

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 156

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 7/16

(21) PV 5308-86.D

(22) Přihlášeno 11 07 88

(40) Zveřejněno 11 04 89

(45) Vydáno 13 07 90

(75)

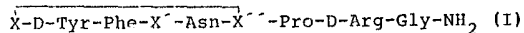
Autor vynálezu

ZAORAL MILAN ing. DrSc., BLÁHA IVO RNDr. CSc.,
LEBL MICHAL ing. CSc., PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc.,
ROZTOKY

(54)

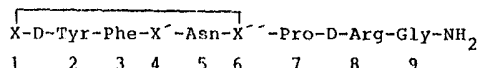
Vasopresinová analoga a způsob jejich přípravy

(57) Řešení spadá do oblasti peptidových hormonů a způsobu jejich přípravy. Látky lze využít jako léčiva, zejména pro substituční terapii diabetes insipidus (úplavice žíznivá). Výhoda popsaných látek proti dosud známým látkám, spočívá v podstatně vyšší a čistší účinnosti a ve vyšší chemické stabilitě. Jsou popisována vasopresinová analoga obecného vzorce I



1 2 3 4 5 6 7 8 9
v němž X je zbytek kyseliny máselné nebo zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové X' je Gln, Val nebo Asn X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné. Řeší se rovněž příprava těchto látek. Látky spadají do skupiny peptidů.

Vynález se týká vasopresinových analogů s velmi vysokým a velmi specifickým antidiuretickým účinkem a způsobu jejich přípravy. Tato analoga jsou charakterizována vzorcem I



v němž X je zbytek kyseliny máselné nebo zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové

X' je Gln, Val nebo Asn

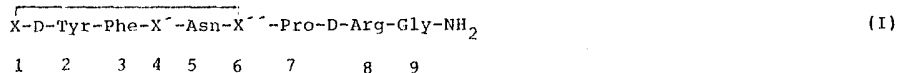
X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné.

Vysoce účinná a přitom vysoce specificky působící antidiuretika vasopresinového typu se používají v lékařství pro substituční terapii diabetes insipidus (úplavice žíznivá), enuresis nocturna (noční pomočování dětí), lehčích forem hemofilie včetně von Willebrandova syndromu a v klinické diagnostice (Zaoral M.: Int. J. Peptide Protein Res. 25, 561 (1985)). Dosud používané preparáty, v první řadě [1-kyselina 3-merkaptopropionová, 8-D-arginin] vasopresin (DDAVP), (Zaoral M., Kolc J.: Šorm.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1 250 (1967)) jsou sice velice účinné a v praxi se dobře osvědčují jak vyplývá např. z toho, že DDAVP je zařazován mezi 15 nejvýznamnějších preparátů vyráběných dosud v tomto století, ale mají ještě některé nedostatky. Mají nízký, ale nicméně zcela patrný účinek na krevní tlak a na uterus. Tyto vedlejší účinky snižují poněkud jejich terapeutickou hodnotu. Uvedené nedostatky nemají látky podle čs. AO 242 062 (Zaoral M., Bláha I., Krchňák V.). Látky podle AO jsou z hlediska lékařského použití výhodnější než DDAVP. Jejich nevýhodou je jen nevýrazně vyšší, nebo nižší účinnost ve srovnání s DDAVP. Vzhledem k velikosti antidiuretického účinku DDAVP a nízké hodnotě jeho vedlejších účinků představují látky podle AO 242 062 sice výrazný, ale přece jen ne takový pokrok, aby byly jednoznačně zajímavé z praktického hlediska.

Je známo, že náhrada jedné sirné skupiny disulfidového mostu vasopresinů methylenovou skupinou vede často k látkám se zvýšenými biologickými účinky. Tak lze zvýšit i účinnost vasopresinových analogů obsahujících v poloze 8 aminokyselinu konfigurace D.

Nyní bylo zjištěno, že změna konfigurace v poloze 2 vede u těchto analogů, tj. vasopresinových karba analogů obsahujících v poloze 8 aminokyselinu konfigurace D, k neočekávanému zvýšení antidiuretického účinku (8 až 10násobnému) a k zesílení inhibičních účinků proti vedlejším účinkům, jako je účinek na krevní tlak a na uterus. Tyto látky představují novou skupinu vasopresinových analogů se silnými agonisticko-antagonistickými účinky. Jejich antidiuretický účinek je až o jeden řád vyšší ve srovnání s DDAVP a současně patří k nejsilnějším známým inhibitorům účinku na krevní tlak a na uterus.

Podstatou tohoto vynálezu jsou vasopresinová analoga podle vzorce I

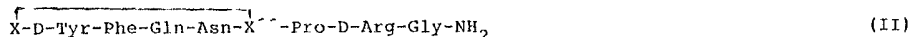


v němž X je zbytek kyseliny máselné nebo zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové

X' je Gln, Val nebo Asn

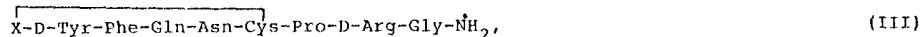
X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné.

Dále jsou předmětem vynálezu sloučeniny obecného vzorce II

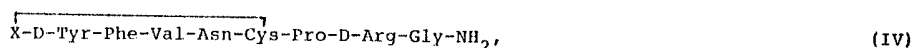


kde X značí zbytek kyseliny merkaptopropionové

X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné, vzorce III



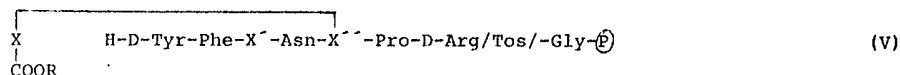
kde X značí zbytek kyseliny máselné, a vzorce IV



kde X značí zbytek kyseliny máselné.

Podstatou vynálezu je dále způsob přípravy těchto látek.

Podstata přípravy vasopresinových analogů podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že se připraví lineární prekursor analogu obecného vzorce V,



v němž R je terc.-butyl nebo fluorenylmethyl

(P) je polymerní nosič

Tos značí zbytek kyseliny p-toluensulfonové

a ostatní zkratky mají stejný význam jako v bodu 1, odštěpí se chránicí skupina R, provede se cyklisace mezi zbytky 1 a 2, vzniklý cyklický prekursor analogu se odštěpí z polymerního nosiče amonolysou, p-toluensulfonový zbytek se odštěpí působením kapalného fluorovodíku nebo působením sodíku v kapalném amoniaku a získaný produkt se vyčistí.

Metodou syntézy peptidů v pevné fázi, s výhodou na styren-divinylbenzénovém kopolymeru se připraví lineární prekursor analogu podle vzorce V, přičemž ve čtvrtém stupni syntézy nekondensuje k peptidovému řetězci N-Boc-S-/tetrbutoxykarbonylpropyl/cystein nebo N-Boc-S-/fluorenylmetyloxykarbonylpropyl/cystein. Po skončení přípravy lineárního prekursoru podle vzorce V se odštěpí Boc chránicí skupina (resp. Boc a fluorenylmetylová chránicí skupina) a provede se uzávěr kruhu mezi karboxylovou skupinou S-/karboxypropionyl/cysteinu a aminoskupinou tyrosinu v poloze 2. Produkt se pak odštěpí z pryskyřice amonolysou, Tos zbytek chránicí guanidinovou skupinu D-argininu se odštěpí, s výhodou působením sodíku v kapalném amoniaku nebo působením kapalného fluorovodíku v přítomnosti anisolu a získaný produkt se vyčistí gelovou filtrací na Sephadexu, kontinuální beznosičovou elektroforesou a vysoko-výkonnou kapalinovou chromatografií.

Cyklisace lineárního vasopresinového analogu vzorce V se provádí v dimethylformanidu.

Připravené látky byly zkoušeny na antidiuretický, presorický a uterotonický účinek a na inhibici presorického a uterotonického účinku (testy byly prováděny v podstatě podle: Vávra I., Machová A., Krejčí I.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 188, 241 (1974); Krejčí I., Kubková B., Vávra I.: Brit. J. Pharmacol. 30, 497 (1967); Munsick R. A.: Endocrinology 66, 451 (1960)). Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Z údajů uvedených v tabulce je patrné, že změna konfigurace v poloze 2 zvyšuje antidiuretický účinek karbaanalogů 3-6x a současně prohlubuje jejich inhibiční účinky ve srovnání s jinými analogy tohoto typu. Dále je zřejmé, že karba¹ analogon (látko I) má mnohem vyšší účinnost než odpovídající karba⁶ analogon (látko III).

T a b u l k a 1

VP	AD	BP	UT
I [But ¹ , D-Tyr ² , D-Arg ⁸]	7,9	pA ₂ 7,2	pA ₂ 7,5
II [But ¹ , D-Tyr ² , Val ⁴ , D-Arg ⁸]	10,0	pA ₂ 6,8	pA ₂ 7,9
III [Mpr ¹ , D-Tyr ² , Abu ⁶ , D-Arg ⁸]	1 až 2	pA ₂ 6,8	pA ₂ 7,8
IV DDAVP	1	0,96	5,1

Použité zkratky: VP = vasopresin, AD = antidiuretický účinek, BP = presorický účinek, UT = uterotonický účinek. Velikost antidiuretického účinku je vyjádřena v relativních hodnotách, přičemž účinnost DDAVP = 1, But je zbytek kyseliny máselné, Mpr je zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové, Abu je zbytek kyseliny alfa-aminomáselné.

Látky I a II mají mnohem vyšší a specifitější antidiuretický účinek než DDAVP. Specifičnost jejich antidiuretického účinku je de facto nekonečná, poněvadž obě látky jsou značnými inhibitory presorického účinku a specifitnost antidiuretického účinku se stanovuje z poměru velikosti antidiuretického a presorického účinku. Obě látky se jeví jako jednoznačně výhodnější pro ty indikační oblasti, v nichž je dosud považován za lék první volby DDAVP. Další výhodou látek I a II proti DDAVP je zvýšená resistance proti ataku proteolytických enzymů a odstranění chemické lability vyplývající z přítomnosti disulfidového mostu v DDAVP. Stabilita látek I a II je předurčuje pro perorální aplikaci. Značná účinnost obou látek při perorální aplikaci byla experimentálně prokázána.

Podstata vynálezu je ilustrována a doložena následujícími příklady provedení:

Teploty tání (t.t.) byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigované. Optické aktivity byly stanovovány na objektivním polarimetru. Syntézy v pevné fázi byly prováděny na automatickém syntetizátoru peptidů. Volné peptidy byly čištěny na kontinuální beznosičové elektroforese a/nebo vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií. Čistota produktů byla kontrolována chromatografií v tenké vrstvě silikagelu, papírovou elektroforesou, analytickou vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií, analýsou aminokyselinového složení a elementární analýsou. Biologická účinnost připravených látek byla testována metodami uvedenými na str. 4. Program syntézy analogů je uveden v tabulce 2. Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti analogů jsou uvedeny v tabulce 3.

T a b u l k a 2

Program syntézy analogů vasopresinu

Číslo kroku	Činidlo	Čas (min)	Počet opakování
1	55% TFA/CH ₂ Cl ₂ ^a	2	1
2	55% TFA/CH ₂ Cl ₂ ^a	30	1
3	CH ₂ Cl ₂	1	3
4	30% dioxan/CH ₂ Cl ₂	1	3
5	CH ₂ Cl ₂	1	3
6	10% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	2	1
7	CH ₂ Cl ₂	1	2
8	10% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	2	1
9	CH ₂ Cl ₂	1	6
10	Sym. anhydrid/CH ₂ Cl ₂ (DMF)	30 až 120 ^b	1
11	CH ₂ Cl ₂	1	3
12	20% EtOH/CH ₂ Cl ₂	1	3
13	CH ₂ Cl ₂	1	3

^a Po navázání Tyr bylo přidáváno 5% anisolu.

^b Do negativního ninhydrinového testu.

Tabulka 3

Některé vlastnosti připravených analogů vasopresinu

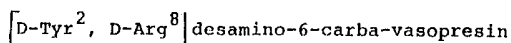
Látka	E ^a		R _F ^b		k	Sumární vzorec (Mol. hmotnost)	Vypočteno		Aminokys. analýza						
	2.4 E ^a 5.7	1 3	2 4	Nalezeno %C			%H	%N	Asp	X	Tyr	Phe	Gly Arg		
[Mpr ¹ , C ¹ , D-Tyr ² , D-Arg ⁸]VP	0.61	0.15	0.01	0.01	3.88	C ₄₇ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₂ S.6AcOH (1 411.5)	50.21	6.42	13.89	1.04	1.00			1.00	
	0.40	0.15	0.60	0.60			50.42	6.11	13.76		0.94		1.03	0.90	
[Mpr ¹ , C ¹ , D-Tyr ² , Val ⁴ , D-Arg ⁸]VP	0.60	0.18	0.01	0.01	15.1	C ₄₇ H ₆₇ N ₁₃ O ₁₁ S.6AcOH (1 382.5)	51.26	6.63	13.17	1.00	0.99 ^f			1.08	
	0.35	0.07	0.53	0.53			51.99	6.52	12.84	0.99 ^e	0.92	0.94	3.90		
[Mpr ¹ , D-Tyr ² , C ⁶ , D-Arg ⁸]VP	0.61	0.16	0.01	0.01	3.61	C ₄₇ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₂ S.2TFA. .2H ₂ O (1 315.3)	46.72	5.52	14.91	1.00	1.04	0.94	1.06		
	0.40	0.14	0.60	0.60			46.35	5.24	15.03	0.95 ^d	0.96	1.02	0.97		

^aElektroforéza na papíře Whatmann 3MM, 20V/cm, 1 h, v 1M CH₃COOH (pH 2.4) nebo pyridin-acetátovém pufru (pH 5.7).^bChromatografie na tenké vrstvě (Silufol, Kavalier, ČSSR) v systémech.

1. 2-butanol - 98%HOCH₂-H₂O (75:13.5:11.5)
2. 2-butanol - 25%HN₃/H₂O-H₂O (85:7.5:7.5)
3. 1-butanol - CH₃COOH-H₂O (4:1:1)
4. 1-butanol-pyridin-CH₃COOH-H₂O (15:10:3:6)

^cHPLC, Separon Si-C-18, 40%MeOH, 60% 0.05%TFA^dHodnota pro Hcy(C₂H₄COOH)^eHodnota pro Cys(C₃H₆COOH)^fHodnota pro Val

P ř í k l a d 1



K syntéze v pevné fázi bylo použito 2 g chlormetylovaného aifovaného polystyrenu (1% p-divinylbenzenu, 0.63 mmol Cl/g) esterifikovaného Boc-Gly kaliumfluoridovou metodou (Horiki K., Igano K., Ynuye K.: Chem. Letters 1978, 165). Na nosič obsahující 0.30 mmol Gly/g byly postupně připojeny: Boc-D-Arg(Thos)OH, Boc-ProOH, Boc-Hcy(CH₂-CH₂COOBu^t)OH, Boc-AsnOH, Boc-GlnOH, Boc-PheOH a Boc-D-Tyr(Z)OH metodou symetrických anhydridů (Hagenmaier H., Frank H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973)). Syntéza byla provedena na automatickém syntetizátoru dle programu uvedeného v tabulce 2. Po odštěpení Boc-chránič skupiny tyrosinu a terc.-butylové chránič skupiny homocysteinového derivátu, Hcy(CH₂-CH₂COOBu^t), působením kyseliny trifluoroctové, byl peptid na nosiči cyklisován 3 ekviv. N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu v 20 ml CH₂Cl₂^x. Po 3 dnech, kdy bylo dosaženo negativní reakce v ninhydrinovém testu (Kaiser E., Kolesott R. L., Bossinger C. D., Cook D. I.: Anal. Biochem. 34, 595 (1970)), byl peptid na nosiči promyt (3x20 ml dimetylformamidu, 3x20 ml CH₂Cl₂) a vysušen. Bylo získáno 2.36 g (90%) látky.

Získaný peptid byl odštěpen z nosiče působením nasyceného roztoku amoniaku v metanolu (30 ml, 20 °C, 2 dny). Nosič byl odfiltrován a promyt teplým dimetylformamidem (50 °C, 20 ml). Po zahuštění roztoku ve vakuu byl produkt sražen eterem, odfiltrován a vysušen. Bylo získáno 607 mg (84%) surového peptidu. Tosylová chránič skupina argininu byla odštěpena působením 10 ml kapalného HF (0 °C, 1 h) za přídavku anisolu (0,3 ml) a thioanisolu (0,3 ml)^{xx}. Po odpaření HF byl zbytek suspendován v etylacetátu (20 ml), odfiltrován a filtrační koláč byl extrahován 3x20 ml 3M kyseliny octové. Spojené extrakty byly lyofilizovány a bylo získáno 470 mg (75%) produktu.

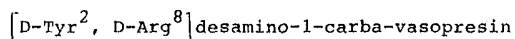
^xSe stejným výsledkem lze cyklisaci provést v dimetylformamidu, toluenu nebo směsi dimetylformamid-metylenchlorid (1:1).

^{xx}Tosylovou chránič skupinu je možno odštěpit také sodíkem v kapalném amoniaku.

Vzniklá látka byla rozpuštěna v 9,4 ml 20%CH₃COOH a podrobena dělení na kontinuální bez-nosičové elektroforéze (1M, CH₃COOH, 2 600 V). Získané frakce byly detegovány spektrofotometricky při 280 nm, frakce odpovídající produktu byly spojeny a lyofilizovány. Bylo získáno 97,2 mg (15,5%) látky vyhovujících vlastností.

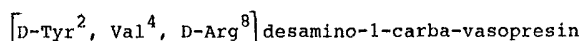
Část produktu (8 mg) byla analysována gradientovou elucí (15% až 40% vodný methanol obsahující 0,1% kyseliny trifluoroctové) na koloně Separonu Si-C-18 (5x2,5 cm). Byl tak získán chromatograficky zcela jednotný produkt.

P ř í k l a d 2



Syntéza byla provedena postupem užitným u příkladu 1, jen s tím rozdílem, že jako čtvrtá aminokyselina byl použit Boc-Cys(CH₂-CH₂-CH₂-COOBu^t)OH. Po připojení Boc-AsnOH byla pryskyřice rozdělena na polovinu. Získané meziproducty byly použity k syntézám dalších analogů vasopresinů (příklad 3). Cyklisace byla provedena 3ekv. N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu v dichlormethanu (3 dny). Po amonolýze byla tosylová skupina argininu odštěpena kap. HF jako v předchozím případě a také postup purifikace byl analogický. Charakteristiky produktu jsou uvedeny v tabulce 3.

P ř í k l a d 3



Při syntéze bylo použito části pryskyřice získané při přípravě předchozí látky (příklad 2) a místo glutaminu byl kondenzován valin. Postupy kondenzací, cyklizace, štěpení a čištění byly analogické (při HPLC čištění byl použit gradient až do 50% methanolu). Vlastnosti získaného peptidu jsou uvedeny v tabulce 3.

Látky, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být použity k léčebným účelům v oblastech, které jsou vyznačeny v úvodní části, a to ve formě vhodné pro intranasální, sublinguální, subkutánní, intravenosní a perorální aplikaci. Mohou být použity ve vodných roztocích, v emulsích s rostlinnými oleji, v liposomech, dále adsorbované, absorbované, enkapsulované a kovalentně vázané na/v polymerních nosičích. Pro svou vysokou chemickou a zvláště enzymatickou stabilitu jsou velmi vhodné pro perorální použití.

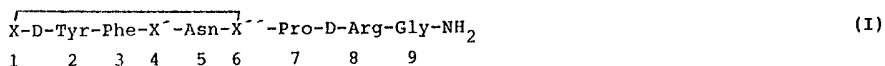
T a b u l k a 3

Seznam zkratk

Zkratka	Plný název
Hcy	homocystein
Boc	zbytek terc.-butyloxykarbonylový
Tos	zbytek p-toluensulfonylový
TFA	kyselina trifluoroctová
VP	vasopresin
AD	antidiuretický účinek
BP	presorický účinek
UT	uterotonický účinek
But	zbytek kyseliny máselné
Mpr	zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové
Abn	zbytek kyseliny alfa-aminomáselné

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

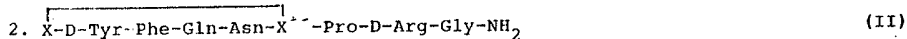
1. Vasopresinová analoga obecného vzorce I



v němž X je zbytek kyseliny máselné nebo zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové

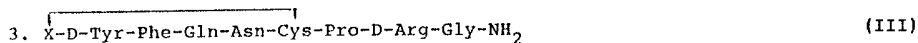
X' je Gln, Val nebo Asn

X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné

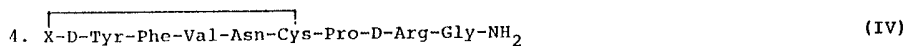


kde X značí zbytek kyseliny 3-merkaptopropionové

X'' je Cys nebo zbytek kyseliny alfa-aminomáselné

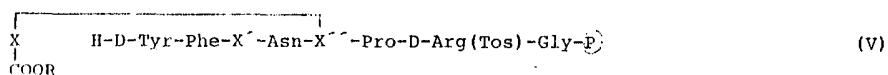


kde X značí zbytek kyseliny máselné



kde X značí zbytek kyseliny máselné

5. Způsob přípravy vasopresinových analogů obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačující se tím, že se metodou v pevné fázi připraví lineární prekursor analogu obecného vzorce V



v němž R je terc. Butyl nebo fluorenylmethyl

(P) je polymerní nosič

Tos značí zbytek kyseliny p-toluensulfonové

a ostatní symboly mají stejný význam jako v bodu 1, odštěpí se Boc skupina Tyr a skupina R působením kyseliny trifluoroctové, provede se cyklisace mezi zbytky 1 a 2 působením N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu v dichlormetanu, dimetylformamidu, toluenu nebo směsi dimetylformamidu a dichlormetanu, cyklický prekursor analoga se odštěpí z polymerního nosiče amonolysou, p-toluensulfonylový zbytek se odštěpí působením kapalného fluorovodíku nebo působením sodíku v kapalném amoniaku a získaný produkt se vyčistí na kontinuální beznosičové elektroforese nebo vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií.