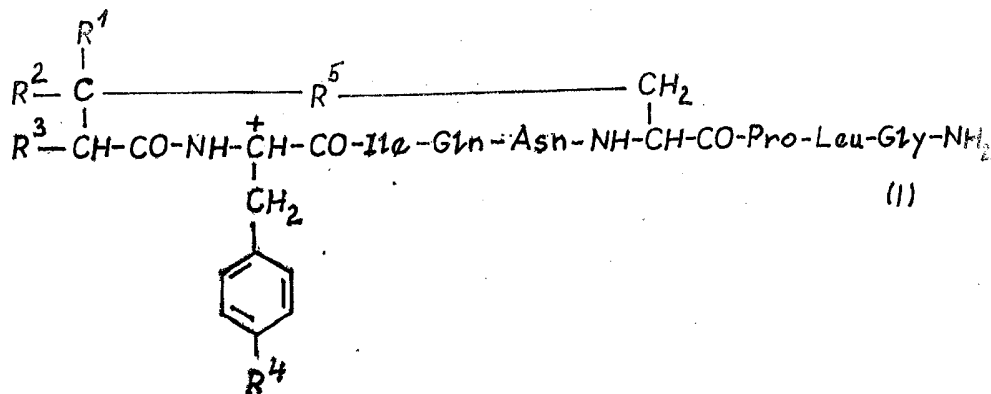
Analogy tohoto typu jsou předmětem několika čs. autorských osvědčení OA číslo 216 722, AO číslo 226 923) a mají významný natriuretický účinek, pokud obsahují v poloze 2 aminokyselinu o konfiguraci L, případně jsou účinnými inhibitory uterotonického účinku oxytocinu, pokud je aminokyselina v poloze 2 konfigurace D.

Tyto analogy se zatím připravují postupnou výstavbou peptidického řetězce následnou cyklizací, a to buď přes stadium aktivního esteru ω -karboxylu modifikovaného cysteinového zbytku (u karba-analogů), který rea-

2

guje s α -aminoskupinou aminokyseliny v poloze 2 za tvorby peptidické vazby, nebo (v případě analogů obsahujících disulfický můstek) oxidací sulfhydrylových skupin vzniklých po odstranění chránicích skupin ze síry cysteinu. Dosud byla příprava těchto analogů prováděna s opticky čistou nepřírozenou aminokyselinou, která musela být získána resolucí, např. s využitím enzymů [viz např. Zhuze A. L. a kol.: Collect. Czech. Chem. Commun. **29**, 2648 (1964), AO číslo 228 431].

Tuto nevýhodu odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstatou je, že se D a L isomery analogů oxytocinu obecného vzorce I



kde

R^1 a R^2 je H nebo CH_3 , R^3 je H nebo NH_2 , R^4 je H, OH, alkyl o 1 až 3 uhlících nebo alkoxyl s jedním až dvěma uhlíky, R^5 je S—S, S— CH_2 nebo CH_2 —S a konfigurace aminoskupiny v poloze 2 označené + je D nebo L, dělí pomocí vysokotlaké chromatografie na koloně silikagelu se zakotvenými oktaedecylovými řetězci na obrácené fázi v soustavě methanol nebo tetrahydrofuran jako organické rozpouštědlo a 0,1 % obj. kyselina trifluoroctová nebo 0,05 M octan amonný o pH 7 jako vodný pufr.

Způsob dělení diastereoizomerů je dále objasněn v následujících příkladech provedení. Složení mobilní fáze je vyjádřeno v objemových procentech.

Příklad 1

(2-D- a L-fenylalanin)deamino-6-karba-oxytocin

o-Nitrobenzensulfenyl-D, L-fenylalanyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-(ω -karboxyethyl)homocysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (200 mg) byl převeden na aktivní ester a cyklizován obvyklým způsobem (AO č. 226 923). Část směsi diastereoizomerních peptidů (100 mg) byla rozpuštěna ve 4 ml methanolu a 7 ml vody, roztok byl přefiltrován a nanesen na kolonu silikagelu se zakotvenými oktaedecylovými řetězci (Partisilu ODS-2) o rozměrech $50 \times 0,9$ cm a eluce byla provedena směsí 56 % methanolu a 44 % 0,1% kyseliny trifluoroctové. Byly získány dvě frakce obsahující peptidický materiál, tyto byly zahuštěny ve vakuu a lyofilizovány. Bylo získáno 12,3 mg látky o $k' = 4,9$, která byla totožná se standardem analogu obsahujícím L-fenylalanin (OA č. 216 722) a 13 mg látky o $k' = 6,5$, která byla totožná se standardem látky obsahující D-fenylalanin (AO č. 226 923).

Příklad 2

(2-D- a L-O-ethyltyrosin)deamino-6-karba-oxytocin

o-Nitrobenzylsulfenyl-D, L-O-ethyltyrosyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-(β -karboxyethyl)homocysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (100 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 1 a dělení diastereoizomerů bylo provedeno na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 55 % methanolu a 45 % 0,1% kyseliny trifluoroctové. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 10,7 miligramu látky obsahující L-O-ethyltyrosin ($k' = 8,0$) a 11,6 mg látky obsahující D-O-ethyltyrosin ($k' = 10,1$). Oba analogy byly shodné se standardy.

Příklad 3

(2-D- a L-p-methylfenylalanin)deamino-6-karba-oxytocin

o-Nitrobenzylsulfenyl-D, L-p-methylfenylalanyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-(β -karboxyethyl)homocysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (200 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 1 a dělení části produktu bylo provedeno na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 60 % methanolu a 40 % vody. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 12,6 mg látky obsahující L-p-methylfenylalanin ($k' = 5,7$) a 13,7 miligramu analogu obsahujícího D-p-methylfenylalanin ($k' = 7,6$). Obě látky byly totožné se standardy.

Příklad 4

(2-D- a L-p-ethylfenylalanin)deamino-6-karba-oxytocin

o-Nitrobenzensulfenyl-D, L-p-ethylfenylalanyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-(β -karboxyethyl)homocysteinyl-prolyl-leucylglycinamid (200 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 1 a dělení části diastereoizomerů (100 mg) bylo provedeno na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 70 % methanolu a 30 % 0,1% kyseliny trifluoroctové. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 18,3 mg látky obsahující L-p-ethylfenylalanin ($k' = 6,18$) a 17,6 mg látky obsahující D-p-ethylfenylalanin ($k' = 8,48$). Oba analogy byly totožné se standardy.

Příklad 5

(2-D- a L-p-methylfenylalanin)deamino-I-karba-oxytocin

o-Nitrobenzensulfenyl-D, L-tyrosyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-(γ -karboxypropyl)cysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (100 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 1 a dělení diastereoizomerů bylo provedeno na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 12 % tetrahydrofuranu a 88 % 0,5 M octanu amonného o pH 7. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 12,1 mg látky obsahující L-tyrosin ($k' = 17,2$) a 11 miligramů látky obsahující D-tyrosin. Obě látky byly totožné se standardy [Jošt K.: Collect. Czech. Chem. Commun. **36**, 218 (1971) a Lebl M.: nepublikované výsledky].

Příklad 6

(2-D- a L-p-ethylfenylalanin)deamino-oxytocin

Z S-benzylmerkaptopropionyl-D, L-p-ethylfenylalanyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamidu (100 mg) byly chránící skupiny odštěpeny sodíkem v kapalném amoniaku a oxidační cyklizace byla provedena obvyklým způsobem [AO č. 226 923]. Diastereoizoméry byly děleny na stejné koloně jako v příkladu 1 s použitím mobilní fáze obsahující 65 % methanolu a 35 % 0,1% kyseliny trifluoroctové. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 16,2 mg látky obsahující L-p-ethylfenylalanin ($k' = 10,2$) a 15,3 mg látky obsahující D-p-ethylfenylalanin ($k' = 15,9$). Obě látky byly totožné s analogy připravenými s použitím opticky čisté aminokyseliny.

Příklad 7

(2-D- a L-p-ethylfenylalanin)oxytocin

N α -benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-D, L-p-ethylfenylalanyl-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (100 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 6 a dělení diastereoizomerů bylo provedeno na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 60 % metha-

nolu a 40 % 0,05 M octanu amonného o pH 7. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 8,2 mg látky obsahující D-p-ethylfenylalanin ($k' = 11,6$) a 7,9 mg látky obsahující D-p-ethylfenylalanin ($k' = 23,3$). Obě látky byly totožné se standardy. [Zhuze A. L. a kol.: Collect. Czech. Chem. Commun. **29**, (1964)].

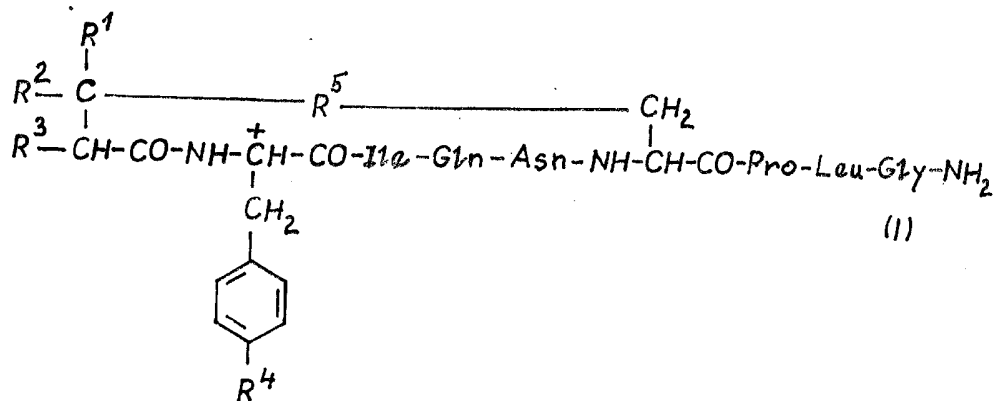
Příklad 8

[1-Penicilamin-, 2-D a L-p-ethylfenylalanin]-oxytocin

N-Benzyloxykarbonyl-S-benzylpenicilaminyl-D, L-p-ethylfenylalanin-isoleucyl-glutaminy-asparaginy-S-benzylcysteinyl-prolyl-leucyl-glycinamid (200 mg) byl cyklizován stejně jako v příkladu 6 a část (100 mg) diastereoizomerů byla dělena na stejné koloně s použitím mobilní fáze obsahující 65 procent methanolu a 35 % 0,05 M octanu amonného pH 7. Po zahuštění a lyofilizaci bylo získáno 7,2 mg látky obsahující L-p-ethylfenylalanin ($k' = 8,05$) a 7,4 mg látky obsahující D-p-ethylfenylalanin ($k' = 13,8$). Obě látky byly totožné s analogy připravenými s použitím opticky čistých aminokyselin.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob dělení D a L isomerů analogů oxytocinu obecného vzorce I



kde

R^1 a R^2 je H nebo CH_3 , R^3 je H nebo NH_2 , R^4 je H, OH, alkyl o 1 až 3 uhlících nebo alkoxy s jedním až dvěma uhlíky, R^5 je S—S, S— CH_2 nebo CH_2 —S a konfigurace aminoskupiny v poloze 2 je označené + je D nebo L, vyznačený tím, že směs analogů obecného vzorce I majících v

poloze 2 racemickou aminokyselinu, se dělí pomocí vysokotlaké chromatografie na koloně silikagelu se zakotvenými oktadecylovými řetězci na obrácené fázi v soustavě methanol nebo tetrahydrofuran jako organické rozpouštědlo a 0,1 % obj. kyselina trifluoroctová nebo 0,05 M octan amonný o pH 7 jako vodný pufr.