

7234/90



**-55798- KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

KIVONAT

és ezeket a közzétételt tartalmazó példányokat...

Eljárás peptid származékok előállítására

MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC., CINCINNATI, Ohio

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1990. 11. 21.

Elsőbbsége: 1989 11. 22. (440,547)

1990. 10. 31. (603,830)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya eljárás bombesin/GRP antagonistá hatású anyagok előállítására, amelyek természetesen előforduló bombesin/GRP származékok, és tiometilén vagy metilén-szulfoxid kötést tartalmaznak két aminosav között a karboxi terminális végen. A találmány szerint előállított vegyületek kompetitíven kötődnek a bombesin/GRP kötődési helyekhez és antagonistá hatást fejtenek ki. A találmány

vegyület

szerinti eljárással előállított alkalmasak rákos szövetek növekedésének különösen kis sejtű tüdő és prosztata karcinomák növekedésének szabályozására valamint emésztőrendszer^ű sav szekréció szabályozására, amely szekréció az emésztőrendszeri (nyelőcső, gyomor és nyombél) fekélyek okozója. A találmány szerinti peptid származékok^{gyógyszere} ~~részében~~^{ben} alkalmazhatók.

9-21

: 530 72 / 54
: 7234 / 90



A

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 133-3733

-55798-

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

NSZOS: COTK 7/02
P6IK 37/02

ELJÁRÁS PEPTIDÉK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

számonként az eredeti kópiát

*fontos! győződjön meg
a példányról*

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati, OH,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: Edwards, Judson Vincent *kutató-vegyész,*
CINCINNATI
Fanger, Bradford Otto *biokémikus,*
CINCINNATI
Ohio,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1990. 11. 21.

Elsőbbsége: 1989.11.22. / 440,547/
1990.10.31. / 603,830/

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

sejtű tüdő karcinóma sejtek (SCLC) és a prosztata belhám sejtek nagy affinitású receptoraihoz. Ezekhez a növekedési faktorokhoz való kötődés mérhető (³H)-timidin felvételt és clonusos növekedést okoz.

Számos vizsgálatban alkalmaztak sejtnövekedési faktorokat rákos sejtek növekedésében olyan módon, hogy a növekedési faktor receptorokat aktiválták. Ebben a vonatkozásban a bombesin/GRP és a receptor aktiválás más, jól ismert növekedési faktorokkal és daganatképzőkkel van összefüggésben. Széleskörű kutatásokat folytattak, hogy kifejlesszenek kompetitív bombesin receptor antagonistákat, amelyek mitosis ellenes szerként alkalmazhatók, mivel felfedezték, hogy ezek a peptidek a bombesin illetve a GRP mint potenciális növekedési faktor hatnak kis sejtű emberi tüdő karcinóma, és lehetségesen prosztata karcinóma rendszerekben. A kutatásokat alátámasztották azok a kísérletek, amelyekben anti-bombesin monoklóos antitesteket alkalmaztak abból a célból, hogy megakadályozzák receptoruk kötődését és mitosisos választ hozzanak létre. A kísérletekben, amelyekben SCLC sejtekben in vitro és sárgásbarna egerek beültetett szöveteiben in vivo monoklón antipeptid antitesteket alkalmaztak, klónos növekedés inhibíciót tapasztaltak. A mitosisos válasz a ligandum-receptor komplex által sejten belül létrehozott jelképző anyag termeléssel indul. A GRP/bombesin esetében ez egy G-fehérje aktiválását jelenti, amely ezt követően a foszfolipáz C (PLC) enzimet aktiválja. A PLC enzim a foszfatidil-inozitol-foszfátot

(PI) inozitol-1,4,5,-trifoszfáttá (IP_3) és diacil-glicerol-
 lá (DAG) alakítja. Feltételezik, hogy az IP_3 és a DAG a GRP/
 bombesin receptor rendszer aktiválásához szükséges sejten
 belüli jelző anyagok.

Miután az SCLC sejtekben kimutatták a bombesin/GRP
 sejt receptorok jelenlétét, ilyen receptorokat találtak a
 humán prosztata sejtekben is. Későbbi kutatások kimutatták
 in vitro bombesin/GRP antitest alkalmazással, hogy a bombe-
 sin/GRP növekedési hatást fejt ki a prosztata hámsejtekben.
 Ezen túlmenően sejtburjánzási kísérletek PC3 (emberi prosz-
 tata karcinóma sejt) és PMU23 (III állapotú prosztata kar-
 cinóma elsődleges tenyészetből vett hámsejt) esetében ki-
 mutatták, hogy bombesin/GRP dóziszfüggő a növekedési görbe.
 Ez az adat azt mutatja, hogy a prosztata mirigyen belül auto-
 crin vagy paracrin rákos sejt növekedés gyorsítás lehet je-
 len. Ennélfogva a GRP/bombesin hatásának megszakítása alkal-
 mas lehet prosztata rákos megbetegedések kifejlődésének ke-
 zelésére olyan esetekben, ahol ezek a faktorok autocrin vagy
 paracrin mitosisos hatóanyagként szerepelnek.

A bombesin és a GRP továbbá tumor és hasnyálmirigy
 szekréciót indukáló hatással is rendelkezik, és kimutatható
 telíthető receptorokkal rendelkezik hasnyálmirigy (B-sejt-
 tek) és bél (C-sejtek) eredetű sejteken. Ennélfogva az i-
 lyen receptorok antagonistá anyagai alkalmazhatók gyomor-
 fekélyes megbetegedések és bél, valamint hasnyálmirigy be-

tegségek kezelésére, valamint ezen szövetek mirigyrákos megbetegedéseinek kezelésére.

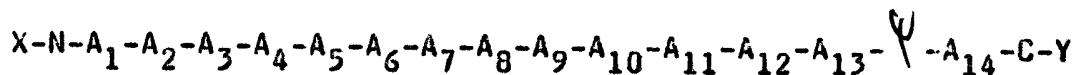
Az anti-bombesin/GRP antitestekkel végzett kísérletek ahhoz a hipotézishez vezettek, hogy lehetséges a bombesin/GRP autocrin növekedési ciklusának megszakítása tervezett fehérje receptor antagonisták alkalmazásával. Ennek felfedezésétől kezdődően számos típusú bombesin antagonistát írtak le. Ezeket az antagonistá anyagokat a természetes szekvencia típusával és szubsztituenseinek helyzetével jellemzik. A korai időszakban kidolgozott antagonisták alacsony hatásossággal rendelkeztek, nem voltak specifikusak és toxikusak voltak, amely tulajdonságaik tudományos és terápiás alkalmazásukban nagy nehézséget jelentettek.

Az utóbbi években végzett kísérletek elsősorban a fehérjék karboxil-végcsoportjainak (C-végcsoport) módosítását célozták meg ebből a célból, hogy a receptor kölcsönhatást megakadályozzák és számos, különböző típusú C-végcsoport módosított analógot kidolgoztak. Ezek az analógok például D-aminósavakat, nem-peptid típusú kötések ($\gamma(\text{CH}_2\text{NH})$) amidokat és észter módosított változatokat tartalmaztak. Ezek a módosítások azt eredményezték, hogy bizonyos peptidok javított jellemzőket mutattak.

Jelen feltalálók kidolgoztak és előállítottak egy lineáris peptid analógot a természetes bombesinre, amely ana-

lóg a 13 és 14 aminosavak között nem peptid típusú kötést tartalmaz, amely kötés tiometilén-csoport tartalmú ($\Psi(\text{CH}_2\text{S})$) abból a célból, hogy a kötés konformációs flexibilitása megnövekedjék, és ennél fogva a peptid teljes konformációs flexibilitása növekedjen. A feltalálók továbbá előállítottak olyan peptidket, amelyek a megfelelő metilén-szulfoxid-csoportot tartalmazták ($\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))$) és ezek előállítását a tiometilén-vegyületek megfelelő oxidációjával végezték. A tiometilén-csoport metilén-szulfoxid csoporttá történő oxidációja két izomert eredményez. A feltalálók fizikai módszerekkel elválasztották a metilén-szulfoxid izomereket, amelyeket ($\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{I}}$) és ($\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{II}}$) jellel jelölték, és ezeket megfelelő kísérletekben tesztvizsgálatnak vetették alá. Jelen feltalálók kimutatták, hogy a bombesin tiometilén-analógok és metilén-szulfoxid analógok in vitro antagonistái a természetes molekulának és (1) a receptor kötődésben kompetitív inhibitoroként hatnak, valamint (2) a gasztrin kibocsátó peptid biológiai hatására antagonistá hatást fejtenek ki. A találmány szerinti peptid antagonistá anyagok potenciálisan jelentős mitosis ellenes és/vagy szekréció ellenes aktivitással rendelkeznek, és ennél fogva tudományos és terápiás vonatkozásban rákterápiában, illetve fekélyek kezelésében alkalmazhatók. Ezen túlmenően a molekulában a tiometilén-csoport vagy a metilén-szulfoxid csoport jelenléte megnövelt hatékonyságot és megnövelt hatásidőt eredményezhet.

A találmány tárgya eljárás az alábbi általános képletű peptid származékok vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóik előállítására



Ahol az általános képletben

- X jelentése amino-terminális maradék, amely lehet hidrogénatom, egy vagy két 1-10 szénatomszámú alkilcsoport, egy vagy két 2-10 szénatomszámú acil-csoport, karbobenziloxi- vagy t-butiloxi-karbonil-csoport; ha csak az amino-terminális aminősáv nem valamely ciklikus származék, amely esetben X jelentése elhagyott;
- N jelentése bombesin, SRP vagy ezek bármely természetes variánsa, illetve szekvencia részletük variánsa egy kötés vagy egy 1-11 bármely aminósav maradékot tartalmazó peptid; ha csak a terminális aminósav nem ciklikus származék, amely esetben N jelentése elhagyott;
- A₁ jelentése Glp, vagy alkalmas savas hidrofil maradék;
- A₂ jelentése Gln, alkalmas semleges vagy hidrofób maradék, Nle, α -amino-butánsav, pSubPhe, BNep, vagy egy kötés;

- A₃ jelentése Arg, alkalmas bázisos hidrofil mara-
dék, vagy egy kötés;
- A₄ jelentése Leu, vagy A₂ jelentésével megegyező;
- A₅ jelentése Gly, A₂ jelentésével megegyező, D-Ala;
- A₆ jelentése Asn, A₂ jelentésével megegyező, D-Ala,
pGlu, Lys, Lys(Z), SubPhe, vagy DPnc;
- A₇ jelentése Gln, His, alkalmas semleges hidro-
fób vagy bázikus hidrofil maradék, Nap, D-His,
MeHis, His(T-Me), His(N-Me), D-Glu(OMe), D-Glp,
D-Leu, MeLeu, D-Pnc, vagy Glu;
- A₈ jelentése Trp valamint alkalmas semleges mara-
dék vagy Met, MeTrp, SubPhe, Lys, Cha, vagy
Lys(Z(ZCl));
- A₉ jelentése Ala, A₂ jelentésével megegyező, MeAla,
Aib, D-Phe, L-Nal, Arg, vagy Glu;
- A₁₀ jelentése Val, A₂ jelentésével megegyező, MeVal,
Irr(CH₂Ph), vagy DL-Fig;
- A₁₁ jelentése Gly, alkalmas semleges maradék, Phe,
D-Pnc, Sar, D-Ala, D-Ser, D-Ser(CH₂Ph), SubPhe,
D-Pro, D-Lys, Asp, D-Arg, D-Lys(Z(ZCl)), Ac³c,
Ac⁵c, vagy Ac⁶c;
- A₁₂ jelentése His, alkalmas semleges vagy bázikus
hidrofil maradék, Tyr, D-Pnc, pSubPhe, His,
MeHis, His(T-Me), His(N-MeOH), D-pcF, Aib,
Anx, Apo, Gln, Lys, Lys(Z), Ser, Ser(CH₂Ph),
Thr, Glu, Asp, Asp(DBut), vagy N-Nal;

- A₁₃** jelentése Leu, Phe, alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, Me-Leu, MeIle, MeVal, vagy Glu; jelentése az A_{13aa} A_{14aa} dipeptidet meghatározó kötés, ahol jelentése (CH₂S), (CH₂S(O)), Ψ(CH₂S(O))^I és Ψ(CH₂SO)^{II}, ahol A_{13aa} és A_{14aa} jelentése a szubsztituáló aminosavak;
- A₁₄** jelentése Leu, Met, Nie, alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, MeLeu, MeIle, MeVal, vagy Glu;
- C** jelentése bombesin, GRI, vagy ezek természetes variánsa illetve szekvencia részlete, egy kötés, vagy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid; és
- Y** jelentése karboxil-terminális maradék, amely lehet hidroxil-csoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-észter-csoport, karboxamid-csoport, mono- vagy di- 1-4 szénatomszámú alkil-amid-csoport, 1-4 szénatomszámú alkil-amin-csoport, 1-4 szénatomszámú tioalkil-éter-csoport.

A találmány szerinti eljárás és anyagok leírásában az alábbi szokásos rövidítéseket alkalmazzuk; (1) aminosavak és ezek hárombetűs kódjai, (2) módosított és nem szokásos aminosavak, és (3) terminális aminó és karboxil szubsztitu-

ensek.

(1): Aminosavak és hárombetűs kódjuk

L-AMINOSAVAK

Ala - alanin

Arg - arginin

Asn - asparagin

Cys - cistein

Gly - glicin

Glu - glutaminsev

Val - valin

Gln - glutamin

His - hisztidin

Ile - izoleucin

Leu - leucin

Lys - lizin

Phe - fenilalanin

Met - metionin

Pro - prolin

Ser - Serin

Thr - treonin

Trp - triptofán

Tyr - tirozin

D-AMINÓSAVAK

D-Ala - D-alanin
D-Arg - D-arginin
D-Asn - D-aszparaginsav
D-Cys - D-cisztein
D-Glu - D-glutaminsav
D-Val - D-velin
D-Gln - D-glutamin
D-His --D-hisztidin
D-Ile - D-izoleucin
D-Leu - D-loucin
D-Lys - D-lisin
D-Phe - D-fenilalanin
D-Met - D-metionin
D-Pro - D-prolin
D-Ser - D-szerin
D-Thr - D-treonin
D-Trp - D-triptofán
D-Tyr - D-tirozin

(2): Módosított és nem szokásos aminosavak

Ac3c - 1-amino-1-ciklopropén-karbonsav
Ac5c - 1-amino-1-ciklopentán-karbonsav
Ac6c - 1-amino-1-ciklohexán-karbonsav
Asp(OtBu) - O-t-butil-aszparaginsav
Aba - α -amino-butánsav

Ahx	- (2S)-2-amino-hexánsav (norleucin)
Ape	- (2S)-2-amino-pentánsav (norvalin)
Cha	- ciklohexil-alanin
Chg	- ciklohexil-glicin
Cin	- cinnamoil-csoport
Deh	- (2,3-dietil-guanidino)-homoarginin
DhCin	- 3,4-dihidro-cinnamoil-csoport
Hse	- homoszerin-lakton
Mis(π -Me)	- N $^{\pi}$ -metil-hisztidin
Mis(γ -Me)	- N $^{\gamma}$ -metil-hisztidin
Hyp	- hidroxil-prolin
pGlu	- piroglutaminsav
Glu(Ome)	- gamma-metil-D-glutaminsav
I-Tyr	- 3-jód-tirozin, 5-jód-tirozin, 3,5-dijód-tirozin
Lys(Z)	- benziloxi-karbonil-lizin
Lys(ZCl)	- p-klór-benziloxi-lizin
MeLys	- N-metil-lizin
MeLeu	- N-metil-leucin
MeHis	- N-metil-hisztidin
MeTrp	- N-metil-triptofán
MeAla	- N-metil-alanin
MeVal	- N-metil-valin
MeAhx	- N-metil-(2S)-2-amino-hexánsav
MeApe	- N-metil-(2S)-2-amino-pentánsav
MeIle	- N-metil-izoleucin

MePhe	- N-metil-fenilalanin
MePgl	- N-metil-fenilglicin
Npa	- β -naftil-alanin
DhPro	- 3,4-dihidro-prolin
Nle	- norleucin
Orn	- ornitin
Pip	- pipekolát
Pba	- p-amino-fenil-butánsav
pSubPhe	- para szubsztituált fenilalanin, pClPhe - p-klór-fenilalanin, pBrPhe - p-bróm-fenilalanin, pFlPhe - p-fluór- fenilalanin, pNO ₂ Phe - p-nitro-fenil- alanin, pOHPhe - p-hidroxi-fenil- alanin
Pgl	- fenilglicin
Ser(CH ₂ Ph)	- benzil-szerin
Sar	- szarkozin (N-metil-glicin)
SubPhe	- orto-, meta-, vagy para-, mono- vagy di- szubsztituált fenil-alanin
Tha	- β -(2-tienil)-alanin
Thr(CH ₂ Ph)	- benzil-treonin
Trp(CH ₂ Ph)	- benzil-triptofán
Tiq	- Tetrahydro-izokinolin-3-karboxilát

konfigurációjú lehet. Ezen túlmenően a leírásba beleértendő, hogy a tiometilén-csoport oxidációja után a metilén-szulfoxid-csoport két peptid izomer előállítását teszi lehetővé, amelyeket $(\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{I}})$ és $(\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{II}})$ jelöléssel adunk meg. Ezen túlmenően a leírásba beleértendő, hogy ezek az izomerek elválaszthatók és abszolút konfigurációjuk meghatározható. A $\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))$ jelölés alatt a leírásban a két izomert értjük vagy együtt, vagy elválasztva.

Az alkilcsoport és az alkoxi-csoport alkilcsoportja lehet egyenes vagy elágazó, illetve ciklusos szénláncú csoport, mint például metilcsoport, etilcsoport, propilcsoport, izopropil-csoport, butil-csoport, izobutil-csoport, t-butil-csoport, pentil-csoport, izopentil-csoport, szek-pentil-csoport, ciklopentil-csoport, hexil-csoport, izohexil-csoport, ciklohexil-csoport és ciklopentil-metilcsoport, heptil-csoport, oktil-csoport(Oct), 8-amino-oktán-sav-csoport(Oac). A 2-10 szénatomszámú acil-csoport lehet egyenes vagy elágazó szénláncú, illetve ciklusos, telített vagy telítetlen acil-csoport, amely 1 vagy 2 karbonilcsoportot tartalmazhat. Ilyen csoport lehet például acilcsoport(Ac), azetidín-2-karboxilát-csoport(Azt), benzoilcsoport, szukcinil-csoport, cinnemoil-csoport(Cin), 3,4-dihidro-cinnemoil-csoport(DhCin), maleil-csoport(Mal), és glutaril-csoport (Glt). Mind az alkilcsoportok, mind az acil-csoportok lehetnek olyan csoportok, amelyek halo-

génatom szubsztituenseket tartalmaznak, ahol a halogénatom lehet fluóratom, klóratom, brómatom vagy jódatom. Például ilyen csoport lehet a trifluór-acetil-csoport (Tfa). Az N-terminális aminosav maradék ciklusos származéka lehet például piroglutaminsav (pGlu) és homoszérin-lekton (Hse).

A "bármely aminosav" elnevezés alatt nem bármely karbonsavat értünk, amely aminócsoport szubsztituenst tartalmaz, hanem olyan aminosavakat értünk, amelyeket általában polipeptid származékok előállításában alkalmaznak, azaz természetesen előforduló aminosavakat, valamint más, nem fehérje típusú aminosavakat értünk, mely utóbbiakat szokásosan a peptid kémiában alkalmaznak természetes peptidek szintetikus analóggjainak előállításában. A természetesen előforduló aminosavak glicin, az alanin, a valin, a leucin, az izoleucin, a szerin, a metionin, a treonin, a fenilalanin, a tirozin, a triptofán, a cisztein, a prolin, a hisztidin, az aszparaginsav, az aszparagin, a glutaminsav, a glutamin, az arginin, az ornitin és a lizin. Az elnevezésbe továbbá beleértjük a természetesen előforduló aminosavak D-izomerjeit; a D-alanint, a D-valint, a D-leucint, a D-izoleucint, a D-szerint, a D-metionint, a D-treonint, a D-fenilalanint, a D-tirozint, a D-triptofánt, a D-ciszteint, a D-prolint, a D-hisztidint, a D-aszparaginsavat, a D-aszparagint, a D-glutaminsavat, a D-glutamint, a D-arginint. Az elnevezésbe továbbá bele-

értjük a nem fehérje típusú α -aminósavakat, mint például az 1-amino-1-ciklopropán-karbonsavat (Ac3c), az 1-amino-1-ciklopentán-karbonsavat (Ac5c), az 1-amino-1-ciklohexán-karbonsavat (Ac6c), az O-t-butil-eszperaginsavat (Asp(OtBu)), az α -amino-buténsavat (Aba), a (2S)-2-amino-hexánsavat (Nórleucint) (Ahx vagy Nie), a (2S)-2-amino-penténsavat (nórvalint) (Ape), az N^V-metil-hisztidint (Mis(γ -Me)), az N^{II}-metil-hisztidint (Mis(π -Me)), az N-metil-lizint (MeLys), az N-metil-leucint (MeLeu), az N-metil-hisztidint (MeHis), az N-metil-triptofánt (MeTrp), az N-metil-alanint (MeAla), az N-metil-valint (MeVal), az N-metil-(2S)-2-amino-hexánsavat (MeAhx), az N-metil-(2s)-2-amino-penténsavat (MeApe), az N-metil-izoleucint (MeIle), az N-metil-fenil-alanint (MePhe), az N-metil-fenil-glicint (MePgl), a β -(2-tienil)-alanint (The), a benzil-treonint (Thr(CH₂Ph)), a benzil-triptofánt (Trp(CH₂PH)), a nórleucint, a nórvalint, az allo-izoleucint, a homo-arginint, a tieprolint, a dihidroprolint, a hidroxiprolint (Hyp), a homoszerint, a ciklohexil-glicint (Chg), az β -amino-buténsavat (Aba), a ciklohexil-alanint (Cha), az amino-fenil-buténsavat (Pba), a mono- vagy diszubsztituált orto, meta vagy para helyzetben szubsztituált fenil-alamineket, mint például a para helyzetben szubsztituált fenil-alanint (PSubPhe) és a p-klór-fenil-alanint, a t-amino-fenil-alanint és p-nitro-fenil-alanint (pNPhe), vagy a fenilcsoporton

egy vagy két előbbi szubsztituenset tartalmazó fenilalaninokat, amely szubsztituensek lehetnek 1-4 szénatomszámú alkilcsoport, 1-4 szénatomszámú alkoxi-csoport, halogénatom vagy nitrocsoport, vagy a metiléndioxi-csoporttal szubsztituált fenil alaninokat. A β -2 és 3-tienil-alanint a β -2- és a 3-furanil-alanint, a β -2-, 3-, és 4-piridil-alanint, a β -(benzotienil-2- és 3-il)-alanint, a β -(1- és 2-naftil)-alanint (Npa), az O-alkilezett szerin, treonin vagy triozin származékokat, a glutaminsav és aszparaginsav metilésztereket, az S-alkilezett ciszteint, a tirozin O-szulfát észttert és a halogénezett tirozinokat, mint például a 3-jód-tirozint, az 5-jód-tirozint és a 3,5-dijód-tirozint.

A "bombesin vagy GRP vagy ezek természetes variánsai" elnevezés alatt a bombesin vagy GRP természetesen előforduló aminosav szekvenciáját értjük.

A bombesin és a GRP vonatkozásában az "ezek részletei" elnevezés alatt a GRP a bombesin vagy variánsaik 1-11 aminosav vagy hosszabb szekvenciáját értjük.

Az α -aminósavakat bizonyos jellemzők alapján csoportosíthatjuk. Az oldalláncok két jellemző tulajdonsággal rendelkeznek: polárosak vagy nem polárosak lehet-

nek. A nem poláros aminosavak azok, amelyek hidrofób oldallánccal rendelkeznek, amelyek lehetnek alifás szénhidrogén oldallánccot tartalmazó aminosavak: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Nle, Pro és aromás csoportot tartalmazó aminosavak Phe és Trp, valamint pszeudoszénhidrogén csoportot tartalmazó aminosavak, Met. A poláros aminosavak három csoportba oszthatók: (1) Savas hidrofób csoportok, (2) semleges csoportok és (3) bázikus hidrofób csoportok. A semleges típusú aminosavak lehetnek hidroxilcsoportot tartalmazók, mint például Ser és Thr; amidok, mint például Asn és Gln; aromás gyűrűt tartalmazó aminosavak, mint például Tyr és Trp; szulfhidril-csoportot tartalmazó aminosavak, mint például Cys, és kis szerkezetű aminosavak, mint például Ala és Gly. A poláros csoportban találhatunk "savas hidrofil" maradékokat, amelyek lehetnek aszparaginsavak, glutaminsav és tirozin, valamint "bázikus hidrofil" maradékokat, mint például His, Lys és Arg.

Az "1-11 bármely aminosavat tartalmazó peptid-csoport" elnevezés alatt azt értjük, hogy az aminosav szekvenciát a mag aminosav egység (A_2-A_{14}) akár aminos- vagy karboxi- végcsoportjához csatolva alkalmazzuk, úgy, hogy a vegyület megőrzi alapvető hatásosságát.

Y jelentése olyan kémiai csoport, amely alkalmazható a terminális aminosav helyettesítésére vagy módosítására. Ennélfogva Y jelentése lehet karboxamid-csoport, alkoxiészter-csoport, alkilamid-csoport, alkilamin-csoport vagy tioalkil-éter-csoport.

A találmány szerinti (1) általános képletű polipeptidok bármely nem toxikus szerves vagy szervetlen savval gyógyszerészetileg elfogadható sók képezhetnek. Például alkalmazható szervetlen savak sóképzésre lehetnek sósav, a hidrogénbromid, a kénsav, a foszforsav és a savas kénsók, mint például a nátriummonohidrogénortofoszfát és a káliumhidrogénszulfát. Alkalmazható szerves savak, amelyek alkalmas sók képeznek lehetnek mono- di- és trikarbonsavak. Ilyen savak például az ecetsav, a glikolsav, a tejsav, a piroszőlősav, a malomsav, a borkósav, a glutársav, a fumársav, az almasav, a borostyánkősav, a citromsav, az aszkorbinsav, a maleinsav, a hidroximaleinsav, a benzoésav, a hidroxibenzoésav, a fenil-ecetsav, a fahéjsav, a szalicilsav, a 2-fenoxibenzoésav és a szulfonsavak, mint például a metánszulfonsav és a 2-hidroxietánszulfonsav. A karboxi-terminális aminosav sói lehetnek nem toxikus karbonsav sók, amelyeket bármely alkalmas szervetlen vagy szerves bázissal képezhetünk. Ilyen sók lehetnek például alkálifémsók, mint például nátrium és káliumsó; alkáli földfém sók, mint például kalcium és magnézium sók; könnyűfém sók, amely

fémek a IIIA csoporthoz tartoznak, mint például alumínium-só; és szerves elsőrendű, másodrendű vagy harmadrendű aminokkal képzett sók, mint például trietil-aminokkal képzett sók, például trietilaminnal, prokainnal, dibenzilaminnal, 1-eténeaminnal, N,N'-dibenzil-etilén-diaminnal, dihidro-abietilaminnal, N-kis szénatomszámú alkil-piperidinnel és bármely más, alkalmas aminnal képzett sók.

A szokásos peptid kémiában alkalmazott nevezéktan szerint amennyiben például az $A_{13}-\Psi-A_{14}$ olyan vegyületet jelent, amelyben az A_{13} maradék és az A_{14} maradék egyaránt Leu, és ezt egy redukált tiometilén-kötés kapcsolja össze, a Phe $(CH_2S)Leu$ jelöléssel jelölhetjük. Ez a jelölés kifejezi, hogy az utolsóelőtti Phe egység karbonilcsoportja tiometilén-csoporttá redukált. Az (1) általános képletű peptid származékok előállításának eljárását, amelyekben Ψ jelentése $-CH_2S-$ csoport, azaz a vegyületek a $\Psi(CH_2S)$ típusú vegyületek, Spatola és Darlak, Tetrahedron Letters, 44 (3), 821-33 (1988) közleményükben leírták. Más, jelen táblán szerinti peptidszármazékok leírására alkalmazott metilén-szulfoxid elnevezés $\Psi(CH_2S(O))$ megtalálható Edward és Spatola Journal of Liquid Chromatography, 915, 903-919 (1986) közleményében. Ezen túlmenően a tiometilén-csoport metilén-szulfoxid csoporttá történő oxidációja után két metilén-szulfoxid-peptid-izomer létezik, amelyeket $(\Psi(CH_2S(O)))^I$ és $(\Psi(CH_2S(O)))^{II}$ jelöléssel különböztetünk meg. A leírásba beleértendő, hogy ezek az izomerek izolál-

hatók és abszolút konfigurációjuk meghatározható. A leírásban alkalmazott $\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))$ jelölés mindkét izomer együttes vagy elválasztott jelenlétét jelöli. A $(\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{I}})$ és a $(\Psi(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{II}})$ izomerek sorrendben 5.40 perc és 6.28 perc retenciós idővel rendelkeznek, C18 Vydac analitikai oszlopon végzett (4.6 mmID x 25 cm, 5 mikron C18) végzett elválasztás során, amely elválasztásban az áramlási sebesség 2 ml/perc és az eluens 25-75% acetonitril/víz lineáris gradiens keverék, amely 0.1% trifluórecetsavat tartalmaz, valamint az elúciót 25 percig hajtjuk végre.

A találmány szerinti peptid származékok Bombesin/GRP antagonistá hatását kimutathatjuk azáltal, hogy ezek a peptidek kompetitív kötődést mutatnak radióaktív jódozott bombesin/GRP anyagokkal szemben emlős bombesin/GRP receptorok esetében, amely tulajdonságukat Buck és munkatársai, Science 226: 987-989, 1984 közleményében leírt eljárással határozhatjuk meg. A találmány szerinti vegyületek bombesin/GRP indukált foszfatidil-inozitol felvételt stimuláló vagy inhibáló hatását Bristow és munkatársai British J. Pharmacol. 90: 211-21, 1987 közleményében leírt eljárással határozhatjuk meg.

A találmány szerinti vegyületek közül bizonyos vegyületek különösen előnyös tulajdonságaik. A feltalálók

- A_1 jelentése pGlu, vagy alkalmas savas hidrofil maradék;
- A_2 jelentése Gln, vagy alkalmas semleges vagy hidrofób maradék, Nle, α -amino-butánsav, pSubPhe, BNap, vagy egy kötés;
- A_3 jelentése Arg, alkalmas bázikus hidrofil maradék vagy egy kötés;
- A_4 jelentése Leu, vagy A_2 jelentésével megegyező;
- A_5 jelentése Gly, az A_2 jelentésével megegyező, D-Phe, vagy D-Ala;
- A_6 jelentése Asn, A_2 jelentésével megegyező, D-Ala, pGlu;
- A_7 jelentése Gln, His, alkalmas semleges hidrofób vagy bázisos hidrofil maradék, vagy Nap;
- A_8 jelentése Trp, alkalmas semleges maradék, vagy Met;
- A_9 jelentése Ala, vagy A_2 jelentésével megegyező;
- A_{10} jelentése Val, vagy A_2 jelentésével megegyező;
- A_{11} jelentése Gly, alkalmas semleges maradék, Phe, vagy D-Phe;
- A_{12} jelentése His, alkalmas semleges vagy bázisos hidrofil maradék, Tyr, D-Phe, vagy pSubPhe;
- A_{13} jelentése Leu, Phe, vagy alkalmas hidrofób vagy semleges maradék

Ψ jelentése A_{13}^{aa} A_{14}^{aa} dipeptid, ahol Ψ jelentése (CH_2S) , $(CH_2S(O))$, $\Psi(CH_2S(O))^I$, és $\Psi(CH_2SO)^{II}$, ahol A_{13}^{aa} és A_{14}^{aa} jelentése szubsztituált aminosavak;

A_{14} jelentése Leu, Met, Nle, vagy alkalmas hidrofób vagy semleges maradék;

C jelentése Bombesin, GRP vagy természetes variánsuk szekvenciája, vagy ennek részlete, egy kötés, vagy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid; és

Y jelentése karboxi-terminális maradék, amely lehet hidroxilcsoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-észter, karboxamid-csoport, mono- vagy di- 1-4 szénatomszámú alkil-amid, 1-4 szénatomszámú alkilamin, 1-4 szénatomszámú tioalkiléter.

Különösen előnyös találmány szerinti peptid származékok a



általános képletű vegyületek, ahol az általános képletben:

X jelentése aminos-terminális maradék, amely lehet hidrogénatom, egy vagy két 1-10 szénatom-számú alkilcsoport, egy vagy két 2-10 szénatomszámú acil-csoport, karbobenzil-oxi- vagy t-butiloxi-karbonil-csoport; ha csak az aminos-terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben X jelentése törölt,

N jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsaik, vagy ezek szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosavat tartalmazó peptid egység; ha csak a terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben N jelentése törölt;

- A₁ jelentése** pGlu vagy egy kötés;
- A₂ jelentése** Gln vagy egy kötés;
- A₃ jelentése** Arg vagy egy kötés;
- A₄ jelentése** Leu vagy egy kötés;
- A₅ jelentése** Gly vagy egy kötés;
- A₆ jelentése** Asn, pGlu, Gly, vagy D-Phe;
- A₇ jelentése** Gln vagy His;
- A₈ jelentése** Trp;
- A₉ jelentése** Ala;
- A₁₀ jelentése** Val;
- A₁₁ jelentése** Gly;

A₁₂ jelentése His;

A₁₃ jelentése Phe;

Ψ jelentése A¹³aaΨ A¹⁴aa, dipeptid, ahol Ψ jelentése (CH₂S), Ψ(CH₂S(O))I, (Ψ(CH₂SO)II) valamint A₁₃aa és A₁₄aa jelentése a megfelelő szubsztituens aminosav;

A₁₄ jelentése Leu, vagy Nle;

C jelentése bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk, vagy szekvencia részletük, egy kötés vagy 1-11 bármely aminosavat tartalmazó peptid egység;

Y jelentése karboxi-terminális maradék, amely lehet hidroxilcsoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-csoport, aminócsoport, mono- vagy di- 1-4 szénatomszámú alkilcsoporttal szubsztituált aminosav, vagy egy alkohol-terminális maradék;

és

X jelentése hidrogénatom, acetyl-csoport vagy szuccinil-csoport.

Peptid előállítás:

A találmány szerinti peptideket a szakirodalomban ismert számos eljárással könnyen előállíthatjuk. Ilyen eljárások lehetnek szilárdfázisú szekvenciális vagy blokk szintézis, glén-

klónozás és a fenti technikák kombinációi. A szilárd-fázisú szekvenciális eljárást automatizált eljárással hajthatjuk végre, és például automata peptid szintetizátort alkalmazhatunk. Ebben az eljárásban a peptideket úgy állítjuk elő, hogy a szintézist a gyantán egy olyan dipeptid egységen kezdjük, amely védett dipeptid, a C-terminális aminosavval kapcsolódik a metil-benzhidril-amin-gyantához és az aminosavak közötti tiometilén-metilén-szulfoxid hidat tartalmazza. A peptid szekvencia növelését standard eljárással végezzük, amely a berendezés gyártója által leírt, és a szakember előtt ismert.

Miután a szekvencia kapcsolását befejezzük, a molekulán vagy rajta hagyjuk a Boc védőcsoportot, vagy ezt eltávolítjuk és az N-terminális aminos csoportot acilezzük. A védett fragmens gyantáról való eltávolítását hidrogénfluoridos eljárással végezzük.

Az egyes polipeptid szekvenciába bevezetett aminosavakon alkalmazott α -aminó csoport védő csoport bármely ilyen szakirodalomban ismert védő csoport lehet. Az ide beleértett α -aminó csoport védő csoportok például lehetnek (1) acil típusú védő csoportok, mint például: formil-csoport, trifluór-acetil-csoport, ftalil-csoport, toluol-szulfonil-csoport (tozil-csoport), benzolszulfonil-csoport, nitro-fenil-szulfenil-csoport, tritil-szulfenil-csoport, o-nitro-fenoxi-acetil-csoport és α -klór-butiril-csoport; (2) aromás karbamid

típusú védőcsoportok, mint például benziloxi-karbonil-csoport, és szubsztituált benziloxi-karbonil-csoport, mint például p-klór-benziloxi-karbonil-csoport, p-nitro-benzil-karbonil-csoport, p-bróm-benziloxi-karbonil-csoport, p-metoxi-benziloxi-karbonil-csoport, 1-(p-bifenilil)-1-metil-etoxi-karbonil-csoport, χ, α -dimetil-3,5-dimetoxi-benziloxi-karbonil-csoport és benzhidriloxi-karbonil-csoport; (3) alifás karbamid típusú védőcsoportok, mint például t-butiloxi-karbonil-csoport (Boc). Diizopropil-metoxi-karbonil-csoport, izopropiloxi-karbonil-csoport, etoxi-karbonil-csoport és aliloxi-karbonil-csoport; (4) cikloalkil típusú karbamid védőcsoportok, mint például ciklopentiloxi-karbonil-csoport, adamantiloxi-karbonil-csoport és ciklohexiloxi-karbonil-csoport; (5) tiokarbamid típusú védőcsoportok, mint például feniltio-karbonil-csoport; (6) alkil típusú védőcsoportok, mint például trifenil-metil-csoport (tritol-csoport) és benzil-csoport; és (7) trialkil-szilil-csoportok, mint például trimetil-szilil-csoport. Előnyösen alkalmazható χ -aminócsoporthoz védőcsoport a t-butiloxi-karbonil-csoport (Boc).

Mint a szilárdfázisú peptid szintézis szakirodalmában ismert, számos aminosav olyan funkciócsoportot tartalmaz, amely a lánc előállításakor védőcsoporttal láttandó el. A megfelelő védőcsoportnak kiválasztása és alkalmazása a szakember előtt ismert, és attól függ, hogy

ciklohexil-karbodiimid és N-etil-N'-(γ -dimetil-amino-propil)-karbodiimid); (2) a ciánamidok (pl. az N,N-di-benzil-ciánamid); (3) a keténiminek; (4) az izoxazólium sók (pl. N-etil-5-fenil-izoxazólium-3'-szulfonát); (5) a monociklusos nitrogéntartalmú heterociklusos amidok, amelyek aromás jellegűek és 1-4 nitrogént tartalmaznak a gyűrűben, mint például az imidazolidok, a pirazolidok és az 1,2,4-triazolidok. Ilyen heterociklusos alkalmazható amidok például az N,N'-karbonil-diimidazol és az N,N'-karbonil-di-1,2,4-triazol; (6) az alkoxilezett acetilének (pl. az etoxi-acetilén); (7) az aminosav karboxilcsoportjával vegyes anhidridet képező reagensek (pl. etil-klór-formiát és izobutil-klór-formiát) vagy a kapcsolandó aminosav szimmetrikus anhidridjei (pl. Boc-Ala-O-Ala-Boc), (8) a gyűrű egyik nitrogénatomján hidroxilcsoportot tartalmazó nitrogén tartalmú heterociklusos vegyületek (pl. N-hidroxi-ftálimid, N-hidroxi-szukcinimid és 1-hidroxi-benzotriazol) és (9) difenil-foszforilazid. Más aktiváló reagenseket és peptid kapcsolatban való alkalmazásukat írt le Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, 1-27 (1970) közleményében. A feltalálók előnyösnek találják kapcsoló reagensként valamennyi aminosav esetében a szimmetrikus anhidrid alkalmazását, kivéve az Arg, Asn és Gln esetét.

Valamennyi védett aminosavat vagy aminosav szekvenciát a szilárdfázisú reaktorba körülbelül négyszeres feleslegben tépléljük be és a kapcsolást dimetilformamid:

diklórmetán (1:1) vagy tiszta dimetilformamid, vagy előnyösen tiszta diklórmetán oldószerben hajtjuk végre. Azokban az esetekben, amennyiben a kapcsolás nem teljes, a kapcsolási eljárást az α -aminócsoport védőcsoport eltávolítása előtt megismételjük, mielőtt a következő aminosavat a szilárdfázisú reaktorba betáplálnánk. Minden egyes fázisban a kapcsolási reakció sikerességét ninhidrin reakcióval ellenőrizhetjük az E. Kaiser és munkatársai, Analyt. Biochem. 34, 595 (1970) közleményében leírt eljárás szerint.

Miután az α -aminócsoporton védett aminosavat a gyantahordozóhoz kapcsoltuk, a védőcsoportot bármely alkalmas eljárással, mint például trifluór-ecetsavat diklórmetánban, trifluór ecetsavat önmagában, vagy sósavat dioxánban alkalmazva eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítást 0°C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten hajtjuk végre. Az egyes α -aminócsoport védőcsoportok eltávolítására más, standard hasító reagenseket is alkalmazhatunk. Miután az α -aminócsoport védőcsoportot eltávolítjuk, lépésenként más aminócsoporton védett aminosavakat kívánt sorrendben a lánchoz kapcsolunk. Más eljárás szerint több aminosavból álló csoportokat kapcsolhatunk egymáshoz oldatban végzett eljárással azelőtt, mielőtt ezt az együttest a gyantahordozóra felvitt aminosav szekvenciához kapcsolnánk.

Miután a kívánt aminosav szekvenciát előállítottuk, a peptidet a gyantáról lehasítjuk. A hasítási eljárást például hidrolízissel végezhetjük, és például a gyantához kötött polipeptidet, amely a gyantához egy aminosavon keresztül kapcsolódik, alkohol és ecetsav diklórmetános oldatával végezhetjük. A védőcsoportokat a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal távolíthatjuk el. Jellemzően a védőcsoportok eltávolítását akkor végezzük, amikor a peptidlánc szintézise befejeződött, de a védőcsoportok kívánt esetben a szintézis bármely más lépésében is eltávolíthatók. A peptidek tisztítását alapvetően preparatív, reverz fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével végezzük, amely a szakember előtt ismert.

Más eljárásban, amennyiben metilén-szulfoxid előállítása kívánatos, a tiometilén-csoport oxidációját számos oxidálószerrel elvégezhetjük. Az egyik eljárás szerint a tiometilén-peptidet hidrogénperoxid vizes oldatával reagáltatjuk, és így a peptidet metilén-szulfoxid-származékká alakítjuk. Az izomerek elválasztását nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével végezhetjük, amely a szakember előtt ismert. Például C18 reverz fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiai eljárást alkalmazhatunk a metilén-szulfoxid-peptid izomerek elválasztására.

Terápiás alkalmazás

Az emésztési fekélybetegségek általában súlyosbodások és enyhülések ismétlődő folyamatából állnak. Ebből következően a fekélyes betegségeket krónikus betegségként kell kezelni. Az emésztőszervek fekélyei (nyelőcsövi, gyomor és nyombél) az emésztő-bélrendszer azon traktusában jönnek létre, amelyek savnak és pepszinnek vannak kitéve. A találmány szerinti vegyületek, amelyek alkalmasak bélemésztőrendszer és/vagy hasnyálmirigy fekélyek kezelésére, úgy hatnak, hogy a hasnyálmirigyben és/vagy gyomorban létrejövő túlzott szekréciót különösen sósav és pepszin szekréciót inhibiálják. Mint ilyenek, a találmány szerinti vegyületek alkalmasak emésztőrendszeri fekélyek kezelésére.

A találmány szerinti peptid származék alkalmas dózisa emésztőrendszerű fekélyek kezelésében 0.2 mg/kg - 250 mg/kg beteg testsúly/nap, és a dózis függ a beteg-től, az emésztőrendszeri fekély súlyosságától, valamint a választott peptid származéktól. Az egyes beteg esetében alkalmazandó dózist könnyen meghatározhatjuk. Előnyösen 1-4 napi dózist alkalmazunk, amely jellemzően 5 mg - 100 mg aktív hatóanyagot jelent dózisonként. A gyomorsav szekréciót inhibiáló hatásos találmány szerinti peptid mennyiségét a szakember könnyen meghatározhatja.

A bombesin/GRP analógokat rák terápiában általában SCLC és prosztata karcinómák kezelésére alkalmazzák, valamint különféle más, rákos megbetegedések megelőzésére alkalmazzák. A szakember könnyen felismeri azokat a körülményeket, amelyek rák terápia alkalmazását igénylik. A beteg elnevezés alatt emlősöket, mint például főemlősöket, beleértve az embert, juhot, lovat, marhát, disznót, kutyát, macskát, patkányt és egeret értünk.

A rákos szövet elnevezés alatt jóindulatú és rosszindulatú rákos daganatokat, vagy neoplasmát értünk, és ez lehet melanoma, lymphoma, leukémia és sarcoma. Ilyen rákos szövetek például bőrhez kötődő szövetek, mint például rosszindulatú melanóma és gombás fertőzés; haematológiás rákos megbetegedések, mint például leukémiák, például akut nyirokszöveti leukémia, akut velősejt leukémia vagy krónikus velősejt leukémia; lymphoma, mint például Hodkin-betegség vagy rosszindulatú lymphoma; nőgyógyászati tumorok, mint például petefészek és méhtumorok; urológiai tumorok, mint például prosztata húgyhólyag vagy here tumorok; lágy szöveti sarcomák, csont vagy nem csont sarcomák, mellrákok; hypopysis, pajzsmirigy és mellékvesekéreg tumorok; gyomor-bél tumorok, mint például nyelőcső, gyomor, bél és vastagbél tumorok; hasnyálmirigy és májtumorok; gégecső papilloma és tüdőtumorok.

A növekedés kontrollja alatt a rákos betegségek kezelésén azt értjük, hogy melegvérű állatokban a gyorsan növekedő tumor növekedését lelassítjuk, megszakítjuk, leállítjuk vagy megállítjuk, és a metastasis kialakulását leállítjuk; a melegvérű állat kezelésébe beleértjük, hogy ez nem jelenti általában azt, hogy a tumort meggyógyítjuk olyan értelemben, hogy a tumoros szövetet szétroncsoljuk vagy teljesen megszüntetjük.

A találmány szerinti peptid származékok alkalmas dózisa tumoros szövet vagy rákos daganat növekedésének kezelésére a kis sejtű tüdő karcinómát vagy prosztatara rákos megbetegedést is bele értve, 0.2 mg/kg - 250 mg/kg beteg testsúly/nap, amely dózis függ a kezelt betegről, a kis sejtű tüdő karcinóma betegség súlyosságától és az alkalmazott peptidszármazék fajtájától. Az adott beteg esetében alkalmazandó megfelelő dózist könnyen meghatározhatjuk. Előnyösen napi 1-4 dózist alkalmazunk, jellemzően 5 mg - 100 mg aktív hatóanyagot adagolunk dózisonként. A találmány szerinti peptid mennyisége, amely SCLC növekedés inhibálásához szükséges, a szakember által könnyen meghatározható.

Általában ismert, hogy a rákos betegségek kezelésében alkalmazott terápiás szereket más terápiás szerekekkel vagy rák kezelésében használt terápiákkal együttesen alkalmazzák. A találmány szerinti peptidok ugyancsak al-

kalmazhatók kapcsolt terápiás eljárásokban. Például az (1-5) általános képletű peptideket alkalmazhatjuk a rákos daganat sebészeti eltávolításával vagy besugárzásos terápiájával, immunoterápiával vagy helyi melegítéses terápiával kapcsolatban. Az (1-5) általános képletű peptidek előnyös rákos kezelésben való alkalmazási módja kémiai citotoxikumokkal együttes alkalmazás, amely citotoxikumokat rákos betegségek kezelésében alkalmazhatnak. Ilyen kémiai citotoxikumok lehetnek például a ciklofoszfamid, a metotrexát, a prednison, a 6-merkapto-purin, a procarbazin, a danorubicin, a klórambucil, a cytosin, az arabinozid, a 6-tioguanin, a tio-TEPA, az 5-fluór-uracil, az 5-fluór-2-deoxi-uridin, az 5-aza-citidin, a nitrogén mustár, az 1,3-bis(2-klór-etil)-1-nitrozo-karbamid (BCNU), az 1-(2-klór-etil)-3-ciklohexil-1-nitrozo-karbamid (CCNU), a busulfan, az adriamycin, a bleomycin, a vindesin, a cikloeucin vagy metilglioxál-bis(guanilhidrazon) (MGBG). Amennyiben ilyen kombinációs terápiát alkalmazunk, a citotoxikus hatóanyag hatásossága potenciálható. Ennélfogva az ilyen kombinált terápia alkalmazása lehetővé teszi, hogy a citotoxikus szerből kisebb dózist vagy kevesebb alkalmú dózist alkalmazzunk. A kombinált terápia alatt azt értjük, hogy az (1-5) általános képletű peptidet a citotoxikus szerrel végzett kezelés előtt ezzel párhuzamosan, vagy közvetlenül az ilyen kezelés befejezése után alkalmazzuk. Amennyiben ilyen kombinált terápiát alkalmazunk, rákos megbetegedés kezelésé-

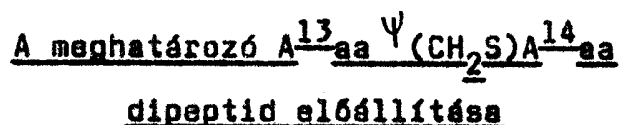
re, a citotoxikus szert a szakirodalomban ismert, hatásos dózis mennyiségben alkalmazhatjuk. Azonban az alkalmazott (15) általános képletű peptid additív vagy szinergetikus hatást eredményezhet a citotoxikus szerrel egy adott tumor esetében. Ennélfogva amennyiben ilyen kombinált rákellenes terápiát alkalmazunk, az adagolt citotoxikus szer mennyisége kisebb lehet, mint az egyedüli alkalmazáskor alkalmazott dózis. Az (1-5) általános képletű peptiddel kombinációban alkalmazva a citotoxikus szert kisebb dózisban alkalmazhatjuk, vagy kevésbé gyakori dózisban alkalmazhatjuk, mint olyan esetekben, amennyiben a citotoxikus szert önmagában használjuk. Hasonlóan, amennyiben kombinált terápiát alkalmazunk, az (1-5) általános képletű peptid dózisa illetve alkalmazásának gyakorisága kisebb lehet, mint amennyiben ezt a hatóanyagot citotoxikus szer nélkül alkalmazzuk.

Habár néhány peptidszermazék túlélheti a nyelősövn keresztül haladást orális adagolás esetében, a feltalálók előnyösnek találják a találmány szerinti hatóanyag nem orális úton történő, például subcután, intravénás, intramuszkuláris vagy intraperitoneális alkalmazását. Beültetett injekció formában történő alkalmazását, beültetett készítmény formában történő alkalmazását vagy nyálkahártyára történő alkalmazását, mint például orrban, torokban és hörgőkben történő alkalmazását, például a peptid származékot tartalmazó aerosol formában, vagy szárazpor

Parentáris adagolás céljára a találmány szerinti vegyületeket injektálható dózis formában alkalmazhatjuk, amely lehet a találmány szerinti vegyület oldat, vagy szuszpenzió formája, gyógyszerészetileg elfogadható hígítóanyagban, amely lehet steril folyadék, mint például víz vagy olajok, és amely kívánt esetben tartalmazhat felületaktív anyagot vagy más, gyógyszerészetileg elfogadható adalékanyagokat. Alkalmazható olajok például az ilyen formált alakokban a petróleum, az állati, a növényi vagy a szintetikus eredetű olajok, például a mogyoróolaj, a szójaolaj és az ásványi olaj. Általában előnyös folyadék hordozóanyagok különösen injektálható oldatok számára a víz, a fiziológiás sóoldat, a vizes dextróz és hasonló cukoroldatok, az etanol és a glikolok, mint például a propilén-glikol vagy polietilén-glikol.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákön részletesen bemutatjuk.

1. példa



2-merkaptó-4-metil-pentánsav (merkaptó-leucin; 1 vegyület)

5 g D-leucin és 114 g káliumbromid 400 ml 2.5 n kénsav oldatban készült oldatát jeges sós fürdővel -5°C hőmérsékletre hűtjük. Az oldathoz 30 g nátriumnitrit 70 ml vízben készült hideg oldatát csepegtetjük keverés közben ($0-50^{\circ}\text{C}$). A reakcióelegyet körülbelül 14 óráig szobahőmérsékleten keverjük. Ezután az elegyet háromszor 75 ml éterrel extraháljuk. Az éteres extraktumot vízmentes nátriumszulfáton megszáritjuk. Az oldatot leszűrjük és az étert elpárologtatjuk. A kapott világos olajos 2-bróm-4-metil-pentánsavat (18 g) (Martin és Greco, (1968) J. Org. Chem. 33, 1275-1276) 250 ml 33%-os nátriumtritiokarbonát oldathoz adjuk 0°C -on keverés közben. A reakcióelegyet 48 óráig keverjük, majd 0°C hőmérsékleten 10 n kénsav segítségével megsevanyítjuk. A megsevanyított oldatot ezután háromszor 75 ml éterrel extraháljuk. Az éteres extraktumot vízmentes nátriumszulfáton megszáritjuk és az étert vákuumban elpárologtatjuk. A kapott sárgás olajos anyagot (17 g) vákuumdesztillációval tisztítjuk. A végső termelés 15.3 g (S)-2-merkepto-4-metil-pentánsav; f.p.: 92-93 (0.75 Hgmm); $(\lambda)_{\text{D}}^{25} = -23.2^{\circ}$ (c = 1, MeOH).

(S)-(t-butiloxi-karbonil)-2-amino-3-fenil-propanil-p-toluolszulfonát (2 vegyület)

A címbeli vegyület előállításához alkalmazott kiindulási reagens (S)-(t-butiloxi-karbonil)-2-amino-3-

fenil-propanolból (4.5 g, 0.0179 mol; amelyet L-fenil-alaninolból (Sigma) és di-t-butyl-dikarbonáttól állítunk elő) állítjuk elő. A kiindulási reagenst ezután 20 ml piridinhez adjuk vízmentes körülmények között, és az elegyet szárazjég-acetonos fürdővel -40°C hőmérsékletre hűtjük. Az elegyhez ezután 6.9 g (3.6 mmol) tozil-kloridot adunk. A reakcióelegyet 4°C hőmérsékleten keverjük. A kiváló piridinium-kloridot nem távolítjuk el. A reakció befejezése után a piridint vákuumban ledesztilláljuk és a kapott szilárd maradékot éterben oldjuk. Az éteres extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszűrjük, leszűrjük, és az étert vákuumban elpárologtatjuk. 10.5 g olejos terméket kapunk, amelyet etil-acetát-hexán oldószerkelegetből csapadékként leválasztunk. 9.0 g fehér szilárd terméket kapunk, o.p.: $109-110^{\circ}\text{C}$,

(S)-(S)t-butioxi-karbonil-Phe^ψ(CH₂S)Leu-OH előállítás
(3. vegyület)

0.43 mol-os nátrium-etoxid oldatot (A oldat) készítünk frissen uágott nátriumból és vízmentes etanolból. 0.72 g (S)-2-merkaptó-4-metil-pentánsevat (1 vegyület) oldunk 25 ml etanolban (B oldat), nitrogén atmoszférában 15 ml B oldathoz lassan 13.5 ml A oldatot adagolunk. Az elegyet 5 percig keverjük, majd az etanolt vákuumban elpárologtatjuk. A fehér szilárd maradékot benzollal is-

mételten bepároljuk, amíg szárazzá nem válik. A kapott merkopto-leucin dinátrium sóit körülbelül 1 ml dimetilszulfoxidon (DMSO) oldjuk, és az oldathoz 1.58 g 2 vegyület 2 ml dimetilszulfoxidban készült oldatát adagoljuk. A reakcióelegyet éjjelen át keverjük, majd 175 ml desztillált vízzel elegyítjük. A keveréket háromszor 20 ml éterrel extraháljuk, majd 5n sósavval 0°C hőmérsékleten keverés közben megsevanyítjuk. A vizes oldatot ezután ismét háromszor etilacetáttal extraháljuk. Az extraktumot telített sóoldattal mossuk, majd nátriumszulfáton megazáritjuk, leszűrjük és az etilacetátot vákuumban elpárologtatjuk. 1.05 g világos színű olajat kapunk, amelyet etilacetát-hexán oldószerkelegyből kristályosítunk. 0.83 g fehér, szilárd terméket kapunk; o.p.: 110-111, $(\alpha)^{25} = 52.50$ (C = 0.88, MeOH).

(Phe₁₃Ψ(CH₂S)Leu₁₄)Bombesin (4 vegyület)

A 3 vegyület (0.20 g) 4-metil-benzhidril-amin-gyanta-hoz (MBHA) való acilkötését a 3 vegyület 0.113 g diklohexil-karbodiimid 0.074 g hidroxibenzotriazol és 0.414 g MBHA 20 ml diklórometán: dimetilformamid (9:1; tf/tf) oldatban való elegyítésével végezzük. A 3 vegyület kapcsolását Vega szilárdfázisú peptid szintetizátorba végezzük, amelyet az irodalmi eljárás szerint félautomata módon működtetünk. Két óra kapcsolás után a reakciót

ninhidrin próbával ellenőrizzük. A kapott Boc-Phe^ψ(CH₂S)
Leu MBHA gyanta amidot dimetilformamiddal majd etanollal
mossuk és megszáritjuk. Így 0.498 g terméket kapunk, amely
0.53 mmol/g gyanta szubsztitúciós szintű. Az aminosav szek-
vencia növelésének peptid szintézis szilárdfázisú eljárás-
sát egy Applied Biosystems peptid szintetizátoron végez-
zük standard eljárás szerint, amely a gyártó előírásainak
felel meg, és amely a szakemberek előtt ismert.

A teljes, gyantához kötött peptidet (0.712 g termelés)
a gyantáról hidrogénfluorid (10 ml/g gyanta) 0°C-on anizol
jelenlétében (etán-ditiol 1 ml: 0.5 mg gyanta) alkalmazásá-
val egy óra reakcióideig végezzük. A hidrogénfluoridot el-
távolítjuk, majd a gyantát 2 x 30 ml dietil-éterrel keverjük
és extraháljuk, ezt követően 30%-os ecetsavval extraháljuk.
Liofilozálással 250 mg nyers terméket kapunk. A termék
400 mg részletét preparatív reverz fázisú nagynyomású fo-
lyadékkromatográfia segítségével C18 Dynamax oszlopon tisztítjuk,
gradiens elúciót alkalmazunk (15 perc acetónitril
gradiens 20-30% 40 ml/perc; amelyet acetónitril és 0.1%
TFA-t tartalmazó víz tartályokból készítünk). A fő csúcs
négy frakcióját gyűjtjük, amely az A₂₁₄ értéknél abszorpciót
mutat.

Az eljárással előállított peptidek kívánt molekula
ion csúccsal rendelkeznek FAB-MS vizsgálatban, és az aminosav

analízis eredménye a kívánt peptidnek megfelel. Ezzel az el-
járással az alábbi peptideket állítjuk elő, amelyek a le-
írt tulajdonságokkal rendelkeznek.

1) pGlu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His

Phe (CH₂S)Leu-NH₂

MS 1637 FAB-MS (MH)⁺ 1638 t_R

55% peptid tartalom

2) Ac-D-Phe Gln Trp Ala Val D-Ala His Phe (CH₂S)Leu-NH₂

MS 1160 FAB-MS (MH)⁺ 1161 t_R

89% peptid tartalom

3) Asn Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S)Leu-NH₂

MS 1089 FAB-MS (MH)⁺ 1090 t_R

52% peptid tartalom

4) Asn Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S(O))Leu-NH₂

MS 1072 FAB-MS (MH)⁺ 1075 t_R

50% peptid tartalom

5) pGlu Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S(O))Leu-NH₂

MS 1069 FAB-MS (MH)⁺ 1070 t_R

80% peptid tartalom

6) pGlu Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S)Nle-NH₂

MS 1069 FAB-MS (MH⁺) 1070 t_R

2. példa

Metilén-szulfoxid izomerek: (Phe₁₃Ψ(CH₂S(O))Leu₁₄)^ILitorin
& (Phe₁₃Ψ(CH₂S(O))Leu₁₄)^{II}Litorin

20 mg (Phe₈(CH₂S)Leu₉)Litorin anyagból a nagynyomású folyadékkromatográfiában alkalmazott eluens oldószerrel (0.1% TFA: acetonitril, 75:25, tf:tf) 3 ml oldatot készítünk. A mintaoldathoz 0.25 ml 5%-os hidrogénperoxid oldatot adunk. Az elegyet két óráig 0°C hőmérsékleten állni hagyjuk, majd preparatív reverz-fázisú rendszerbe tápláljuk (C18 Dynamax 300A⁰ oszlop). A peptid diasztereomer metilén-szulfoxid származékokká történő oxidációját nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével követjük, és ezt két közel jelentkező elúciós csúcs mutatja, amelyeknek retenciós ideje jelentősen kisebb, mint a tiometilén-csoportot tartalmazó peptidé. A metilén-szulfoxidokat reverz-fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével választjuk el és tisztítjuk. A PheΨ(CH₂S(O))^ILeu Litorin és a PheΨ(CH₂S(O))^{II}Leu Litorin jelölését a reverz fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás analízisben mutatott retenciós idejük alapján választottuk.

Az eljárással előállított peptidek FAB-MS vizsgálatban kívánt molekula ion csúcsot mutatnak és aminosav analízis eredményük megfelel a kívánt szerkezetnek. Ezzel az eljárással az alábbi megadott jellemzőkkel rendelkező peptideket állítjuk elő.

7) pGlu Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S(O))^ILeu-NH₂

MS 1085 FAB-MS (MH⁺) 1086 t_R

55% peptid tartalom

Retenciós idő 5.40 perc^{*}

8) pGlu Gln Trp Ala Val Gly His Phe (CH₂S(O))^{II}Leu-NH₂

MS 1085 FAB-MS (MH⁺) 1086 t_R

63% peptid tartalom

Retenciós idő 6.28 perc.^{*}

* A retenciós időt Vydac analitikai oszlopra, 4.6 mm ID x 25 cm, 5 mikron C18; 2 ml/perc áramlási sebesség mellett 25 perc alatt 25% - 75% acetonitril lineáris gradiens eluens alkalmazásával, amelyet 0.1% tri-fluórecetsavat tartalmazó vízzel elegyítünk, és a gradienst 25 perc időtartam alatt fejlesztjük ki, adjuk meg.

3. példa

A (Phe¹³(CH₂S)Leu¹⁴) BOMBESIN
BOMBESIN RECEPTOR ANTAGONIZMUSA, AMELYET A RECEPTORHOZ
VALÓ JÓDOZOTT GRP-VEL ÖSSZEHASONLÍTOTT KOMPETITIV
KÖTŐDÉSEL HATÁROZTUNK MEG

Egy vagy több egér hasnyálmirigyét gyűjtjük, felvágjuk és 50 mmol HEPES (pH 7.4) oldatban, amely 120 mmol NaCl-t és 5 mmol KCl-t tartalmaz homogenizáljuk 4°C hőmérsékleten. Ezután az elegyet 37,500 x g alkalmazásával 15 percig centrifugáljuk. A ledacsot 50 mmol HEPES (pH 7.4) oldatban, amely 10 mmol EDTA-t és 300 mmol KCl-t tartalmaz, újra szuszpendáljuk, majd 30 percig 4°C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a szuszpenziót a fenti módon centrifugáljuk, és a ledacsot kétszer 50 mmol HEPES (pH 7.4) oldattal mossuk, amely proteáz inhibitorokat tartalmaz. (10 µm fenilmetil-szulfonil-fluorid, 1 µm tulorphan, 40 µg/ml bacitracin, 10 mmol jód-acetimid és 4 µg/ml leupeptin), majd ismét centrifugáljuk. A szövetet ezután inkubálási pufferben újra szuszpendáljuk (1 ml/4 mg hasnyálmirigy), és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután minden egyes vizsgálati csőbe 250 µl mennyiséget adagolunk. A vizsgálati csövek inkubálási puffert tartalmaznak, amely 50 mmol HEPES (pH 7.4) 0.5% BSA, proteáz inhibitor, 2 mmol MnCl₂^t, 1 µm somatostatint és a végső 500 µl térfogathoz szük-

séges ^{125}I -GRP és peptid anyagot tartalmaz. A vizsgélati mintát hagyjuk egyensúlyba kerülni 90 percig szobahőmérsékleten. Ezután minden egyes cső tartalmát gyorsan átszűrjük előre 0.1%-os politetilén-imin oldattal nedvesített Whatman GF/B szűrőpapíron leszűrjük. A szűrőpapírt gyorsan háromszor jegesen hűtött 50 mmol HEPES oldattal mossuk (pH 7.4). A szűrőhöz kötött rádióaktivitást gamma számlálóval mérjük. A jódozott GRP kötődésével kompetitív vizsgált vegyület kötődést vagy standard kötődést százalékban fejezzük ki azzal összehasonlítva, amely kötődést olyan esetben tapasztalunk, amikor peptid jelenléte nélkül csak ^{125}I -RRP anyagot alkalmazunk. Ligand módszerrel az affinitást és a maximális kötődést számítjuk (Biosoft, Cambridge, UK) (1. és 2. ábrák).

4. példa

(Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴) BOMBESSIN BOMBESSIN RECEPTORRA
KIFEJKTETT ANTAGONIZMUSA, AMELYET FOSZFATIDIL-
INOZITOL KÖRFOLYAMATRA KIFEJTETT HATÁSSAL MUTATUNK KI

Egér hasnyálmirigyet gyűjtünk, és sejtaprítóban 350 mikrométer méretre aprítjuk. Az aprított szövetet kétszer Krebs-Hepes oldattal mossuk, majd 30 percig 37°C hőmérsékleten Krebs-Hepes pufferben inkubáljuk úgy, hogy

minden 15 percben friss puffert adagolunk. Ezután a szövetet a fenti pufferben inkubáljuk, amely puffer 100-200 mikron $\text{Ci } ^3\text{H}$ -inozitolt tartalmaz 37°C hőmérsékleten egy óráig. Ezután a szövetet kétszer mossuk, majd újabb 30 percreig Krebs-Hepes oldatban inkubáljuk (amely 10 mmol Li^+ tartalmú) 37°C -on úgy, hogy 15 percenként friss puffert adagolunk. A szövet tömeg 10 mg részleteit adagoljuk mintacsövekbe, amely mintacsövek Li^+ puffert és proteázt inhibitorokat (40 $\mu\text{g/ml}$ bacitracin, 4 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 4 $\mu\text{g/ml}$ chymostatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ thiorpán), továbbá 0.1% BSA-t tartalmaz, majd 0.1-1000 nmol peptidet adagolunk 25 mikroliter térfogatba, és a végső térfogatot 250 mikroliterre állítjuk be. Az antagonizmus mérése céljából az Li^+ pufferben levő szövet részleteit előkezeljük egy ún. potenciális antagonistá anyaggal 5 percreig 25°C hőmérsékleten, mielőtt az agonista anyagot (GRP) beadagoljuk. 60 perc szobahőmérsékleten történő reakció után a foszfatidil-inozitol forgalmat befejezzük úgy, hogy az elegyhez 940 mikroliter kloroform: metanol (1:2) elegyet, majd 310 mikroliter kloroformot, végül 310 mikroliter vizet adagolunk. Ezután minden csövet 5 másodpercreig örvényeltetünk, majd 2500 x g erővel 8 percreig centrifugálunk. 900 mikroliter felső (vizes) fázist ezután 7.1 ml vízzel elegyítünk, és 0.5 ml-es Biorad AG-1X8 (formiát) ioncserélő oszlopra visszük Minden csőből 50 mikroliter alsófázist (kloroformos) veszünk, és számlálócsőbe helyezük, megszárítjuk, majd szintillációs folyadékkal

számláljuk. Az oszlopra vitt anyagot sorrendben: 1) 10ml vízzel, 2) 5 ml 5 mmol dinátrium-tetraborát/60 mmol nátrium-formiát oldattal, 3) 10 ml 1 mol ammónium-formiát 0.1 mólos hangyasavban készült oldattal mossuk. A végső (harmadik) mosást gyűjtjük, és ennek 1 ml-ét 10 ml Bio-Safe scintillációs folyadékkal elegyítjük, majd számláljuk. A fenti számlálások arányát (teljes inozitol foszfátok) a megfelelő szerves fázis számlálásával meghatározzuk minden egyes minta esetében. Az arányokat a tesztvizsgálati anyag jelenlétében és/vagy standard anyag jelenlétében összehasonlítjuk a kontroll csövekben tapasztalt arányokkal (amelyekben nincs stimuláló agonista). Dózis-válasz függvényt készítünk, és meghatározzuk, hogy a tesztvizsgálati vegyület milyen mértékben képes stimulálni vagy inhibálni a GRP indukált foszfatiidil-inozitol forgalmat, amely meghatározást grafikus analízissel végezzük, kompjúter program segítségével. Ezt a 3. és 4. ábrán mutatjuk be.

Ábrák leírása

Az 1. ábrán bemutatjuk, hogy a ^{125}I -GRP hogyan kötődik az egér hasnyálmirigy membrán egyszeres osztályú kötődési helyeihez (a bombesin/GRP receptorhoz) (1. példa). A 25-1600 pm ^{125}I -GRP kötését háromszoros kísér-

letben vizsgáltuk majd analizáltuk, és LIGAND módszerrel ábrázoltuk. Az adatokhoz legjobban illeszkedő érték 19 pm receptor/mint (körülbelül 100 fmol receptor/mg membrán fehérje), amelynek K_d értéke 47 pm. Az abszcisszán (x tengelyen) jelöltük a receptorhoz kötött ^{125}I -GRP koncentrációt. Az ordinátán (y tengelyen) jelöltük a receptorhoz kötött ^{125}I -GRP koncentráció és a szabad (nem kötött) ^{125}I -GRP koncentráció hányadosát. Az egyenes vonal azt jelzi, hogy egyetlen hely típus van jelen! Azaz azt mutatja, hogy a ^{125}I -GRP minden egyes receptorához azonos affinitással kötődik. Más kísérletek, amelyekben 25-3200 pm ^{125}I -GRP vagy 10 pm ^{125}I -GRP + 8-500 pm GRP oldatot alkalmaztunk, hasonló K_d értéket mutatott. Ez azt mutatja, hogy a bombesin/GRP receptorhoz való kötődést mérhetjük egér hasnyálmirigy membránokon a ^{125}I -GRP kötődéssel való versengés értékével.

A 2. ábrán bemutatjuk a bombesin analógok kötődési képességét a GRP receptorhoz úgy, hogy bemutatjuk, hogy ezek a peptidek milyen mértékben versengenek a kötődésben a ^{125}I -GRP anyaggal egér hasnyálmirigy membránokon való kötődés esetében (1. példa). A kötődést háromszoros párhuzamos vizsgálatban mértük, amelyekben 0.1 nm ^{125}I -GRP-t és jelzett koncentráció peptidet alkalmaztunk. Az abszcisszán (X tengely) logaritmikusan ábrázoltuk a GRP receptor agonista vagy antagonistá koncentrációt. Az ordi-

nátán (Y tengely) ábrázoltuk az egyes vizsgált peptidek kötődésének mértékét, mint a maximális ^{125}I -GRP kötődés százalékát. (Amennyiben peptid nincs jelent) A LIGAND analízis ezekre a kísérletekre és más kísérletekre azt mutatja, hogy a bombesin és a $(\text{Phe}^{13}\text{Leu}^{14})$ bombesin egyaránt K_d 0.1 nm értékkel, és a $(\text{Phe}^{13}(\text{CH}_2\text{S})\text{Leu}^{14})$ bombesin K_d 3 nm értékkel rendelkezik.

- o- bombesin
- D- $(\text{Phe}^{13}\text{Leu}^{14})$ bombesin
- A- $(\text{Phe}^{13}\Psi(\text{CH}_2\text{S})\text{Leu}^{14})$ bombesin

A 3. ábrán bemutatjuk, hogy a GRP stimulálja a foszfatidil-inozitol (PI) forgalmat dóziszfüggő módon, és a $(\text{Phe}^{13}\Psi(\text{CH}_2\text{S})\text{Leu}^{14})$ bombesin ezt nem stimulálja (2. példa). Az abszcisszán (X tengely) logaritmikusan jelöltük a jelenlevő peptid koncentrációját. Az ordinátán (Y tengely) a kontrollra vonatkoztatott százalékos PI forgalmat jelöltük. Az értékek, átlagértékek \pm standard hibát tartalmaznak háromszoros párhuzamos mérésre; amennyiben nincsen jelölve, a hibák \leq mértékűek az adatpontokhoz. Az, hogy a $(\text{Phe}^{13}\Psi(\text{CH}_2\text{S})\text{Leu}^{14})$ bombesin nem befolyásolja a PI forgalmat, még a GRP koncentrációjánál háromszor nagyobb koncentrációban sem, amely GRP koncentráció körülbelül maximális stimulálást idéz elő azt mutatja, hogy a peptid nem agonista aktivitású.

-o-GRP

-Δ-(Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴)bombesin

A 4. ábrán bemutatjuk a (Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴)bombesin képességét, hogy antagonistát hatást fejt ki egér hasnyálmirigyben GRP-indukált PI forgalommal szemben. (2. példa) Az abszcisszán (X tengely) logaritmikusan ábrázoljuk a peptid koncentrációját. Az ordinátán (Y tengely) jelöljük a kontrollra vonatkozó százalékos értéket a PI forgalmat. A 30 percig 1000 nm (Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴)bombesinnel végzett előinkubálás lecsökkenti az 1-1000 nm GRP által kiváltott PI forgalom stimulálását a csupán GRP-vel kiváltott értékekhez képest. Az értékek átlagértékek ± standard hiba és háromszoros mérésből számítottak; ahol nem jelezzük a hibák kisebb = értékűek az adatpontokhoz képest. A (Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴)bombesin képessége, hogy inhibálja a GRP hatást azt mutatja, hogy ez valódi antagonistát anyag.

-o- GRP önmagában

-Δ- GRP (Phe¹³ψ(CH₂S)Leu¹⁴)bombesin kezelés után

5. ábra: Reverz fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia eljárást alkalmaztunk a metilén-szulfid izomerek elválasztására, C18 stacionárius fázist alkalmaztunk (Vydac analitikai oszlop; 4,6 mm ID x 25 cm, 5 mikron C18).

A mozgó fázis áramlási sebessége 2 ml/perc. A mozgó fázis 25 perc alatt kifejlesztett lineáris gradiens eluens, amely 25%-75% acetonitril vizes elegye, amely víz 0.1% trifluór ecetsavat tartalmaz. A $\text{Phe}^{\Psi}(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{I}}\text{Leu}$ Litorin és a $\text{Phe}^{\Psi}(\text{CH}_2\text{S}(\text{O}))^{\text{II}}\text{Leu}$ Litorin retenciós ideje sorrendben 5.40 perc és 6.28 perc. A reakcióban alkalmazott indulási anyag a $(\text{Phe}_8(\text{CH}_2\text{S})\text{Leu}_9)\text{Litorin}$ ebben a rendszerben 10.92 perc retenciós idővel rendelkezik.

Az 1. Táblázatban összehasonlítjuk a korábbi kísérletek (1-4. ábrák) eredményeit a receptor affinitás (K_D) és a PI forgalom vonatkozásában számos bombesin analógra.



1. TÁBLÁZAT

Számos peptid analóg affinitása és hatásossága

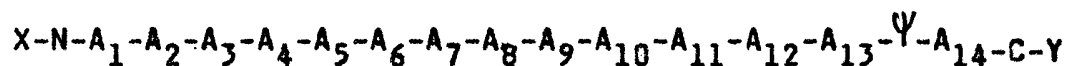
Szekvencia	Kd (nm)	PI Forgalom	
		Agonista	Antagonista
<u>pQ Q R L G N Q W A V G H F (CH₂S)L</u>	3	-	+
<u>pQ Q W A V G H F CH₂S)L</u>	3		+
AcI Q W A V G H F (CH ₂ S)L	10	-	+
N Q W A V G H F (CH ₂ S)L	50	ND	ND
N Q W A V G H F (CH ₂ S(O))L	100	ND	ND
pQ Q W A V G H F (CH ₂ S)Z	4	ND	ND
pQ Q W A V G H F (CH ₂ S(O)) ^I L	2	-	+
pQ Q W A V G H F (CH ₂ S(O)) ^{II} L	1	-	+

A K_d értékét az 1. példa szerint állapítjuk meg, a PI Forgalom értéket a 2. példa szerint állapítjuk meg, az "+" aktivitást jelöl, az "-" azt jelöli, hogy nincs aktivitás, az ND jelöli, hogy az aktivitást nem határoztuk meg. Az agonista aktivitás az a képesség, hogy a vegyület a PI forgalmat stimulálja. Az antagonistista aktivitás az a képesség, hogy a vegyület a GRP-stimulált PI Forgalmat blokkolja. Ac jelentése acetil-csoport, pQ jelentése piroglutamin-csoport, Q jelentése glutamin-csoport, A jelentése alanin, R jelentése arginin, N jelentése aszparaginsav, C jelentése cisztein, E jelentése glutaminsav, G jelentése glicin, H jelentése

hisztidin, I jelentése izoleucin, L jelentése leucin, K jelentése lizin, M jelentése metionin, F jelentése fenilalanin, P jelentése prolin, S jelentése szerin, T jelentése treonin, W jelentése triptofán, Y jelentése tirozin, V jelentése valin; felső eset L-aminósav, alsó eset D-aminósav; Z jelentése nórleucin; Ψ jelentése amid kötés; Ψ (CH₂S) jelentése, hogy a molekulában CH₂S aminósav közti kötés van jelen; (CH₂S(O)) jelentése, hogy a molekulában CH₂S(O) aminósav közötti kötés van jelen; az I és II indexek a CH₂S(O) izomereket jelölik

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az



általános képletű peptid származék vagy gyógyszerészetileg elfogadható sói előállítására, ahol az általánops képletben

X jelentése amino-terminális maradék, amely lehet hidrogénatom, egy vagy két 1-10 szénatom számú alkilcsoport, egy vagy két 2-10 szénatomszámú acil-csoport, karbobenziloxi- vagy t-butiloxi-karbonil-csoport; hacsak az amino-terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben X jelentése törölt;

N jelentése bombasin, GRT, vagy természetes variánsuk szekvenciája, vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid; hacsak az amino-terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben N jelentése törölt;

- A_1 jelentése Glp, vagy alkalmas savas hidrofil maradék;
- A_2 jelentése Gln, alkalmas semleges vagy hidrofób maradék, Nle, κ -amino-butánsav, pSubPhe, θ Nap vagy egy kötés;
- A_3 jelentése Arg, alkalmas bázisos hidrofil maradék, vagy egy kötés;
- A_4 jelentése Leu, vagy A_2 jelentésével megegyező;
- A_5 jelentése Gly, A_2 jelentésével megegyező, D-Phe, vagy D-Ala;
- A_6 jelentése Asn, A_2 jelentésével megegyező, D-Ala, pGlu, Lys, Lys(Z), SubPhe, vagy D-Phe;
- A_7 jelentése Gln, His, alkalmas semleges hidrofób vagy bázikus hidrofil maradék, Nap, D-His, MeHis, His(N-Me), His(\tilde{V} -Me), D-Glu(OMe), O-Glp, D-Leu, Me-Leu, D-Phe, vagy Glu;
- A_8 jelentése Trp, alkalmas semleges maradék, vagy Met, MeTrp, SubPhe, Lys, Cha, vagy Lys(Z(2Cl));
- A_9 jelentése Ala, A_2 jelentésével megegyező, MeAla, Aib, D-Phe, L-Nal, Arg, vagy Glu;
- A_{10} jelentése Val, A_2 jelentésével megegyező, MeVal, Thr(CH₂Ph), vagy DL-Flg;

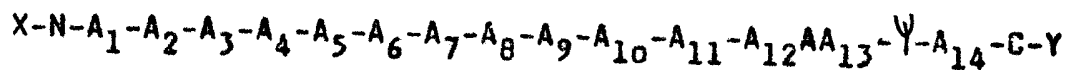
- A₁₁ jelentése** Gly, alkalmas semleges maradék, Phe, D-Phe, Sar, D-Ala, D-Ser, D-Ser(CH₂Ph), SubPhe, D-Pro, D-Lys, Asp, D-Arg, D-Lys(Z(2Cl)), Ac3c, Ac5c, vagy Ac6c;
- A₁₂ jelentése** His, alkalmas semleges vagy bázisos hidrofil maradék, Tyr, D-Phe, PSubPhe, His, MeHis, His(π-Me), His(γ-MeOH), D-pcF, Aib, Ahx, Ape, Gln, Lys, Lys(Z), Ser, Ser(CH₂Ph), Thr, Glu, Asp, Asp(OBu⁺) vagy N-Nal;
- A₁₃ jelentése** Leu, Phe, alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, MeLeu, MeIle, MeVal, vagy Glu;
- Ψ JELENTÉSE** A¹³aaΨA¹⁴aa megjelölésű dipeptid, ahol Ψ jelentése (CH₂S), (CH₂S(O)), (CH₂S(O))^I és (CH₂SO)^{II} és A₁₃aa, valamint A₁₄aa jelentése, a helyettesítő aminosavak;
- A₁₄ jelentése** Leu, Met, Nle alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, MeLeu, MeIle, MeVal, vagy Glu;
- C jelentése** Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosavmaradékból álló peptid, és

- A_{11} jelentése Gly, alkalmas semleges maradék, Phe, D-Phe, Sar, D-Ala, D-Ser, D-Ser(CH_2Ph), SubPhe, D-Pro, D-Lys, Asp, D-Arg, D-Lys(Z(2Cl)), Ac3c, Ac5c, vagy Ac6c;
- A_{12} jelentése His, alkalmas semleges vagy bázisos hidrofil maradék, Tyr, D-Phe, Ψ SubPhe, His, MeHis, His(N-Me), His(γ -MeOH), D-pcF, Aib, Ahx, Ape, Gln, Lys, Lys(Z), Ser, Ser(CH_2Ph), Thr, Glu, Asp, Asp(OBut) vagy N-Nal;
- A_{13} jelentése Leu, Phe, alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, MeLeu, MeIle, MeVal, vagy Glu;
- Ψ JELENTÉSE $A_{13}^{aa}\Psi A_{14}^{aa}$ megjelölésű dipeptid, ahol Ψ jelentése (CH_2S), ($CH_2S(O)$), ($CH_2S(O)$)^I és (CH_2SO)^{II} és A_{13}^{aa} , valamint A_{14}^{aa} jelentése, a helyettesítő aminosavak;
- A_{14} jelentése Leu, Met, Nle alkalmas hidrofób vagy semleges maradék, Ahx, MeAhx, Ape, MeApe, D-Leu, MeLeu, MeIle, MeVal, vagy Glu;
- C jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosavmaradékból álló peptid, és

Y jelentése karboxi-terminális maradék, amely lehet hidroxilcsoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-észter, karboxeoid, mono- vagy di- 1-4 szénatomszámú alkil-amid, 1-4 szénatomszámú alkil-amin, 1-4 szénatomszámú tioalkil-éter, azzal jellemezve, hogy az alábbi reakciólépéseket hajtjuk végre.

- a) egy alkalmasan C-terminálisan védett kötött dipeptidet tartalmazó gyantát alkalmazunk, ahol a dipeptid $A_{13}\Psi A_{14}$ általános képletű vegyület, ahol jelentése (CH_2S) csoport, és A_{13} és A_{14} jelentése a szubsztituens aminosav;
- b) az $A_{12}-X$ egyéb védett aminosavakat sorrendben kapcsoljuk, és így a kívánt védett aminosav szekvenciát állítjuk elő;
- c) a védőcsoportokat eltávolítjuk;
- d) a kívánt peptidet tisztítjuk, vagy kívánt esetben a $\Psi(CH_2S)$ peptid $\Psi(CH_2S(O))^I$ és $\Psi(CH_2SO)^{II}$ izomerjeit állítjuk elő, majd a kívánt izomerpeptideket tisztítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az



általános képletű peptid származék vagy gyógyszerészetileg elfogadható sói előállítására, ahol az általános képletben

X jelentése amino-terminális maradék, amely lehet hidrogénatom, egy vagy két 1-10 szénatomszámú alkilcsoport, egy vagy két 2-10 szénatomszámú acil-csoport, karbo-benziloxi- vagy t-butiloxi-karbonil-csoport; ha csak az amino-terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben X jelentése törölt;

N jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid; ha csak az aminó-terminális aminosav nem ciklusos származék, amely esetben N jelentése törölt;

A₁ jelentése P⁺Glu, vagy alkalmas hidrofil maradék;

A₂ jelentése Gln, alkalmas semleges vagy hidrofób maradék, Nle, α -amino-buténsav,

- pSubPhe, BNap, vagy egy kötés;
- A₃ jelentése Arg, egy alkalmas bázisos hidrofil mara-
dék, vagy egy kötés;
- A₄ jelentése Leu, vagy A₂ jelentésével megegyező;
- A₅ jelentése Gly, A₂ jelentésével megegyező, D-Phe,
vagy D-Ala;
- A₆ jelentése Asn, A₂ jelentésével megegyező, D-Ala,
NAc-D-Ala, pGlu, D-Phe;
- A₇ jelentése Gln, His, alkalmas semleges hidrofób
vagy bázikus hidrofil maradék, Nnp,
vagy D-Gln;
- A₈ jelentése Trp, alkalmas semleges maradék, vagy
Met;
- A₉ jelentése Ala, vagy A₂ jelentésével megegyező;
- A₁₀ jelentése Val, vagy A₂ jelentésével megegyező;
- A₁₁ jelentése Gly, alkalmas semleges maradék, Phe,
vagy D-Phe, D-Ala;
- A₁₂ jelentése His, alkalmas semleges vagy bázisos
hidrofil maradék, Tyr, D-Phe, vagy
pXPhe, (X=F, Cl, Br, OH, vagy CH₃);
- A₁₃ jelentése Leu, Phe, Nle, vagy alkalmas hidrofób
vagy semleges maradék;
- Ψ jelentése A¹³aaΨA¹⁴aa általános képletű meghatá-
rozó dipeptid, ahol Ψ jelentése (CS₂S),
(CH₂S(O)), (CH₂S(O))^I, és (CH₂SO)^{II} és

A_{13aa} valamint A_{14aa} jelentése a szubsztituens aminosavak;

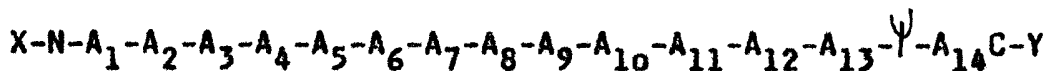
A₁₄ jelentése Leu, Met, vagy alkalmas hidrofób vagy semleges maradék;

C jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája, vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid;

és

Y jelentése karboxi-terminális maradék, amely lehet hidroxilcsoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-észter, karboxamid, mono- vagy di-1-4 szénatomszámú alkil-amid, 1-4 szénatomszámú alkil-amin, 1-4 szénatomszámú tioalkil-éter, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás az



általános képletű peptid származék, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója előállítására, ahol az általános képletben

- X jelentése amino-terminális maradék, amely lehet hidrogénatom, egy vagy két 1-10 szénatomszámú alkilcsoport, egy vagy két 2-10 szénatomszámú acil-csoport, karbo-benziloxi- vagy t-butiloxi-karbomil-csoport; hacsak az amino-terminális aminósav nem ciklusos származék, amely esetben X jelentése törölt;
- N jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája, vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminósav maradékot tartalmazó peptid; hacsak az aminó-terminális aminósav nem ciklusos származék, amely esetben N jelentése törölt;
- A₁ jelentése pGlu, vagy egy kötés;
- A₂ jelentése Gln, vagy egy kötés;
- A₃ jelentése Arg, vagy egy kötés;
- A₄ jelentése Leu, vagy egy kötés;
- A₅ jelentése Gly, vagy egy kötés;
- A₆ jelentése Asn, vagy D-Phe;
- A₇ jelentése Gln, vagy His;
- A₈ jelentése Trp;
- A₉ jelentése Ala;

A_{10} jelentése Val;

A_{11} jelentése Gly, vagy D-Ala;

A_{12} jelentése His;

A_{13} jelentése Phe;

Ψ jelentése $A_{13}aa\Psi A_{14}aa$ képletű meghatározó dipeptid, ahol Ψ jelentése (CH_2S) , $\Psi(CH_2S(O))^I$, és $\Psi(CH_2SO)^{II}$ és $A_{13}aa$, valamint $A_{14}aa$ jelentése a szubsztituens aminosavak;

A_{14} jelentése Leu, vagy Nle;

C jelentése Bombesin, GRP, vagy természetes variánsuk szekvenciája, vagy szekvencia részlete, egy kötés, vagy egy 1-11 bármely aminosav maradékot tartalmazó peptid;

Y jelentése karboxi-terminális maradék, amely lehet hidroxilcsoport, 1-8 szénatomszámú alkoxi-észter, aminócsoport, mono- vagy di-1-4 szénatomszámú alkil-amid, 1-4 szénatomszámú alkil-amin, 1-4 szénatomszámú tioalkil-éter, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe $\Psi(CH_2S)$ Leu-NH₂ képletű peptid előállítására,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, az Ac-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Phe Ψ (CH₂S)Leu-NH₂ képletű peptid előállítására,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, az Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe Ψ (CH₂S)Leu-NH₂ képletű peptid előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, az Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe Ψ (CH₂S(O))Leu-NH₂ képletű peptid előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe Ψ (CH₂S(O))Leu-NH₂ képletű peptid előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe^ψ(CH₂S)Nle-NH₂ képletű peptid előállítására,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe^ψ(CH₂S(O))^ILeu-NH₂ képletű peptid előállítására,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe^ψ(CH₂S(O))^{II}Leu-NH₂ képletű peptid előállítására,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

12. Eljárás gyógyszerészetileg elfogadható formált alak előállítására,

azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti vegyületet, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóját gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokkal formált alakká feldolgozzuk.

13. Eljárás kezelést igénylő beteg rákellenes kezelésére, beleértve a kis sejtű tüdő és prosztata karcinóma kezelést, azzal jellemezve, hogy a betegnek az 1-3. igénypontok szerinti peptid származék hatásos mennyiségét adagoljuk.

14. Eljárás betegben rákos szövet növekedésének szabályozására, azzal jellemezve, hogy a betegnek az 1-3. igénypont szerinti peptid származék hatásos mennyiségét adagoljuk.

15. Eljárás emésztőrendszerbeni fekélyek kezelésére, ilyen kezelést igénylő betegben, azzal jellemezve, hogy a betegnek az 1-3. igénypontok szerinti peptid származék hatásos mennyiségét adagoljuk.

16. Eljárás bombesin/GRP antagonizmus kialakítására ilyen kezelést igénylő betegben, azzal jellemezve, hogy a betegnek az 1-3. igénypont szerinti peptid származék hatásos mennyiségét adagoljuk.

Handwritten signature and initials.

S.B.G. & K.
 BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
 ÉS SZABADALMI IRODA
 1081 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
 TELEFON: 136-3763

Handwritten signature over the stamp.

7234/90

44919

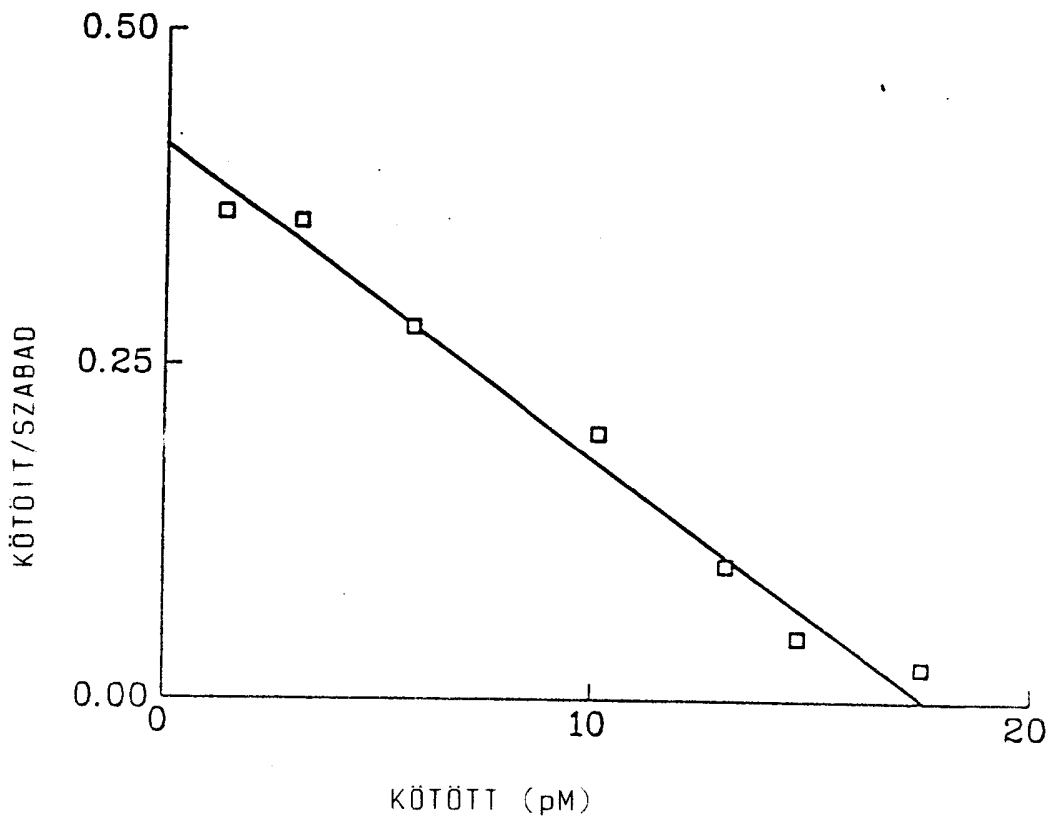
53.072/SM

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

5/1

1. ábra

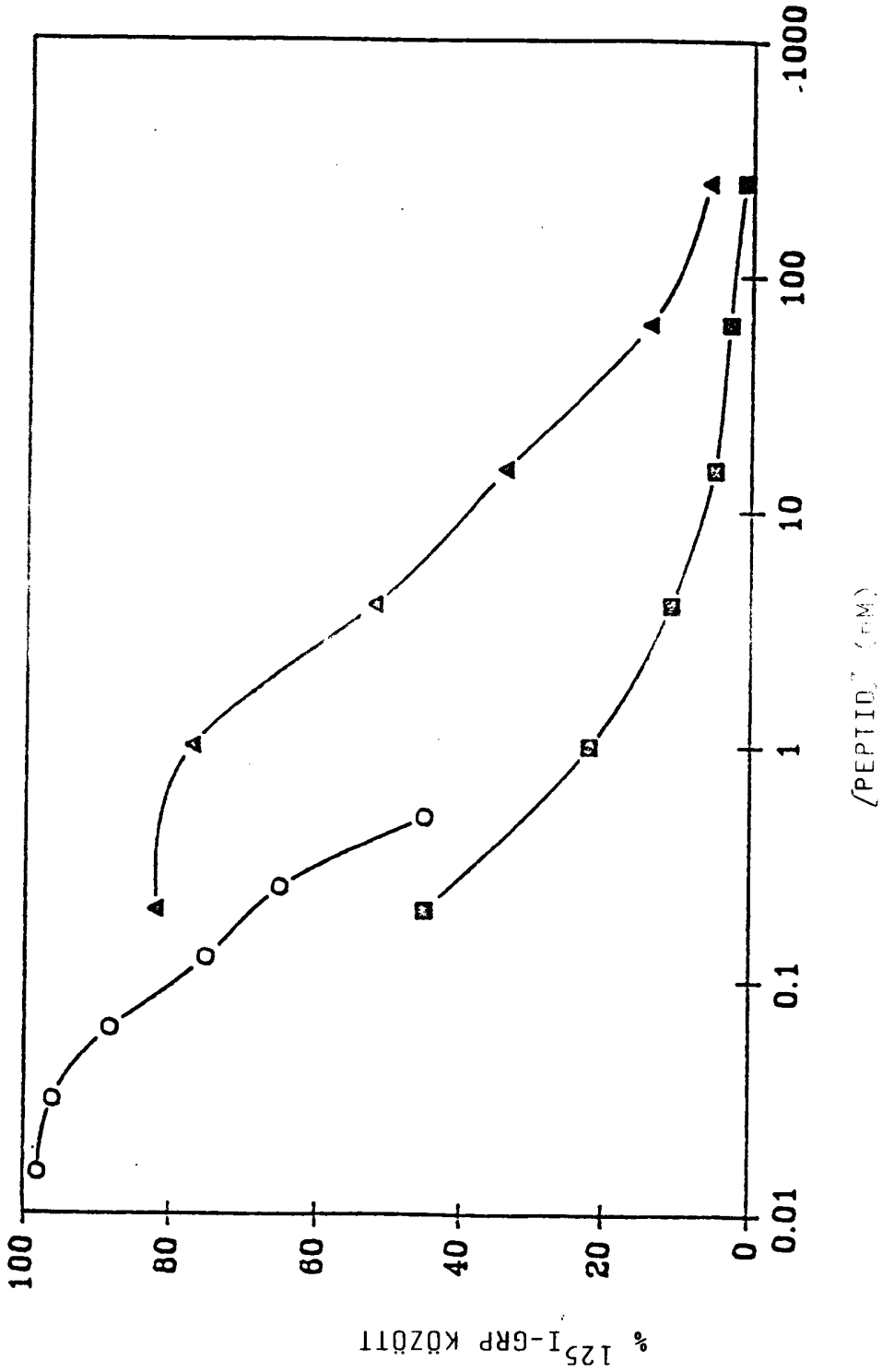
-55798-



SBG & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ES SZABADALMI IRODA
1081 BUDAPEST, DAKSZENTKÉZ U. 10.
TELEFON: 150-3733

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

2. ÁBRA



7234/90

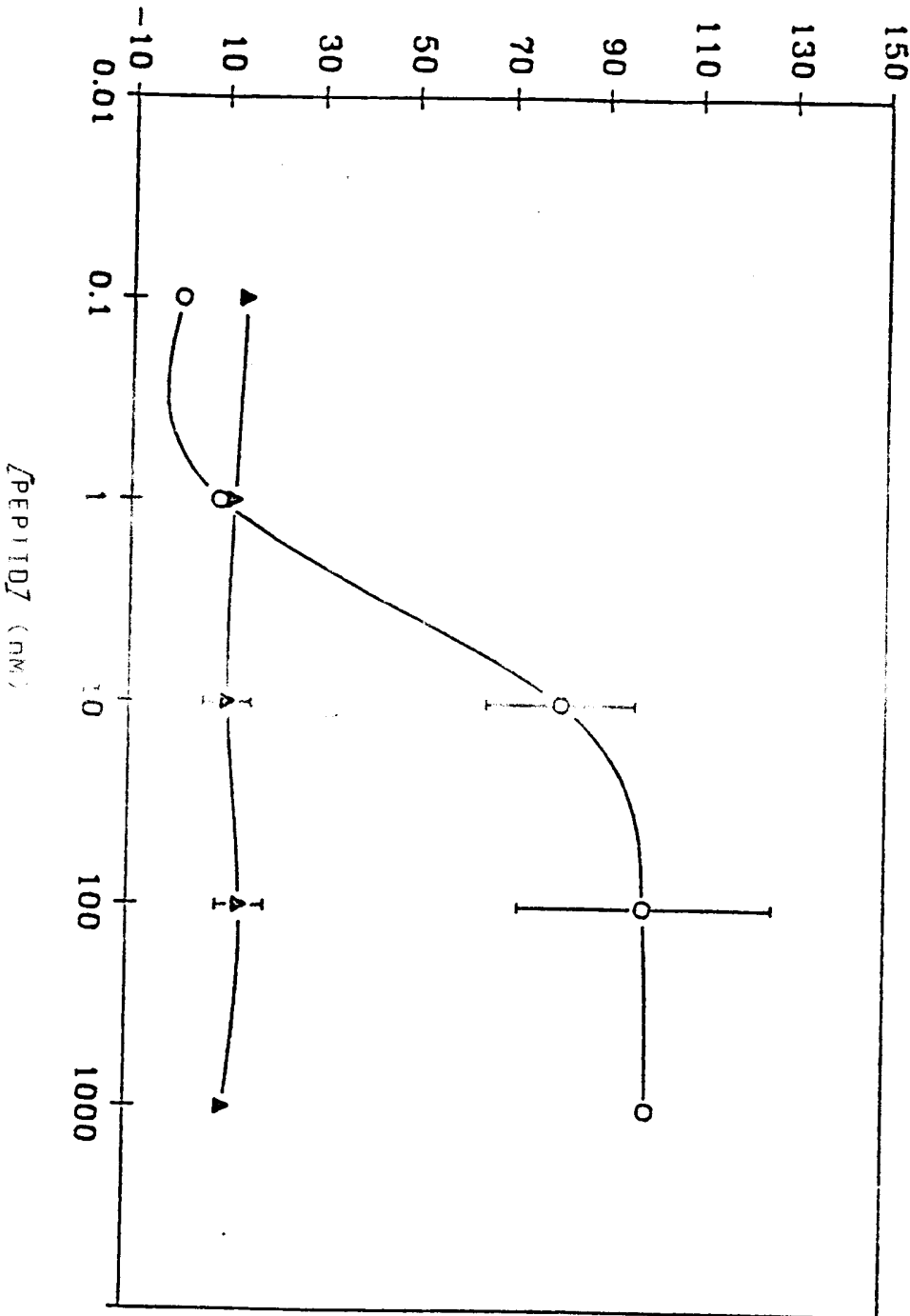
44919

53 072/SM

KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

473

P₁ FORGALOM
(% MAXIMUM STIMULÁLÁS)



5 ÁBRA

SBG. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1066 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

7234/90

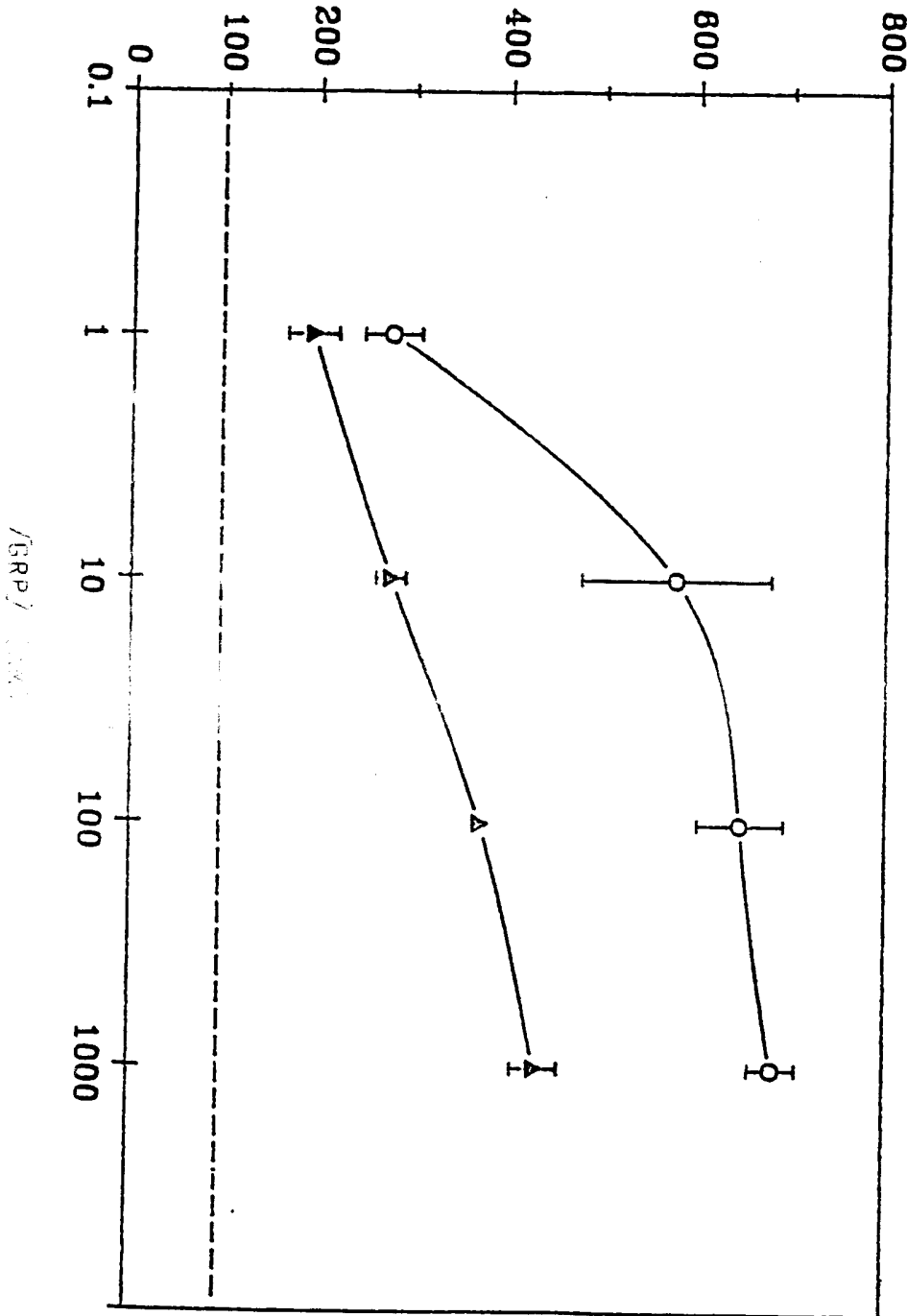


~~53.872/SM~~

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

514

PI FORGALOM
(% KONTROL)



4. ABRA

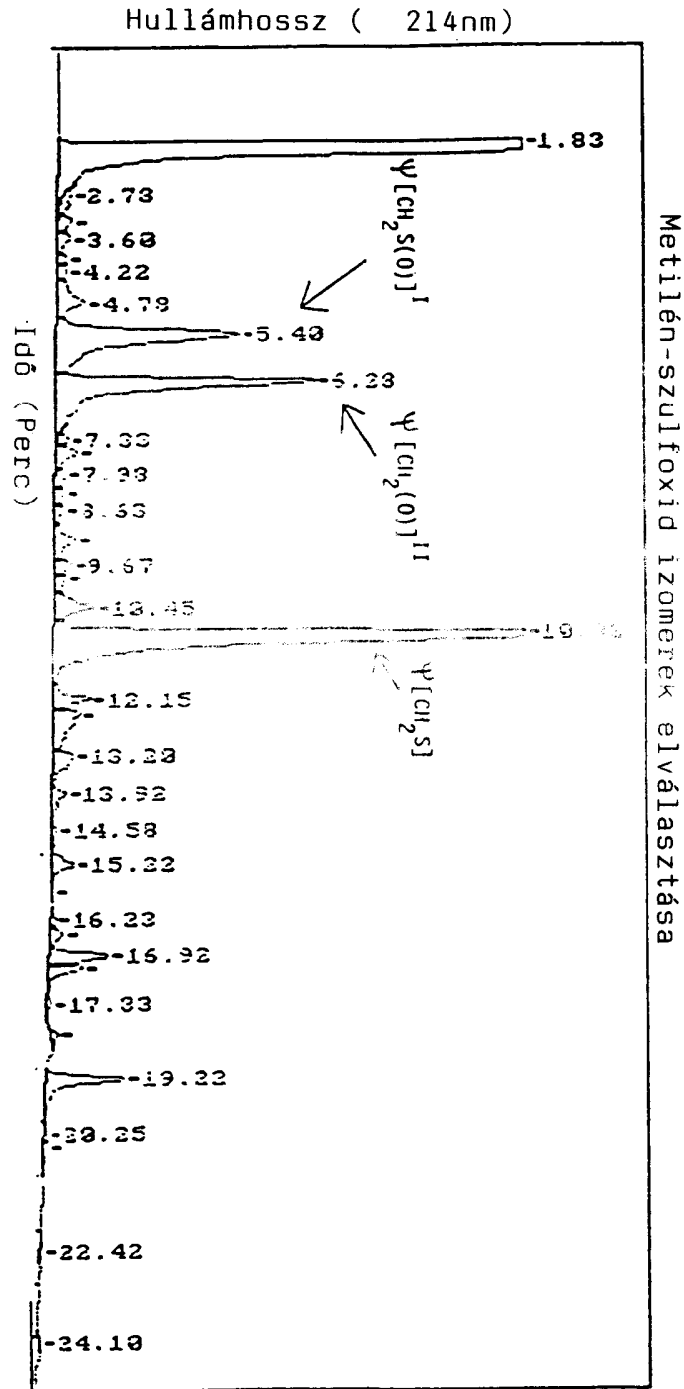
7234/90



05.07.2000

5/5

KÖZZÉTÉTELI FÉLDÁNY



S. ÁBRA

SBG & K
NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
IRODA
BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ D. 10.
TELEFON: 150-3733