

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 852 B

(21) A bejelentés száma: 4419/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 08. 25.
(30) Elsőbbségi adatok:
237 591 1988. 08. 26. US

(51) Int. Cl.⁵

**C 07 K 7/10
A 61 K 37/02**

(40) A közzététel napja: 1990. 03. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 02. 28. SZKV 92/02

(72) Feltaláló:
Krstenansky, John Leonard, Cincinnati, Ohio (US)

(73) Szabadalmaz:
Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati,
Ohio (US)

(54) Eljárás neuropeptid Y agonisták, és ezeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I)–(IV) általános képletű peptidszarmazékok

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-X₁-L-X₂-R-Y-
-Y-X₃-A-L-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-T-R-X₆-R-Y-Tc (I)

Y-P-S-K-C-D-θ-Y-X₇-A-c-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-
-T-R-Q-R-Y-Tc (II)

Y-P-S-K-P-D-c-θ-X₈-R-C-Y-X₃-A-L-R-H-Y-
-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (III)

Y-P-S-K-P-D-N-θ-X₂-R-Y-Y-X₃-A-L-R-H-Y-
-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (III')

Y-C-S-K-θ-R-H-c-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (IV)

– ahol X₁ E vagy D; X₂ S vagy A; X₃ S vagy A; X₄
L, I, Nle vagy V; X₅ L, I, Nle vagy V; X₆ Q, P, H vagy
I; X₇ S; X₈ A; Tc OH vagy NH₂ és θ -NH-(CH₂)_n-CO₂-
csoport, ahol n 5 és 11 közötti egész szám – valamint a
(XII)–(XIV) képletű peptidek

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-
-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-H-R-Y (XII)

Y-Aoc-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# (XIII)

Y-C-Aoc-R-H-c-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# (XIV)

és gyógyászati lag elfogadható sóik előállítására.

A leírás terjedelme: 8 oldal

Az eljárást az jellemzi, hogy egy védett tirozint egy aktivált gyantahordozóhoz kötnék, majd a többi α-aminovédett aminosavat a prolintól vagy ciszteintől kezdve a karboxiterminális tirozinig lépésenként hozzákapszolják a növekvő peptidlánc terminális aminos csoportjához, miközben eltávolítják az aminvédő csoportjaikat, és belsőleg ciklizált peptidszarmazék előállítására esetén kívánt esetben a lineáris peptidet oxidatív kapcsolásnak vetik alá, majd a kapott peptidet vagy gyógyászati lag elfogadható sóját izolálják.

HU 204 852 B

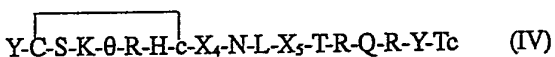
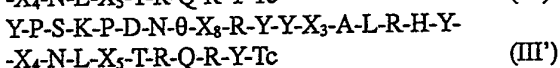
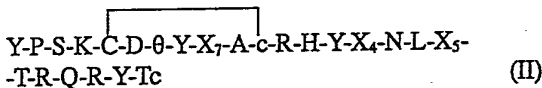
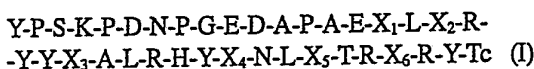
A találmány tárgya eljárás új, neuropeptid Y agonista hatású peptidszármazékok előállítására.

A neuropeptid Y hatását Allen, J. M. és Bloom, S. R. írják le a *Neuropeptide Y: A Putative Neurotransmitter* című közleményben [Neurochem. Int. 8 (11): 1-8 (1986)]. Boublik és munkatársai két cikkben foglalkoznak a neuropeptid Y és a rövidített NPY peptidek szerkezeti és biológiai jellemzésével [Neuropeptide Y and Neuropeptide Y 18-36, Int. J. Peptide protein Res. 33: 11-15 (1989)] és [Synthesis and Hypertensive Activity of Neuropeptide Y ..., J. Med. Chem. 32, 597-601 (1989)].

A porcín neuropeptid Y (pNPY) egy 36 aminosavmaradékból álló peptid, amely a központi és perifériás idegrendszerben elhelyezkedő peptidek különleges családjába tartozik. Az NPY receptorai a központi idegrendszerben és a perifériás idegrendszerben egyaránt megtalálhatók. Az agyban az NPY a tápanyagfelvétel erőteljes stimulátora, amely stimulálja a luteinizáló hormont, növekedési hormont és a prolaktint, és cardiovascularis depressziót okoz. Az NPY emellett erőteljes perifériás érszűkítő hatású is, és egyes vélemények szerint átmeneti myocardinális ischaemiát okoz angina pectorisban szenvedő pacienseknél. Az olyan szerektől, amelyek ezeknek a receptoroknak az agonistái, étvágycsökkentő, szexuális készletés csökkentő, thyroïd stimuláló hormon-prolaktin, valamint luteinizáló hormoncsökkentő hatás várható el, és ezért fogamzásgátló szerként, bűnözők esetében szexuális készletés csökkentő szerként, továbbá a reprodukív rendszerrel kapcsolatos rendellenességek, így idő előtti pubertás, endometriosis, melltumörök, prosztatatumor esetén ezek elleni szerként használatosak. Ezek a vegyületek a felszabadítás stimulálásával csökkentik a növekedési hormonszinteket is, végül mint perifériás értágítók, vérnyomáscsökkentő szerként is alkalmazhatók.

A találmány oltalmi körébe eső vegyületek táplálkozási rendellenességek, így anorexia nervosa kezelésére is használhatók.

A találmány tárgya közelebbről eljárás az (I)-(IV) általános képletű új peptidszármazékok -



- ahol

X₁ jelentése E vagy D,
X₂ jelentése S vagy A,
X₃ jelentése S vagy A,
X₄ jelentése L, I, Nle vagy V,
X₅ jelentése L, I, Nle vagy V,

X₆ jelentése Q, P, H vagy I,

X₇ jelentése S,

X₈ jelentése A,

Tc jelentése OH vagy NH₂ és

5 θ jelentése -NH-(CH₂)_n-CO₂-általános képletű csoport,

ahol n jelentése 5 és 11 közötti egész szám - és gyógyászatiilag elfogadható sóik előállítására. Ezek a vegyületek neuropeptid Y agonisták, amelyek növelik a vérnyomást, és étkezési rendellenességek, így az anorexia nervosa kezelésében is alkalmazhatók.

10 Az általános képletekben és a leírásban az alábbi jelöléseket alkalmaztuk az aminosavakra és az aminosav- és karboxilterminális csoportokra:

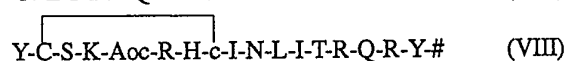
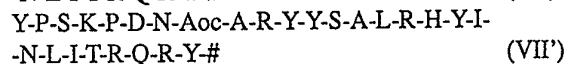
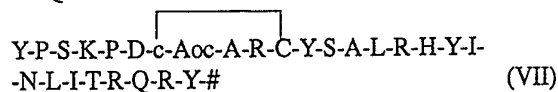
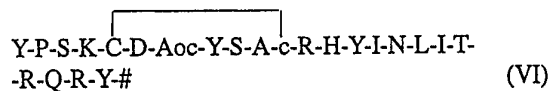
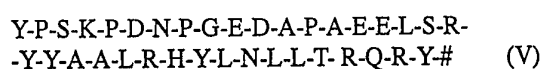
15 Ala (vagy A) - alanin
Val (vagy V) - valin
Leu (vagy L) - leucin
Ile (vagy I) - izoleucin
20 Pro (vagy P) - prolin
Ser (vagy S) - szerin
Thr (vagy T) - treonin
Cys (vagy C) - cisztein
cys (vagy c) - D-cisztein
25 Tyr (vagy Y) - tirozin
Asn (vagy N) - aszparagin
Asp (vagy D) - aszparaginsav
Lys (vagy K) - lizin
Arg (vagy R) - arginin
30 His (vagy H) - hisztidin
Glu (vagy E) - glutamát
Gln (vagy Q) - glutamin
Nle - norleucin
Aoc - 8-amino-oktánsav
35 # - -NH₂

A természetes aminosavak a glicin kivételével mind tartalmaznak egy királis szénatomot. Ha csak nincs más-ként jelölve, a találmány szerinti vegyületek esetében az optikailag aktív aminosavak L-konfigurációjúak.

Az (I) általános képletű polipeptidek bármely nem toxikus, szerves vagy szervetlen savval gyógyászatiilag elfogadható sókat képezhetnek. Ilyen szervetlen savak lehetnek például a sósav, hidrogén-bromid, kénsav, foszforsav; a savas fémsók, mint amilyen a nátrium-monohidrogén-ortofoszfát, és a kálium-hidrogén-szulfát. Megfelelő szerves savak lehetnek például a mono-, di- és trikarbonsavak, mint amilyen az ecetsav, glikolsav, tejsav, piroszőlősav, malonsav, borostyánkősav, glutársav, fumársav, almasav, borkősav, citromsav, aszkorbinsav, maleinsav, hidroximaleinsav, benzoészav, fenil-ecetsav, fahéjsav, szalicilsav, 2-fenoxi-benzoészav; a szulfonsavak, mint amilyen a metánszulfonsav és 2-hidroxi-etánszulfonsav. A karboxilterminális aminosavcsoport sói közé tartoznak a megfelelő szervetlen vagy szerves bázisokkal képzett nem toxikus karbonsavas sók. Ilyenek például az alkálifémsók, így a nátrium- és káliumsók; az alkáliföldfémsók, így a kalcium- és a magnéziumsók; a IIIA csoport könnyűfémek, így az alumíniumnak a sói; valamint szerves primer,

szekunder és terciér aminok sói, így például a trialkilaminok, prokain, dibenzil-amin, 1-eten-amin, N,N'-dibenzil-etilén-diamin, N-(rövidszénláncú)alkil-piperidin és más megfelelő aminok sói.

A találmány szerinti vegyületek esetében bizonyos csoportok előnyösebbek a többiekénél. Így előnyösek azon (I) általános képletű peptidszarmazékok, ahol X₁ jelentése glutamát (E). Előnyösek azok az (I) általános képletű peptidszarmazékok is, ahol X₂ és X₃ jelentése egymástól függetlenül szerin (S) vagy alanin (A), valamint azok, ahol X₄ vagy X₅ jelentése egymástól függetlenül leucin (L) vagy izoleucin (I), valamint azok, ahol Tc=NH₂ és ahol Θ jelentése Aoc csoport. Az (I)-(IV) általános képletű peptidszarmazékok közül a legelőnyösebbek az (V)-(VIII) képletű peptidek:



A találmány szerinti peptideket sokféle, a szakember számára az irodalomból jól ismert eljárással előállíthatjuk. Ilyen eljárás lehet a szilárd fázisú szekvenciális peptidszintézis, amelyet automatizált módszerekkel, így automata peptidszintézis készülék alkalmazásával hajthatunk végre.

Az alkalmazott gyantahordozó bármilyen, a szilárd fázisú polipeptidszintézis során alkalmazott ismert gyanta, előnyösen 0,5% – körülbelül 3% divinil-benzollal térhálósított polisztirol gyanta lehet, amelyet átalakíthatunk a p-metil-benzhidril-amin vagy benzhidril-amin-szarmazékká (a C-terminális amidok számára), vagy klórmetilhezhetjük, illetve hidroximetilhezhetjük őket, helyeket képezve a kezdetben beépített α-aminovédett aminosavval képzett észter képződése számára (C-terminális alkil-amidok és észterek létrehozása céljából).

Hidroxi-metil gyantát ismert Bodanszky és társai [Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966)] munkája. A klórmetilzett gyanták kereskedelmi forgalmazója a Bio Rad Laboratories, Richmond, California; az ilyen gyanták előállítását Stewart és társai [„Solid Phase Peptide Synthesis” (Freeman & Co., San Francisco 1969), chapter 1, pp. 1-6] ismertetik. A védett aminosav Gisin eljárásával [Helv Chem. Acta, 56, 1476 (1973)] köthető a gyantához. Sok gyantán kötött védett aminosav a kereskedelemben kapható. Például, a találmány oltalmi körébe tartozó olyan polipeptid előállítása esetén, ahol a karboxiterminális vég egy Thr maradék, egy benzilezett, hidroximetilzett fenil-acetamidometil (PAM) gyantához kötött terc-butil-oxi-karbo-

nil (Boc) védett Thr alkalmazható, amely kereskedelemben kapható.

Az α-aminovédett aminosavnak a gyantához való kötését követően a védőcsoportot valamilyen megfelelő módszerrel, így metilén-kloridos trifluor-ecetsav, trifluor-ecetsav, vagy sósavas dioxán alkalmazásával eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítását 0 °C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten hajtjuk végre. Más standard hasítóreagenseket és a specifikus α-aminovédő-csoport eltávolítására alkalmas reakciókörülményeket is alkalmazhatunk. Az α-aminovédő-csoport eltávolítása után a többi aminovédett aminosavat lépésenként kapcsoljuk, a megkívánt sorrendben. Alternatív módon, a többszörös aminosavcsoportokat az oldatos módszerrel kapcsolhatjuk össze, a gyantán kapcsolódó aminosav-szekvenciával való összekapcsolást megelőzően.

Az α-aminovédőcsoportok szokásosan alkalmazott, ismert védőcsoportok lehetnek, így

1. acil típusú védőcsoportok, mint amilyen a formil-, trifluor-acetil-, ftalil-, toluolszulfonil(tozil)-, benzol-szulfonil-, nitro-fenil-szulfenil-, tritil-szulfenil-, o-nitro-fenoxi-acetil- és α-klór-butiril-csoport;

2. aromás uretán típusú védőcsoportok, mint amilyen a benzil-oxi-karbonil- és szubsztituált benzil-oxi-karbonil-csoport, így p-klór-benzil-oxi-karbonil-, p-nitro-benzil-karbonil-, p-bróm-benzil-oxi-karbonil-, p-metoxi-benzil-oxi-karbonil-, 1-(p-bifenilil)-1-metil-etoxi-karbonil-, α,α-dimetil-3,5-dimetoxi-benzil-oxi-karbonil-, benzhidril-oxi-karbonil- és 9-fluorenil-metoxi-karbonil-csoport (Fmoc);

3. alifás uretánvédő-csoportok, mint amilyen a terc-butil-oxi-karbonil-(Boc), diizopropil-metoxi-karbonil-, izopropil-oxi-karbonil-, etoxi-karbonil- és allil-oxi-karbonil-csoport;

4. cikloalkil uretán típusú védőcsoportok, így a ciklopentil-oxi-karbonil-, adamantil-oxi-karbonil- és ciklohexil-oxi-karbonil-csoport;

5. tio uretán típusú védőcsoportok, mint amilyen a fenil-tio-karbonil-csoport;

6. alkil típusú védőcsoportok, így trifenil-metil-(tritolil-) és benzilcsoport; és

7. trialkil-szilán-csoportok, így trimetil-szilán-csoport. Előnyös α-aminovédőcsoport a terc-butil-oxi-karbonil-csoport vagy a Fmoc csoport.

A megfelelő kapcsolóreagens kiválasztása bármely, a szakember számára ismert módon történhet. Különösen megfelelő kapcsolóreagens abban az esetben, ha a hozzáadni kívánt aminosav Gln, Asn vagy Arg, a diizopropil-karbodiimid és az 1-hidroxi-benzotriazol. Ezeknek a reagenseknek az alkalmazása megelőzi a nitril- és laktámképződést. Egyéb kapcsolóanyagok:

1. karbodiimidek, például az N,N'-diciklohexil-karbodiimid és N-etil-N'-γ-dimetil-amino-propil-karbodiimid;

2. ciánamidok, például N,N-dibenzil-ciánamid;

3. keténiminek;

4. izoxazolium sók, például az N-etil-5-fenil-izoxazolium-3'-szulfonát;

5. aromás karakterű, monociklusos nitrogéntartalmú heterociklusos amidok, amelyek 1-4 nitrogénatomot

tartalmazznak a gyűrűben, ilyenek az imidazolidek, pirazolidek és az 1,2,4-triazolidek. Jól használható specifikus heterociklusos amidok az N,N'-karbodiimidazol és az N,N-karbonil-di-1,2,4-triazol;

6. alkoxilezett acetilén, például az etoxi-acetilén;

7. olyan reagensek, amelyek vegyes anhidridet képeznek az aminosav karbonilcsoportjával, ilyen például az etil-klór-formiát és izobutil-klór-formiát, vagy a kapcsolni kívánt aminosav szimmetrikus anhidridje, ilyen például: (Boc-Ala)₂O; és

8. nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületek, amelyek egy hidroxilcsoportot tartalmaznak egy gyűrűs nitrogéneken, ilyen az N-hidroxi-ftálimid, N-hidroxi-szukcinimid és 1-hidroxi-benzotriazol.

Egyéb aktiváló reagenseket és peptidekben való felhasználásukat ismertetik az alábbi irodalomban: Kapor, J. Pharm. Sci., 59, pp. 1–27 (1970). Az alkalmazások minden aminosav esetében (kivéve az Arg, Asn és Gln) leginkább a szimmetrikus anhidrideket szeretik kapcsolóreagensként alkalmazni.

A védett aminosavakat vagy aminosav-szekvenciákat körülbelül négyszeres feleslegben beadjuk a szilárd fázisú reaktorba és a kapcsolást 1:1 arányú dimetil-formamid/metilén-klorid elegyben vagy tiszta dimetil-formamidban, vagy előnyösen tiszta metilén-kloridban hajtjuk végre. Olyan esetekben, amikor a kapcsolat nem teljes, a kapcsolási lépést az α-aminovédő-csoport eltávolítása előtt megismételjük, a következő aminosavnak a szilárd fázisú reaktorba való kapcsolását megelőzően. A kapcsolási reakció sikerességét az E. Kaiser és társai [Anal. Biochem. 34, 595 (1970)] által leírt ninhidrines reakcióval kísérhetjük figyelemmel.

Miután a kívánt aminosav-szekvenciát megkaptuk, a peptidet eltávolítjuk a gyantáról. Ezt hidrolízissel hajtjuk végre, vagyis, a gyantára kötött polipeptidet dimetil-szulfid, p-krezol és tiokrezol folyékony hidrogén-fluoridos oldatával történő kezeléssel távolítjuk el.

Amint a szilárd fázisú peptidszintézis irodalmában jól ismert, a funkciós csoportokat viselő aminosavak legtöbbjében szükség van védelemre a lánc előállítás során. A megfelelő védőcsoport kiválasztása és alkalmazása a szakember feladata, s függ a védendő aminosavtól és más védett aminosavmaradékok jelenlététől a peptiden. Az olyan oldalláncvédő csoport kiválasztása kritikus, amelyben kell legyen egy, amelyet nem távolítottunk el az α-aminocsoport védőcsoportjának lehasítása alkalmával. Például, lizin esetében megfelelő oldalláncvédő csoportok: a benzil-oxi-karbonil- és szubsztituált benzil-oxi-karbonil-csoport, ahol a szubsztituensek a következők lehetnek: halogénatom – például klór-, bróm-, fluoratom – és nitrocsoport – (így tehát megfelelőek 2-klór-benzil-oxi-karbonil-, p-nitro-benzil-oxi-karbonil-, 3,4-diklór-benzil-oxi-karbonil-csoport); a tozil-, t-amil-oxi-karbonil-, t-butil-oxi-karbonil- és diizopropil-metoxi-karbonil-csoport. A treonin és szerin alkoholos hidroxilcsoportját acetil-, benzil-, terc-butil-, tritil-, benzil-, 2,6-diklór-benzil- vagy benzil-oxi-karbonil-csoporttal védhetjük. Az aszparaginsav és glutaminsav karboxilcsoportját benzil- vagy ciklohexilcsoporttal védhetjük. Az előnyös védőcsoport a benzilcsoport.

Ezeket a csoportokat az irodalomból jól ismert módszerekkel távolíthatjuk el. A tipikus védőcsoport eltávolítás után történik, amikor a peptidlánc-szintézis teljes, de a védőcsoportokat bármely más megfelelő időpillanatban is eltávolíthatjuk.

5 Az (I) általános képletű vegyületek neuropeptid Y agonista hatását ezeknek a peptideknek azon képességével demonstrálhatjuk, hogy versenyeznek a jódozott neuropeptid Y-nal a receptorokért.

10 A vizsgálatokhoz Lendberg és társai [Eur. J. Pcol. 145: 21–9 (1988)] módszerét használtuk. 125 I-Bolton-Hunter-neuropeptid Y (BHNP; Amersham) kötést hoztunk létre disznólép nyers membránon. A fagyasztott lépből származó membránokat az előzőleg a tachikinin peptidkötés vizsgálatoknál leírtak szerint (Buck és társai, 1984) készítettük el. A membránkészítmény egy alikvot mennyiségét (közelítőleg 15 mg szövetet) szobahőmérsékleten 2 óra hosszat inkubáltuk olyan pufferben (pH=7,4), amely a peptidanalógon kívül 130 mM nátrium-kloridot, 2,7 mM kálium-kloridot, 2 mM magnézium-kloridot, 1,8 mM kalcium-kloridot, 20 mM HEPES-t, 4 mg/ml BSA-t, 40 µg/ml bacitracint, 4 µg/ml leupeptint és 4 µg/ml chymostatint tartalmazott. A BHNPY kötést 0,1 nM koncentrációban vettük számításba és a nem specifikus kötést 1 M pNPY beszámításával határoztuk meg. A mintákat Whatman GF/C szűrőkön gyorsan átszűrjük, a szűrőket egy éjszakán át előzőleg 0,5% hisztocinban (II-AS típusú, Sigma) áztattuk és kétszer átmostuk jéghideg tiszta HEPES-só pufferrel (pH=7,4). A vizsgált peptidekre vonatkozó IC₅₀-értékeket 6–10 pontos kompetíciós görbékkel számítottuk ki. Ezt a módszert alkalmazva az 1. és 2. példa szerinti peptidszámazékok IC₅₀-értékei <50 nM-nak bizonyultak.

35 A találmány szerinti peptidszámazékok neuropeptid Y agonista hatásuk következtében értékes farmakológiai tulajdonságokat, nevezetesen érszehűző tulajdonságokat mutatnak, összehűzzák a szívkoszorú-vegyőret, valamint bélrelaxáló hatásúak és csökkentik az emésztőszervek kiürülési sebességét. Szignifikáns a találmány szerinti NPY agonisták gyógyászati felhasználása az étkezési rendellenességek, így az anorexia nervosa esetében.

45 A találmány szerinti peptidszámazékok hatásos neuropeptid Y agonista – és ennek következtében kialakuló hipertenzív vagy érszehűző hatásának – dózisa 0,2 mg/kg – 250 mg/kg/nap. Ez a dózis függ a páciensről, a kezelendő betegség súlyosságától és a kiválasztott peptidszámazéktól. Általában előnyösen 1–4 napi dózist adnak be, dózisonként 5 mg–100 mg hatóanyaggal.

50 Az itt használt „páciens” kifejezés emlősdöket, így főemlősdöket – beleértve az embert is –, valamint például juhokat, lovakat, borjakat, disznókat, kutyákat, macskákat, patkányokat és egereket jelent.

55 Bár a találmány szerinti peptidszámazékok jó része beadható orálisan is, a felhasználók jobban szeretik a nem orális beadást, így például a szubkután, intravénás, intramuszkuláris vagy intraperitoneális beadást. Beadhatók még a vegyületek depot injekciók, implantátumok, sprayk segítségével is.

Parenterális beadás céljára a vegyületeket injektálható oldatok vagy szuszpenziók formájában készíthetjük ki, ahol a hatóanyag valamilyen gyógyászati alkalmaszható hígítóanyag mellett van – amely lehet steril folyadék, így víz és olajok – s adott esetben jelen lehetnek felületaktív szerek és más gyógyászati alkalmaszható adalékanyagok is. Az ilyen készítményekben alkalmazható olajok lehetnek például állati, növényi vagy szintetikus eredetű olajok, például mogyoróolaj, szójaolaj, valamint ásványolaj. Általában víz, sóoldat, glikolok, így propilén-glikol vagy polietilén-glikol az előnyös hordozóanyagok, főként az injektálható oldatok esetében.

A vegyületeket beadhatjuk depot injekciók vagy implantátumok formájában is, amelyek olyan formában készülnek, hogy biztosítsák a hatóanyag késleltetett leadását. A hatóanyagot pelletekbe vagy kis hengerekbe zárhatjuk és szubkután vagy intramuszkulárisan építhetjük be. Az implantátumok inert anyagokat, így biológiai lebomlásra képes, polimereket vagy szintetikus szilikonokat, például Silastic-ot, (szilikonkaucsuk, gyártja a Dow-Coming Corporation) tartalmazhatnak.

Az alább következő példák a találmány szerinti eljárást szemléltetik anélkül, hogy igényünket ezekre a példákra korlátoznánk.

1. példa

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-E-L-S-R-Y-Y-A-A-L-R-H-Y-L-N-L-L-T-R-Q-R-Y# előállítása

A cím szerinti peptidszarmazékot 0,5 mmól-os arányban szilárd fázisú módszerrel, p-metil-benzhidril-amin gyantán (0,40 mmól/g; Peptides Intl.), egy Applied Biosystems Model 430-A peptidszintetizáló berendezés segítségével állítjuk elő. Minden csoportot kettősen kapcsolunk az N^α-terc-Boc-védett aminosavak szimmetrikus anhidridjeiként, az Arg, Asn és Gln kivételével, amelyeket a DCC/HOBT (N,N'-diciklohexil-karbodiimid és 1-hidroxi-benzotriazol) módszer segítségével kettősen kapcsolunk. Az oldalláncvédelem a következő: Arg(Tos), Asp(Chx), Cys(pMeBzl), Glu(Bzl), His(Tos), Ser(Bzl), Tyr(2-BrZ), Thr(Bzl), Lys(2-ClZ), ahol Tos=tozil-, Chx=ciklohexil-, pMeBzl=p-metil-benzil-, Bzl=benzil-, 2-BrZ=2-bróm-benzil-oxi-karbonil-, 2-ClZ=2-klór-benzil-oxi-karbonil-csoport. A peptideket (0,25 mmól elméletileg) lehasítjuk a hordozógyantáról és 5 térfogat% anizoltartalmú folyékony hidrogén-fluoriddal, -5 °C-on, 40 perces kezeléssel eltávolítjuk a védőcsoportokat. A hidrogén-fluorid vákuumban való eltávolítása után a peptideket 30 térfogat%-os ecetsav-víz eleggyel extraháljuk a gyantáról. Az oldatot leszűrjük a gyantáról és liofilizáljuk. A megmaradó peptidet preparatív HPLC-vel (nagy nyomású folyadékkromatográfia) tisztítjuk, Dynamax C-18 oszlopon (21,4•250 mm; Rainin), eluensként 0,1% trifluor-ecetsavas acetonitril alkalmazva. A peptid tisztaságának vizsgálatát és az azonosítást analitikai HPLC-vel [Vydac 218TP54 oszlop, 4,6•250 mm, 2,0 ml/perc, t_r=1,9 perc, lineáris gradiens elúció: 15–40 térfogat% acetonitril 0,1%-os trifluor-ecetsavban (TFA), 25 percen át]; aminosav analízissel (AAA) (8% fenolt tartalmazó 6 n sósav; 106 °C-on 20 és 40 óra); és FAB-tömegspektrográfias méréssel (FAB-MS) (M-Scan Ltd.) végezzük.

Az analitikai HPLC eredménye: t_r(retenció idő)=14,0 perc;

AAA^a: B – 4,03; T – 0,98; S – 1,81; P – 4,02; A – 4,23; L – 5,08; Y – 4,50; H – 0,93; R – 4,13; Z – 4,10; G – 1,23; K – 0,94.

^a6 n HCl, 24 óra, 106 °C.

FAB-MS: (M+H)⁺ 3311,2±1 mu.

2. példa

Y-P-S-K-C-D-Aoc-Y-S-A-c-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# előállítása

A cím szerinti peptidszarmazékot 0,5 mmól-os arányban szilárd fázisú módszerrel, p-metil-benzhidril-amin gyantán (0,40 mmól/g; Peptides Intl.), egy Applied Biosystems Model 430-A peptidszintetizáló berendezés segítségével állítjuk elő. Minden csoportot kettősen kapcsolunk az N^α-terc-Boc-védett aminosavak szimmetrikus anhidridjeiként, az Arg, Asn és Gln kivételével, amelyeket a DCC/HOBT módszer segítségével kettősen kapcsolunk. Az oldalláncvédelem a következő: Arg(Tos), Asp(Chx), Cys(pMeBzl), Glu(Bzl), His(Tos), Ser(Bzl), Tyr(2-BrZ), Thr(Bzl), Lys(2-ClZ). A peptideket (0,25 mmól elméletileg) lehasítjuk a hordozógyantáról és 5 térfogat% anizoltartalmú folyékony hidrogén-fluoriddal, -5 °C-on, 40 perces kezeléssel eltávolítjuk a védőcsoportokat. A hidrogén-fluorid vákuumban való eltávolítása után a peptideket 30 térfogat%-os ecetsav-víz eleggyel extraháljuk a gyantáról. Az extraktumot 1 literre hígítjuk, a pH-t ammónium-hidroxiddal 8 és 9 közé állítjuk be, és 0,01 n kálium-hidroxidot adunk hozzá, míg a sárga szín állandósul (körülbelül 25 ml). 30 percig tartó keverés után a pH-t jégécet hozzáadásával <5-re csökkentjük, és az oldatot 25 ml kötött AC 3 X4A (Bio Rad) gyantával 2 óra hosszat keverjük. Ezt követően a gyantát kiszűrjük az oldatból, és az oldatot liofilizáljuk. A megmaradó peptidet preparatív HPLC-vel (nagy nyomású folyadékkromatográfia) tisztítjuk, Dynamax C-18 oszlopon (21,4•250 mm; Rainin), eluensként 0,1% trifluor-ecetsavas acetonitril alkalmazva. A peptid tisztaságának vizsgálatát és az azonosítást analitikai HPLC-vel (Vydac 218TP54 oszlop, 4,6•250 mm, 2,0 ml/perc, t_r=1,9 perc, lineáris gradiens elúció: 15–40 térfogat% acetonitril 0,1%-os trifluor-ecetsavban, 25 percen át); aminosav analízissel (AAA) (8% fenolt tartalmazó 6 n sósav; 106 °C-on 20 és 40 óra); és FAB-tömegspektrográfias méréssel (FAB-MS) (M-Scan Ltd.) végezzük.

Az analitikai HPLC eredménye: t_r=14,6 perc;

AAA^a: B – 1,89; T – 0,99; S – 1,68; Z – 1,13; P – 0,93; A – 1,03; L – 1,09; I – 2,07; Y – 3,88; H – 0,94; R – 3,06.

^a6 n HCl, 24 óra, 106 °C.

FAB-MS: (M+H)⁺ 2888,0±1 mu.

3. példa

Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# előállítása

A 2. példában leírtak szerint eljárva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő.

Az analitikai HPLC eredményei: $t_r=10,7$ perc (lineáris gradiens elúció: 25–50 térfogat% acetonitril 0,1%-os trifluor-ecetsavban, 25 percen át).

AAA*: B – 2,03; T – 1,05; S – 1,83; Z – 1,10; P – 1,98; A – 2,04; L – 2,07; I – 1,93; Y – 3,91; K – 1,02; H – 0,98; R – 3,87.

*6 n HCl, 24 óra, 106 °C.

FAB-MS: (M+H)⁺ 3327±1 mu.

4. példa

Y-C-S-K-Aoc-R-H-c-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y#

előállítás

A 2. példában leírtak szerint eljárva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő.

Az analitikai HPLC eredménye: $t_r=10,4$ perc (lineáris gradiens elúció: 15–40 térfogat% acetonitril 0,1%-os trifluor-ecetsavban, 25 percen át).

AAA*: B – 1,00; T – 1,00; S – 1,01; Z – 1,03; L – 0,99; I – 1,86; Y – 2,06; H – 0,97; R – 2,97; K – 1,10.

*6 n HCl, 24 óra, 106 °C.

FAB-MS: (M+H)⁺ 2193±1 mu.

Hasonló módon állítjuk elő az alábbi 5–12. példa szerinti vegyületeket:

Példa

száma

5. Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-P-R-Y# (IX)

6. Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-H-R-Y# (X)

7. Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-P-R-Y# (XI)

8. Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-H-R-Y (XII)

5 9. Y-Aoc-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# (XIII)

10. Y-P-S-K-P-D-N-Aoc-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# (VII')

11. Y-C-Aoc-R-H-c-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y# (XIV)

10 12. Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-I-R-Y# (XV)

Az 5–12. példa szerinti vegyületek a következő jellemzők mutatják:

Példa	vegyület	számított molekula-tömeg	(M+H)	Ellman	HPLC retenciósidő
20	5. IX	3293,7	3295,3	neg	10,4 ^b
	6. X	3333,7	3334,2	neg	10,2 ^b
	7. XI	4220,1	4220,8		16,0 ^b
	8. XII	4160,1	4262,4		14,6 ^b
	9. XIII	1478,9	1480,0		16,1 ^a
25	10. VII'	3397,8	3398,9		10,0 ^b
	11. XIV	1976,0	1978,4	neg	14,5 ^b
	12. XV	4236,2	4236,2		15,4 ^b

*lineáris gradiens elúció: 15–40 térfogat% acetonitril 0,1%-os TFA-ban, 25 perc.

^blineáris gradiens elúció: 25–50 térfogat% acetonitril 0,1%-os TFA-ban, 25 perc.

	B	T	S	Z	P	A	G	I	L	Y	F	H	K	R
5.	2,03(2)	1,04(1)	1,82(2)		2,95(3)	2,06(2)		1,98(2)	2,02(2)	3,91(4)		0,99(1)	1,00(1)	4,02(4)
6.	2,05(2)	1,07(1)	1,78(2)		1,86(2)	2,01(2)		1,96(2)	2,12(2)	3,81(4)		2,02(2)	1,03(1)	4,06(4)
7.	5,07(5)	0,99(1)	1,86(2)	2,11(2)	5,10(5)	4,20(4)	1,34(1)	1,81(2)	3,02(3)	4,74(5)		0,97(1)	1,03(1)	3,95(4)
8.	5,43(5)	0,96(1)	1,69(2)	2,00(2)	3,88(4)	4,68(5)	1,37(1)	1,93(2)	3,24(3)	5,08(5)		1,94(2)	0,87(1)	4,11(4)
9.	1,03(1)	1,01(1)		1,05(1)				1,91(2)	1,01(1)	1,93(2)				2,06(2)
10.	2,65(3)	1,03(1)	1,96(2)	1,08(1)	2,08(2)	2,09(2)		1,95(2)	2,15(2)	5,04(5)		1,01(1)	1,06(1)	3,84(4)
11.	1,01(1)	1,05(1)		1,07(1)				1,92(2)	0,99(1)	2,04(2)		0,97(1)		2,96(3)
12.	4,92(5)	1,00(1)	1,80(2)	2,01(2)	3,94(4)	4,12(4)	1,27(1)	2,65(3)	3,01(3)	4,68(5)		0,96(1)	0,96(1)	3,73(4)

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

45

1. Eljárás az (I)–(IV) általános képletű peptidszámazékok

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-X₁-L-X₂-R-Y-Y-X₃-A-L-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-T-R-X₆-R-Y-Tc (I)

Y-P-S-K-C-D-θ-Y-X₇-A-c-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (II)

Y-P-S-K-P-D-c-θ-X₈-R-C-Y-X₃-A-L-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (III)

Y-P-S-K-P-D-N-θ-X₈-R-Y-Y-X₃-A-L-R-H-Y-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (III')

Y-C-S-K-θ-R-H-c-X₄-N-L-X₅-T-R-Q-R-Y-Tc (IV)

– ahol

X₁ jelentése E vagy D,

X₂ jelentése S vagy A,

X₃ jelentése S vagy A,

X₄ jelentése L, I, Nle vagy V,

X₅ jelentése L, I, Nle vagy V,

X₆ jelentése Q, P, H vagy I,

X₇ jelentése S,

X₈ jelentése A,

Tc jelentése OH vagy NH₂ és

θ jelentése -NH-(CH₂)_n-CO₂-általános képletű csoport,

ahol n jelentése 5 és 11 közötti egész szám –

valamint a (XII)–(XIV) képletű peptidek

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-
Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-H-R-Y (XII)
Y-Aoc-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-# (XIII)

Y-C-Aoc-R-H-c-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-# (XIV) 5

és gyógyászatilag elfogadható sóik előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy megfelelően védett tirozint egy aktivált gyantahordozóhoz kötünk, majd a többi α -aminovédett aminosavat a prolintól vagy ciszteintől kezdve a karboxilterminális tirozinig lépésenként hozzákapcsoljuk a növekvő peptidlánc terminális aminocsoportjához, miközben eltávolítjuk az aminovédő-csoportjait, és belsőleg ciklizált peptidszarmazék előállítása esetén kívánt esetben a lineáris peptidet oxidatív kapcsolásnak vetjük alá, majd a kapott peptidet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol

X_2 jelentése A,

X_1 , X_3 – X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol

X_3 jelentése S,

X_1 , X_2 , X_4 – X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I)–(IV) általános képletű vegyületek előállítására, ahol

X_4 jelentése I,

X_1 – X_3 , X_5 – X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I)–(IV) általános képletű vegyületek előállítására, ahol

X_5 jelentése I,

X_1 – X_4 , X_6 – X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol

X_6 jelentése Q,

X_1 – X_5 , X_7 , X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I)–(IV) általános képletű vegyület előállítására, ahol

θ jelentése Aoc,

X_1 – X_8 és Tc jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás az (V)–(VIII) és (XVI) képletű peptidszarmazékok

Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-E-L-S-R-
-Y-Y-A-A-L-R-H-Y-L-N-L-L-T-R-Q-R-Y-# (V)

Y-P-S-K-C-D-Aoc-Y-S-A-c-R-H-Y-I-N-L-I-T-
-R-Q-R-Y-# (VI) 20

Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-
-N-L-I-T-R-Q-R-Y-# (VII)

Y-C-S-K-Aoc-R-H-c-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-# (VIII) 25

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazzuk.

9. Eljárás hatóanyagként az (I)–(IV) általános képletű vegyületeket vagy gyógyászatilag elfogadható sóikat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, az 1. igénypont szerint előállított (I)–(IV) általános képletű vegyületet – ahol X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , Tc és θ jelentése az 1. igénypontban megadott – vagy gyógyászatilag elfogadható sóját a gyógyszeriparban szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.