(19) HU

MAGYAR NÉPKÖZTÁRSASÁG

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
197759 B

(22) A bejelentés napja: 85.05.17. (21) 1870/85
(33) US:
(32) 84.05.18.
(31) 611 844

(51) Int.Cl$_4$
C 07 K 7/10

ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

(41) (42) A közzététel napja: 1986.01.28.

(45) Megjelent: 1989.12.27.

Országos Találmányi Hivatal
Szabadalmi Tár.
TULAJDONA

(72) Feltalálók:
VALE Wylie jnr., RIVIER Jean Edouard Frederic, La Jolla, Kalifornia, US

(73) Szabadalmas:
The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, Kalifornia, US

(54) ELJÁRÁS A NÖVEKEDÉSI HORMON FELSZABADÍTÓ FAKTOR ANALÓGJAI ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az R_1-R_2-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}-Gly-Gln-Leu-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{24}-R_{25}-Ile-Nle-W (I) általános képletű szintetikus peptidek előállítására.

Az (I) általános képletben

R_1 jelentése Tyr, D-Tyr, Ac-Tyr, His, vagy N^{α}-metil-D-tyr;
R_2 jelentése Ala vagy N^{α}-metil-D-Ala;
R_{10} jelentése Tyr vagy D-Tyr,
R_{14} jelentése Leu vagy D-Leu;
R_{18} jelentése Tyr vagy Ser;
R_{28} jelentése Asn vagy Ser;
R_{29} jelentése Arg vagy D-Arg;
W jelentése -NHR, -R_{28}-NHR, -R_{28}-R_{29}-NHR vagy R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-NHR és R jelentése hidrogénatom vagy etilcsoport, és
R_8 jelentése Asn, R_{12} jelentése Lys, R_{13} jelentése Val, R_{24} jelentése Gln, R_{25} jelentése Asp, vagy
R_8 jelentése Ser, R_{12} jelentése Arg, R_{13} jelentése Ile, R_{24} jelentése His, R_{25} jelentése Glu, és W jelentése -Asn-R_{29}-NHR,

azzal a megkötéssel, hogy R_2 jelentése N^{α}-metil-D-Ala vagy R_{14} jelentése D-Leu és/vagy R_{29} jelentése D-Arg.

A fenti peptidek elősegítik az agyalapi mirigy növekedési hormon-elválasztását.

A jelen találmány tárgya eljárás olyan új peptidek előállítására, amelyek befolyásolják az emberek és más állatok agyalapi mirigyének működését. Részletesebben, a találmány tárgya eljárás olyan peptidek előállítására, amelyek elősegítik a növekedési hormonnak az agyalapi mirigyből való felszabadulását.

Az élettannal foglalkozó szakemberek már régen felismerték, hogy az adenohipofízis (az agyalapi mirigy egyik része) működését a hipotalamusz szabályozza az általa termelt különleges hormonok révén, ezek az anyagok serkentik vagy gátolják az agyalapi mirigy összes hormonjának kiválasztását. 1972-ben leírták a hipotalamusz által termelt egyik gátló anyagot, a szomatosztatint, amely gátolja a növekedési hormon kiválasztását. 1982-ben humán (emberi) hasnyálmirigy--daganatok kivonataiból elkülönítettek egy növekedési hormon releasing faktort (serkentő anyagot) [human pancreatic (tumor) growth hormon releasing factor, rövidítése: hpGRF], megtisztították, szerkezetét felderítették, szintetikus úton előállították és megvizsgálták. A vizsgálat során megfigyelték, hogy ez az anyag elősegíti a növekedési hormon felszabadulását az agyalapi mirigyben. E két, az agyalapi mirigyre ható faktort totálszintézissel is előállították, és elkészítették e természetes anyagok egyes analógjait is. Az az elfogadott nézet, hogy a humán hipotalamusz által termelt növekedési hormon releasing faktornak pontosan ugyanaz a szerkezete, mint a fentiekben másodikként említett vegyületnek. Így e vegyületet a továbbiakban humán növekedési hormon releasing faktornak nevezzük. A patkány hipotalamusz által termelt, megfelelő növekedési hormon releasing faktor, valamint a sertés hipotalamusz által termelt, megfelelő növekedési hormon releasing faktor, továbbá a szarvasmarha hipotalamusz által termelt, megfelelő növekedési hormon releasing faktor szerkezetét ugyancsak felderítették, és a vegyületeket szintetikus úton is előállították.

A jelen munka során szintetikus peptideket állítottunk elő és vizsgáltunk, e polipeptidek az agyalapi mirigy sejtjeinek tenyészetéből növekedési hormont szabadítanak fel, és legalább részben ellenállnak a szervezetben végbemenő enzimes bomlásnak, továbbá hatásuk lényegesen erősebb.

A jelen találmány szerinti vegyületek olyan peptidanalógok, amelyekben a peptidlánc 27—32 aminosavból épül fel. Az ilyen peptideket tartalmazó gyógyászati készítményeket az ember- és állatgyógyászati klinikai gyakorlatban gyógyászati, valamint diagnosztikai célokra használhatjuk. Ezenkívül a készítmények alkalmazhatók arra is, hogy elősegítsük melegvérű állatok, beleértve a szárnyasokat is, növekedését, továbbá a mezőgazdaságban hidegvérű állatok, például halak, angolna és más, hasonlók növekedését.

A peptidek leírására a Schröder és Lübke által meghatározott [The Peptides (A peptidek), Academic Press, 1965] nevezéktant használjuk, ahol az N-terminális aminocsoportja a szokásos módon a képlet bal oldalára kerül, és a C-terminális karboxilcsoportja a képlet jobb oldalán helyezkedik el. Természetes aminosavakon a szokásos, a természetben előforduló aminosavakat értjük, ezek a glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin, lizin, arginin, aszparginsav, aszparagin, glutaminsav, glutamin, cisztein, metionin, fenil-alanin, tirozin, prolin, triptofán és a hisztidin. Ha egy aminosav izomerek formájában létezhet, akkor a megadott rövidítések az L-izomereket jelölik, illetve az ettől való eltéréseket külön megadjuk. Az N^{α}-metil-D-alanin- az alanin D-izomerjének az α-aminocsoporton metilcsoporttal helyettesített származéka.

A találmány tárgya eljárás az R_1-R_2-Asp--Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}--Gly-Gln-Leu-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-R_{24}--R_{25}-Ile-Nle-W (I) általános képletű ahol

R_1 jelentése Tyr, D-Tyr, Ac-Tyr, His, vagy N^{α}--metil-D-Tyr,

R_2 jelentése Ala vagy N^{α}-metil-D-Ala;

R_{10} jelentése Tyr vagy D-Tyr;

R_{14} jelentése Leu vagy D-Leu;

R_{18} jelentése Tyr vagy Ser;

R_{28} jelentése Asn vagy Ser;

R_{29} jelentése Arg vagy D-Arg;

W jelentése -NHR, -R_{28}-NHR, R_{28}-R_{29}-NHR vagy R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-NHR és R jelentése hidrogénatom vagy etilcsoport, és

R_8 jelentése Asn, R_{12} jelentése Lys, R_{13} jelentése Val, R_{24} jelentése Gln, R_{25} jelentése Asp, vagy

R_8 jelentése Ser, R_{12} jelentése Arg, R_{13} jelentése Ile, R_{24} jelentése His, R_{25} jelentése Glu, és W jelentése -Asn-R_{29}-NHR,

azzal a megkötéssel, hogy R_2 jelentése N^{α}-metil-D-Ala vagy R_{14} jelentése D-Leu és/vagy R_{29} jelentése D-Arg szintetikus peptidek előállítására.

A találmány szerinti kiindulási peptideket valamely alkalmas módszerrel állítjuk elő, például kizárólag szilárd fázisú módszerrel, részben szilárd fázisú módszerrel, fragmens--kondenzáció útján vagy a klasszikus, oldatban lefolyatott szintézissel. A közelmúltban kidolgozott rekombinációs dezoxi-ribonukleinsavas módszer is alkalmazható a növekedési hormon analógja egy olyan részletének előállítására, amely csak természetes aminosavakat tartalmaz, majd ezt a részletet hozzákapcsolhatjuk valamely, az N-terminálisan lévő rövid peptidlánchoz. Így például a kizárólag szilárd fázisú szintézis módszerét a „Solid-Phase Peptide Synthesis" (Szilárd fázisú peptid-szintézis, Stewart and Young, Freeman and Co., San Francisco, 1969) című tankönyv írja le, további példákat ismertet Vale és munkatársai 1978. augusztus 8-án

közzétett 4,105,603. számú amerikai szabadalmi leírása. A klasszikus, oldatban lefolytatott szintézis módszereit részletesen ismerteti a „Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden" [A szerves kémia módszerei, (Houben-Weyl), A peptidek szintézise, szerkesztette: E. Wunsch, 1974, Georg, Thieme Verlag, Stuttgart, NSZK] című mű. A fragmens-kondenzációs szintézis-módszert például a 3,972,859. számú, 1976. augusztus 3-án közzétett amerikai szabadalmi leírás ismerteti. További alkalmas módszereket találhatunk a 3,842,067. számú (1974. október 15.) és 3,862,925. számú (1975. január 28.) amerikai szabadalmi leírásokban.

E módszerek közös vonása az, hogy a különféle aminosavak oldalláncában szereplő reakcióképes csoportokat alkalmas védőcsoportokkal megvédjük, e védőcsoportok megakadályozzák, hogy az adott helyen kémiai reakció játszódjék le, mindaddig míg a védőcsoportot véglegesen le nem hasítjuk. E módszereknek általában az is közös jellemzője, hogy egy adott aminosav vagy fragmens α-aminocsoportját megvédjük, és így reagáltatjuk a molekula karboxilcsoportját, majd ezután az α-aminocsoport védőcsoportját szelektíven eltávolítjuk, majd így visszük reakcióba a szabaddá tett aminocsoportot. Ennek megfelelően e módszerek közös vonása, hogy a szintézis egyik lépéseként egy olyan köztiterméket állítunk elő, amely már tartalmazza a peptidláncban valamennyi szükséges aminosavat, a kívánt sorrendben, továbbá az egyes aminosavak oldalláncában szereplő csoportok védőcsoportokat viselnek.

A találmány szerint úgy járunk el, hogy X^1-R_1(X vagy X^2)-R_2-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-R_8(X^4 vagy X^5)-Ser-(X^4)-R_{10}(X^2)-Arg(X^6)-R_{12}(X^6 vagy X^7)-R_{13}-R_{14}-Gly-Gln-(X^5)-Leu-R_{18}(X^2)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-Leu-R_{24}(X vagy X^5)-R_{25}(X^3)-Ile-Nla-Y

(II) általános képletű köztitermékről, ahol a fenti általános képletben X, X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6 és X^7 jelentése egyaránt hidrogénatom vagy a peptidkémiában önmagában ismert védőcsoport,

X^9 jelentése hidrogénatom, a peptidkémiában önmagában ismert védőcsoport vagy a peptidkémiában önmagában ismert gyanta-hordozó,

R_1, R_2, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{18}, R_{24}, R_{28}, és R_{29} a fenti, és Y — NHX^9, -R_{28}(X^4 vagy X^5)-NHX^9, R_{28}(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-GLN(X^5)-Gln-(X^5)-Gly-NHX^9, NHZ, -R_{28}(X^4 vagy X^5)-NHZ, -R_{28}(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-NHZ vagy -R_{28}(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln-(X^5)-Gly-NHZ csoport, ahol Z etilcsoport vagy a peptidkémiában önmagában ismert gyanta-hordozó, a peptidkémiában önmagában ismert módon lehasítjuk a védőcsoportot vagy védőcsoportokat és/vagy lehasítjuk a peptidet a gyantáról.

Az X^1 helyén szereplő, az α-aminocsoport védésére alkalmas csoportok a polipeptidek „stepwise„-szintézisében szokásosan alkalmazott védőcsoportok lehetnek. Az α-aminocsoportok védésére használt X^1 csoport lehet például

1) aromás uretán-típusú védőcsoport, mint például fluorenil-metoxi-karbonil-csoport, benziloxi-karbonil-csoport vagy helyettesített benziloxi-karbonil-csoport, mint például p-klór-benziloxi-karbonil-csoport, p-nitro-benziloxi-karbonil-csoport, p-bróm-benziloxi-karbonil-csoport vagy p-metoxi-benziloxi-karbonil-csoport;

2) alifás uretán-típusu védőcsoport, mint például tercier-butoxi-karbonil-csoport, diizopropil-metoxi-karbonil-csoport, izopropoxi-karbonil-csoport, etoxi-karbonil-csoport vagy alliloxi-karbonil-csoport; vagy

3) cikloalifás uretán-típusu védőcsoport, mint például ciklopentil-oxi-karbonil-csoport, adamantiloxi-karbonil-csoport vagy ciklohexiloxi-karbonil-csoport.

Az α-aminocsoport védésére előnyösen tercier-butoxi-karbonil-csoportot használunk, még abban az esetben is, ha a peptidlánc 1-es helyén N^{α}-metil-helyettesítő van.

X jelentése hidrogénatom vagy a hisztidin imidazolgyűrűje 1-es nitrogénatomjának védésére alkalmas védőcsoport, például p-toluol-szulfonil-csoport.

X^2 jelentése lehet a tirozin fenolos hidroxilcsoportjának védésére alkalmas védőcsoport, például tetrahidro-piranilcsoport, tercier-butil-csoport, tritilcsoport, benzilcsoport, 2-karboxi-benzoil-csoport, 4-bróm-2-karboxi-benzoil-csoport vagy 2,6-diklór-benzil-csoport. Előnyös védőcsoport a 2,6-diklór-benzil-csoport.

X^2 jelentése lehet hidrogénatom is, ez azt jelenti, hogy az adott helyen lévő aminosav oldalláncát nem védjük.

X^3 jelentése hidrogénatom vagy az aszparaginsav vagy glutaminsav karboxilcsoportjának védésére alkalmas észteresítő csoport, például benzilcsoport, 2,6-diklór-benzil-csoport, metilcsoport vagy etilcsoport.

X^4 jelentése lehet a treonin vagy szerin hidroxilcsoportjának védésére alkalmas védőcsoport, például acetilcsoport, benzoilcsoport, tercier-butil-csoport, tritilcsoport, tetrahidro-piranil-csoport, benzilcsoport, 2,6-diklór-benzil-csoport vagy 2-karboxi-benzoil-csoport. Előnyös védőcsoport a benzilcsoport.

X^4 jelentése lehet hidrogénatom is, ez azt jelenti, hogy a hidroxilcsoportot nem védjük.

X^5 jelentése hidrogénatom vagy az aszparagin vagy glutamin oldalláncában lévő amidocsoport védésére alkalmas védőcsoport, és előnyösen xantilcsoport.

X^6 jelentése az arginin guanidinocsoportjának védésére alkalmas védőcsoport, például nitrocsoport, p-toluol-szulfonil-csoport, 2-karboxi-benzoil-csoport, adamantiloxi-

-karbonil-csoport vagy tercier-butoxi-karbonil-csoport, vagy pedig hidrogénatom.

X^7 jelentése hidrogénatom vagy a lizin oldalláncában lévő aminocsoport védésére alkalmas védőcsoport, például 2-klór-benziloxi--karbonil-csoport, p-toluol-szulfonil-csoport, tercier-amiloxi-karbonil-csoport vagy tercier-butoxi-karbonil-csoport.

X^8 jelentése hidrogénatom vagy valamely, a fentiekben általában megadott oldallánc--védőcsoport.

A metionint adott esetben oxigénatommal védhetjük, de előnyösen nem védjük.

Nem döntő jelentőségű, hogy milyen védőcsoportot választunk egy aminosav oldalláncában szereplő aminocsoport védésére, általában azonban olyan védőcsoportot választunk, amely az α-aminocsoport védőcsoportjának lehasítása során nem hasad le. Bizonyos aminosavak, például hisztidin esetében általában a kapcsolás után nem szükséges ezt az oldalláncban lévő aminocsoportot védeni, ilyen esetekben ugyanazokat a védőcsoportokat alkalmazhatjuk.

Ha egy szilárd gyanta-hordozót alkalmazunk, akkor X^9 jelentése például -NH-[benzhidril-amin-gyanta] vagy -NH-[p-metil-benzhidril-amin-gyanta] lehet. Ha helyettesítetlen amidot kívánunk előállítani, akkor előnyösen benzhidril-amin-gyantát vagy metil-benzhidril-amin-gyantát használunk, ugyanis az ezen gyantákról való lehasítás útján közvetlenül az amidot kapjuk. Abban az esetben, ha N-etil-amidot kívánunk előállítani, akkor ezt egy N-etil-benzhidril-amin-gyantával valósítjuk meg. Amennyiben más helyettesítőket viselő amidokat kívánunk előállítani, vagy a C-terminálison a szabad karboxilcsoporttól eltérő csoportokat kívánunk kiépíteni, akkor a peptidet előnyösen a Houben-Weyl-műben leírt klasszikus módszerekkel állítjuk elő.

A találmány szerinti köztitermékek fenti képletében az X-csoportok közül legalább az egyiknek a jelentése valamely védőcsoport vagy pedig X^9 tartalmazza a gyanta-hordozót.

A peptidek szintézise során egy adott oldalláncban alkalmazott védőcsoport megválasztásánál a következő általános szabályokat kell szem előtt tartanunk:

a) a védőcsoportnak a kapcsolási reakció körülményei között meg kell tartania védő tulajdonságait és nem szabad lehasadnia,

b) a védőcsoportnak az alkalmazott reagenssel szemben stabilnak kell lennie, és a xantilcsoport kivételével előnyösen stabilnak kell lennie a szintézis egyes lépéseiben az α-aminocsoport védőcsoportjának lehasításához választott reakciókörülmények között, és

c) a kívánt aminosavakat tartalmazó peptidlánc szintézise után az oldalláncban alkalmazott védőcsoportot olyan reakciókörülmények között lehessen lehasítani, amelyek nem változtatják meg a peptidláncot nem kívánatos módon.

A találmány szerinti peptideket előnyösen a szilárd fázisú szintézissel állítjuk elő, e szintézist Merrifield [J. Am. Chem. Soc., **85**, 2149 (1963)] írta le általánosságban, de használhatunk más, önmagában ismert, ezzel egyenértékű kémiai szintézis-módszereket is, amint ezt a fentiekben is említettük. A szilárd fázisú szintézist a peptid C-terminálisán kezdjük, oly módon, hogy valamely, az α-aminocsoportján védett aminosavat egy alkalmas gyantához kapcsolunk. Egy ilyen kiindulási anyagot úgy állíthatunk elő, hogy valamely, az α-aminocsoportján védett aminosavat amidkötéssel egy benzhidril-amin-gyantához vagy metil-benzhidril-gyantához kapcsolunk.

A benzhidril-amin- és metil-benzhidril--amin-típusú gyanta-hordozók a kereskedelemben kaphatók, ezeket általában csak olyan esetekben használjuk, ha az előállítani kívánt polipeptid a C-terminálisán helyettesítetlen karboxamido-csoportot tartalmaz.

Először a C-terminális aminosavat, például tercier-butoxi-karbonil-csoporttal és xantilcsoporttal védett aszparagint kapcsolhatjuk a gyantához, például K. Horiki és munkatársai módszerével (Chemistry Letters, **1978**, 165—168.), dimetil-formamidban, kálium--fluorid jelenlétében, körülbelül 60°C hőmérsékleten, 24 órás keveréssel, így kezdjük meg a 43 aminosavból álló peptidlánc kiépítését. Miután a védett aminosavat rákapcsoltuk a gyanta-hordozóra, az α-aminocsoport védőcsoportját diklór-metánban trifluor-ecetsavval vagy csak trifluor-ecetsavval lehasítjuk. A védőcsoport lehasítását körülbelül 0°C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten végezzük. Használhatunk, más önmagában ismert, szokásos lehasító reagenseket, például dioxános sósav-oldatot, és az α-aminocsoport védésére szolgáló egyes védőcsoportok lehasítására alkalmas reakciókörülményeket, amint ezt Schröder and Lübke, a „The Peptides" (A peptidek, I. kötet, 72—75. oldal, Academic Press, 1965) című műben leírta.

Az α-aminocsoport védésére szolgáló védőcsoport lehasítása után a többi, az α-aminocsoporton és az oldalláncban védett aminosavat egymás után, a kívánt sorrendben kapcsoljuk a már meglévő részhez, és így állítjuk elő a fentiekben meghatározott köztiterméket. Eljárhatunk úgy-is, hogy a szintézis során nem egyenként kapcsoljuk az egyes aminosavakat, hanem néhányat ezek közül külön összekapcsolhatunk, majd ezután az így kapott peptidet kapcsoljuk a szilárd fázisú szintézishez használt reaktorban. A kapcsoláshoz használt reagens megválasztásának szempontjai a szakemberek előtt ismeretesek. A kapcsoláshoz különösen jól alkalmazható a N,N'-diciklohexil-karbodiimid.

A szilárd fázisú peptid-szintézis során használható aktiválószerek a peptidkémiában járatos szakemberek előtt ismeretesek. Alkalmas ilyen aktiválószerek például a karbodiimidek, mint például az N,N'-diizopropil-kar-

bodiimid és az N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid. További aktiválószereket és a peptidek kapcsolásához való alkalmazásukat Schröder és Lübke fent idézett művének 3. fejezete írja le, továbbá Kapoor, J. Pharm. Sci. **59**, 1—27 (1970).

Valamennyi védett aminosavat vagy peptidet körülbelül négyszeres vagy ennél nagyobb fölöslegben visszük be a szilárd fázisú szintézishez használt reaktorba, és a kapcsolást dimetil-formamid és diklór-metán 1:1 arányú elegyében vagy tiszta dimetil-formamidban vagy tiszta diklór-metánban végezzük. Ha a kapcsolás nem megy végbe tökéletesen, akkor az α-aminocsoport védőcsoportjának lehasítása és a következő aminosavval való kapcsolás előtt ezt a kapcsolási műveletet megismételjük. Ha a szintézist kézi vezérléssel végezzük, akkor a kapcsolási reakció sikerét a szintézis minden egyes lépésében a ninhidrin-reakcióval ellenőrizzük, amint ezt E. Kaiser és munkatársai leírták [Anal. Biochem, **34**, 595 (1970)]. A kapcsolási reakciókat elvégezhetjük automatikus úton is, például egy Beckman 990 típusú automata szintetizátorral, például a Rivier és munkatársai által leírt (Biopolymers, 1978, **17**, 1927—1938) program alkalmazásával.

A kívánt aminosavakat a megfelelő sorrendben tartalmazó peptidlánc kiépítése után a köztitermékként kapott peptidet valamely reagenssel, például cseppfolyós fluor-hidrogénsavval való kezelés útján lehasíthatjuk a gyanta-hordozóról, ez a reagens nemcsak a peptidet hasítja le a gyantáról, hanem az X, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7 és X^8 védőcsoportokat is lehasítja, továbbá az X^9 helyén szereplő, a gyantához kapcsoló kémiai kötést is, továbbá az α-aminocsoporthoz adott esetben kapcsolódó X^1 védőcsoportot is, és így a peptidet szabad sav formájában kapjuk. Ha a peptidláncban metionin is van jelen, akkor előnyösen először trifluor-ecetsav és 1,2-dimerkapto-etán-alkalmazásával lehasítjuk a tercier-butoxi-karbonil-csoportot, majd ezután hasítjuk le a peptidet a gyantáról fluor-hidrogénsav segítségével, hogy így kiküszöböljük az esetleges S-alkilezést. Ha a hasításhoz fluor-hidrogénsavat használunk, akkor a reakcióelegyhez segédanyagként anizolt és metil-etil-szulfidot is adunk.

Az alábbi példákkal a szilárd fázisú peptid-szintézis előnyös kivitelezési változatait szemléltetjük, nyilvánvaló azonban, hogy valamely megfelelő, rövidebb peptid fragmenst ugyanilyen módon állíthatunk elő, és ennek során egyszerűen elhagyunk megfelelő számú aminosavat a peptidlánc egyik vagy másik végéről. Jelenleg azonban az az álláspontunk, hogy a biológiailag aktív fragmenseknek az N-terminálison a megadott aminosavakat kell a megadott sorrendben tartalmazniuk.

A találmány szerinti eljárást a továbbiakban, a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül, példákkal szemléltetjük.

A jelen leírásban az alábbi rövidítéseket alkalmazzuk:

GH	növekedési hormon (growth hormon)
hpGRF	emberi hasnyálmirigy-daganatból elkülönített növekedési hormon releasing faktor [human pancreatic (tumor) growth hormon releasing factor]
rGRF	patkány növekedési hormon releasing faktor (rat growth hormon releasing factor)
pGRF	sertés növekedési hormon releasing faktor (porcine growth hormon releasing factor)
bGRF	szarvasmarha növekedési hormon releasing faktor (bovine growth hormon releasing factor)
Gly	glicin
Ala	alanin
Val	valin
Leu	leucin
Ile	izoleucin
Ser	szerin
Thr	treonin
Lys	lizin
Arg	arginin
Asp	aszparaginsav
Asn	aszparagin
Glu	glutaminsav
Gln	glutamin
Cys	cisztein
Met	metionin
Phe	fenil-alanin
Tyr	tirozin
Pro	prolin
Trp	triptofán
His	hisztidin
Nle	norleucin
Nva	norvalin
pCl-Phe	(p-klór-fenil)-alanin
N^{α}-Me-D-Ala	N^{α}-metil-D-alanin
D-NMA	N^{α}-metil-D-alanin
N^{α}-MeTyr	N^{α}-metil-tirozin
C^{α}MePhe	C^{α}-metil-fenil-alanin
C^{α}MeLeu	C^{α}-metil-leucin
C^{α}MeHis	C^{α}-metil-hisztidin
N^{α}MeHis	N^{α}-metil-hisztidin
Ac	acetilcsoport
BOC	tercier-butoxi-karbonil-csoport

1. példa

A [D-NMA^2, Nle^{27}]-hGRF(1—29)-NH_2 képlettel jellemezhető, H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2 képletű peptidet stepwise módszerrel, egy Beckmann 990 típusú peptid-szintetizátorban állítjuk elő egy metil-benzhidril-amin-gyantán, amelynek kapacitása körülbelül 0,1—0,5 millimól/g gyanta. A p-toluol-szulfonil-csoporttal arginint a 4 292 313. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett általános módszerrel kapcsoljuk a gyantához.

A védőcsoport lehasítása és semlegesítése után a peptidláncot lépésenként építjük ki a gyantán. A védőcsoport lehasítását, a semlegesítést és az egyes aminosavakkal való kapcsolást általában a J. Rivier által részletesen leírt [J. Amer. Chem. Soc., **96**, 2986—2992 (1974)] módszerrel végezzük. A szintézis során használt összes oldószert gondosan levegőmentesítjük oly módon, hogy valamely semleges gázt, például héliumot vagy nitrogént vezetünk bele, hogy ezáltal biztosítsuk az oxigénmentes közeget, ugyanis az oxigén nemkívánatos módon oxidálhatná a metioninban jelenlévő kénatomot.

A védőcsoport lehasítását előnyösen az alábbi A-műveletsor szerint végezzük:

A-műveletsor

	Reagens	Keverési idő, perc
1.	60 % trifluor-ecetsav/2 % 1,2-dimerkapto-etán	10
2.	60 % trifluor-ecetsav/2 % 1,2-dimerkapto-etán	15
3.	1 %-os izopropanolos 1,2-dimerkapto--etán-oldat	0,5
4.	10 %-os, diklór-metános trietil-amin--oldat	0,5
5.	Metanol	0,5
6.	10 %-os, diklór-metános trietil-amin--oldat	0,5
7.	Metanol /kétszer/	0,5
8.	Diklór-metán /kétszer/	0,5

A kapcsolásokat előnyösen az alábbi B-műveletsor szerint végezzük:

B-műveletsor

	Reagens	Keverési idő, perc
9.	Diciklohexil-karbodiimid	-
10.	Tercier-butoxi-karbonilcsoporttal védett aminosav	50-90
11.	Metanol /kétszer/	0,5
12.	Diklór-metán /kétszer/	0,5
13.	3 molos, diklór-metános ecetsav-anhidrid--oldat	15,0
14.	Diklór-metán	0,5
15.	Metanol	0,5
16.	Diklór-metán /kétszer/	0,5

6

Röviden úgy járunk el, hogy a gyanta 1 grammjára számítva 1—2 millimól, tercier-butoxi-karbonil-csoporttal védett aminosavat használunk diklór-metánban, plusz egy egyenértéknyi mennyiségű, 1,0 mólos diklór-metános diciklohexil-karbodiimid-oldatot, és az elegyet 2 órán át keverjük. A tercier -butoxi-karbonil-csoporttal és p-toluol-szulfonil-csoporttal védett arginin kapcsolását dimetil-formamid és diklór-metán 1:1 arányú elegyében végezzük. A szerin és a treonin oldalláncában jelenlévő hidroxilcsoportot benzil-éter formájában védjük. Az aszparagin vagy glutamin amidocsoportját a diciklohexil-karbodiimiddel végzett kapcsolás során előnyösen xantilcsoporttal védjük. Az aszparagin vagy glutamin karboxilcsoportjának aktiválására p-nitro-fenil-észtercsoportot használunk, és például a tercier-butoxi-karbonil-csoporttal védett aszparagin p-nitro-fenil-észterét úgy kapcsolhatjuk, hogy a reakciót egy egyenértéknyi mennyiségű 1-hidroxi-benzotriazol jelenlétében, dimetil-formamid és diklór-metán 1:1 arányú elegyében végezzük, éjszakán át. Ebben az esetben diciklohexil-karbodiimidet nem adunk a reakcióelegyhez. A lizin oldalláncának védésére 2-klór-benziloxi-karbonil-csoportot használunk. Az arginin guanidinocsoportjának és a hisztidin imidazolgyűrűje 1-es nitrogénatomjának védésére p-toluol-szulfonilcsoportot használunk, és a glutaminsav vagy aszparaginsav oldalláncának karboxilcsoportját benzil-észter formájában védjük. A tirozin fenolos hidroxilcsoportját 2,6-diklór-benzil-csoporttal védjük.

A szintézis végeredményeképpen a BOC-$^{\alpha}$Tyr(X^2)-D-NMA-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr-(X^4)-Asn(X^5)-Ser(X^4)-Tyr(X^2)-Arg(X^6)-Lys-(X^7)-Val-Leu-Gly-Gln(X^5)-Leu-Ser(X^4)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-Leu-Gln(X^5)-Asp(X^3)-Ile-Nle-Ser(X^4)-Arg(X^9) általános képletű vegyületet kapunk, ahol a fenti általános képletben

X^2 jelentése 2,6-diklór-benzil-csoport,
X^3 jelentése O-benzilcsoport,
X^4 jelentése benzilcsoport,
X^5 jelentése xantilcsoport,
X^6 jelentése p-toluol-szulfonil-csoport,
X^7 jelentése 2-klór-benziloxi-karbonil-csoport, és
X^9 jelentése -NH-[gyanta] általános képletű csoport.

Az α-aminocsoport védőcsoportjának lehasításához használt trifluor-ecetsav hatására a xantilcsoport részlegesen vagy teljesen lehasadhat.

A gyantához kapcsolt védett peptid védőcsoportjainak eltávolítása és a gyantáról való lehasítás céljából ezt a terméket a gyantához kötött peptid 1 grammjára számított 1,5 ml anizollal, 0,5 ml metil-etil-szulfiddal és 15 ml fluor-hidrogénsavval kezeljük —20°C hőmérsékleten félórán át, majd 0°C hőmérsékleten újabb félórán át. Ezután a fluor-hidrogénsavat nagymértékben csökkentett nyomáson eltávolítjuk, a gyantát és a peptidet tartalmazó maradékot felváltva vízmentes dietil-éterrel és kloroformmal mossuk, majd a peptidet levegőmentesített 2 normál vizes ecetsav-oldattal kivonatoljuk, és a gyantát kiszűrjük. A hasítás kitermelése lényegében 100%.

A gyantáról lehasított és védőcsoportokat már nem viselő peptidet ezután feloldjuk 0—5%-os ecetsavban, és megtisztítjuk, például finomszemcsés Sephadex G—50-en való gélszűrés útján.

Ezután a kapott peptidet preparatív vagy félpreparatív nagyfelbontású folyadék-kromatográfiás módszerrel tovább tisztítjuk, amint ezt Rivier és munkatársai [Peptides: Structure and Biological Function (A peptidek: szerkezet és biológiai hatás), 1979, 125—128], valamint Marki és munkatársai [J, Am. Chem. Soc., **103**, 3178 (1981)] leírták. E célra egy Waters Associates prep LC—500 típusú készüléket használunk, az oszlopokat Vydac-féle, 300A jelzésű, 15—20 μ szemcseméretű C_{18}-szilikagéllel töltjük. Acetonitril és trietil-ammónium-foszfát-oldat felhasználásával, egy kisnyomású Eldex-féle készülék segítségével gradiens elúciót végzünk, amint ezt J. Rivier leírta [J. Liq. Chromatography, **1**, 343—367 (1978)]. A kromatografált frakciók tisztaságát nagyfelbontású folyadék-kromatográfiás módszerrel gondosan ellenőrizzük, és csak a megfelelően tiszta frakciókat egyesítjük. A tisztaságra nézve egymástól függetlenül megvizsgált, tisztított frakciókat sómentesítjük, e célból acetonitril 0,1%-os trifluor-ecetsav-oldattal készült oldatával gradiens elúciót végzünk. A középső frakciókat fagyasztva szárítva a kívánt peptidet kapjuk, amelynek tisztasága nagyobb lehet, mint 98%.

E célból a szintézis kezdetén a Vale és munkatársai által a 4 292 313. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett általános módszer szerint az aszparagint egy metil-benzhidril-amin-típusú gyantához kötjük.

2. példa

Az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő az 1. táblázatban ismertetett szintetikus peptideket, melyek hatását in vitro körülmények között végzett biológiai vizsgálatokban összehasonlítjuk a humán hasnyálmirigy daganatból elkülönített növekedési hormon releasing faktor szintetikus úton előállított 1—40 fragmensének a C-terminálison szabad karboxilcsoportot tartalmazó változatával [hpGRF(1-40)OH]. E vegyületek általában nagyobb mértékben serkentik a növekedési hormon kiválasztását, egyéb lényeges hatásaik pedig hasonlóak az összehasonlító anyag hatásaihoz. Megállapíthatjuk, hogy a jelen találmány szerinti összes szintetikus peptid biológiailag hatásos, és elvileg felhasználható a növekedési hormon felszabadulásának a serkentésére az agyalapi mirigyben.

7.

Egyes jellemző, szintetikus peptideknek a növekedési hormon felszabadulását serkentő relatív hatékonyságát úgy határozzuk meg, hogy párhuzamos in vitro mérésekben, molárisan azonos koncentrációkban összehasonlítjuk a humán hasnyálmirigyből elkülönített növekedési hormon releasing faktor szintetikus úton előállított 1—40 fragmensének a C-terminálison szabad karboxilcsoportot tartalmazó, összehasonlító anyagként használt változatát a szintetikus úton előállított jellemző analógokkal. E célra patkányokból 3—5 nappal a mérés előtt eltávolított agyalapi mirigyből származó sejtek tenyészetét használjuk. Az ilyen sejttenyészeteket a növekedési hormon kiválasztása szempontjából optimálisnak tekinthetjük, az összehasonlító vizsgálatokhoz ezeket a tenyészeteket használjuk a Vale és munkatársai által leírt [Edocrinology, **91**, 562—572 (1972)], majd a Vale és munkatársai által részletesebben ismertetett [Endocrinology, **112**, 1553—1555 (1983)] módon. A vizsgálandó anyagot tartalmazó tenyészeteket 3—4 órán át inkubáljuk, majd a tenyészet közegéből meghatározott mennyiségű mintákat veszünk, ezeket feldolgozzuk, és a mintákban lévő, immunreakcióra képes növekedési hormon mennyiségét egy meghatározott módon végzett radioimmun-assay módszerrel mérjük.

A molárisan azonos koncentrációkkal végzett összehasonlító vizsgálatok eredményeit az 1. táblázatban adjuk meg.

1. TÁBLÁZAT

Peptid	Relatív hatékonyság	Optikai forgatóképesség $[\alpha]_D^{22}$ (c=1, 1%-os ecetsavban)
hGRF/1-40/-OH /összehasonlító anyag/	100%	
[D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-29/-NH_2	1330%	-57,9°
[D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-27/-NH_2	150%	-56,8°
[D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-29/-$NHCH_2CH_3$	1130%	-57,0°
[D-NMA^2, Nle^{27}, Asn^{28}] -hGRF/1-29/-NH_2	520%	-57,6°
[D-Leu^{14}, Nle^{27}] -rGRF/1-29/-NH_2	120%	-52,6°
[Nle^{27}, D-Arg^{29}] -rGRF/1-29/-NH_2	386%	-52,7°
[D-NMA^2, Nle^{27}] -rGRF/1-29/-NH_2	900%	-51,9°
[D-NMA^2, D-Tyr^{10}, Nle^{27}] -hGRF/1-29/-NH_2	270%	-56,7°
[D-NMA^2, Nle^{27}, D-Arg^{29}] -hGRF/1-29/-NH_2	580%	-57,8°
[D-Tyr^1, D-NMA^2, Nle^{27}, D-Arg^{29}] -hGRF/1-29/-NH_2	60%	-57,5°
[D-N$^{\alpha}$MeTyr^1, D-NMA^2, Nle^{27} -hGRF/1-29/-NH_2	30%	-57,2°
[His^1, D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-29/-NH_2	260%	-57,3°
[D-NMA^2, Ser^{18}, Nle^{27}] -rGRF/1-29/-NH_2	260%	-52,3°
[D-NMA^2, Nle^{27}, Asn^{28}] -hGRF/1-29/-$NHCH_2CH_3$	1510%	-56,9°
[D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-28/-$NHCH_2CH_3$	140%	-56,5°
[D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF/1-32/-NH_2	820%	-57,9°
[Ac-Tyr^1, D-NMA^2, Nle^{27}] -hGFR/1-29/-NH_2	90%	-56,8°

Az in vitro körülmények között végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy e szintetikus peptidek közül több vegyület meglepő módon erősebb biológiai hatást mutat, mint a humán hasnyálmirigy daganatból elkülönített növekedési hormon releasing faktor 1—40 fragmensének a C-terminálison szabad karboxilcsoportot tartalmazó változata. Így például a [D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF(1-29)-NH_2 képlettel jellemezhető peptid legkisebb hatásos koncentrációja körülbelül 1.10^{-12} mól.

A növekedési hormon kiválasztására gyakorolt hatás vizsgálatára szolgáló in vitro vizsgálatokon kívül in vivo vizsgálatokat is végzünk, e célból a szintetikus peptideket uretánnal altatott hím patkányoknak adjuk be intravénás (a vénába adott) injekció formájában, és meghatározzuk, milyen mértékben szorítják vissza e vegyületek a növekedési hormon spontán kiválasztását, anélkül, hogy felfüggesztenék az exogén (külső eredetű) növekedési hormon releasing faktorra adott válaszreakciót. Az állatok véréből mintákat veszünk, közvetlenül az injekció előtt, majd 10, 30 és 90 perccel az injekció után. Mind a 10 perccel, mind a 30 perccel az injekció után végzett mérések alapján a növekedési hormonnak a vérben radioimmun-assay módszerrel meghatározott szintjei azt mutatják, hogy a szintetikus [D-NMA^2, Nle^{27}] -hGRF (1—29)-NH_2 képlettel jellemezhető peptid közel hatszor olyan erős hatást gyakorol az agyalapi mirigyből származó nödekedési hormon vérszintjére, mint a

humán növekedési hormon releasing faktor 1—40 fragmensének a C-terminálison szabad karboxilcsoportot tartalmazó változata. Ezeket az eredményeket megerősítjük a növekedési hormon releasing faktor hatásának vizsgálatára szolgáló, további, ismert in vivo vizsgálatokkal, amelyekről ismeretes, hogy ezek révén meg lehet határozni a növekedési hormon kiválasztásának mértékét. Megállapíthatjuk, hogy e peptideknek a testsúlykilogrammonként körülbelül 50 nanogramm és körülbelül 5μg közötti dózisai hatásosak a növekedési hormon kiválasztása tekintetében. Bizonyos olyan peptidek, amelyek in vitro körülmények között körülbelül ugyanakkora vagy esetleg valamivel gyengébb biológiai hatást mutatnak mint az összehasonlító anyag, in vivo körülmények között az összehasonlító anyagnál sokkal erősebb hatást fejtenek ki.

A humán növekedési hormon releasing faktor ilyen szintetikus analógjait és valószínűleg a patkány növekedési hormon releasing faktor, a szarvasmarha növekedési hormon releasing faktor analógjait és a sertés növekedési hormon releasing faktor analógjait feltehetőleg emberen lehet alkalmazni mindazon esetekben, ha a kezelőorvos növelni akarja a növekedési hormon termelését. A növekedési hormon kiválasztásának ilyen analógokkal való serkentése olyan betegek esetében érdekes, akik az endogén növekedési hormon releasing faktornak a normálishoz képest csökkent mértékű termelése miatt teljes vagy viszonylagos növekedési hormon-hiányban szenvednek. Továbbá valószínű, hogy e vegyületek alkalmazásával a normális növekedési hormonszintekkel rendelkező emberekben vagy állatokban is meg lehet növelni a növekedési hormon kiválasztásának mértékét, és ennek következményeképpen meg lehet növelni a testmagasságot. Ezenkívül e vegyületek adagolása feltehetően menváltoztatja a test zsírtartalmát, és módosít bizonyos további, a növekedési hormontól függő anyagcsere-, immunológiai és fejlődési folyamatokat. Így például ezeket az analógokat felhasználhatjuk arra, hogy emberekben bizonyos körülmények között, például égési sérülések után serkentsük az anabolikus folyamatokat. Egy további példaképpen megemlítjük, hogy ezeket az analógokat adagolhatjuk melegvérű haszonállatoknak, például csirkéknek, pulykáknak, sertéseknek, kecskéknek, szarvasmarháknak és birkáknak, továbbá felhasználhatjuk e vegyületeket a mezőgazdaságban is halak is más hidegvérű tengeri állatok, például tengeri teknősök és angolnák, továbbá kétéltűek tenyésztése során a növekedés meggyorsítására és a fehérje és zsír arányának megnövelésére, oly módon, hogy az említett állatoknak e peptidek hatásos mennyiségeit adagoljuk.

Ha e szintetikus peptideket embereknek kívánjuk beadni, akkor e vegyületek tisztaságának legalább körülbelül 93%-osnak, és előnyösen legalább 98%-osnak kell lennie. A jelen alkalmazás céljait tekintve, a tisztaság a kívánt peptidnek az összes jelenlévő peptid és peptid-fragmens összsúlyára vonatkoztatott százalékos mennyiségét jelenti. Ha ezeket a szintetikus peptideket haszonállatoknak vagy más állatoknak kívánjuk beadni a növekedés elősegítése és testük zsírtartalmának csökkentése céljából, akkor elfogadható, ha körülbelül 5%-os vagy ennél kisebb, akár 0,01%-os tisztaságú peptidet alkalmazunk.

Ezeket a szintetikus peptideket vagy nem toxikus sóikat az ember- vagy állatgyógyászatilag elfogadható vivőanyagokkal gyógyászati készítményekké alakíthatjuk, és e készítményeket állatoknak, beleértve az embert is, adagolhatjuk intravénásan, szubkután (bőr alá), intramuszkulárisan (izomba), perkután (bőrön át), például intranazálisan (orrba) vagy akár orálisan (szájon át) is. Az ilyen készítményeket a kezelőorvos alkalmazhatja a növekedési hormon felszabadulásának serkentésére, olyan esetekben, ha a kezelni kívánt betegnek ilyen kezelésre van szüksége. A szükséges dózis a kezelni kívánt egyed állapotától függően, továbbá állapotának súlyosságától és a kívánt kezelés időtartamától függően változhat.

Az ilyen peptideket gyakran nem toxikus sóik formájában, például savaddíciós sóik vagy fém-komplexeik, mint például cinkkel, vassal és más hasonlókkal képzett komplexeik formájában adagolhatjuk (e komplexeket a jelen leírás céljait tekintve ugyancsak sóknak tekintjük). Ilyen savaddíciós sók például a hidrokloridok, hidrobromidok, szulfátok, foszfátok, maleátok, acetátok, citrátok, benzoátok, szukcinátok, malátok, aszkorbátok, tartarátok és más hasonlók. Ha a hatóanyagot orálisan, tabletta formájában kívánjuk adagolni, akkor a tabletta tartalmazhat valamely kötőanyagot, például tragakantát, kukorica-keményítőt vagy zselatint; a szétesést elősegítő anyagot, például alginsavat, továbbá egy csúsztatószert, mint például magnéziumsztearátot. Ha a hatóanyagot cseppfolyós halmazállapotú készítmény formájában kívánjuk adagolni, akkor használhatunk édesítő és/vagy ízesítőszereket is, intravénás adagolásra pedig izotóniás (a vérrel azonos ozmózisnyomású) oldatokat, foszfát-puffer-oldatokat és más hasonlókat használhatunk.

E peptideket a kezelőorvos felügyelete mellett kell embereknek adagolni, és a gyógyászati készítmények e peptideket általában valamely szokásos, szilárd vagy cseppfolyós halmazállapotú, gyógyászatilag elfogadható vivőanyag kíséretében tartalmazzák. A parenterális (a gyomor- és bélrendszer megkerülésével beadott) dózis a kezelt egyed egy testsúlykilogrammjára számítva körülbelül 0,01 μg és körülbelül 1 μg között van.

Habár a jelen találmány szerinti eljárást annak előnyös kivitelezési változataira írtuk

le, amelyek a feltalálók által jelenleg ismert legjobb kivitelezési változatok, úgy kell tekintenünk, hogy bizonyos — egy átlagosan képzett szakember számára nyilvánvaló — változtatásokat és módosításokat bevezethetünk anélkül, hogy az a találmány tárgyát képezné. Így például módosíthatjuk a peptidláncot, és különösen elhagyhatunk bizonyos aminosavakat a C-terminálisról, egészen körülbelül a peptidlánc 27-es helyéig, és így a jelenleg ismert kísérleti gyakorlatnak megfelelően olyan peptideket vagy peptidfragmenseket állíthatunk elő, amelyek megtartják a peptid biológiai hatását vagy legalább annak legnagyobb részét, az ilyen peptideket ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartozóknak tekintjük. Ezenkívül kiegészíthetjük a peptidláncot az egyik vagy másik, vagy mindkét terminálison, és/vagy a természetben előforduló aminosavak helyett alkalmazhatunk általában egyenértékűnek bizonyuló aminosavakat is, amint ez a peptidek kémiájában jól ismert dolog, és így olyan további analógokat állítunk elő, amelyek az igényelt polipeptidek biológiai hatásának legalábbis legnagyobb részét megtartják, és e kiegészítésekkel és helyettesítésekkel ugyancsak eltérünk a találmány oltalmi körétől. Ezenkívül módosíthatjuk a C-terminálison lévő előnyös aminocsoportot a tudomány mai állásának megfelelő módon, például a C-terminálison lévő aminosav karboxilcsoportja helyén szerepelhet -COOR, -CRO, -CONHNHR, -CON(R)(R') vagy $-CH_2OR$ általános képletű csoport, ahol

R és R' jelentése rövidszénláncú alkilcsoport, fluorozott rövidszénláncú alkilcsoport vagy vagy hidrogénatom,

és az ilyen módosításokkal ugyancsak eltérünk a jelen találmány oltalmi körétől, és a fentiekkel egyenértékű szintetikus peptideket állíthatunk elő.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az R_1-R_2-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}-Gly-Gln-Leu-R_{18}-Ala-Arg-Lys-R_{24}-R_{25}-Ile-Nle-W (I) általános képletű, ahol

R_1 jelentése Tyr, D-Tyr, Ac-Tyr, His, vagy N^{α}-metil-D-Tyr;

R_2 jelentése Ala vagy N^{α}-metil-D-Ala;

R_{10} jelentése Tyr vagy D-Tyr;

R_{14} jelentése Leu vagy D-Leu;

R_{18} jelentése Tyr vagy Ser;

R_{28} jelentése Asn vagy Ser;

R_{29} jelentése Arg vagy D-Arg;

W jelentése -NHR, $-R_{28}$-NHR; $-R_{28}$-R_{29}-NHR vagy R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-NHR és R jelentése hidrogénatom vagy etilcsoport, és

R_8 jelentése Asn, R_{12} jelentése Lys, R_{13} jelentése Val, R_{24} jelentése Gln, R_{25} jelentése Asp; vagy

R_8 jelentése Ser, R_{12} jelentése Arg, R_{13} jelentése Ile, R_{24} jelentése His, R_{25} jelentése Glu, és W jelentése -Asn-R_{29}-NHR,

azzal a megkötéssel, hogy R_2 jelentése N^{α}-metil-D-Ala vagy R_{14} jelentése D-Leu és/vagy R_{29} jelentése D-Arg, szintetikus peptidek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy X^1-R_1(X vagy X^2)-R_2-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-R_8(X^4 vagy X^5)Ser(X^4)-R_{10}(X^2)-Arg(X^6)-R_{12}(X^6 vagy X^7)-R_{13}-R_{14}-Gly-Gln-(X^5)-Leu-R_{18}(X^2)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-Leu-R_{24}(X vagy X^5)-R_{25}(X^3)-Ile-Nle-Y (II) általános képletű köztitermékről, ahol a fenti általános képletben X, X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6 és X^7 jelentése egyaránt hidrogénatom vagy a peptidkémiában önmagában ismert védőcsoport,

X^9 jelentése hidrogénatom, a peptidkémiában önmagában ismert védőcsoport vagy a peptidkémiában önmagában ismert gyanta-hordozó, R_1, R_2, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{18}, R_{24}, R_{28} és R_{29} a fenti, és Y—NHX^9, $-R_{28}$(X^4 vagy X^5)-NHX^9, $-R^{28}$(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6-NHX^9, $-R_{28}$(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^5)-Gly-NHX^9, -NHZ, $-R_{28}$(X^4 vagy X^5)-NHZ, $-R_{28}$(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-NHZ vagy $-R_{28}$(X^4 vagy X^5)-R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^5)-Gly-NHZ csoport, ahol Z etilcsoport vagy a peptidkémiában önmagában ismert gyanta hordozó, a peptidkémiában önmagában ismert módon lehasítjuk a védőcsoportot vagy védőcsoportokat és/vagy lehasítjuk a peptidet a gyantáról.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol R_2 jelentése N^{α}-Metil-D-Ala és R_1, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{18}, R_{24}, R_{25}, R_{28}, R_{29} és W az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően szubsztituált védett peptidből indulunk ki.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol R_{29} jelentése D-Arg, és R_1, R_2, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{18}, R_{24}, R_{25}, R_{28} és W az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően szubsztituált védett peptidből indulunk ki.

4. Az 1—3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol R_{14} jelentése D-Leu, és R_1, R_2, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{18}, R_{24}, R_{25}, R_{28}, R_{29} és W az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően szubsztituált védett peptidből indulunk ki.

Rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 8130. Nyomdaipari vállalat, Ungvár