

(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)
196227

Nemzetközi
osztályjelzet:

(51) NSZO,
C 07 K 7/16
A 61 K 37/34

(22) A bejelentés napja: 84. 02. 15.

(21) (597/84)

(33) US

(32) 83. 02. 16.

(31) (464 117)

(41) (42) Közzététel napja: 85. 01. 28.

(45) A leírás megjelent: 89. 12. 12.



Feltaláló(k): (72)

HUFFMAN William Francis, Malvern, MOORE Michael Lee, Media, Pennsylvania, US

Szabadalmaz: (73)

Smithkline Beckman Corporation, Philadelphia, Pennsylvania, US

(54) ELJÁRÁS ÚJ CIKLIKUS, VAZOPRESSZIN ANTAGONISTA PEPTIDEK ÉS AZ EZEKET TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás új, (I) általános képletű vegyületek, mely képletben

P jelentése Phe vagy Phe(4'-Alk), csoport,

X jelentése D-Leu, D-Ile, D-Tyr, vagy D-Tyr (Et) csoport,

Y jelentése NH₂, NHAlk, vagy amennyiben Z jelentése egyszeres kötés, OH⁻, csoport,

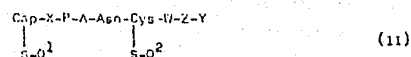
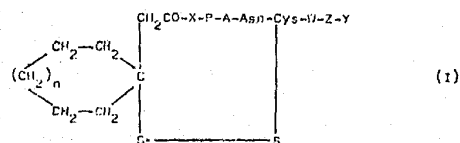
W jelentése D-Pro, L-Pro, vagy amennyiben Y és Z az általános képletből hiányzik, OH csoport,

A jelentése Val, Abu, Ala, Gly, Lys, vagy Chg csoport,

Z jelentése D-Arg, L-Arg, vagy egyszeres kötés, ha Y jelentése OH csoport,

n jelentése 0 vagy 1,

Alk jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport, előállítására.



A találmány tárgya eljárás új, ciklikus, vazopresszin antagonistá oktapeptidek és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány szerinti vegyületek 9-desGly-vazopresszin (VSP) antagonistá vagy 9-desGly-1-Pmp-vazopresszin hatásúak.

A találmány szerinti oktapeptidekben egy β -merkapto- β , β -cikloalkilén-propionsav és öt aminosav-egység található, melyek egy hattagú gyűrűt képeznek a cisztein egység és a propionsav egység kénatomja segítségével. A gyűrűnek jellegzetes, glicin egységet nem tartalmazó dipeptid végződése van, mely a 6-cisztein egységhez amino-kötéssel kapcsolódik.

M. Manning, W. H. Sawyer és munkatársai számos publikációt tettek közzé különböző [1-(β -merkapto- β , β -ciklopentametilén-propionsav)-4-valin]-arginin-vazopresszinokról, melyek antivazopresszin hatással rendelkeznek. (61356. számú Európa, 4367225. és 4339125. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A Manning-féle vegyületek mindegyikében a hatos számú egységhez egy tripeptid-lánc kapcsolódik, és ezek a vegyületek természetesen nonapeptidek. A találmány szerinti vegyületeket a fenti vegyületektől az különbözteti meg, hogy oktapeptidek, a 6-os egységhez egy des-Gly peptidvégződés kapcsolódik és jelentős vazopresszin antagonistá hatással rendelkeznek.

A találmány szerinti vegyületek jelentős biológiai aktivitása meglepő, ha azt tekintjük, hogy a des-glicinamid⁹-vazopresszin és a des-lizin⁸-des-glicinamid⁹-vazopresszin [T. Barth és munkatársai, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 39, 506 (1974)] és a des-glicin⁹-oxitocin [B. Berde és munkatársai, Handb. Exp. Pharm. 23 860 (1968)] olyan származékok, melyek a megfelelő kiindulási vegyület aktivitásának csak tört részével rendelkeznek. Barth arról számol be, hogy a dez-glicinamid⁹-AVP CNS aktivitással rendelkezik, de gyakorlatilag nincs semmiféle antidiuretikus vagy uterotóniás hatása (896509. számú belga szabadalmi leírás).

A leírásban és az igénypontokban az alábbi jelöléseket használjuk a vegyületek rövidítésére:

Cap	β -merkapto- β , β -(4—5 szénatomos cikloalkilén)-propionsav,
Pmp	β -merkapto- β , β -ciklopentametilén-propionsav,
Tmp	β -merkapto- β , β -ciklotetrametilén-propionsav,
Chg	ciklohexil-glicin,
Abu	α -amino-n-vajsav,
Cha	ciklohexil-alanin,
Pba	amino-fenil-vajsav,
Gln	glutamin,
Gly	glicin,
Tyr	tirozin,
Phe	fenil-alanin,
Phe(4'-alk)	(4'-1-4 szénatomos alkil)-fenilalanin,
Val	valin,
Nva	norvalin,
Ile	izoleucin,
Nle	norleucin,
D-alle	D-allo-izoleucin,
Leu	leucin,

Ala	alanin,
Lys	lizin,
Arg	arginin,
Asn	asparagin,
Met	metionin,
Tos	tozilát,
HF	hidrogén-fluorid,
BHA	benzhidril-amin,
DIEA	diizopropil-etil-amin,
4-MeBzl	4-metil-benzil-csoport,
TFA	trifluor-ecetsav,
DCC	diciklohexil-karbodiimid,
HBT	1-hidroxil-benzotriazol,
AHD	antidiuretikus hormon,
ACM	acetamido-metil-csoport,
DMAP	dimetil-amino-piridin.

Ha a leírásban a „vazopresszin” kifejezést használjuk, amennyiben ezt másképp nem jelezzük, L-arginin vazopresszint (AVP) értünk alatta. A találmány szerinti vegyületek AVP származékai előnyösek. „Alk” jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport, amely adott esetben az Y nitrogénatomjához, vagy a tirozin egység — amennyiben a 2-es helyzetben ilyen van — oxigén-szubsztituenséhez, vagy a gyűrű 3-as helyzetében lévő fenilalanin benzol-gyűrűjének 4-es helyzetébe kapcsolódik. Ilyen alkil-szubsztituensek például a metil-, etil-, n-propil-, izopropil- vagy butil-csoport.

A leírásban és az igénypontokban a peptid és vazopresszin kémiában általánosan alkalmazott nomenklaturát használjuk. Ha a konfigurációt nem jelöljük, az aminosav L vagy a természetben előforduló konfigurációját értjük.

A találmány szerinti (I) általános képletű vegyületek képletében

P	jelentése Phe vagy Phe(4'-Alk) csoport,
X	jelentése D-Leu, D-Ile, D-Tyr vagy D-Tyr (alk) csoport,
Y	jelentése NH ₂ , NHalk vagy amennyiben Z egyszeres kötést jelent, -OH-csoport,
W	jelentése D-Pro, L-Pro, amennyiben Y és Z az általános képletből hiányzik, -OH-csoport,
A	jelentése Val, Abu, Ala, Gly, Lys, vagy Chg csoport,
Z	jelentése D-Arg, L-Arg vagy egyszeres kötés, ha Y jelentése -OH-csoport,
n	jelentése 0,1,
Alk	jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport.

A találmány szerinti (I) általános képletű vegyületek alcsoportját azok a vegyületek képezik, melyek képletében

X	jelentése D-Tyr, D-Ile, D-Leu vagy D-Tyr (Et) csoport,
P	jelentése Phe vagy Phe(4'-Et) csoport,
A	jelentése a fentiekben megadottal megegyezik,
Y	jelentése NH ₂ csoport,
W	jelentése Pro csoport,
Z	jelentés Arg csoport és
n	jelentése 1.

Azok az (I) általános képletű vegyületek, melyek képletében X jelentése D-Tyr(Et) és az amid⁸ származékok, különösen aktív ADH antagonistá hatásúak.

Értékes vegyület az [1-(β -merkapto- β , β -ciklopentametilén-propionsav)-2-D-tirozin-4-valin-8-

arginin-9-dezglycin]-vazopresszin, az [1-(β -merkaptó- β , β -ciklopentametilen-propionsav)-2-D-tirozin-4-valin-8-arginin-9-dez-glicin-amid]-vazopresszin, és különösen az [1-(β -merkaptó- β , β -ciklopentametilen-propionsav)-2-(0-etil-D-tirozin)-4-valin-8-arginin-9-dez-glicin]-vazopresszin.

A találmány szerinti (I) általános képletű vegyületeket egy lineáris oktapeptidnek a 6-os helyzetben lévő cisztein (Cys) egységében és az 1-es helyzetben lévő 3-merkaptó-3,3-cikloalkilén-propionsav (Cap) egységben levő két merkaptó-csoport segítségével való ciklizációval állítjuk elő. A ciklizációs reakció azonnal lejátszódik egy enyhe, a merkaptánnak diszulfidá váló oxidálására képes oxidáló ágens jelenlétében.

A találmány szerinti reakció során a (II) általános képletű vegyületből képződik a (III) általános képletű vegyület, mely képletben

X, P, A és Y jelentése az (I) általános képletben megadott,

Z jelentése vagy az (I) általános képletben megadott vagy egyszeres kémiai kötést jelent, ha Y jelentése OH csoport,

W jelentése az (I) általános képletben megadott vagy OH, ha a fenti képletből Z és Y hiányzik,

Q₁ és Q₂ jelentése külön-külön hidrogénatom vagy védőcsoport.

A találmány szerinti (II) általános képletű intermedierek újak. A (III) általános képletű vegyületek, melyek képletében W és Z közül az egyik vagy mindkettő hiányzik, szintén új intermedierek. Az utóbbiak az oktapeptidekénél kisebb VSP antagonistá aktivitással rendelkeznek.

A ciklizációt oxidációval hajtjuk végre. Bár mely, az irodalomban ismert, egy dimerkaptánt diszulfidá oxidálni képes oxidálószer alkalmas a reakció végrehajtására. Példaként az ilyen oxidálószerekre az alkálifém-ferricianidokat, különösen a kálium- vagy nátrium-ferricianidot, oxigéngázt, dijódmetánt vagy jódot említhetjük.

A reakciót úgy hajthatjuk végre, hogy például kálium-ferricianidot adunk a (II) általános képletű, megfelelő inert oldószerben, például vízben vagy vízes metanolban oldott dimerkaptánhoz 0–40 °C hőmérsékleten. Az oxidációt pH = 7–7,5-en, szobahőmérsékleten híg oldatban végezve jó kitermelést, a ciklikus vegyület elméleti kitermelésére számított 40–50 %-os kitermelést kapunk.

A (III) általános képletű Cys(OH)⁶ vagy Pro(OH)⁷ vegyületet egy dipeptiddel, egy védett (NH₂)-WZY-nal vagy egy (NH₂)-Z-Y-nal reagáltatjuk.

A lineáris merkaptán kiindulási anyagok tartalmazhatnak vagy nem tartalmazhatnak a szakirodalomból ismert védőcsoportokat (Q₁ és Q₂) a különböző aminosav egységeken. Ilyen védőcsoportok például a benzil-p-metoxi-benzil-, l-adamantil-, t-butil-, p-nitrobenzil-, tritil-, benzil-tiometil-, etil-karbamoil-, vagy acetamido-metil-csoport. A benzil-, adamantil- vagy t-butil-csoport higany-(halo)-acetát sók segítségével távolíthatók el vízes metanolban 0–80 °C-on. A védőcsoportot általában a ciklizáció előtt, mint például a peptidnek a gyantáról hidrogén-fluoriddal való lehasítása során távolítjuk el. Azonban a védőcsoport a ciklizáció alatt, vagy in situ, a ciklizáció előtt is eltávolítható.

Az S-acetamido-metil-csoportok különösen előnyösek. Például az S-ACM-Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-S-ACM-Cys-Pro-OBzl-t kálium-karbonáttal kezeltük vízes metanolban, így a Pro sav lineáris peptidet 78–84%-os kitermeléssel kaptuk. Ezt ezután oxidatív ciklizációnak vetettük alá oxidálószerként vízes metanolos jódot használva, így a kívánt Pro(OG)⁷ terméket 65–70%-os kitermeléssel kaptuk. Alternatív módon a védett terméket ugyanilyen körülmények között úgy ciklizáltuk, hogy kezdetben jóddal reagáltattuk, majd a védő észter-csoportot kálium-karbonáttal távolítottuk el. A Pro⁷ savat ezután Arg(NH₂)-vel kondenzáltuk DMF-ben oldott DCC-t és DMAP-t használva 0–20 °C-on, így a Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg(NH₂)-t 45%-os kitermeléssel kaptuk.

A jód lehasítja az S-védőcsoportot, különösen az ACM csoportot és ciklizálja az intermediert. Higany-acetát vagy ólom-acetát szintén eltávolítja az ACM csoportot, és fém-merkaptidot kapunk. Ezt tiollá alakítjuk in situ hidrogén-szulfidot használva, majd egy külön lépésben oxidáljuk.

A kívánt ciklikus (I) általános képletű oktapeptidet kényelmesen elválasztjuk a vízes oxidációs elegy megsavanyításával, például jégecetet használva és a reakcióelegyet egy ioncsereelő kromatográfiás oszlopon például gyengén savas akrilgyanta oszlopon átvezetve és az anyagot savval eluálva, de géliszűrést is alkalmazhatunk, amikor is az oldatot gyöngyformájúra kialakított, dextrán és epiklórhidrin térhálósításával kapott gélen vezetjük keresztül.

A (II) általános képletű lineáris intermedierek ciklizációja alternatív módon úgy is végrehajtható, hogy a ciklizált 6-Cys savakat vagy 7-Pro savakat [melyek (I) általános képletében a láncvégi W és Z egység együttesen, vagy csak az egyik, a Z láncvégi egység hiányzik] megfelelően kondenzáljuk vagy egy W-Z-Y védett dipeptiddel, vagy egy Z-Y aminosavval. A Cys vagy a Pro sav megfelelően védett dipeptiddel vagy aminosavval való reakcióját a peptidkémiai ismeretes amidképzési módszerrel hajtjuk végre. Általában a kiindulási vegyületek lényegében ekvimoláris mennyiségét reagáltatjuk egy karbodiimid, például diciklohexil-karbodiimid és 1-hidroxi-benzotriazol vagy dime-til-amino-piridin jelenlétében szerves oldószerben 0–35 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 0 °C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten. A védőcsoportokat olyan rektáns segítségével távolítjuk el, mely nem hasítja a hexapeptid gyűrű diszulfid kötéseit, például egy gyenge bázissal.

A (II) általános képletű fontos intermediereket könnyen előállíthatjuk a peptid-szintézis szilárd fázisú módszereivel [M. Manning és társai, J. Med. Chem. 25, 46, (1982)]. Kereskedelmi benzhidril-amin-gyantát (BHR) használtunk az (I) általános képletű végtermékek, melyek képletében Y jelentése NH₂ (dez-glicinek) előállítására, míg azokat az (I) általános képletű vegyületeket, melyek képletében Y jelentése OH csoport (dez-glicinamidok) klórmetyl-gyanta (CMR) segítségével állítottuk elő. A (II) általános képletű lineáris peptidek láncát lépésenként építettük fel a 8-as egység felől az 1-es egység irányában haladva. Minden egységet a peptidkémiai ismert, az alábbiakban ismertetett módon építettünk fel. Egy másik megoldás szerint

különböző oligopeptidek folyadékfázisú vagy hordozót alkalmazó reakciókkal is felépíthetők, és a reakciósorozat utolsó lépéseként kondenzálják őket, hogy a dimerkapto-intermediereket kapják.

A gyanta hordozós reakciólépések előnyös sorrendben kényelmesen végrehajthatók egy Beckman 990-B peptid szintetizátorban anélkül, hogy minden intermediert peptidet el kellene választanunk. Az eljárás részleteit a kiviteli példákban ismertetjük. Az oldatban történő vagy enzimatis reakciókat az irodalomból ismert körülmények között hajthatjuk végre.

A különböző aminosavak, melyeket egymás után kapcsolunk a gyantához kötött lánchoz, a peptidkémiai ismert módon védettek. Például a Boc védőcsoportot különösen az α -helyzetben lévő amino-csoport védelmére; a megfelelően szubsztituált benzil-csoportot a Pmp és a Cys egységekben lévő merkaptó-csoportok védelmére; a tozil-csoportot az Arg egység védelmére, míg egy megfelelően szubsztituált karbобенzoxi-csoportot (Z) a Tyr vagy Lys egység védelmére alkalmazhatjuk. Védőcsoportként előnyösen olyan csoportokat alkalmazhatunk, melyek könnyen eltávolíthatók; például a terc-butoxi-karbonil-csoportot savas kezeléssel, a benzil- vagy a karbобенzoxi-csoport nátrium/folyékony ammóniával való kezeléssel, vagy katalitikus hidrogénezéssel hasítható le, amikor is a védőcsoport eltávolításának körülményei nem eredményezik a peptid más részeinek, például a diszulfid-kötés sérülését is.

Példaként más védőcsoportokra említhetjük, hogy egy aminosav vagy oligopeptid amino-csoportját általában egy acil-csoporttal, például formil-, trifluoro-acetil-, ftaloil-, p-toluol-szulfonil- vagy o-nitro-fenil-szulfonil-csoporttal, egy benziloxi-karbonil-csoporttal, például benziloxi-karbonil-, o-bróm-benziloxi-karbonil-, p-bróm-benziloxi-karbonil-, o- vagy p-klór-benziloxi-karbonil-, p-nitro-benziloxi-karbonil- vagy p-metoxi-benziloxi-karbonil-csoporttal; egy alifás oxikarbonil-csoporttal, például triklór-etoxi-karbonil-, t-amiloxi-karbonil-, t-butoxi-karbonil- vagy diizopropil-metoxi-karbonil-csoporttal; vagy egy aralkil-oxi-karbonil-csoporttal, például 2-fenil-izopropoxi-karbonil-, 2-tolil-izopropoxi-karbonil- vagy 2-p-difenil-izopropoxi-karbonil-csoporttal védhetjük. Az amino-csoportokat úgy is blokkolhatjuk, hogy egy 1,3-diketonnal, például benzoil-acetonnal vagy acetil-acetonnal reagáltatjuk őket, és így az enamin formát kapjuk.

A karboxil-csoportok aminképzéssel, hidrazidképzéssel vagy észterezéssel védhetők. Az amid-csoportot szükség esetén egy 3,4-dimetoxi-benzil- vagy bisz-(p-metoxi-fenil)-metil-csoporttal védhetjük. A hidrazid-csoportot egy benziloxi-karbonil-, triklór-etoxi-karbonil-, trifluoro-acetil-, t-butoxi-karbonil-, tritil- vagy 2-p-difenil-izopropoxi-karbonil-csoporttal szubsztituált. Az észter csoport egy alkanollal, például metanollal, etanollal, t-butanollal vagy ciano-metil-alkohollal vagy egy aralkanolal, például benzil-alkohollal, p-bróm-benzil-alkohollal, p-klórbenzil-alkohollal, p-metoxi-benzilalkohollal, p-nitro-benzilalkohollal, 2,6-diklór-benzilalkohollal, benzhidril-alkohollal, benzoil-metil-alkohollal, p-bróm-benzoil-metil-alkohollal vagy p-klór-benzoil-metil-alkohollal vagy egy fenollal, például 2,4,6-triklór-fenollal, 2,4,5-triklór-

-fenollal, pentaklór-fenollal, p-nitro-fenollal vagy 2,4-dinitro-fenollal; vagy egy tiofenollal, mint például a tiofenol vagy p-nitro-tiofenol szubsztituált. A tirozin hidroxil-csoportját adott esetben észterezéssel vagy éterezéssel védjük. Észterezés esetén a védett csoport például egy O-acetil-, O-benzoil-, O-benziloxi-karbonil- vagy O-etoxi-karbonil-csoport. Éterezés esetén a védett csoport például egy O-benzil-, O-tetrahydro-piranyl- vagy O-t-butil-csoport lehet.

A guanidino-csoport amino-csoportját az argininben sóképzéssel, nitro-, tozil-, benziloxi-karbonil- vagy mezitilén-2-szulfonil-csoporttal védhetjük. Azonban nem szükséges mindig védeni a guanidino-csoportot.

A védett lineáris peptid intermediert a hordozó gyanta mátrixról például alkoholos oldószerben oldott ammóniával hasíthatjuk le, majd a védőcsoportok eltávolítására például nátriumot használhatunk folyékony ammóniában. Ez az eljárás a lineáris oktapeptid amid-származékát eredményezi.

Előnyösebben a két lépést összevonhatjuk úgy, hogy a gyanta hordozón lévő peptidet vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeljük egy megfelelő, az irodalomból ismert kation megkötő anyag, például anizol jelenlétében, így a (II) általános képletű oktapeptid intermediert kapjuk dimerkaptán formában, jó kitermeléssel.

A találmány szerinti vegyületek nagy vazopresszin-antagonista hatással rendelkeznek. A vazopresszinről ismeretes, hogy elősegíti a vese antidiuretikus mechanizmusú működését. Amikor ezeknek a vegyületeknek a hatása a természetes antidiuretikus hormon (ADH) hatását antagonizálja, a test vizet választ ki a veséhez tartozó (renális) csatorna terminális részeinek megnövekedett áteresztőképessége következtében. Véleményünk szerint ez a folyamat bizonyos renális epiteliális sejtek plazma membránján elhelyezkedő vazopresszin receptorok (V_2 -receptorok) működésének következménye. A találmány szerinti ADH antagonistá vegyületek legemléstreméltőbb farmakodinamikai hatása, hogy inkább víz-diuretikusak, mint nátriuretikusak, mint például a tiazid.

A találmány szerinti vegyületek olyan betegeknek adhatók, akik nem megfelelő antidiuretikus hormonkiválasztásban (SIADH) vagy nemkívánatos ödémás megbetegedésekben szenvednek. A találmány szerinti vegyületek a következő klinikai szimptómák esetén alkalmazhatók: magas vérnyomás, májcirózis, vértolulós szívbetegség vagy bármely traumatikus állapot olyan komponensének kezelésére, mely olyan komoly károsodás vagy betegség eredménye, amelyben a VSP-közvetített receptor helyeken a természetes vazopresszin agonizmusa befolyásoló faktor.

A vazopresszin-receptor helyek második csoportja a vaszkuláris presszor helyek (V_1 receptorok), melyek magában a kardiovaszkuláris rendszerben helyezkednek el. Például az I. táblázat 5. vegyületét Dykes módszerével vizsgálták (4.357.255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) patkányok vazopresszin indukálta vazokonstrikciója meggátlására in vitro (pA_2 : 8,40) és in vivo (pA_2 : 7,71) állapotban. A V_2 receptor helyeken fellépő antagonizmus vazodilációt eredményez, aminek a végkövetkezménye magas vérnyomás ellenes hatás.

A puffer: 0,1% TFA
 B puffer: 0,25% TFA/CH₃CN (4:6) 60%
 B; izokratikus; 235 nm (2,0 AUFS)
 injektlás: 10 mg/0,5 ml A puffer 17 mg
 tiszta cím szerinti termék

4. Ioncserélős kromatográfia

Minta: 365 mg az 1/a-ból és 2/a-ból; CMC; 0,01
 M NH₄OAc 0,1 M NH₄OAc-hez

lineáris gradiens

a) 51—70. frakció	93,5 mg
b) 71—89. frakció	86,5 mg
c) 91—110. frakció	65 mg
d) 111—121. frakció	24,5 mg

2. példa

A Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-OH előállítás

Az 1. példában nyert Pmp(Bzl)-D-Tyr(Br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-gyanta 4,2 g-ját (1,5 millimól) 4,5 ml desztillált anizolban oldjuk, majd 40 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal reagáltatjuk 0°C-on egy órán keresztül. A fenti kezelés után a terméket vákuumban szárazra pároljuk, a maradékot vízmentes éterrel kezeljük és leszűrjük, így 1,33 g nyers peptidet kapunk. A Bzl csoport Pmp részről való eltávolítását nátrium/folyékony ammónia segítségével fejezzük be az 1. példában leírt módon. A kapott, védőcsoportot nem tartalmazó oktapeptidet 0,01 mól/l kálium-(hexaciano-ferrát) oldatot használva ciklizáljuk pH = 7—7,5-en, míg a szín 30 percen keresztül megmaradt, mint azt az amid előállításánál leírtuk.

600 mg dez-glicin-amid oktapeptidet kaptunk az oxidációs elegy ecetsavval való pH = 4,5-re való savanyítása és a reakcióelegy Bio-Rex-70 (H⁺ forma) oszlopon való kromatografálása után 1 l 5%-os ecetsavat használva eluensként.

A Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-OH tisztítása

1. Ellenáramú elválasztás

Minta: 600 mg a Bio-rex 70 oszlopról lejtött termékből, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5) 200. transzfer frakció

a) 150—161. frakció	169 mg
b) 133—149. és 162—163. frakció	

2. Preparatív HPLC

Minta: 52 mg [az 1/a-ból kapott termékből], Altex C18/25 cm × 10 mm, 10 mikron)

A puffer: 0,1%-os TFA

B puffer: 0,25%-os TFA/CH₃CN (4:6) 60% B, izokratikus; 20,7 bar túlnyomás; 3,0 ml/min

Injektlás: 10 mg/0,6 ml A pufferben 235 nm (2,0 AUFS)

a) 24 mg

b) 7,3 mg

A 2/a-t és 2/b-t egyesítjük, HPLC-vel ismét megtisztítjuk, így 15 mg tiszta peptidet kapunk.

3. Megosztásos kromatográfia

Minta: 117 mg [1/A-ból] finomszemcsés Sephadex G-25 (2,5 × 55 cm-es oszlop) n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5) eluens

a) 32-36. frakció 83 mg tiszta termék

3. példa

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

A cím szerinti terméket benzhidril-amin-gyantát (BHA) használva állítjuk elő szilárd fázisú technika segítségével. Így 1,0 g BHA-gyantát [1,13 millimól NH₂/g gyanta] reagáltattunk 1,5 ekvivalensnyi Boc-Arg(Tos)-nal, 1,5 ekvivalens DCC-vel és 3,0 ekvivalens HBT-vel, melyeket dimetil-formamidban úgy készítünk el, hogy az oldat a Boc-Arg(Tos)-ra nézve 0,1 mól/l koncentrációjú legyen. A védőcsoport eltávolítást 50% TFA/metilén-klorid eleggyel, a semlegesítést 5%-os DIEA/metilén-klorid eleggyel végezzük. A peptidet lépésenként építjük fel az aminosavak egymás utáni kapcsolásával előzetesen elkészített Boc-aminoacil-szimmetrikus anhidridek 0,1 mól/l dimetil-formamid oldatát használva. A Boc-Asn-t, a Boc-D-Tyr(Et)-t és a Pmp(MBz)-t egymás után kapcsoljuk dimetil-formamidban oldott DCC-t és HBT-t használva. A kapcsolás teljessé válását a kvalitatív ninhidrin-próba segítségével követjük nyomon és amennyiben szükséges, újbóli kapcsolást végeztünk. A befejezett Pmp(MBz)-D-Tyr-(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(MBz)-Pro-Arg(Tos)-BHA-gyantához kötött peptidet metilén-kloriddal mosuk és állandó súly eléréséig szárítjuk (2,34 g).

A peptidről a védőcsoportokat úgy távolítjuk el és a peptidet a gyantáról úgy hasítjuk le, hogy 30 ml vízmentes folyékony hidrogén-fluoridot és 4 ml anizolt adtunk hozzá 0°C hőmérsékleten, és a reakciót egy órán keresztül folytatjuk. A kapott anyag vákuumban való szárazra párlása után a gyantát etil-éterrel mostuk, levegőn szárítjuk, majd háromszor 20 ml gázmentesített dimetil-formamiddal és négyszer 20 ml 20%-os ecetsavval mossuk. A dimetil-formamid és savas extraktumokat 4 l vízbe öntjük (az így keletkezett oldat pH-ja 4,5). A pH-t ammónium-hidroxiddal 7,2-re állítjuk és az oldatot 0,01 mól/l kálium-(hexaciano-ferrát) oldattal titráljuk argon gáz atmoszférában addig, amíg a sárga szín fennmarad (85 ml).

A pH-t 4,8-ra állítjuk jégacet hozzáadásával. Az elegyet leszűrjük és a szűrletet egy Bio-Rex 70 oszlopra (H⁺) öntjük. Az oszlopot 200 ml vízzel mossuk, majd a nyers peptidet 300 ml piridin/ecetsav/víz 30:4:66: térfogatarányú elegyével eluáljuk. Az eluenst vákuumban 30°C hőmérsékleten bepároljuk. A maradékot 100 ml 0,2 N ecetsavban oldjuk, liofilizáljuk, így 507 mg cím szerinti nyers oktapeptidet kapunk.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ tisztítása

1. Ellenáramú eloszlás

Minta: 607 mg nyers termék,

n-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:5 240. frakció

a) 154-170. és 190-2. frakciók	71 mg
b) 171-189. frakciók	230 mg

2. Gélszűrés

Minta: 123 mg a b) mintából Sephadex G—15 (2,5 × 55 cm-es) oszlop 0,2 N HOAc eluens 25 ml/ó áramlási sebességgel

- a) 46-50. frakció 20 mg
b) 51-77. frakció 60 mg tiszta peptid

4. példa

A *Pmp-D-Leu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NHC₃H₇* előállítása

0,1 millimól, a fentiek szerint előállított, de a 2-es helyzetben Boc-D-Leu-t tartalmazó Pmp-D-Leu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ és 0,1 millimól n-propil-amin 20 ml dimetil-formamidban oldott elegyét 23 mg (0,11 millimól) DCC-vel és 14 mg (0,11 millimól) HBT-vel szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül reagáltatjuk. Az illékony anyagokat lepárolva olajos maradékot kapunk. A kapott terméket a következő módon tisztítjuk:

- a) gélzűrőssel, oszlopként G-10-Sephadexet, eluensként 0,2 N ecetsavat használva,
- b) nagynyomású folyadékkromatográfiával, 0,05% TFA-t tartalmazó 39%-os vizes acetonnitril oldatot használva, és ismét,
- c) gélzűrőssel; így a cím szerinti tiszta oktapeptid 20 mg-ját nyertük.

Aminosav analízis:

Asp = 0,88; Leu = 1,09%;
Pro = 0,93; Phe = 0,88;
Val = 1,00; Arg = 1,07.

HPLC = 95%, fő csúcs 11,33-nál 40%-os vizes, 0,05 M káliumhidrogénfoszfátot tartalmazó acetonnitril oldatot használva.

A *Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂*-t melyet a fenti 2. példa szerinti módon állítottunk elő, és benzilamint használva *Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NHBzl*-t állítottunk elő. A többi N-alkilezett származékokat hasonlóan kapjuk meg.

5. példa

Gyantához kötött *Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA* szilárd fázisú szintézise

A cím szerinti gyanta hordozóhoz kötött peptid szilárd fázisú szintéziséhez BHA gyanta hordozóhoz kötött Boc-Arg(Tos)-t (1,19 millimól/g gyanta) használunk kiindulási anyagként. 3 millimól Boc-Arg(Tos)-t 1,0 millimól benzhidril-amin-gyantával reagáltatunk dimetil-formamidban 2 órán keresztül. A benzhidril-amin-gyantát a hidroklorid sója formájában egy éjszakán át dimetil-formamidban áztatjuk. Ezután metilén-kloriddal mossuk négyszer 1 percen keresztül, 7% diizopropil-etil-amin tartalmú metilén-kloriddal kétszer 2 percig, majd hatszor 1 percig csak metilén-kloriddal, majd végül kétszer 1 percig előzetesen vízmentesített dimetil-formamiddal semlegesítjük. A Boc-Arg(Tos) felvitelét a gyantára kétszer hajtottuk végre 6 millimól 1-hidroxi-benzotriazolt (HBT) és 3 millimól diciklohexil-karbodiimidet (DCC) használva. A kötés után rutinszerű ninhidrin-próbával és aminosav analízissel ellenőrizzük a gyantához

kötés %-os arányát. A megkötés mértéke ebben az esetben 62,66%-os, vagyis 0,74 millimól/g gyanta terméket kapunk. A következő aminosavat, a Boc-Pro-t a következő módon kapcsoljuk a gyanta hordozóra felvitt aminosavhoz:

1. Hatszor 1 percig metilén-kloriddal mossuk,
2. Egyszer 1 percig 50% TFA-t tartalmazó metilén-klorid oldattal előmossuk,
3. A védőcsoportokat 50% TFA tartalmú metilén-klorid oldattal eltávolítjuk (20 perc),
4. Hatszor 1 percig metilén-kloriddal mossuk,
5. 7% DIEA tartalmú metilén-kloriddal egyszer 1 percig előmossuk,
6. 8 percig 7% DIEA tartalmú metilén-kloriddal semlegesítjük,
7. Hatszor 1 percig metilén-kloriddal mossuk,
8. Kétszer 1 percig dimetil-formamiddal mossuk,
9. 3 millimól, védőcsoporttal védett aminosavat és 6 millimól, dimetil-formamidban oldott HBT-t adunk hozzá, majd
10. Kétszer 1 percig dimetil-formamiddal mossuk,
11. Négyszer 1 percig metilén-kloriddal mossuk,
12. Kétszer 1 percig etanol/metilén-klorid 1:1 arányú elegyével mossuk,
13. Négyszer 1 percig metilén-kloriddal mossuk.

A további aminosavakat a megfelelő sorrendben Beckman peptid 990 B szintetizátort használva kapcsolunk. A kapcsolás menete a Boc-Asn és a Pmp(4-MeBzl) kivételével a következő:

1. Háromszor 1 percig metilén-kloriddal való mosás,
2. Egyszer 1 percig 50 TFA-t tartalmazó metilén-kloriddal való előmosás,
3. A védőcsoportok eltávolítása 50% TFA-t tartalmazó metilén-kloriddal 30 percig,
4. Háromszor 1 percig mosás metilén-kloriddal,
5. Egyszer 1 percig előmosás 7% DIEA tartalmú metilén-kloriddal,
6. Egyszer 10 percig 7% DIEA tartalmú metilén-kloriddal való semlegesítés,
7. Háromszor 1 percig mosás metilén-kloriddal,
8. 3 millimól, dimetil-kloridban oldott védőcsoportot tartalmazó aminosavat adunk hozzá, majd 3 millimól DCC-t (10 ml 0,3 M-os metilén-kloridos oldatot) adunk hozzá, és két órán keresztül a kapcsolást végrehajtjuk,
9. Háromszor 1 percig metilén-kloriddal mossuk,
10. Háromszor 1 percig etanol/metilén-klorid 1:1 arányú elegyével mossuk,
11. Háromszor 1 percig metilén-kloriddal mossuk.

Amikor az Asn-részt kapcsoljuk, 6 millimól 1-hidroxi-benzotriazolt (HBT) használtunk 10 ml 0,6 M-os dimetil-formamidos oldat formájában. Vízmentes dimetil-formamidot használunk oldószerként akkor is, amikor Pmp(4-MeBzl)-t kapcsolunk a gyantához kötött peptidhez 3 millimól 4-dimetil-amino-piridin segítségével. Mindegyik kapcsolási reakció befejeződését a ninhidrin-próbával kísérjük figyelemmel. A 4-metil-benzil(4-MeBzl) csoportot a Cys és a pentametilén-merkaptopropionsav (Pmp) részek tiol-csoportjainak védelmére alkalmazzuk.

A dysmenorrhea kezelése a találmány szerinti vegyületek egy másik alkalmazási lehetősége, amennyiben ezeket intravénásan vagy intarnazálisan adagoljuk.

A találmány szerinti vegyületek tehát ödéma kezelésére vagy vízajtásra alkalmazhatók. A kezelést a vegyületek parenterális vagy befűvások adagolásával végezhetjük, amikor is a kiválasztott vegyület nem toxikus, de hatékony mennyiségét előnyösen egy gyógyászati hordozóanyaggal alkotott készítmény formájában alkalmazzuk. A hatóanyag dóziségsége 0,01–10 mg/kg, előnyösen 0,01–5 mg/kg lehet 70 kg-os beteg esetén. A dóziségségek bevitelét naponta 1–5 alkalommal megismételhetjük.

A vazopresszin antagonizmust okozó gyógyászati készítmény hatóanyagként egy (I) általános képletű vegyületet tartalmaz a fentiekben leírt dóziségség formájában, egy standard folyékony hordozóanyagban oldva vagy szuszpendálva. A standard hordozó izotóniás sóoldat, melyet olyan ampullába vagy egy többszörös dózist tartalmazó üvegcsebe helyezünk, melyek alkalmasak parenterális, intravénás, szubkután vagy intramuszkuláris injekció beadására. A belélegzésre alkalmas készítmény hasonló, de általában egy adagolóval ellátott készüléket vagy inhalátort alkalmazunk. Porított porkészítmények szintén használhatók, akárcsak az olajos készítmények, gélek, izotóniás készítményekhez való pufferek, emulziók vagy aeroszolok standard készítmény formájában.

A találmány szerinti vegyületekről bebizonyították, hogy különleges, egyedi antagonistá aktivitással rendelkeznek a természetes antidiuretikus hormonnal szemben (anti-ADH aktivitás), in vitro a sertés medulláris szövetében vagy az emberi vesében, és in vivo a hidropéniás patkányban vagy a hidropéniás majomban. Az in vitro vizsgálatok részleteit F. L. Stassen és munkatársai ismertetik [J. of Pharm. Exp. Ther. 233, 50–54 (1982)], de a receptor helyek cikláz aktivitása és kötőpotenciáljának számítását az alábbiakban ismertetjük:

Az adenilát cikláz aktivitás vizsgálata

Minden kísérletben a medulláris membrán távollétében képződött ^{32}P /cAMP mennyiségét határozzuk meg.

Ezt az értéket minden kísérleti adatból leszámítottuk. A vegyületeknek az alap adenilát cikláz aktivitásra és/vagy vazopresszin stimulálta aktivitására való hatását vizsgáltuk. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. A K_a értéket Lineweaver-Burke görbe alapján kaptuk. Rel. $V_{\max} = (V_{\max} \text{ vegyület} / V_{\max} \text{ vazopresszin}) \times 100$. $K_i = 1/[K_a' (K_a - 1)]$, ahol I jelentése az antagonista koncentrációja, míg K_a' és K_a az antagonista jelenlétében illetve távollétében a vazopresszin olyan koncentrációja, amely az adenilát cikláz maximális aktivitásának felének eléréséhez elegendő.

A kötési potenciál vizsgálata

Minden kísérletben háromszor mértük meg a kötött ^3H -vazopresszin mennyiségét vazopresszin feleslegének ($7,5 \times 10^{-6}\text{M}$) jelenlétében és távollétében. Ezek az értékek a teljes illetve a nem specifikus kötést jelentik. A vegyület K_B értékét a kompetitív gátlás egyenletéből számítjuk ki: $K_B = \text{IC}_{50} / (1 + L/K_D)$, ahol IC_{50} jelentése a specifikus ^3H -vazopresszin kötés 50%-os gátlásához szükséges koncentráció, L a ligandum koncentrációja, K_D a ^3H -vazopresszin disszociációs állandója ($K_D = 3,6 \times 10^{-9}\text{M}$; $\text{ISD} = 0,4 \times 10^{-9}\text{M}$). Ezt az átlagos K_D értéket három sertésvese membrán készítményen határoztuk meg.

Hidropéniás patkány vizsgálata

Hím patkányokból a vizsgálat előtt körülbelül 18 órával az ételt és a vizet kihajtottuk. Az állatokat négyesével helyeztük el a metabolizmus vizsgálatokhoz szükséges ketrecekben. 0 órákor a vizsgált anyagot intraperitoneálisan adagoltuk a vizsgálandó csoportnak, míg a két kontroll csoportnak (megkötözött és szabadon mozgó) a hordozóanyag ekvivalens mennyiségét adtuk. A vizsgálati eredmények a kiválasztott vizelet ml-jei (kumulatív), a kiválasztott mEq/patkány elektrolit, kiválasztott vizelet mg/patkány, és az ozmolalitás milli-Osmól/kg víz dimenziójúak. A szignifikanciát túrési teszttel vizsgáltuk. Az ED_{500} a 300 milli-Osmól/kg vizelet ozmolalitás eléréséhez (lecsökkentéséhez) szükséges vegyületdózsát [$\mu\text{g}/\text{kg}$] jelenti. Az ED_{500} az 500 milli-Osmól/kg vizelet ozmola-

I. táblázat

(IV) általános képletű vegyület
(n jelentése 1)

X	Y	A	anti-ADH aktivitás		
			in vivo (patkány) ED_{500} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]*	in vitro (sertés) K_i (nM)	K_B [$\mu\text{mól}$]
1.	D-Tyr	Gly-NH ₂	32	30	0,082
2.	D-Tyr	NH ₂	63	27	0,065
3.	D-Tyr	OH	156	160	0,35
4.	D-Tyr(Et)	Gly-NH ₂	9,9	5,9	0,011
5.	D-Tyr(Et)	NH ₂	5,8	3,0	0,0078
6.	D-Tyr(Et)	NH ₂	13	7,6	0,018

* A peptid becsült dózisát ip stat [$\mu\text{g}/\text{kg}$] kaptuk, s ez az U_{osm} -ot a hidropéniás szintről 300 milli-Osmól/kg vízzintre csökkenti.

lítás eléréséhez (lecsökkentéséhez) szükséges vegyületdózist $[\mu\text{g/kg}]$ jelenti. A hidropénias majom vizsgálatát hasonlóképpen végeztük.

Az I. táblázat adatai a kiválasztott reprezentáns vegyületek, melyek oktapeptid szerkezetében a találmány szerinti vegyületekre jellemző dez-Gly dipeptid láncvég megtalálható, anti-vazopresszin aktivitását mutatják. A jelentős antagonistá aktivitás nem várt, mivel az agonisták között a dez-Gly-oxitocin éppen ellenkező hatást gyakorol a vérnyomásra, mint maga az oxitocin (Berde és munkatársai), és az oxitocin és a vazopresszin láncának meg rövidítése az irodalom szerint „a vegyületek tipikus biológiai aktivitásának rohamos csökkenésével jár” (T. Barth és munkatársai).

Az I. táblázat 5. vegyületéről a sertés és emberi szövet in vitro vizsgálata valamint a hidropénias sertés és majom tesztek alapján bebizonyosodott, hogy különleges antagonistá aktivitással rendelkezik. A vegyület anti-ADH aktivitása az öntudatánál lévő, hidropénias mókusmajom vizsgálatban, melyet a vizelet ozmolalitásának 300 milli-Osm/kg víz értékre való csökkentéséhez szükséges anyagmennyiséggel fejezünk ki, $\text{ED}_{100} = 8,6 \text{ Nmól/kg}$ (i. p.). Az I. táblázat 4. vegyületének ED_{100} értéke 33,1 Nmól/kg. Az utóbbi vegyület 2-D-Phe analógjára 319,0 Nmól/kg.

A találmányt az alábbi példákon mutatjuk be anélkül, hogy a találmányt a példákra korlátoznánk.

1. példa

A Pmp(Bzl)-D-Tyr(Br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-gyanta szilárd fázisú szintézise

A gyantához kötött cím szerinti vegyület szilárd fázisú szintézisére gyantához kötött Boc-Arg(Tos)-t [3millimól/5,4 g gyanta] használunk kiindulási anyagként. A megfelelően védett aminosavakat egymás után kapcsoljuk a Boc-Arg(Tos)-gyantához, melyet Boc-Arg(Tos) cézium-sójának a szakirodalomból ismert módon kereskedelmi Merri-field-gyantával (Cl-CH₂ gyanta) való reagáltatásával állítunk elő. Az aminosavak kapcsolása során az alábbi lépéseket tesszük:

1. mosás metilén-kloriddal (háromszor, 1 percig),
2. előmosás 33%-os, metilén-kloridban oldott, 1% indolt tartalmazó trifluor-ecetsavval (egyszer, 1 percig)
3. védőcsoport lehasítás metilén-kloridban oldott, 1% indolt tartalmazó 33%-os trifluor-ecetsavval (20 percig),
4. mosás metilén-kloriddal (háromszor, 1 percig),
5. előmosás metilén-kloridban oldott 10% trietil-aminnal (egyszer, 1 percig),
6. semlegesítés 10% trietil-amin tartalmú metilén-kloriddal (10 percig),
7. mosás metilén-kloriddal (háromszor, 1 percig),
8. hozzáadjuk a trimetil-aminban, metilén-kloridban és 0,5 M N,N'-diciklohexil-karbodiimid tartalmú metilén-kloridban (20 ml) oldott védett aminosavat (10 millimól).

A reakcióidő maximálisan 2 óra.

Amikor az Asn részt kapcsoljuk, vízmentes

dimetil-formamidban oldott 10 millimól 1-hidroxi-benzotriazol (HBT) adunk a Boc-Asn-hez. Vízmentes dimetil-formamidot akkor is használunk oldószerként, ha Pmp(Bzl)-t kapcsolunk a gyantán lévő peptidhez 4-dimetil-amino-piridint (10 millimól) használva. Mindegyik kapcsolási reakció befejeződését a ninhidrin próbával ellenőrizzük. 4-metoxi-benzil-csoportot használjuk a Cys tiol-csoportjának védelmére, míg a D-Tyr fenolos hidroxil-csoportját 2-bróm-benzil-oxi-karbonil-csoporttal védjük.

A kapott védett Pmp(Bzl)-D-Tyr(Br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-gyantát jól megmossuk metilén-kloriddal illetve metanolal. Vákuumban egy éjszakán keresztül való szárítás után 8,4 g cím szerinti, védőcsoportokat tartalmazó, gyantahordozóhoz kötött terméket kapunk.

A Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítása

4 g, 1,5 millimól Pmp(Bzl)-D-Tyr-(p-bróm-benzil-oxi-karbonil)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-gyantát ammonolízisnek vetjük alá 200 ml ammónia/metanol elegy 50 ml dimetil-formamidos oldatát használva szobahőmérsékleten 48 órán keresztül. Szárazra való bepárlás után a maradékot etil-acetát/n-hexán elegyével kicsapjuk, így védett oktapeptid-amidot kapunk (1,54 g).

Ezt a nyers peptidet 250 ml folyékony ammóniában oldjuk és nátrium/folyékony ammónia oldattal kezeljük, így Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t kapunk, melyet 4 l 0,01 mól/l kálium-ferricianid oldat alkalmazásával oxidálunk pH = 7–7,5-en. Az oxidációs reakció befejeződése után a vizes oldat pH-ját 4,5-re állítjuk be jégecet hozzáadásával. Ezt az oldatot lassan egy gyengén savas akril-gyanta [Bio-Rex 70] oszlopon (11 × 2,5 cm, H⁺ fázis) vezetjük keresztül. Az oszlopot 5%-os illetve 50%-os ecetsav oldattal eluáljuk. A nyers ciklizált

Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t az 50%-os ecetsavas frakciókból nyerjük (860 mg).

A Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ tisztítása

1. Ellenáramú tisztítás
Minta: 860 mg nyerstermék, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:5:1) 250 transzfer frakció
a) 186–204. frakció 436 mg
b) 182–185. és 205–218. fr. 219 mg
2. Megosztásos kromatográfia
Minta: 250 mg [az 1/a szerinti termékből] finom Sephadex G-25 (2,5 × 55 cm) n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5)
a) 32–46. frakció 22 mg
3. Preparatív nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)
Minta: 40 mg a 2/a-ból; Altex C18, 20,7 bar túlnyomás
Áramlási sebesség: 3,0 ml/perc

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

1,25 g (0,37 millimól), 2 ml anizolban oldott, BHA-gyanta hordozóhoz kötött Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr-(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-t 20 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal reagáltatunk 0 °C hőmérsékleten 50 percig. A hidrogén-fluorid vákuumban való eltávolítása után a maradékot 4 × 20 ml vízmentes éterrel mossuk és a nyers peptidet 50 ml dimetil-formamiddal és 50 ml 33%-os ecetsavval 2 l gázmentesített, 4,5-ösre előzetesen beállított pH-jú vízbe átxtraháljuk. A vizet, hígított diszulfidril-oktapeptidet 0,01 mól/l kálium-ferricianid oldat segítségével pH = 7,2-n ciklizáljuk addig, amíg a sárga szín 30 percig fenn nem marad. Ehhez 50 ml kálium-ferricianid oldatra van szükség. A pH-t jégecettel 4,5-re állítjuk és az oldatot egy gyengén savas akrilgyanta (Bio-Rex-70) oszlopon (2,5 × 12 cm, H⁺ formában) lassan keresztülvezetjük. Az oszlopot piridin/jégecet/víz 30:4:66 arányú elegyével eluáljuk. A piridin-acetátos oldatot vákuumban desztillációval távolítjuk el. A maradékot 10%-os ecetsavból liofilizáljuk, így 300 mg (76%) nyers, cím szerinti terméket kapunk.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ tisztítása

1. Ellenáramú eloszlás

Minta: 300 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O, 4:1:5, 240 frakció

- a) 176—186. frakció 99,6 mg tiszta peptid
b) 170—175. és 187—210. frakció 117,24 mg
A tiszta anyag kitermelése: 216,84 mg (55%).

2. A molekula összegképlete: C₃₀H₇₂N₁₂O₁₀S₂
Mólsúly: 1064,53

Aminosav analízis: Asp = 1,00,
Abu + Cys = 1,70,
Tyr = 0,64,
Phe = 0,98,
Arg = 0,91.

Peptidtartalom: 68,06—91,52% az aminosav analízis alapján,
87,33%-a a nitrogén analízis alapján.

3. Kromatográfiás adatok:

	Oldószer	R _f
TLC	n-BuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc	0,56
	1:1:1:1	
	n-BuOH/HOAc/H ₂ O	0,42
	4:1:5 felső	
HPLC	C ₁₈ -oszlop	k'
Izokratikus	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA	3
	(60:40:0,25)	
	0,05 M KH ₂ PO ₄ /acetonitril	7,33
	60:40	
Gradiens	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA	8,82
	80:20:0,25-től	
	50:50:0,25-ig	

Gyorsított atom: m/z 1065 (M + H)⁺;
bombázás (FAB) 1063 (M - H)⁻

6. példa

BHA-gyantához kapcsolt

Pmp-(4-MeBzl)-D-Tyr-(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos) szilárd fázisú szintézise

A 0,72 g (0,36 millimól) BHA-gyantára felvitt C-D [Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)] peptidet Beckman 990-B peptid szintetizátorban szintetizáljuk a Boc-Arg(Tos) benzhidril-amin-gyantához kötött formájából kiindulva [0,72 millimól/g gyanta] az 5. példában leírt módon eljárva. A következő aminosavakat a megfelelő sorrendben HBT és DCC segítségével hasonló módon kapcsoljuk (2 óra). Az utolsó aminosav, vagyis a Pmp(4-MeBzl) kapcsolása után a gyantához kötött peptidet a szokásos módon mossuk és a cím szerinti intermediert 0,88 g-ját kapjuk.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

BHA-gyantához kötött, 2 ml anizolban oldott Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-t 20 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal reagáltatjuk 0 °C hőmérsékleten 50 percig. A feldolgozást a szokásos módon végezzük, és 45 ml K₃Fe(CN)₆ felhasználásával 230 mg (60,8%) nyers, cím szerinti terméket kapunk.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ tisztítása

1. Ellenáramú eloszlás

Minta: 230 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:5, 240 frakció

- a) 160—178. frakció 105,2 mg tiszta termék
179—190. és 150—159. frakció 49,5 mg
A tisztított termék kitermelése: 154,7 mg (41%).

2. Képlet: C₄₉H₇₀N₇O₁₀S₂

Mólsúly: 1050,449

Aminosav analízis: Asp = 1,00,
Pro = 1,03,
Ala = 0,94,
Cys = 0,46,
Tyr = 0,65,
Phe = 0,91,
Arg = 0,92.

Peptidtartalom: 59,18—81,77% két analízis alapján

3. Kromatográfiás adatok:

	Oldószer	R _f
TLC	n-BuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc	0,64
	(1:1:1:1)	
HPLC	C ₁₈ -oszlop	k'
Izokratikus	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA	2,18
	(60:40:0,1)	
Gradiens	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA	6,47
	60:40:1-től	
	50:50:0,1-ig	

Gyorsított atombombázás (FAB): m/z

1051 (M + H)⁺;
1049 (M - H)⁻

7. példa

BHA-gyantához kötött Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe(4'-Et)-Val-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos) szilárd fázisú szintézise

A cím szerinti gyantához kötött peptidet BHA-gyantához kötött BOC-Arg(Tos)-ból [0,4 millimól/g gyanta] kiindulva az előzőekben ismertetett módszer szerint állítjuk elő, vagyis a védőcsoportot lehasítjuk és az aminosavat kapcsoljuk. A reakciót HBT és DCC segítségével hajtjuk végre 2 órán keresztül, így BHA-gyantához kötött Boc-Val-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-t kapunk. A következő két aminosavat Beckman peptid 990-B szintetizátor segítségével kapcsoljuk. A Pmp(4-MeBzl)-t manuálisan kapcsoljuk DMAP-DCC elegyet alkalmazva egy éjszakán keresztül. A gyantához kötött peptidet a szokásos módon mossuk és szárítjuk, így a cím szerinti intermedier 2,00 g-ját nyerjük.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe(4-Et)-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítása

3 ml anizolban oldott BHA-gyantához kötött Pmp-(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe(4-Et)-Val-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-t 30 ml hidrogén-fluoriddal reagáltatunk 0 °C hőmérsékleten egy órán keresztül. A fentiekben ismertetett feldolgozási módszert alkalmazzuk, 38 ml kálium-(hexaciano-ferrát)-ot használunk el. 50 mg nyersterméket kapunk a Bio-Rex oszlopról és 139 mg-ot csapunk ki az oldatból, a cím szerinti peptid teljes kitermelése 189 mg (42,7%).

Tisztítás

1. Megosztásos oszlopkromatográfia, Sephadex, G-25

Minta: 50 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O, 4:1:5

a) A frakció 23,86 mg

b) B frakció 18,5 mg

Preparatív HPLC

Minta: 43 mg (az 1/A és 1/B frakcióból) Altex ODS, 10 mm × 25 cm, 5 μ áramlási sebesség: 4 ml/perc, víz/acetonitril/TFA (50:50:0,25), izokratikus, 229 nm (2,0 AUFS), injektálás: 2,0 mg/300 μl és 4,0 mg/420 ml, így 30,0 mg tiszta peptidet kapunk.

2. Fizikai adatok

Képlet: C₅₃H₇₈N₁₂O₁₂S₂

Mólsúly: 1106,47

Aminosav analízis: Asp = 1,00,

Pro = 0,78—0,84,

Cys = 0,45,

Val = 1,02,

Tyr = 0,63,

Phe(p-Et) = 1,50,

Arg = 1,00—0,96.

Peptidtartalom: 73,3—89,6%.

3. Kromatográfiás adatok:

	Oldószer	R _f
TLC	n-BuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc 1:1:1:1	0,70
	n-BuOH/HOAc/H ₂ O 4:1:5 felső	0,299
HPLC	C ₁₈ -oszlop	k'
Izokratikus	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA (55:45:0,1)	4,43
Gradiens	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA 60:40:0,1-től 50:50:0,1-ig	8,7
FAB	m/z 1107 (M+H) ⁺ ; 1105 (M-H) ⁻	

8. példa

MBHA-gyantához kötött Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos) előállítása

Egy millimól MBHA-gyantához kötött Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-t állítottunk elő kiindulási anyagként 1 millimól Boc-Arg(Tos)-4-metil-benzhidril-amin (MBHA)-t használva. A kapcsolási reakciókat egy Beckman 990-B peptid szintetizátorban hajtjuk végre. Az aminosavak t-Boc-védett formáit használjuk.

A kapott, 1,83 g védett, gyantához kötött peptidet két egyenlő részre osztjuk, így két 0,915 g-os mintát kapunk.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Gly-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ szintézise

A kapott, védett, gyantához kötött peptid egyik részéhez további 1,5 millimól mennyiségű, megfelelő Boc-val védett aminosavakat és béta-(S-MeBzl)-Pmp-OH-t kapcsolunk, így 1,16 g cím szerinti, gyanta hordozóhoz kötött peptidet kapunk. Az MBHA-gyantához kötött Pmp(S-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Gly-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos) peptidet vákuumban szárítjuk. A kapott védett peptidet 1,5 ml anizollal és 25 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeljük 0 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül. A védőcsoport nélküli peptidet 0,01 mól kálium-(hexaciano-ferrát)-tal kezeljük pH=7,2-en, 2 l víz oldószer jelenlétében. 53 ml oxidáló ágenszt alkalmazunk.

A kapott oldatot egy C₁₈ flash oszlopon vezetjük keresztül. Az oszlopot 50%-os, 0,25% trifluor-ecetsavat tartalmazó acetonitrillel eluáljuk 20 ml-es frakciókban. 325 mg nyersterméket tudunk a frakciókból elválasztani. A terméket a továbbiakban CCD módszerrel tisztítjuk (B/A/W=4:1:5), így 188 mg/99%-os tisztaságú cím szerinti terméket kapunk.

Aminosav analízis:

Peptidtartalom: 82%

Asp = 1,04; Tyr = 0,92;

Pro = 1,15; Phe = 1,01;

Gly = 1,00; Arg = 0,91.

Cys = 0,54;

FAB/MS = m/z (M+H)⁺ 1037

juk, és a pH-t 50%-os nátrium-hidroxid oldattal 7,2-re állítjuk be. Az oldatot 0,01 M-os kálium-(hexaciano-ferrát) oldattal titráljuk addig, amíg a sárga szín állandósul, ehhez 30 ml oldatot használunk fel. A pH-t 5,4-re állítjuk be jégéccel hozzáadásával és az oldatot leszűrjük. A szűrletet H^+ formában lévő kationcserélő (Bio-Rex 70) gyanta oszlopára visszük fel, az oszlopot vízzel mossuk, majd 100 ml piridin/acetát pufferrel (30 ml piridin, 4 ml ecetsav, 66 ml víz) eluáljuk. Az eluátumot szárazra pároljuk. A maradékot kismennyiségű 10%-os ecetsavval vesszük fel és vízzel 1%-ra hígítjuk az ecetsavra nézve. Liofilizálás után 650 mg nyers, cím szerinti terméket kapunk.

A nyers peptidet ellenáramú eloszlással tisztítjuk n-butanol/ecetsav/víz 4:1:5 arányú elegyével, így 33 mg részben tiszta peptidet kapunk. Ezt tovább tisztítjuk géliszűrőssel Sephadex G-15 oszlopon 1%-os ecetsavval, így 24,5 mg tiszta peptidet kapunk.

Aminosav analízis (hidrolízis sósav és trifluor-ecetsav 2:1 arányú, 0,005% fenolt tartalmazó elegyben 1 órány keresztül):

Asp = 1,00; Val = 0,99;
Pro = 0,72; Tyr = 1,04;
Cys = 0,62; Phe = 1,04;
Arg = 0,95.

Peptidtartalom = 71%.

HPLC: acetonitril/víz/TFA egy csúcs
40:60:0,1 $k' = 5,2$

acetonitril/víz/TFA $k' = 3,6$
45:55:0,1

Gradiens: 20%-os acetonitril 5' $k' = 8,7$
20—50%-os acetonitril 20'
50%-os acetonitril 5'

Tisztaság: 97%

TLC n-BuOA/ecetsav/víz $R_f = 0,32$
1:1:1

n-BuOA/ecetsav/víz $R_f = 0,12$
4:1:1

n-BuOA/piridin/ecetsav/víz $R_f = 0,50$
15:10:3:12

Az extrahált peptides gyanta az aminosav analízis alapján még mindig tartalmaz peptidet, ezért háromszor 50 ml dimetil-formamiddal ismét extraháljuk. A dimetil-formamidot szárazra pároljuk és a maradékot 10%-os ecetsavban feloldjuk, 1% ecetsavtartalomra hígítjuk és liofilizáljuk, így további 260 mg peptidet kapunk. Ennek az anyagnak a FAB tömegspektrumában $m/z = 1079$, ami megfelel a kívánt ciklikus peptid M + H értékének.

13. példa

Az 1. példa szerinti peptid szintézis során a 2. egységként elhelyezkedő Boc-D-Tyr(Br-Z)-t Boc-D-Phe sztöchiometrikus mennyiségével helyettesítve Pmp-D-Phe-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t kapunk.

Ha a 2-es helyzetben lévő egységet Boc-D-Val-lal helyettesítve és a 2. példa szerinti hasítás-oxidáció reakciókat használva Pmp-D-Val-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-t nyerhetünk.

Az 1. példában Boc-D-Leu-t használva Pmp-D-Leu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t kaphatunk.

Az 5. példában a β -merkaptó- β , β -ciklotetrametilén-propionsavat (Tnp) Pmp-vel helyettesítve

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Cys-Pro-Arg(NH₂)-t kapunk. β -merkaptó- β , β -ciklohexametilen-propionsav esetén a Hmp¹ származékhoz jutunk.

Az 1. példában a 2. egység helyére Boc-D-Nl-et-t,

a 8. egység helyére D-Arg(Tos)-t vive Pmp-D-

Nle-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Arg-NH₂-t kapunk.

A 2. példában a 2. egységet Boc-D-Cha-ra cserél-

ve Pmp-D-Cha-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-t kapunk.

Az 1. példában a 2. egységet Boc-alfa-amino-fenil-vajsavval (Pba) helyettesítve Pmp-D-Pba-Phe-

-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-hoz jutunk.

A 3. példában a védett Arg-t Boc-Lys(ClZ)-vel helyettesítve Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-NH₂-t kapunk.

Hasonló módon a következő vegyületeket állítjuk elő:

Pmp-D-Met-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,

Pmp-D-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Lys,

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,

Pmp-D-Tyr(i-Pr)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg,

Pmp-D-alle-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg,

Pmp-D-Nva-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,

Pmp-D-Abu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂.

14. példa

Parenterális dózisegység készítmények

Az 1. vagy 3. példa szerinti ciklikus oktapeptid 0,5 mg-ját steril száraz por formájában tartalmazó parenterális injekció készítményt az alábbi módon állítjuk elő:

0,5 mg peptid-amint 1 ml vízben oldott 20 mg mannitban oldunk fel. Az oldatot steril körülmények között egy 2 ml-es ampullába szűrjük és liofilizáljuk. A port ismét feloldjuk, mielőtt intramuszkuláris vagy intravénás injekciót adnánk olyan betegnek, aki anti-ADH mechanizmusú ödémában szenved. Az injekciót szükséges esetben naponta 1—5 alkalommal vagy folytonos i. v. injekció formájában megismételjük. A találmány szerinti más oktapeptideket is hasonló módon készítjük ki és használjuk fel.

Nazális dózisegység készítmények

30 mg finomra őrölt találmány szerinti oktapeptidet, például a 2. példa szerinti oktapeptidet 75 mg benzil-alkohol és 1,395 g szuszpendálószer, például, hosszabb szénláncú zsírsavak félszintetikus gliceridjeinek kereskedelmi keveréke, elegyében szuszpendálunk. A szuszpenziót egy 10 ml térfoga-

tú, permetezővel ellátott tartóedénybe helyezjük, melyet adagolószelleppel zárunk le. Ez az adag 100 dózisegységet tartalmaz, melyet ödémában szenvedő betegnek intranazálisan naponta 1–6 alkalommal adagolunk.

15. példa

Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-OH előállítása

A cím szerinti terméket az 1. példában ismertetett szilárd fázisú eljárással állítjuk elő kiindulási anyagként Boc-Cys-Merrifield-gyantát alkalmazva, amelyet egymásután a megfelelő Boc-aminosavval kapcsolunk, majd a védőcsoportot hidrogén-fluoriddal eltávolítjuk, a terméket a gyantáról leválasztjuk és a leírt módon oxidatív úton ciklizáljuk.

Tisztítás:

1. C_{18} oszlop kromatográfia
2. preparatív HPLC: 65 mg 0,5 mmól-ból (mólsúly 827) 65/827. 100=16% aminosav-tartalom: 85% N analízis alapján gyorsított atom bombázás (FAB): 827 pozitív megfigyelés 825 negatív megfigyelés aminosav analízis: Asp 1, Tyr 0,98, Cys 0,47, Phe 0,94, Val 0,96 HPLC analízis: egy csúcs 40% CH_3CN és 0,1% vizes TFA oldattal 5 μ C_{18} oszlopon.

16. példa

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH előállítása

A (II) általános képletű ciklikus savak általános szintézise: Boc-Pro-Merrifield gyantát állítunk elő Boc-Pro és Merrifield gyanta összekapcsolásával a céziumsó módszerével, amelynek során Boc-Pro- $OCH_2C_6H_4$ gyantát kapunk, amelyet kiindulási anyagként alkalmazunk. A szintézist Beckman 990B peptid-szintetizáló berendezésen végezzük az alábbi eljárás szerint. Három ekvivalens aminosavat oldunk a megfelelő oldószerben (4-MeBzl)-Cys Boc származékát, Val-t, Phe-t, és 4-MeBzl-Pmp-t metilénkloridban, Asn-t dimetil-formamidban, X-t, így D-Tyr(Et)-t vagy BrZ-D-Tyr-t 1:1 metilénklorid/dimetil-formamid elegyben, majd ekvimoláris mennyiségű diciklo-hexil-karbodiimid (DCC) és 1-hidroxi-benzotriazol (HBT) segítségével összekapcsoljuk, kivéve a 4-MeBzl-Pmp-t, ahol 1,0 ekvivalens dimetil-amino-piridint alkalmazunk katalizátorként. A kapcsolás mértékét alikvot minta kvalitatív ninhidrin analízisével határozzuk meg, és szükség esetén a kapcsolást megismételjük. A Boc-csoportot 1:1 trifluorecetsav/metilénklorid segítségével lehasítjuk, majd mosás után a szabad amint 5% diizopropil-etil-amin/metilénklorid segítségével kinyerjük. A peptid szekvenciáját a 4-MeBzl-Pmp hozzáadása előtt meghatároztuk, majd ellenőriztük a homogenitást. Az utolsó kapcsolás után a peptidet szárítjuk, amelynek során Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-OH esetén 2,24 g peptid gyantát kapunk.

1,1 g (0,5 mmól) fenti peptid gyantát 3 ml anizollal keverünk 60 percen keresztül 0 °C hőmérsékleten (jeges fürdő) 25 ml folyékony, vízmentes hidro-

génfluoridban. A hidrogénfluoridot ezután csökkentett nyomáson 0 °C hőmérsékleten eltávolítjuk. A maradékot etiléterrel négyszer mossuk, és a peptidet dimetil-formamiddal háromszor 10 ml, 20% ecetsavval háromszor 10 ml és 0,3 n ammónium-hidroxiddal eluáljuk. A szűrletet 2 l kiszellőztetett vízhez adjuk és koncentrált ammónium-hidroxiddal pH=7,1 értékre állítjuk. Ezután keverés közben 0,01 mól kálium-ferri-cianid oldatot csepegtetünk hozzá és enyhén sárga szín megjelenéséig folyamatosan keverjük. A kapott oldatot oktadecilszilánál bevont szilikagéllal (C_{18}) töltött oszlopon (5 cm átmérőjű és 15 cm hosszú) hajtjuk át. Az oszlopot 350 ml vízzel mossuk és a peptidet 500 ml 1:1 acetonitril/víz (0,25% trifluor-ecetsav) eleggyel 20 ml frakciókban eluáljuk. A 11–17. frakciókat egyesítjük és bepároljuk. A maradékot koncentrált ecetsavban oldjuk, vízzel hígítjuk és liofilizáljuk. Így 189 mg Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH peptidet kapunk, amely a módosított peptidek előállítására tisztítás nélkül felhasználható. Hasonló módon állítható elő a Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH változat.

17. példa

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítása

8,0 g (8,7 mmól) Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH-t, 1,52 g (11,2 mmól) 1-hidroxi-benzotriazol-hidrátot, 120 ml dimetil-formamidot és 30 ml acetonitrilt 20 °C hőmérsékleten keverünk, majd 2,0 g (9,6 mmól) N,N-diciklohexil-karbodiimidet adunk hozzá. A reakcióelegyet 2,5 órán keresztül keverjük, miközben diciklohexil-karbamid csapadék válik le. Ezután 20 perc alatt 2,58 g (9,77 mmól) argininamid-dihidroklorid-hidrát és 1,50 g (11,6 mmól) diizopropil-etil-amin 16 ml dimetil-formamidban felvett oldatát adjuk hozzá, 20 órán keresztül 20 °C hőmérsékleten keverjük, majd hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. Hozzáadunk 4 ml ecetsavat és 3 ml vizet, 30 percen keresztül keverjük, majd a karbamidot kiszűrjük és az oldószert magas vákuumban eltávolítjuk.

A nyersterméket acetonitrillel és etilacetáttal eldörzsöljük és 1 órán keresztül 10 °C hőmérsékleten keverjük. Szűrés és szárítás után nyers Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t kapunk, amelynek tisztasága HPLC szerint 71%. Ki-termelés: 76%.

2,0 g peptidet nagynyomású folyadék kromatográfia segítségével 15–20 „VYDAC” töltésű 4 mm×50 cm 2500 ml A oldószereleggyel, majd 1200 ml B oldószereleggyel végzett elúció során

1,5 g Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t kapunk, amelynek peptid-tartalma 83% (az

9. példa

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Chg-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ szintézise

A 8. példa szerint előállított hordozón lévő peptid egy részéhez további, Boc csoporttal védett, 1,5 millimól mennyiségű aminosavakat majd béta-(S-4-MeBzl)-Pmp-OH-t kapcsolunk a megfelelő sorrendben, így 1,06 g MBHA-gyantához kötött, védett Pmp(S-4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Chg-Asn-Cys(S-4-MeBzl)-Pro-Arg-(Tos) peptidet kapunk vákuumban való szárítás után.

Ezt a gyantához kötött peptidet 1,5 ml anizollal és 25 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeljük.

Kálium-(hexaciano-ferrát)-tal való oxidáció és a termék Boker C₁₈oszlopon való elválasztása után 165 mg nyers, cím szerinti terméket kapunk. További CCD, Sephadex G—15 és Bio Red P—2 gél-szűrés — melyeket a fentiekben már ismertettünk — 55 mg, nagynyomású folyadékkromatográfián (HPLC) tiszta cím szerinti terméket eredményez.

Peptidtartalom: 88%

FAB/MS: m/z 1119 (M + H)⁺

10. példa

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-OH előállítása és a 3. példa szerinti termék előállításához való felhasználása

4,87 g (15 millimól) Boc-Cys(4-MeBzl)-t 30 ml etanolban oldunk, majd 10 ml vizet adunk hozzá. A pH-t cézium-bikarbonát vizes oldatának hozzáadásával 7,1-re állítjuk be.

Az elegyet bepároljuk, és a maradékot háromszor 50 ml toluolból ismételtén bepároljuk. Ezt a maradékot nagy vákuum alatt szobahőmérsékleten tartjuk egy éjszakán keresztül.

A sötét 35 ml dimetil-formamidban oldjuk, majd 5 g kereskedelmi klór-metil-fenil-gyantát adunk hozzá. A kapott elegyet 53 °C hőmérsékleten argon atmoszférában egy éjszakán át keverjük.

Az elegyet leszűrjük és a gyantát 5 × 60 ml dimetil-formamiddal, 5 × 60 ml dimetil-formamid/víz 9:1 arányú elegyével, 5 × 60 ml dimetil-formamiddal és 6 × 60 ml etanollal mossuk. Ezután nagy vákuum alatt, szobahőmérsékleten a hétvégén szárítjuk.

A peptid láncot egy Beckman szintetizátorban a fentiekben leírt módon építjük fel Asn, Val, Phe, D-Tyr(Et) Boc-vel védett, Pmp S-(4-MeBzl)-lel védett származékát használva. A gyantát a szintetizátorból eltávolítjuk és egy kézi rázó tölcserbe helyezzük.

0,86 g tömegű, gyantához kötött peptidet 1,5 ml anizollal kezelünk és 60 percen keresztül 0 °C hőmérsékleten 15 ml hidrogén-fluoriddal kevertetjük. A hidrogén-fluoridot ezután 0 °C-on eltávolítjuk.

A maradékot ezután háromszor 25 ml éterrel mossuk és a peptidet dimetil-formamidos 30%-os ecetsavba (4 × 10 ml) oldjuk át. Ezt az oldatot 2 l gázmentesített vízhez adjuk, és a pH-t ammónium-hidroxiddal 7,0-re állítjuk be, majd 35 ml 0,01

mól/l kálium-(hexaciano-ferrát) oldatot adunk hozzá lassan.

Ezután a pH-t 4,5-re állítjuk be ecetsavval és az elegyet 30 percig 25 g gyengén bázikus ioncserélő gyantával (WET) (Dowex AG-3 × 4 1R-4S) együtt kevertetjük. A szuszpenziót leszűrjük és a gyantát 2 × 400 ml 30%-os ecetsavval mossuk.

A szűrletet egy C₁₈ flash oszlopon (7 × 16 mm) vezetjük keresztül. Az oszlopot 3 × 400 ml vízzel mossuk, és a peptidet acetonitril/víz/TFA 50:50:0,25 arányú elegyével eluáljuk. A 30—36. frakciókat egyesítjük, koncentrálnak és liofilizáljuk, így 25 mg cím szerinti szabad Cys(OH) ciklikus intermediert kapunk.

FAB tömegspektrum glicerinnel: 827 (M + H)⁺, 825 (M—H)[−].

20 mg Cys savat egy ekvivalensnyi mennyiségű, a kereskedelmi dihidroklorid egy ekvivalensnyi trietil-amminnal való kezelésével előállított Pro-Arg(NH₂)HCl-val reagáltatunk DCC és HBT jelenlétében dimetil-formamid oldószerben, így a 3. példa szerinti terméket kapjuk. Hasonlóan Pro(OMe)-t kapcsolunk a Cys savhoz, híg nátrium-hidroxiddal hidrolizáljuk, így Pro savat kapunk, melyet ezután Arg(HCl) (OMe)-vel reagáltatva az észter-csoport enyhe körülmények között való elhidrolizálásával a 3. példa szerinti termék sav-megfelelőjét kapjuk. Kívánt esetben ezt a vegyületet a kálium-sója formájában választjuk el (lásd a 12. példát). Alternatív módon a Pro-Arg-(NH₂)-t használhatjuk a kondenzáció során közvetlenül is.

4,5 mg a fenti módon előállított Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-OH és 1 ml metanol elegyét éteres diazometánnal kezeljük, és HPLC-vel tisztítjuk (eluens: CH₃CN/H₂O/TFA 50:50:0,1 arányú elegye), így 4,3 mg (94%) metil-észtert kapunk. FAB tömegspektrum: m/z 841 (M + H)⁺. A termék nagynyomású folyadékkromatográfiával és vékonykromatográfián vizsgálva homogén.

11. példa

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítása terminális kondenzációval

Merrifield gyantához kötött Boc-Pro-t állítunk elő úgy, hogy Boc-Pro Merrifield gyantához való kapcsolására a cézium-sós módszert alkalmazzuk, így Boc-Pro-OCH₂-C₆H₄-gyantát kapunk, melyet a szintézis kiindulási anyagként használunk. A szintézist Beckman 990-B peptid szintetizátorban hajtjuk végre a következő módszer szerint.

Az aminosavak három mól ekvivalensnyi mennyiségét a megfelelő oldószerükben feloldjuk [4-MeBzl-Cys, Val, Phe Boc-származékait metilén-kloridban, Asn-t dimetil-formamidban, D-Tyr(Et)-t vagy BrBz-D-Tyr-t metilén-klorid/dimetil-formamid 1:1 arányú elegyében és 4-MeBzl-Pmp-t metilén-kloridban], és diciklohexil-karbodiimid (DCC) és 1-hidroxi-benzotriazol (HBT) ekvimoláris mennyiségének jelenlétében kapcsoljuk őket. Pmp kapcsolásakor a többitől eltérő módon 1,0 mól ekvivalens mennyiségű dimetil-amino-piridint alkalmazunk katalizátorként. A kapcsolat mérté-

két kvalitatív ninhidrin-próbával ellenőrizzük, és a kapcsolást szükség esetén megismételjük. A Boc-csoportokat trifluor-ecetsav/metilén-klorid 1:1 arányú elegye segítségével távolítjuk el, és mosás után a szabad aminosav 5% diizopropil-etil-amin tartalmú metilén-kloriddal szabadítjuk fel. A peptid szekvenciáját szilárd fázisú módszerrel ellenőrizzük mielőtt a 4-MeBzl-Pmp-t hozzákapcsoljuk és homogenitásáról megbizonyosodunk. Az utolsó kapcsolás után a gyantát megszáritva 2,24 g gyantához kötött peptidet kapunk a Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-OH vegyület esetén.

A hordozóhoz kötött fenti peptid 1,1 g-ját (0,5 millimól) 3 ml anizollal keverjük 60 percen keresztül 0 °C hőmérsékleten (jégfürdőn) 25 ml hidrogén-fluoridban. A hidrogén-fluoridot 0 °C hőmérsékleten vákuumban lepároljuk. A maradékot négyszer 20 ml etil-éterrel mossuk, és a peptidet háromszor 10 ml dimetil-formamiddal, háromszor 10 ml 20%-os ecetsavval és háromszor 10 ml 0,3 n ammónium-hidroxiddal eluáljuk.

A szűrletet 2 l gázmentesített vízhez adjuk és a pH-t 7,1-re állítjuk be koncentrált ammónium-hidroxid segítségével. Ezután kálium-(hexaciano-ferrát) 0,01 mól/l oldatát adjuk hozzá addig, amíg a sárga szín állandósul (41 ml). Ezt az oldatot ecetsavval pH = 4,7-re savanyítjuk és egy éjszakán át hűvös helyen tároljuk.

Az oldat pH-ját ammóniával 7-re állítjuk és 15 percen keresztül 30 g Bio-Rad AG-3 × 4 nedves, Cl⁻ formában lévő ioncserélő gyantával keverjük. Ezután ezt az oldatot lassan keresztülszűrjük további 30 g gyantán. A gyantát kétszer 400 ml 20%-os ecetsavval mossuk, és a szűrletet hűvös helyen egy éjszakán át tároljuk.

A szűrletet Baker C-18 márkanévű szilánnal bevont szilikagél töltetű tartalmú flash oszlopon (5 cm × 10 cm) vezetjük keresztül. Az oszlopot ezután 350 ml vízzel mossuk és a peptidet 500 ml, 0,25% trifluor-ecetsavat tartalmazó acetonitril/víz 1:1 arányú elegyével eluáljuk úgy, hogy 20 ml-es frakciókat engedünk rá az oszlopra.

A 11–17. frakciót egyesítjük és bepároljuk. A maradékot koncentrált ecetsavban oldjuk, vízzel hígítjuk és liofilizáljuk, így 189 mg Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH peptidet kapunk, melyet további tisztítás nélkül használunk fel a láncegyen módosított peptidek szintézisében.

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH analízise

Aminosav analízis:

Peptidtartalom: 55%.

Asp: 1,00; Val: 1,04;
Pro: 1,23; Tyr(Et): 1,43;
Cys: 0,35; Phe: 1,51.

HPLC: kielégítő.

A Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH analízise

Aminosav analízis:

Peptidtartalom: 82%

Asp: 0,97; Val: 1,05;
Pro: 1,10; Tyr: 0,99;
Cys: 0,39; Phe: 0,99.

HPLC: kielégítő.

(30% CH₃CN/70% 0,05 M KH₂PO₄; 2 ml/perc; 5 µC-18, k' = 6,14)

10 mg, az előzőekben ismertetett módon előállított Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OH és

1 ml metanol keverékét éteres diazo-metánnal kezeljük, majd preparatív HPLC-vel (eluens: 50% CH₃CN/50% H₂O/0,1% TFA) tisztítjuk, így 7,5 mg (74%) metil-észtert kapunk.

FAB-MS: m/z 938 (M + H)⁺

HPLC-vel és TLC-vel vizsgálva homogén.

29,7 mg, az előzőekben ismertetett módon előállított (0,0331 millimól) Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-

Cys-Pro-OH heptapeptidet és 0,0996 millimól Arg(NH₂)-t 400 µl dimetil-formamidban oldunk,

10,3 mg (0,05 millimól) diklohexil-karbodiimidet és 0,05 millimól dimetil-amino-piridint adunk hozzá, majd a reakcióelegyet 0–20 °C hőmérsékleten 4 órán keresztül keverjük. A dimetil-formamidot ezután vákuumban eltávolítjuk. A maradékot a

3. példában leírt módon kezeljük, így a kívánt Pmp-

D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂-t 45%-os kitermeléssel kapjuk.

12. példa

A Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Arg-NH₂ szintézise

A BHA-gyantához kötött Pmp(S-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(S-MeBzl)-Pro-D-Arg(Tos) lineáris peptidet szilárd fázisú módszerrel állítunk elő, mint azt a fentiekben ismertetettük. Így 1,0 millimól aminnak megfelelő 1,5 g benzhidril-amin-gyantát kapcsolunk egymás után a Boc-vel védett, háromszoros főlegben lévő aminosav-származékokhoz metilén-klorid és dimetil-formamid 1:1 arányú elegyében oldott DCC-t és HOB-t használva. A Pmp(S-MeBzl)-t DCC/DMAP segítségével kapcsoljuk.

A kapcsolási reakció teljessé válását Kaiser-próbával vagy kvantitatív ninhidrin-próbával ellenőrizzük. A kapcsolást újból elvégezzük, ha a próba negatív.

A hordozóhoz kapcsolt, védett peptidet egymás után metilén-kloriddal, metanollal, etil-acetáttal és metilén-kloriddal mossuk, majd a levegőn megszáritjuk. A peptidet 15 ml folyékony hidrogén-fluorid segítségével hasítjuk le a gyantáról 1 ml anizol jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül. A hidrogén-fluorid lehajtása és nagy vákuumban való szárítás után a gyantát háromszor 20 ml éterrel mossuk, majd kétszer 50 ml 50%-os ecetsavval, 50 ml 10%-os ecetsavval és 50 ml vízzel extraháljuk. Az egyesített extraktumokat vízzel 4 l-re hígít-

összehasonlító anyag 88%-ához képest). 1,5 g fenti terméket CCD segítségével butanol/víz/ecetsav 4:5:1 eleggyel tisztítva 1,13 g terméket kapunk. Ki-termelés: 75%.

VRK: $R_f(B) = 0,60$, $R_f(G) = 0,55$.

Peptidtartalom HPLC szerint: 99,1% az összeha-sonlító anyaghoz viszonyítva. Retenciós idő (30 cm, Bondapak C_{18} , acetonitril) 0,05 mol/l ammó-nium-dihidrogén-foszfát (pH=4,4) 30:70, 1 ml (perc)=30,5 perc, peptid-tartalom: 89%.

$[\alpha]_D^{25} = -54,5^\circ$ (c=1, metanol).

Preparatív HPLC oldószerelégei:

A oldószerelég:	95% etanol	3450 ml
	steril víz	4650 ml
	ammónium-acetát	15,4 ml
	ecetsav (0,025 mol/l)	12,0 ml
B oldószerelég:	95% etanol	3750 ml
	steril víz	4250 ml
	ammónium-acetát	15,4 ml
	ecetsav (0,025 mol/l)	12,0 ml

18. példa

Tmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

Tmp(MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA peptidil-gyanta prekursorzt szintetizálunk az 5. példában leírt módon 0,5 mmól mennyiségben. A gyantát 15 ml hidrogén-fluorid-dal kezeljük 1 ml anizol jelenlétében 0 °C hőmér-sékleten 1 órán keresztül. A hidrogén-fluoridot vá-kuumban eltávolítjuk, a gyantát etiléterrel mossuk, majd először DMF és utána TFA segítségével extraháljuk. Az extraktumokat 2,0 l vízzel hígítjuk, majd koncentrált NH_4OH -dal pH=7,2 értékre ál-lítjuk. Az oldatot 0,01 mol/l $K_3Fe(CN)_6$ oldattal sárga szín megjelenéséig titráljuk, 25 ml (az elméleti 50%-a). Ezután az oldatot jégecettel pH=4,5 ér-tékre állítjuk és Bio-Rex 70 (H^+ forma) töltetű osz-lopra visszük fel. Az oszlopot vízzel mossuk és piridin/ecetsav/víz 30:4:66 eleggyel eluáljuk. Az eluátumot bepároljuk és a maradékot 1% ecetsav-ból liofilizáljuk. Így 139 mg nyers peptidet kapunk.

A peptidet megoszlásos kromatográfiával Sephadex G—25-ön n-butanol/ecetsav/víz 4:1:5 eleggyel tisztítjuk. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük, szárazra pároljuk és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 80 mg részlegesen tisztított peptidet kapunk. Ezt tovább tisztítjuk preparatív HPLC segítésével Altex Ultrasphere C_{18} -on 62,5% víz/37,5% acetonitril/0,1% trifluor-ecetsav eluenssel. A meg-felelő frakciókat összegyűjtjük és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 43 mg tiszta peptidet kapunk.

Aminosav-analízis: Asp 1,04, Pro (570 nm) 1,37, Cys 0,29, Val 0,98, Tyr 0,95, Phe 0,92, Arg 1,00.

Peptid-tartalom: 68%, FAB tömegspektrometria m/z 1065 (M+H), 1063 (M+H),

HPLC (izokratikus): egy csúcs, Altex Ultrasphere C_{18} , 40% acetonitril/0,1% trifluor-ecetsav, $k' = 4,2$;

HPLC (gradiens): A=0,1% TFA, B=0,1% TFA acetonitrilben, 20—50% B, 10 perc, lineáris, 50% B, 10 perc $k' = 5,6$.

19. példa

Pmp-D-Ile-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

Pmp(MeBzl)-D-Ile-Phe-Val-Asn-Cys(MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA peptidil gyantát szintetizálunk az 5. példában leírt módon 0,5 mmól mennyiségben. A peptidet 15 ml hidrogén-fluoriddal és 1 ml anizollal 1 órán keresztül 0 °C hőmérsékleten kezelve lehasítjuk a gyantáról. A hidrogén-fluoridot vákuumban eltávolítjuk, a gyantát etil-éterrel mossuk, majd kétszer 50 ml dimetil-formamiddal és kétszer 50 ml 40% ecetsavval extraháljuk. Az extraktumokat vízzel 2 literre hígítjuk és koncentrált NH_4OH segítségével pH=7,2 értékre állítjuk. Az oldatot 0,01 mol/l $K_3Fe(CN)_6$ oldattal a sárga szín megjelenéséig titráljuk, 50 ml (az elméleti 100%-a). Ezután jégecettel pH=4,5 értékre állítjuk és Bio-Rex 70 (H^+ forma) töltetű oszlopra visszük. Az oszlopot vízzel mossuk és piridin/ecetsav/víz 30:4:66 eleggyel eluáljuk. Az eluátumot szárazra pároljuk és a maradékot 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 243 mg nyers peptidet kapunk.

152 mg nyers peptidet megoszlásos kromatográfiával Sephadex G—25-ön n-butanol/ecetsav/víz 4:1:5 eleggyel tisztítunk. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük, szárazra pároljuk és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 81 mg részlegesen tisztított peptidet kapunk. Ezt tovább tisztítjuk géliszűrőssel, Sephadex G—15-ön 0,2 n ecetsavval. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük és liofilizáljuk. Így 26,5 mg tiszta peptidet kapunk. FAB tömegspektrometria m/z 1001 (M+H), 999 (M—H), HPLC (izokratikus): Altex Ultrasphere C_{18} , 35% acetonitril/0,1% TFA, $k' = 7,6$, egy csúcs; HPLC (gradiens): A=0,1% TFA, B=0,1% TFA acetonitrilben, 20—50% B, 2 perc lineáris, 50% B, 20 perc, $k' = 11,4$, egy csúcs.

20. példa

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Lys-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ előállítás

Pmp(MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Lys(Cl-Z)-Asn-Cys(MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA peptidil gyantát szintetizálunk az 5. példában leírt módon 1,0 mmól mennyiségben. A gyantát 15 ml hidrogén-fluoriddal és 1 ml anizollal 0 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül kezeljük. A hidrogén-fluoridot vákuumban eltávolítjuk, a gyantát etiléterrel mossuk, majd kétszer 50 ml dimetil-formamiddal és kétszer 50 ml 40%-os ecetsavval extraháljuk. Az extraktumot vízzel 4 literre hígítjuk és koncentrált NH_4OH segítségével pH=7,2 értékre állítjuk. Az oldatot 0,01 mol/l $K_3Fe(CN)_6$ oldattal sárga szín megjelenéséig titráljuk. 110 ml (az elméleti 110%-a). Ezután jégecettel pH=4,5 értékre állítjuk és Bio-Rex 70 (H^+ forma) töltetű oszlopra visszük fel. Az oszlopot vízzel mossuk és piridin/ecetsav/víz 30:4:66 eleggyel eluáljuk. Az eluátumot szárazra pároljuk és a maradékot 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 628 mg nyers peptidet kapunk.

176 mg nyers peptidet megoszlásos kromatográfiával Sephadex G—25-ön n-butanol/ecetsav/víz

4:1:5 eleggyel tisztítunk. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük, szárazra pároljuk és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 73 mg részlegesen tisztított peptidet kapunk. Ezt tovább tisztítjuk gélszűréssel, Sephadex G—15-ön 0,2 n ecetsavval. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük és liofilizáljuk. Így 42 mg peptidet kapunk. Ezt tovább tisztítjuk preparatív HPLC segítségével Altex Ultrasphere C₁₈-on 29% acetonitril/0,1% TFA eluenssel. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük, szárazra pároljuk és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 34,5 g tiszta peptidet kapunk. FAB tömegspektrometria m/z 1108 (M+H), 1106 (M—H), HPLC (izokratikus): Altex Ultrasphere C₁₈, 40% acetonitril/0,1% TFA, k' = 3,2, egy csúcs; HPLC (gradiens): A=0,1% TFA, B=0,1 TFA acetonitrilben, 20—50%B, 20 perc, lineáris, 50% B, 10 perc, k' = 9,3, egy csúcs.

21. példa

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-D-Pro-Arg-NH₂ előállítás

Pmp(MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(MeBzl)-D-Pro-Arg(Tos)-BHA peptidil gyantát szintetizálunk az 5. példában leírt módon 0,5 mmól mennyiségben. A gyantát 15 ml hidrogén-fluoriddal és 1 ml anizollal kezeljük 0 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül. A hidrogén-fluoridot vákuumban eltávolítjuk, a gyantát etiléterrel mossuk, majd kétszer 50 ml dimetil-formamiddal és kétszer 50 ml 40% ecetsavval extraháljuk. Az extraktumot vízzel 4 literre hígítjuk és koncentrált NH₄OH segítségével pH=7,2 értékre állítjuk. Az oldatot sárga szín megjelenéséig 0,01 mól/l K₃Fe(CN)₆ oldattal titráljuk, 50 ml (az elméleti 100%-a). Ezután jégecettel pH=4,5 értékre állítjuk és Bio-Rex 70 (H⁺ forma) töltetű oszlopra visszük fel. Az oszlopot vízzel mossuk és piridin/ecetsav/víz 30:4:66 eleggyel eluáljuk. Az eluátumot szárazra pároljuk és a maradékot 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 219 mg nyers peptidet kapunk.

151 mg nyers peptidet megoszlásos kromatográfiával Sephadex G—25-ön n-butanol/ecetsav/víz 4:1:5 eleggyel tisztítunk. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük, szárazra pároljuk és 1% ecetsavból liofilizáljuk. Így 32 mg tisztított peptidet kapunk. FAB tömegspektrometria m/z 1079 (M+H), 1077 (M—H), HPLC (izokratikus): Altex Ultrasphere C₁₈, 45% acetonitril, 0,1% TFA, k' = 3,7, egy csúcs; HPLC (gradiens): A=0,1% TFA, B=0,1% TFA acetonitrilben, 20—50% B, 20 perc, lineáris, 50% B, 10 perc, k' = 10,8, egy csúcs.

22. példa

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-OBzl előállítás

20 mg (17,3 mmól) Pmp(ACM)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(ACM)-Pro-OBzl-benzilésztert elkeverünk 1940 ml metanollal, majd szűrjük. A szűrletet 22,1 g (86,4 mmól) jódd 2600 ml metanolban

felvett oldatához adagoljuk laboratóriumi szivattyúval 7—8 ml/perc sebességgel. A reakcióelegyet további 2 órán keresztül keverjük, majd 650 ml térfogatra bepároljuk. A kapott sötét piros oldatot 0,5 mól/l vizes nátrium-hidrogén-szulfid oldattal elegyítjük a szín megváltozásáig (mintegy 150 ml szükséges). Az oldatot csökkentett nyomáson 200 ml térfogatra bepároljuk, 200 ml vízzel elegyítjük és a metanolt eltávolítjuk, amelynek során szilárd terméket kapunk. A terméket 0,25 mól/l vizes nátrium-hidrogén-szulfid oldattal és hideg vízzel kezeljük, majd szűrjük. Szárítás után a szüredéket porítjuk és 4 órán keresztül 200 ml éter/he-xán 1:1 elegyben keverjük. Ezután szűrjük és súlyállandósáig szárítjuk. Így 15 g cím szerinti terméket kapunk (az elméleti 89,7%-a). Szilikagélen kloroform/metanol 95:5 eleggyel kromatografáljuk, az olvadáspont 143—145 °C, $[\alpha]_D^{25} = -72^\circ$ (c=1, metanol/metilénklorid 1:1), $[\alpha]_D^{25} = 90^\circ$,

FAB tömegspektrometria m/e (relatív intenzitás): 1036 (MNa-H⁺, 11,6), 1014 (M⁺, 100), 998 (27), 809 (88);

FAB (negatív ion): 1063 (4,5), 1012 (M⁻-2H, 100), 922 (56), 723 (48).

VRK: R_f(A)=0,48, R_f(G)=0,8;

HPLC: RT(A)=19,3 perc,

Elemanalízis a C₅₂H₆₇N₇O₁₀S₂ összegképlet alapján:

számolt: C 61,58%, H 6,66%, N 9,67%, S 6,32%,

talált: C 60,25%, H 6,67%, N 9,85%, S 6,89%.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás új, (I) általános képletű vegyületek, mely képletben

P jelentése Phe vagy Phe(4'-Alk), csoport,

X jelentése D-Leu, D-Ile, D-Tyr, vagy D-Tyr (Et) csoport,

Y jelentése NH₂, NHAlk, amennyiben Z jelentése egyszeres kötés, vagy -OH, csoport,

W jelentése D-Pro, L-Pro, vagy amennyiben Y és Z az általános képletből hiányzik, -OH csoport,

A jelentése Val, Abu, Ala, Gly, Lys, vagy Chg csoport,

Z jelentése D-Arg, L-Arg, vagy egyszeres kötés, ha Y jelentése -OH csoport,

n jelentése 0 vagy 1,

Alk jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport, előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy adott esetben védőcsoportokat tartalmazó (II) általános képletű vegyületet, mely képletben

X, P, A, W, Z és Y jelentése a fentiekben megadott,

Q¹ és Q² jelentése hidrogénatom vagy egy védőcsoport,

Cap jelentése β,β-cikloalkilén-propionsav, mely a β-helyzetben S- Q¹-csoportot és a cikloalkilén-láncban 4—5 szénatomot tartalmaz,

oxidatív úton ciklizálunk, adott esetben eltávolítjuk a védőcsoportokat, és kívánt esetben a következő reakciókat hajtjuk végre bármilyen sorrendben:

a kapott W helyén -OH csoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületet kívánt esetben (NH₂)-W-Z-Y képletű vegyülettel — amely kép-

letben W, Z, Y jelentése a fentiekben megadott — reagáltatunk egy karbodiimid jelenlétében, vagy a kapott, -OH csoportot tartalmazó (I) általános képletű $\text{Pro}(\text{OH})^7$ vegyületet kívánt esetben $(\text{NH}_2)\text{-Z-Y}$ általános képletű vegyülettel — amely képletben Z és Y jelentése a fentiekben megadott — reagáltatunk egy karbodiimid jelenlétében. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

2. Az igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (II) általános képletű vegyületet használunk, ahol Q^1 és Q^2 jelentése hidrogénatom, Cap, X, P, A, W, Z és Y jelentése az 1. igénypontban megadott. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (II) általános képletű vegyületet használunk, ahol Q^1 és Q^2 jelentése acetamino-metil-csoport, Cap, X, P, A, W, Z és Y jelentése az 1. igénypontban megadott. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ciklizációt jóid jelenlétében hajtjuk végre. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ciklizációt egy ferricianid jelenlétében hajtjuk végre. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az Y helyén -OH csoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületet $\text{Arg}(\text{NH}_2)$ -vel reagáltatjuk. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, mely képletben

n jelentése 1,
X jelentése D-Tyr(Et) csoport,
P jelentése Phe csoport,
A jelentése Val csoport,
W jelentése Pro csoport,
Z jelentése Arg csoport,
Y jelentése NH_2 csoport,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatjuk. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, mely képletben

n jelentése 1,
X jelentése D-Tyr(Et) csoport,
P jelentése Phe vagy Phe(4'-Et) csoport,
A jelentése Val vagy Abu csoport,
W jelentése L-Pro vagy D-Pro csoport,
Z jelentése Arg csoport és
Y jelentése NH_2 csoport,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatjuk. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

9. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1—8.

igénypontok bármelyike szerint előállított (I) általános képletű vegyületet — amely képletben P, X, Y, W, A, Z, n jelentése az 1. igénypontban megadott — egy gyógyászatilag alkalmas hordozóval és/vagy hígítószerezrel összekeverünk és gyógyászati készítménnyé szerelünk ki. (Elsőbbség: 1984. 02. 15.)

10. Eljárás új, (I) általános képletű vegyületek, amely képletben

P jelentése Phe csoport,
X jelentése D-Leu, D-Ile, D-Tyr vagy D-Tyr(Et) csoport,
Y jelentése NH_2 , NH-Alk vagy -OH csoport,
W jelentése Pro csoport,
A jelentése Val csoport,
Z jelentése D-Arg vagy L-Arg csoport,
n jelentése 1,

Alk jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport, előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy adott esetben védőcsoportokat tartalmazó (II) általános képletű vegyületet, amely képletben X, P, A, W, Z és Y jelentése a tárgyi körben megadott, Q^1 és Q^2 jelentése hidrogénatom vagy egy védőcsoport,

Cap jelentése β,β -cikloalkilén-propionsav, amely a β -helyzetben S- Q^1 -csoportot és a cikloalkilén-láncban 5 szénatomot tartalmaz, oxidatív úton ciklizálunk és az adott esetben jelenlévő védőcsoportokat eltávolítjuk. (Elsőbbség: 1983. 02. 16.)

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (II) általános képletű vegyületet használunk, ahol Q^1 és Q^2 jelentése hidrogénatom, Cap, X, P, A, W, Z és Y jelentése a 10. igénypontban megadott. (Elsőbbség: 1983. 02. 16.)

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ciklizációt egy ferricianid jelenlétében hajtjuk végre. (Elsőbbség: 1983. 02. 16.)

13. A 10. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, amely képletben

X jelentése D-Tyr(Et) csoport,
Y jelentése NH_2 csoport,
P, A, W, Z és n jelentése a 10. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatjuk. (Elsőbbség: 1983. 02. 16.)

14. Eljárás az (I) általános képletű vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 10—13. igénypontok bármelyike szerint előállított (I) általános képletű vegyületet — amely képletben P, X, Y, W, A, Z, n jelentése a 10. igénypontban megadott — egy gyógyászatilag alkalmas hordozóval és/vagy hígítószerezrel összekeverünk és gyógyászati készítménnyé szerelünk ki. (Elsőbbség: 1983. 02. 16.)

1 db rajz

