

NEUROHYPOFYZÁRNÍ PEPTIDY V LÉKAŘSTVÍ Z PRAŽSKÝCH A ŠVÉDSKÝCH LABORATOŘÍ. ČÁST II: DESMOPRESSIN, TERLIPRESSIN, CARBETOCIN – FARMAKOLOGIE A KLINICKÉ APLIKACE

VLADIMÍR PLISKA^a, ANTONÍN PAŘÍZEK^b,
MARTIN FLEGEL^{c*}

^a Department of Biology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Wolfgang-Pauli-Strasse 27, CH-8093 Zürich, ^b Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, Perinatologické centrum, Apolinářská 18, 128 51 Praha 2, ^c Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
vladimir.pliska@biol.ethz.ch, parizek@porodnice.cz

Došlo 12.10.21, přijato 1.11.21.

Klíčová slova: neurohypofyzární hormony, oxytocin, vasopressin, deamino-D-arginin vasopressin, DDAVP, Glypressin, Terlipressin, Carbetocin, Ferring company, peptidová léčiva

• <https://doi.org/10.54779/chl20220101>

Výroba léčiv založená na dohodách ÚOCHB ČSAV – Ferring AB

Licenčními dohodami, zmíněnými v předcházejících sděleních^{1,2}, získala v průběhu 70. a 80. let od Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd (ÚOCHB ČSAV) švédská farmaceutická firma Ferring AB Malmö práva na výrobu řady analogů a na jejich distribuci na světovém trhu mimo státy sdružené v RVHP (zkratka pro Radu vzájemné hospodářské pomoci)^a. Tři z nich našly použití jako úspěšné léky.

dDAVP: 1-deamino-8-D-arginin vasopressin (Desmopressin)

Design tohoto analogu, jímž započala spolupráce ÚOCHB s Ferringem^{1,2}, vycházel ze starších známých faktů o vlivech vypuštění N-terminální aminoskupiny a D-enantiomerní substituci v pozici 8 na antidiuretickou a vasopressorickou aktivitu u peptidů vasopressinového typu. 1-Deamino-L-arginin-vasopressin (dAVP) popsali v již roce 1966 Huguenin a Boissonnas (SANDOZ S.A., Basel)³ a později (1974) Sawyer se spolupracovníky⁴; obě laboratoře našly shodné antidiuretické (1300 a 1390 IU/mg) a vasopressorické (370 IU/mg) aktivity^b proti původnímu L-arginin-vasopressinu, tedy podstatně zvýšený antidiuretický účinek při stejné vasopressorické aktivitě. Substituce D-argininem v poloze 8 arginin-vasopressinu vedla sice k mírnému snížení antidiuretické aktivity (z 332 na 257 IU/mg (cit.⁵), resp. 114 IU/mg (cit.⁶)), ale zároveň k podstatnému poklesu aktivity vasopressorické (mezi 1,1 a 4,1 IU/mg). Kombinace obou naznačovala, že by mohlo jít o zajímavý peptid pro substituční terapii neurogenní formy žíznivky^c (*diabetes insipidus*). Přesto, že kumulace strukturálních modifikací v individuálních peptidech obvykle nevede k předpokládané kumulaci aktivit spojených s těmito modifikacemi, pověřil ředitel ÚOCHB František Šorm skupinu Milana Zaoralu, aby peptid s kombinacemi obou strukturálních změn syntetizovala⁷. Výsledek byl více než překvapivý. Již v prvních antidiuretických testech provedených farmakologickou skupinou ÚOCHB vykazoval kombinovaný peptid ve srovnání s 8-L-arginin-vasopressinem (AVP) antidiuretickou aktivitu nejméně padesátinásobně vyšší, aktivitu vasopressorickou testovanou skupinou Ivana Krejčího z Výzkumného ústavu přírodních léčiv^d menší než 3 %. Standardní farmakologické testy antidiuretické aktivity nejsou při tak velkých rozdílech mezi standardem a testovaným peptidem jednoznačné

* † 15. 7. 2021. Nekrolog dr. Flegela viz Drašar P.: Chem. Listy 115, 575 (2021).

^a Po likvidaci RVHP počátkem 90. let bylo toto omezení bezpředmětné a firma FERRING rozšířila činnost celosvětově.

^b Mezinárodní jednotka (IU) oxytocinu je nově definována jako uterotická aktivita 1,68 µg mezinárodního standardu NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control); viz <https://www.nibsc.org/documents/ifu/76-575.pdf>. V přepočtu: 1 mg (nového) mezinárodního standardu (ca. 10⁻⁶ mol oxytocinu) = 595 IU. Starý standard (lyofilizované hovězí neurohypofýzy) uváděl 500 IU.

^c U klinických případů popsanych v tehdejších sděleních šlo velmi pravděpodobně o neurogenní (centrální) formu žíznivky (*d.i. centralis*). U její renální formy (*d.i. renalis*), nezávislé na plasmatické koncentraci vasopressinu, jde zpravidla o mutaci genu vasopressinového receptoru V2R či jeho celulární signální dráhy.

^d Později Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii (VÚFB); na testování se podílela Laboratoř endokrinologie III. interní kliniky všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

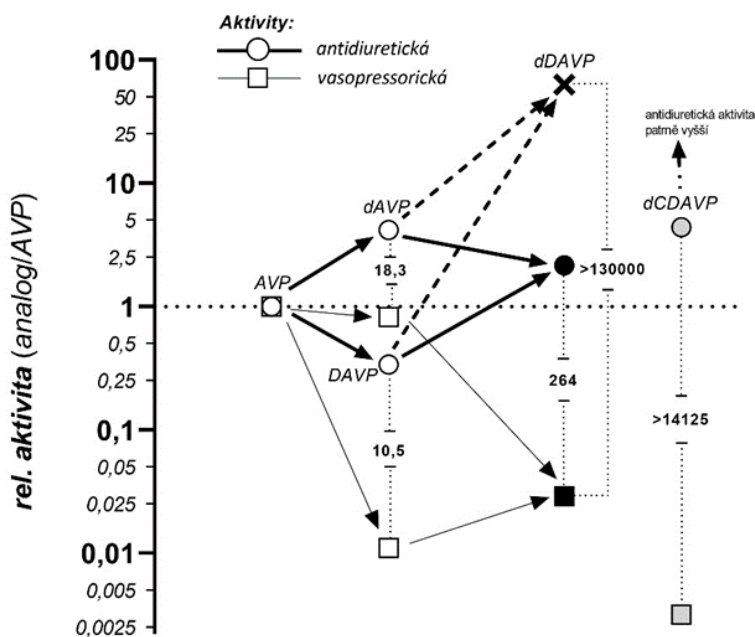
^e Přepočteno z dat ve zmíněných publikacích. Data z VÚFB pro anestetizovanou krysou jsou vztažena na tehdejší mezinárodní standard, pituitrin (extrakt z hovězí neurohypofýzy), po přepočtu ~31 560 IU/mg; v pokusech na neanestetizovaných krysách (standard: syntetický 8-lysin-vasopressin – LVP) ~25 000 až 50 000 IU/mg.

a dostatečně spolehlivé⁸: jednotlivé laboratoře udávaly hodnoty pro dDAVP mezi 870 IU/mg (cit.⁷) a zhruba 50 000 IU/mg (cit.^{9,10})^e. Hodnotu dolní meze, později znovu citovanou⁵, uvádějí autoři první (předběžné) publikace⁶, aniž zmiňují podstatně vyšší aktivity nalezené v tehdy dosud neukončených testech z ÚOCHB. Tyto pozoruhodné diskrepance lze snad částečně vysvětlit citlivostí dDAVP na i poměrně malé rozdíly v použitých testech, především však použitím často zcela rozdílných testů a v neposlední řadě nejednotnou numerickou formulací aktivit. Údaje anti-diuretických aktivit z jednotlivých laboratoří pocházejí z testů na neanestetizovaných krysách hydratovaných jednorázovou perorální dávkou izotonického hydratačního media¹¹ (s 1–2 % ethanolu, nebo bez alkoholu), nebo krys s trvale udržovanou hydratací odpovídající 8–10 % tělesné váhy zvířete^{12,13}. Anti-diuretický efekt je vztažen na celkový objem či váhu vyloučené moči, tedy veličinu definovanou ve farmakologických měřeních jako AUC (area-under-the curve), hodnotu časového integrálu diuretické křivky. V případě, kdy aktivita je definována jako podíl k danému standardu (zde tedy AVP), musí AUC být vztažen na definovanou časovou limitu¹⁴. Není-li tomu tak, postrádá konečný údaj spolehlivou srovnávací hodnotu. (Tak je tomu např. u některých výše citovaných dat¹⁰).

V případě nerovnoběžných závislostí dávka-účinek je tudíž pojem relativní specifické aktivity neadekvátní a dovoluje jen srovnání ekvipotentních dávek (dávek dvou látek působících stejný účinek) na různých úrovních účinku.

Obr. 1 znázorňuje spektrum publikovaných anti-diuretických a vasopressorických aktivit jednotlivých „mezistupňů“ vývoje dDAVP a zároveň i index preference pro anti-diuretickou aktivitu (čísla mezi svislými šipkami), zde *ad hoc* definovaný jako produkt poměru anti-diuretická/vasopressorická aktivita × relativní anti-diuretická aktivita. Jeho vysoké hodnoty pro udávané meze anti-diuretické aktivity dokumentují jeho přednost mezi analogy potenciálně použitelné v substituční terapii žíznivky.

Pokud jde o délku trvání účinků dDAVP: prodloužený účinek byl jeden z parametrů, který byl již od plánované syntézy předpokládán a požadován. Autoři první klinické publikace¹⁰ udávají pro dDAVP 12,75krát pomalejší eliminaci účinku ve srovnání s pituitárním standardem (tj. AVP), což by svědčilo o vysoké metabolické stabilitě analogu v cílových tkáních. Jejich údaje (obr. 1 v citované publikaci) však svědčí o tom, že nešlo o kinetickou analýzu a udávaná vysoká charakteristika perzistence není důvěryhodná. Srovnání směrnic lineárních částí závislosti dávka-účinek¹⁴ naznačuje přibližný index perzistence (I_p)



Obr. 1. Schéma designu dDAVP předpokládajícího kumulaci požadovaných aktivit peptidů s izolovanou strukturální změnou. Anti-diuretická (kroužky) a vasopressorická (čtverce) aktivita analogů arginin-vasopressinu (AVP), deamino-arginin-vasopressinu (dAVP), D-arginin-vasopressinu (DAVP) a kombinovaného peptidu deamino-D-arginin-vasopressinu (dDAVP, černé symboly). Rozdíly obou aktivit jsou označeny svislými tečkovanými spoji, čísla mezi nimi udávají „*ad hoc* index preference“ pro anti-diuretickou aktivitu: produkt poměru anti-diuretická/vasopressorická aktivita × relativní anti-diuretická aktivita (analog/AVP). Dva údaje anti-diuretických aktivit pro dDAVP odpovídají rozdílným údajům z různých zúčastněných laboratoří, používajících často rozdílné anti-diuretické testy (viz text); nižší hodnota se vztahuje k extrapolované (prahové) dávce peptidu, specifická aktivita pro vyšší dávky¹⁰ není jednoznačně definována (× označuje přibližnou horní hranici dat uvážených v literatuře). Schéma naznačuje, že v případě dDAVP byl předpoklad kumulace strukturálních modifikací v různých polohách peptidového řetězce do značné míry splněn. Pro srovnání jsou uvedeny aktivity dCDAVP (šedé symboly; viz text). Anti-diuretická aktivita (2200 IU) byla testována na neanestetizované kryse²¹; její hodnota v testu (krysa v ethanolové narkóze) je podle autorů velmi vysoká a standardní metodou neměřitelná. Index preference je tudíž ve srovnání s dDAVP mnohem vyšší.

v mezích 2,5 a 3,9. Rovněž údaje poločasu diurézy v následující publikaci⁹ dovolují hrubý údaj ineksu perzistence (použitím např. přepočtu podle Kimury a Yokoyamy¹⁵), v důsledku volby neadekvátních experimentálních podmínek však neumožňují detailní analýzu. Nicméně, přepočet naznačuje $I_p \approx 2$, tedy hodnotu blízkou předpokladu. Ačkoliv v pracích T. Bartha a jeho skupiny na ÚOCHB byla kinetická analýza různých řad neurohypofyzárních peptidů prováděna velmi důkladně, dDAVP do těchto studií zahrnut nebyl. Zvýšenou perzistencí a s ní spojený prodloužený účinek je patrně spojen s hydrolyzou N-terminální peptidové vazby (cysteintyrosin), která v analogických případech vede k dvoj- až čtyřnásobnému zvýšení indexu perzistence. Udávané extrémní hodnoty perzistence v citované publikaci¹⁰ jsou

tedy patrně důsledkem předávkování tohoto velmi účinného antiidiuretika v citovaných pokusech.

Terapeutický potenciál dDAVP byl ovšem rychle odhadnut a substance sama byla kryta americkým patentem¹⁶ (US 3,497,491; Feb. 24, 1970; obr. 2). Eventuální další patenty se tedy mohly týkat pouze produkčního postupu, případně nových aplikací. V tomto směru měl Ferring v době udělení patentu již vybudovanou potřebnou infrastrukturu a licenční podmínky byly tudíž pro obě strany – ČSAV a Ferring – výhodné. Licenční dohoda mezi Československou akademií věd (podpis na dohodě: K. Friml, Secretary General), Polytechnou^f (dva nečitelné podpisy) a Ferringem (S. Matarasso, Managing Director; J. Mulder, Research Director) byla uzavřena v Praze v roce 1971.

United States Patent Office

3,497,491

Patented Feb. 24, 1970

1

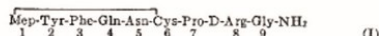
3,497,491

1-DEAMINO-8-D-ARGININE VASOPRESSIN

Milan Zaoral, Ivan Vavra, Alena Machova, and Frantisek Sorm, Prague, Czechoslovakia, assignors to Československa Akademie Ved., Prague, Czechoslovakia
No Drawing. Filed Sept. 14, 1967, Ser. No. 667,679
Claims priority, application Czechoslovakia, Sept. 15, 1966, 5,996/66

Int. Cl. C07c 103/52; A61k 17/00; C07d 93/36
U.S. Cl. 260—112.5

1 Claim

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

wherein Mep is β -mercaptopropionic acid (Mep) at position 1 and D-arginine is at position 8.

The compound of the invention has a high and specific antiidiuretic action.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Compounds exhibiting a high and specific antiidiuretic activity are important in the therapy of diabetes insipidus. Such compounds are well known and represent structural modifications of the vasopressin molecule. The most suitable properties have been observed in the case of 1-deamino-Phe²-Arg⁸-vasopressin (cf. the table below).

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide for an antiidiuretic that has a higher degree of activity and is more specific in its action than the just named vasopressin compound.

This is accomplished by a polypeptide of

2

which latter is then oxidized, preferably with potassium ferricyanide in an aqueous solution at pH 6.5–7 to give the polypeptide of Formula I.

The protected octapeptide derivative of Formula II can also be obtained by other procedures such as are conventional in the preparation of polypeptides. The compound II may be thus prepared by a stepwise synthesis starting with the amino terminal group as well as the carboxylic terminal group, or by coupling of polypeptides containing the partial amino acid sequences of the final polypeptide of Formula I. The temporary protection of the amino groups, mercapto (sulfhydryl) groups and of the guanidine group may be performed by means of substituents that are conventional in the synthetic chemistry of polypeptides. E.g., a t-butyloxycarbonyl, o-nitrophenylsulfenyl or trityl group can be used for blocking of the amino groups, a trityl, benzoyl, or benzylthiomethyl group for the protection of the sulfhydryl function, and a tosyl or benzyloxycarbonyl group for the protection of the guanidine group.

The protective groups are then removed in the usual manner in one stage or successively. Oxidation of the reduced form of the polypeptide of Formula III to the cyclic polypeptide of Formula I may be accomplished by methods known per se, for instance, in an aqueous solution or in a mixture of water and solvents miscible with water.

Preferably, the following method is used. Condensation of β -benzylmercaptopropionyl chloride with tyrosine methyl ester leads to the so far unreported β -benzylmercaptopropionyl-L-tyrosine methyl ester. By the action of hydrazine hydrate, the latter compound is converted to the so far likewise unreported hydrazide and is then coupled with L-phenylalanine methyl ester. The resulting dipeptide ester derivative is condensed, again in the form of the azide, with L-glutamyl-L-asparaginyl-L-phenylalanine methyl ester.

Obr. 2. U.S. patent chránící dDAVP jako substanci a původní postup její syntézy, únor 1970

^f Polytechna (dnes: Polytechna Consulting, a.s.) byl státní podnik zahraničního obchodu, který zprostředkoval též výměnné zdravotnické služby, včetně lidské síly v zahraničí. Jeden z autorů (A.P.) upozorňuje na údaje kolegů-lékařů, kteří zprostředkováním Polytechny odjížděli pracovat např. na Maltu nebo do severní Afriky: Polytechna si přivlastňovala velkou část jejich výdělků. Na druhé straně bylo známo, že ten, kdo vyjel prostřednictvím Polytechny, byl podezřelý ze spolupráce s vládními a stranickými špiónážními složkami (KSC a STB).

Klinické využití dDAVP bylo pak v druhé polovině 70. let rozšířeno o hematologické aplikace, vycházející ze studií o hemostatickém účinku vasoaktivních peptidů. Cash a spol.¹⁷ (Regional Blood Transfusion Centre, Royal Infirmary, Edinburgh) poukázali na zvýšené vyplavování aktivátoru plasminogenu a koagulačního faktoru VIII po intravenózní aplikaci neurohypofyzárních hormonů vasopressinového typu, včetně dDAVP. Později rozšířili tuto studii o další zajímavá analoga¹⁸. Pozoruhodně vysokou hemostatickou aktivitu našli u 6-karba-analogu dDAVP (dCDAVP); naproti tomu zcela neúčinný byl 8-arginin-vasotocin. Použití dDAVP ke zvýšení koncentrace faktoru VIII u pacientů s lehčí formou hemofilie A, von Willebrandova-Jürgensova syndromu a trombocytárních dysfunkcí popsal pak hematolog Pier Mannuccio Mannucci z milánské univerzity se spolupracovníky^{19,20}. Prevalence těchto poruch hemostáze, zpravidla dědičných, je zjevně vyšší než prevalence *diabetes insipidus*; dDAVP (Minirin® Ferring, Desmopressin INN) našel tak širší uplatnění při akutních lehčích spontánních krváceních a při menších chirurgických zásazích (ku příkladu ve stomatologii)^g. To vše velice podstatně zvýšilo význam licence, kterou Ferring dohodou s ÚOCHB získal.

Případ dDAVP zároveň demonstruje časté rozdíly v úplnosti farmakologických a klinických dat. Zatímco klinická dokumentace dDAVP je obsáhlá a detailní, spolehlivé farmakologické údaje jsou nedostatečné. Ne zcela vysvětlitelné jsou zmíněné rozpory v údajích aktivit mezi jednotlivými laboratořemi, chybějící farmakokinetická data a ostatně i doklad o tom, že dDAVP představuje pro klinické účely optimální volbu ve skupině analogů s velmi podobným spektrem aktivit. Publikovaná data naznačují, že pro stejné terapeutické aplikace by takovým mohl být ku příkladu později syntetizovaný karba-6-analog dDAVP²¹, 1-deamino-8-D-arginin-6-karba-vasopressin (dCDAVP, obr. 1). S ohledem na úspěch, který dDAVP v klinickém použití doznal, není ovšem tato akademická kritika zcela podstatná.

Triglycyl-8-lysine-vasopressin (Terlipressin)

V počáteční fázi licenčních dohod ÚOCHB s Feringem figurovala vedle dDAVP také skupina analogů neurohypofyzárních hormonů s prodlouženým peptidovým řetězcem na N^α-koncové aminoskupině, pro něž se ujal (původně pracovní) označení „hormonogeny“²². Jejich syntéza byla motivována představou, že převládající inaktivační proces oxytocinu a vasopressinu vzniká štěpením peptidové vazby mezi 1-hemicystinem a 2-tyrosinem aminopeptidasami, patrně enzymem leucin-aminopeptidasového typu²³. Od prodloužení N-konce amidopeptidasami štěpitelnou aminokyselinou či krátkým peptidovým řetězcem se očekávalo postupně (a dočasné) uvolňování aktivního hormonu a tudíž prodloužení příslušného

biologického účinku *in vivo*²⁴. Tento předpokládaný mechanismus byl postupně potvrzen syntézou řady analogů 8-lysine-vasopressinu^{22,25–27} a oxytocinu^{28,29} s výrazně prodlouženými účinky antidiuretickými, vasopresorickými a uterotonickými, s indexem perzistence I_p mezi 1 (pro lehké štěpitelné aminoacidové substituenty – leucin, tyrosin) až 5. N^α-(Gly)₃-[Cys¹,Lys⁸]vasopressin, jehož standardní biologické aktivity na kryse jsou sice nízké (antidiuretická 2,7, vasopresorická 2,1 IU/μmol, t.j. kolem 0,5 % aktivit lysine-vasopressinu), index perzistence ale vysoký ($I_p \approx 5$)²², naznačoval ve farmakologických testech možnost klinického využití jako vasokonstričního spazmolytika zvyšujícího periferní vaskulární rezistenci při hrozcím hemoragickém šoku. Prodloužený terapeutický účinek je výhodou především v akutních stavech ezofageálním a jiném gastrointestinálním krvácení³⁰, traumatickém a septickém šoku, u cirhotických pacientů s portální hypertensí³¹ a s tzv. hepatorenálním syndromem³². (Stručný přehled klinického použití publikovali v roce 2004 Kam a spol.³³).

Analoga 8-lysine-vasopressinu acylované glycinovými peptidy na N-koncové aminoskupině byly původně chráněny československým patentem CS 4,399/64 (1.8.1964), později patenty v dalších zemích včetně Spojených států (US 3,558,590; July 30,1968). Patenty kryjí, velmi obecně, deriváty lysine-vasopressinu N-acetylované „krátkými peptidy obsahujícími glycin“, tedy rozsáhlou skupinu peptidů včetně meziproductů jejich syntézy uváděné spolu s diglycyl- a triglycyl-analogem jako příklady. Licenci na jejich produkci získal Ferring již v první fázi spolupráce s ÚOCHB a registroval druhý z nich pod názvem Terlipressin (INN, Glypressin®). Z četných publikací po roce 1974 lze vyvodit jeho rychlé rozšíření v četných klinikách, i když v omezeném rozsahu aplikací.

V klinickém zkoušení byla také případná možnost použití triglycyl-vasopressinu jako kontraceptiva. Tento peptid hormonogenného typu má značně protražovaný presorický účinek a nízký, vasopressinu podobný uterotonický efekt. Předpokládalo se, že peptid během I. trimestru těhotenství způsobuje kontrakční činnost hladké svaloviny dělohy a tím smrt plodu. Odhlížeje od etické stránky testování podobných hypotéz, naráží zde fyziologický výzkum na téměř nepřekonatelné potíže: průběh decidualizace a struktura placenty jsou u jednotlivých savců zásadně odlišné a tudíž data získaná v pokusech na zvířeti nelze v tomto specifickém případě v humánní medicíně použít. Pokud je nám známo, další kroky v tomto směru nebyly podniknuty.

Carbetocin: veterinární a humánní uterotonikum

Motivace syntézy a farmakologické závěry

Carbetocin (INN)^h, deaminokarba¹-2-O-methyltyrosin-oxytocin, dnes rozšířené uterotonikum, byl syntetizován

^g Pro zajímavost: dDAVP pronikl, byť epizodicky, i do současné anglické beletrie; viz Barbara Vine: *The Blood Doctor*, Viking – Penguin Random House, London 2002.

^h Generikum pod názvem DURATOCIN®

před rokem 1971 v laboratoři Karla Jošta v rámci výzkumu potenciálních antagonistů oxytocinu. Ohlášen byl k patentování v Československu v únoru 1971; udělení čs. patentu (CS-149028 B1; 15. 6. 1973)³⁴ následovalo v červnu 1973. Jak je zřejmé, nešlo o ochranu látky samotné – to nebylo v československém patentním řízení té doby přípustné, nýbrž o postup její přípravy. Bližší popis tehdy použité syntézy spolu s údaji o biologických aktivitách byl popsán v roce 1974 v publikaci o fyzikálně-chemických vlastnostech karba-analogů oxytocinu³⁵. Tato publikace poprvé zahrnující též carbetocin je z různých hledisek pozoruhodná, uvedené biologické aktivity carbetocinu (zmněně spíše na okraj) nevzbudily však z farmakologického hlediska zvláštní pozornost: uterotonická aktivita v pokuse na krysí děloze byla zhruba 3,5 % (*ex vivo*) a 7 % (*in vivo*) aktivity oxytocinu; výrazný antagonismus *ex vivo* zprvu prokázán nebyl. Byl však dokumentován v pozdějších pokusech na izolovaných buněčných membránách krysího myometria³⁶. Stejná studie prokázala, že jde o parciálního agonistu oxytocinu (maximální kontrakce dělohy *ex vivo* dosáhla 50 % kontrakce inicializované oxytocinem), patrně v důsledku inhibice části oxytocinových receptorů carbetocinem samotným a jeho postupně vznikajícími metabolity (tab. I, obr. 3). Inhibici oxytocinu *in vivo* a s ní spojený tokolytický účinek nebylo tudíž možné předpokládat, peptid vykazoval zhruba 10× nižší uterotonickou aktivitu oxytocinu (viz tab. I). Poločas uterotonického účinku *in vivo* u křesy je relativně k oxytocinu několikanásobně delší³⁷ (poměr rychlostních konstant eliminace je 3,5), především patrně v důsledku vypuštění N-terminální aminoskupiny (farmakologická data jsou shrnuta v tab. I). V souhrnu se tedy carbetocin ve srovnání

s oxytocinem jevil jako dlouhodobě působící agonista se slabším uterotonickým efektem. V té době však byla antagonisticky působící oxytocinová analoga jedním z prioritních zájmů pražského ÚOCHB³⁸ a tímto zájmem byla též motivována syntéza carbetocinu. K tomu několik poznámek:

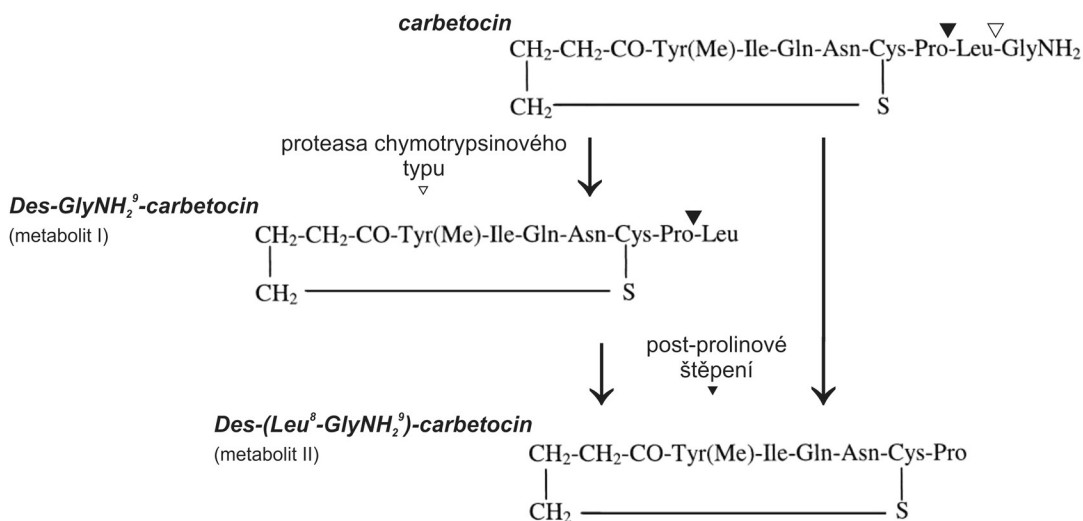
Antagonismem uterotonických účinků oxytocinu v širším smyslu se v druhé polovině 60. let zabýval především Josef Rudinger na ÚOCHB a skupina Ivana Krejčího na VÚFB. Jejich studie byly shrnuty v řadě publikací^{23,38,39}. Zájem o antagonisty oxytocinu na této bázi byl podněcen rovněž možností jejich použití v klinické praxi při hrozícím spontánním potratu (*abortus imminens*) a trval i po odchodu Josefa Rudingera do Švýcarska v roce 1968. Koncem 60. let syntetizoval Karel Jošt 1-N^α-acetylcystein-2-O-methyltyrosin-oxytocin⁴⁰, jeden z prvních inhibitorů uterotonického účinku oxytocinu, chráněný patenty ve více než dvou desítkách zemí (ve Spojených Státech US 3,752,799; Aug. 14, 1973, US 260-112.5, Int. Patent No. 3,752,799; cit.⁴¹). Ještě před publikací projevil zájem o toto potenciální tokolytikum Jan Mulder a spolu s jedním z nás (V.P.) připravoval v říjnu 1969 podklady pro klinickou registraci ve Švédsku. Doklady o dalším licenčním jednání s ÚOCHB nejsou známy; pravděpodobně je, že licence byla udělena, ale další vývoj analogu ve Švédsku nepokračoval. Možné je, že další kroky v klinických zkouškách byly odloženy v očekávání, že nově syntetizované látky budou případně mít výhodnější antagonistické vlastnosti než stávající peptid s poměrně nízkou inhibiční konstantou – na krysí děloze *ex vivo* se udává $pA_2 = 7,03$ (cit.⁴²)ⁱ. Zajisté byly další kroky v tomto směru ovlivněny i náhlým úmrtím Jana Muldera v roce

Tabulka I
Carbetocin a inhibitory uterotonické aktivity oxytocinu

	Parametry uterotonického účinku (křesa)					Poločas eliminace [min]		
	aktivita [IU/mg]		pD_2	partiální agonismus (relativní E_{max})	antagonismus pA_2 ^a	člověk		křesa ^d
	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>				netěhotné ženy ^b	<i>post partum</i> ^c (24–48 h)	
Oxytocin	470	485	8,28	1		5,5–6,1		2,5
Carbetocin	45	17,1	7,32	0,52	8,21	41–42,7	60	8,8
Metabolit I ^c					7,81			
Metabolit II ^c					8,01			
Atosiban					8,29			
Ac-Tyr(Me)-OXT ^f					7,03			

^a Antagonistická aktivita vůči oxytocinu *in vitro* (pA_2 ; viz text, pozn.¹). Dolní část tabulky zahrnuje další potenciální inhibitory zmíněné v textu, včetně metabolitů carbetocinu. ^b Plasmatická clearance (Sweeney et al. 1990, cit.⁴⁸); ^c Clearance odvozená z uterotonického účinku (Hunter et al. 1992, cit.⁴⁹); ^d Clearance odvozená z uterotonického účinku (Barth a spol. 1980, cit.³⁷); ^e Identifikované štěpné produkty carbetocinu³⁶. ^f N^α-acetyl-2-O-methyltyrosin-oxytocin⁴⁰

ⁱ pA_2 : negativní dekadický logaritmus molární koncentrace antagonisty redukující efekt E libovolné koncentrace agonisty na polovinu, $E/2$.



Obr. 3. Potenciální metabolity carbetocinu identifikované *in vitro* a jejich antagonistické vazby (pA_2) na oxytocinovém receptoru (krysa)³⁶. V prvním stupni se předpokládá paralelní štěpení C-terminální peptidové vazby leucin-glycinamid („chymotrypsin-like enzyme“^{50–52}, bílý trojúhelník; metabolit I) a enzymem hydrolyzujícím vazbu Pro⁷-Leu⁸ („postproline cleavage enzyme“^{53,54}, černý trojúhelník; metabolit II), v dalším stupni následné štěpení metabolitu I na konečný metabolit II

1976. Intenzivní vývoj nových antagonistů v Malmö pokračoval po nastoupení nového ředitele výzkumu Hanse Vilhardta, převážně pod vedením farmakologa Per Melina. Jeho výsledkem byl v druhé polovině 80. let analog 1-deaminocystein-8-ornitin-oxytocin s dalšími změnami v poloze 2 (D-O-ethyltyrosin) a 4 (threonin)⁴³, který se stal postupně standardním inhibitorem v experimentální farmakologii a fyziologii neurohypofyzárních peptidů (pA_2 = 8,29) a jako Atosiban (INN) rozšířeným klinickým tokolytikem^{44 j}.

Zdá se, že neprokazatelnost antagonismu u carbetocinu byla pro pražskou peptidovou skupinu zklamáním a ani jeho agonistické účinky neslibovaly výrazné výhody ve srovnání s jinými uterotoniky. Vysvětlovalo by to okolnost, proč tento analog, resp. jeho původní syntéza, nebyl chráněn v zemích, jejichž farmaceutický průmysl byl schopen v krátkém čase zajistit jeho produkci. Jeho patentové krytí nebylo tudíž příliš důsledné a řada firem má carbetocin ve svých nabídkách. Podmínky, za jakých převzal Ferring v této situaci carbetocin do svého výrobního programu (patrně opět v licenci Čs. akademie věd), nemohli autoři tohoto sdělení zjistit.

Carbetocin jako veterinární léčivo

Jeho první klinické použití ve veterinární medicíně spadá do druhé poloviny 70. let. Patrně z popudu Karla Jošta (ÚOCHB) převzal veterinární klinický vývoj carbe-

tocinu a jeho zavedení do veterinární praxe Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva v Pohoří-Chotouni u Jílového (jeho ředitelem byl Bohumil Ševčík; ústav byl v červnu 1994 zakoupen firmou FATRO SPA, Bologna). Dokumentace pro FDA (Food and Drug Administration^k) ve formě „Drug Master File“ (DMF)^l pro léčivou látku (Depotocin[®]) byla sestavena v pražské společnosti PolyPeptide Laboratories s.r.o. (PPL, viz níže) pro firmu Veyx-Pharma GmbH, Sachwarzenborn (Hessen). Deklarovaným cílem bylo usnadnění a vedení porodu u krav a prasnic, především ale snaha dosáhnout synchronizovaného porodu ve velkochovech, v nichž zvířata byla uměle inseminována ve stejný den. Očekávalo se též omezení nutné asistence veterinárních lékařů při porodech – tedy charakteristické cíle zkolektivizovaného chovu užitkových zvířat. Ukázalo se však, že zatímco porod mláďat bylo možno prakticky synchronizovat, porod placenty probíhal nezávisle a měl odlišný průběh. Přesto se stal carbetocin ve veterinární medicíně běžně užívaným prostředkem k indukci a vedení porodu; jevil se jako obecně šetrnější ve srovnání s oxytocinem už tím, že snižoval frekvenci porodních a poporodních komplikací. Zdůrazňovanou předností bylo bezpečnější vedení porodu u krav⁴⁵ a zvláště u (multiparitních) prasat^{46,m}, absence tetanické kontrakce uteru (časté při použití oxytocinu), zamezení poporodní hypoxie/asfyxie selat a urychlení involuce dělohy *post partum* u krav⁴⁷.

^j Tractocile[®], FERRING Pharmaceuticals A/S

^k Státní instance povolující užití léčiv a poživatin v U.S.A. Její rozhodnutí jsou téměř universálně přebírána i mimo U.S.A..

^l https://de.wikipedia.org/wiki/Drug_Master_File

Zde je nutno podotknout, že výzkum prováděný ve jmenovaném ústavu nebyl *in extenso* publikován. Prvé publikace z jiných laboratorí pocházejí z let 1977–1979. Výzkum ve veterinární medicíně však později usnadnil zavedení carbetocinu v humánní medicíně, především v porodnické praxi.

Carbetocin, humánní klinická aplikace

V humánní medicíně se carbetocin stal v posledním desetiletí celosvětově používaným lékem pro prevenci a léčbu porodnického krvácení, z hlediska matky nejčastější a nejnebezpečnější komplikací porodu.

K fyziologické zástavě porodního krvácení dochází po porodu dítěte ve III. době porodní v důsledku redistribuce v cirkulaci krve a současně k aktivaci hemostatických faktorů. Tato závěrečná část porodu je časově přesně klinicky ohraničena: začíná porodem dítěte (plod přestává být plodem a stává se novorozencem) a končí porodem placenty. Při oddělování placenty od stěny dělohy je hemostáza řízena kombinací dvou mechanismů:

- retrakci hladké svaloviny dělohy (myometrium). Tím vzniká komprese cévního řečiště, kterým byla zásobena vedle myometria i placenta. Výsledkem je mechanická hemostáza;
- hemostatickými faktory z děložní sliznice v těhotenství (decidua^m), kdy působí tkáňový faktor, inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1, systémové koagulační faktory (fibrinogen apod.), které způsobují srážení krve.

V patologických případech dochází k poruše alespoň jednoho ze čtyř zúčastněných faktorů označovaných také jako 4T (tonus – trauma – tkáň – trombin); následkem může být závažné, až život ohrožující krvácení. Peripartální krvácení (*peripartum/postpartum hemorrhage*, dále také PPH) patří mezi pět nejčastějších příčin úmrtí žen v souvislosti s těhotenstvím, porodem a šestineděním (trombembolická nemoc, hypertenzní choroby, kardiopatie, sepsa a PPH). Je tomu tak jak v zemích s vysokými, tak i nízkými příjmy na obyvatele, i když absolutní riziko úmrtí na peripartální krvácení v zemích s vysokými příjmy je mnohonásobně nižší.

Pro snížení rizika PPH u všech vaginálních porodů ve III. době porodní a po vybavení plodu při porodu císařským řezem, byl dosud lékem první volby intravenózně nebo intermuskulárně aplikovaný oxytocin. Od druhé poloviny 90. let minulého století se v klinické medicíně ke stejným účelům stále častěji uplatňuje carbetocin. Mechanismus účinku obou peptidů je stejný,

ve III. době porodní (porod placenty) zvyšují stažení (retrakci) dělohy, a tím působí proti hypotonii nebo dokonce atonii dělohy, což bývá až v 80 % příčinou peripartálního život ohrožujícího krvácení (podle definice se jedná o krevní ztrátu vyšší než 1500 ml krve matky). Ve srovnání s oxytocinem je výraznou předností carbetocinu, jako uterotonika v této kritické porodnické situaci, jeho podstatně delší eliminační poločas (přibližně 8krát u netěhotných žen⁴⁸, 10- až 20krát 24–48 hodin *post partum*⁴⁹). Má tudíž mnohem delší účinek než oxytocin. Podává se pouze intravenózně, rychlostí 100 µg během jedné minuty. V případě carbetocinu nejsou přitom popisovány závažné vedlejší účinky.

V důsledku neúplného patentového chránění carbetocinu jako substance produkuje od počátku 21. století několik firem na jeho bázi i veterinární léčiva (Depotocin[®]: Veyx Pharma, Germany; WDT, Germany; Veyx-Pharma, Netherlands a Tettang, Baden-Württemberg, BRD; Decomoton[®]: Calier Polska; Laboratorios Calier SA, Barcelona; atd.)^o. Ferring AB však zůstává nejvýznamnějším distributorem jeho lékových forem (pod různými jmény^p) pro humánní medicínu.

Carbetocin, navržený a poprvé syntetizovaný v laboratoři Karla Jošta na pražském Ústavu organické chemie a biochemie, se tak stal díky úzké spolupráci se švédskou firmou účinným, často používaným lékem v kritických porodnických stavech.

LITERATURA

1. Pliska V., Pařízek A., Flegel M.: Chem. Listy 116, 19 (2022).
2. Pliska V., Pařízek A., Flegel M.: Chem. Listy 113, 675 (2019).
3. Huguenin R. L., Boissonnas R. A.: Helv. Chim. Acta 49, 695 (1966).
4. Sawyer W. H., Acosta M., Balaspiri L., Judd J., Manning M.: Endocrinology 94, 1106 (1974).
5. Manning M., Balaspiri L., Moehring J., Haidar J. H. S. W.: J. Med. Chem. 19, 842 (1976).
6. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1242 (1967).
7. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1250 (1967).
8. Pliška V., Krejčí I.: Arch. Int. Pharmacodyn. 161, 289 (1966).
9. Vávra I., Machová A., Krejčí I.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 188, 241 (1974).
10. Vávra I., Machová A., Holeček V., Cort J. H., Zaoral

^m Autor tohoto sdělení není totožný s J. H. Cortem (Joseph Henry Cort): Nicholas Cort, PhD, DVM, Department of Obstetrics & Gynecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, je uváděn jako Senior research scientist ve FERRING Pharmaceuticals. Autorům není známo, zda je v příbuzenském poměru s J. H. Cortem.

ⁿ <https://www.wikiskripta.eu/w/Decidua>

^o Přehled firem: <https://www.drugs.com/international/carbetocin.html>

^p Lonactene[®], Duratocin[®], Pabal[®], Duratobal[®].

- M., Šorm F.: *Lancet* 291, 948 (1968).
11. Burn J. H.: *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 4, 517 (1931).
 12. Pliška V., Rychlík I.: *Acta Endocrinol.* 54, 129 (1967).
 13. Sawyer W. H.: *Endocrinology* 63, 694 (1958).
 14. Pliška V.: *Arzneim.-Forsch.* 16, 886 (1966).
 15. Kimura T., Yokoyama R.: *Tohoku J. Exp. Med.* 109, 281 (1973).
 16. Zaoral M., Vavra I., Machova A., Sorm F.: US Patent: US 3497491 DA (1970).
 17. Cash J. D., Gader A. M., da Costa J.: *Br. J. Haematol.* 27, 363 (1974).
 18. Prowse C. V., Sas G., Gader A. M. A., Cort J. H., Cash J. D.: *Br. J. Haematol.* 41, 437 (1979).
 19. Mannucci P. M., Ruggeri Z. M., Pareti F. I., Capitanio A.: *Lancet* 310, 1171 (1977).
 20. Mannucci P. M., Ruggeri Z. M., Pareti F. I., Capitanio A.: *Lancet* 309, 869 (1977).
 21. Jošt K., Procházka Z., Cort J. H., Barth T., Škopková J., Prusík Z., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 39, 2835 (1974).
 22. Kynčl J., Řežábek K., Kasafírek E., Pliška V., Rudinger J.: *Eur. J. Pharmacol.* 28, 294 (1974).
 23. Rudinger J., Pliška V., Krejčí I.: *Rec. Prog. Hormone Res.* 28, 131 (1972).
 24. Pliška V., Chard T., Rudinger J., Forsling M. L.: *Acta Endocrinol.* 81, 474 (1976).
 25. Kasafírek E., Rábek V., Rudinger J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31, 4581 (1966).
 26. Zaoral M., Pliška V., Řežábek K., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 28, 747 (1963).
 27. Zaoral M., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2812 (1965).
 28. Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 28, 2021 (1963).
 29. Beranková-Ksandrová Z., Bisset G. W., Jošt K., Krejčí I., Pliska V., Rudinger J., Rychlík I., F. Š.: *Br. J. Pharmacol.* 26, 615 (1966).
 30. Cort J. H., Hammer J., Ulrych M., Píša Z., Douša T., Rudinger J.: *Lancet* 284, 840 (1964).
 31. Rabøl A., Juhl E., Schmidt A., Winkler K.: *Digestion* 14, 285 (1976).
 32. Döhler K. D., Meyer M.: *Best Pract. Res., Clin. Anaesthesiol.* 22, 335 (2008).
 33. Kam P. C. A., Williams S., Yoong F. F. Y.: *Anaesthesia* 59, 993 (2004).
 34. Jošt K., Barth T., Krejčí I., Šorm F.: CS Patent: CS-149028 B1 (1973).
 35. Frič I., Kodíček M., Jošt K., Bláha K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 39, 1271 (1974).
 36. Engström T., Barth T., Melin P., Vilhardt H.: *Eur. J. Pharmacol.* 355, 203 (1998).
 37. Barth T., Slaninová J., Lebl M., Jošt K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45, 3045 (1980).
 38. Rudinger J., Krejčí I., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (Berde B., ed.), str. 748. Springer Verlag, Berlin 1968.
 39. Krejčí I., Poláček I., Rudinger J.: *Br. J. Pharmacol. Chemotherapy* 30, 506 (1967).
 40. Jošt K., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 36, 297 (1971).
 41. Jost K., Pliska V., Krejčí I., Sorm F.: US Patent: US 3,752,799 (1973).
 42. Krejčí I., Kupková B., Barth T., Jošt K.: *Physiol. Bohemoslov.* 22, 315 (1973).
 43. Melin P., Trojnar J., Johansson B., Vilhardt H., Åkerlund M.: *J. Endocr.* 111, 125 (1986).
 44. Åkerlund M., Carlsson A. M., Melin P., Trojnar J.: *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 64, 499 (1985).
 45. Věžník Z., Holub A., Zralý Z., Kummer V., Holčák V., Jošt K., Cort J. H.: *Am. J. Vet. Res.* 40, 425 (1979).
 46. Cort N., Einarsson S., Viring S.: *Am. J. Vet. Res.* 40, 430 (1979).
 47. Bajcsy Á. C., Szenci O., van der Weijden G. C., Doornenbal A., Maassen F., Bartyik J., Taverne M. A. M.: *Theriogenology* 65, 400 (2006).
 48. Sweeney G., Holbrook A. M., Levine M., Yip M., Alfredsson K., Cappi S., Ohlin M., Schulz P., Wassenaar W.: *Curr. Ther. Res.* 47, 528 (1990).
 49. Hunter D. J. S., Schulz P., Wassenaar W.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 52, 60 (1992).
 50. Barth T., Pliška V., Rychlík I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 1058 (1967).
 51. Barth T., Hütter H. J., Pliska V., Šorm F.: *Experientia* 25, 646 (1969).
 52. Glass J. D., Dubois B. M., Schwartz I. L., Walter R.: *Endocrinology* 87, 730 (1970).
 53. Walter R., Schlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerenyi T. D.: *Science* 173, 827 (1971).
 54. Yoshimoto T., Orłowski R. C., Walter R.: *Biochemistry* 16, 2942 (1977).

V. Pliska^a, A. Pařízek^b, and M. Flegel^c (^a Department of Biology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Zürich, Switzerland, ^b Department of Obstetrics and Gynaecology, 1st Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, ^c Department of Chemistry of Natural Substances, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic): **Neurohypophysial Peptides from Prague and Swedish Laboratories Used as Pharmaceuticals. Part 2: Desmopressin, Terlipressin, Carbetocin – Pharmacology and Clinical Applications**

Licence agreements between the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (IOCB), and the pharmaceutical company Ferring AB Malmö enabled the Swedish company to produce and commercialize worldwide a number of neurohypophysial peptides designed at the IOCB. Several of them found therapeutic applications.

dDAVP: 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin was designed in one of the IOCB peptide laboratories (M. Zaoral and F. Šorm) in 1967. It displayed an extremely high antidiuretic activity (various tests indicate a 2- to 50-fold increase, as compared to arginine vasopressin) and a very low pressor activity. The peptide (covered by the

U.S. Patent No. 3,497,491, 1970) has been used as a preferred drug in the substitution therapy of the central form of diabetes insipidus (Minirin[®], today as Desmopressin INN). Besides, as later discovered (Mannucci et al. 1977), dDAVP increases the plasma concentration of the blood-clotting factor VIII. This fact extended its clinical use as haemostatics in cases of milder forms of haemophilia A, von Willebrand-Jürgens syndrome and some thrombocyte dysfunctions. Despite of the clinical success of dDAVP, a closer look reveals certain inadequacies in the presently available pharmacological data: several reports declare activity values and the prolongation effect (index of persistence) in very broad ranges.

Triglycyl-8-lysine-vasopressin (Terlipressin), a peptide with lysine vasopressin chain extended at the N-terminal by a triglycine residue, acts mainly as a pro-drug (releasing lysine vasopressin after aminopeptidase splitting at the N^α group). The analogue belongs to the so-called „synthetic hormonogens“; individual peptides carrying various acylating groups were synthesized in the mid-sixties at the IOCB and legally protected by U.S. Patent No. 3,558,590 (1968). It was a part of the licence agreements mentioned above. The activities of triglycyl-8-lysine-vasopressin (both antidiuretic and vasopressor) are about 100 times lower than those of lysine vasopressin, but its persistence is 5 times longer. As such, it is occasionally used in emergency medicine in cases of esophageal (and other gastroenteral) bleeding, traumatic or septic shock, in cirrhotic patients and patients with portal hypertension. Its use as an early abortion drug was discussed but not pursued.

Carbetocin (deaminocarba¹-2-*O*-methyltyrosin-oxytocin) was synthesized in the laboratory of Karel Jošt at the IOCB before 1971; its synthesis was covered by a Czechoslovak patent (CS-149,028 B1) in June 1973 (at that time, Czechoslovak patent law did not provide for the patentability of substances as such) and first published in a biophysical communication by Frič *et al.*, 1974). As a part of the licence agreement, it was included in the production program of Ferring AB, but marketed later also by several other pharmaceutical companies due to an incomplete patent protection. The peptide is a moderately active uterotonic partial agonist and as such has been utilized in veterinary obstetrics for delivery induction in cows and (multiparous) pigs: its milder and better-controlled uterotonic action was found preferential as compared to oxytocin so far used for these purposes. In the last two decades, carbetocin has been commonly used also in the human obstetrics, especially to prevent the peri- and post-partum haemorrhage, from the maternal side the most frequent and most severe delivery complication. It became a life-saving drug in emergency obstetrics.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: neurohypophysial hormones, oxytocin, vasopressin, deamino-D-arginine-vasopressin, DDAVP, Glypressin, Terlipressin, Carbetocin, Ferring company, peptide drugs

- Pliska V., Pařízek A., Flegel M.: Chem. Listy 116, 101–109 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220101>