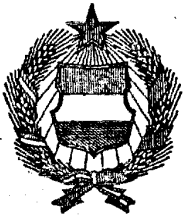


(19) HU

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 185 427

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

A bejelentés napja: (22) 81. 06. 01.

(21) (1620/81)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
US

(32)
80. 06. 02.

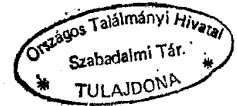
(31)
(155 249)

A közzététel napja: (41) (42) 84. 04. 30.

Megjelent: (45) 87. 04. 30.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄

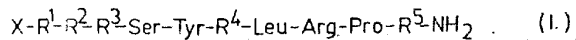
~~C 07 K 7/20~~
C 07 K 7/20



72/73 Schally Andrew Victor, orvos, Metairie, Coy David
Howard, vegyészmérnök, New Orleans, Louisiana, US

(54) ELJÁRÁS LUTEINIZÁLÓ HORMONT FELSZABADÍTÓ HORMON-ANTAGONISTÁK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT



A találmány tárgya eljárás új, (I) általános képletű decapeptidek előállítására, amelyek a luteinizáló hormont felszabadító hormon(LH-RH) antagonistái. Az (I) általános képletben

- X jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomszámú alkanóilcsoport, vagy HOOC-(CH₂)_n-CO-csoport, amelyben n értéke 2–6-ig terjedő egész szám;
- R¹ jelentése Gly,L-Ala,D-Ala, D-Trp,D-Phe vagy D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;
- R² jelentése D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;
- R³ jelentése D-Trp;
- R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe és
- R⁵ jelentése Gly vagy D-Ala.

Az (I) általános képletű vegyületek a szokásos peptid szintézissel, vagy az ún. szilárd fázisú technikával lehet előállítani. A találmány szerinti vegyületet az emberi és állati gyógyászatban a gonadotrop hormonok, folliculus hormonok és a luteinizáló hormon szabályzására lehet felhasználni.

A találmány tárgya eljárás olyan új, (I) általános képletű peptidok előállítására, melyek a luteinizáló hormon releasing hormon (LH-RH) antagonistái.

Pontosabban a találmány tárgya eljárás a luteinizáló hormont felszabadító hormon (LH-RH) analógoknak, azok sóinak, valamint ezeket a vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

A találmány szerinti LH-RH analógok szerkezete abban különbözik az LH-RH-tól, hogy az 1, 2 és 6. helyzetben levő, illetve adott esetben a 3-as és 10-es helyzetben levő aminosav rész más aminosav résszel van helyettesítve.

A kutatók már néhány éve keresik az LH-RH decapeptidok hatékony antagonistáit. Ld. D. H. Coy és A. V. Chally, *Annals of Clinical Research*, 10, 139, 1978-ban megjelent cikkét.

Az ilyen antagonistákkal kapcsolatos nagy érdeklődés onnan származik, hogy ezek igen hatásosak az endokrinológia és a rák ellenes küzdelem területén. Nagy számú vegyületet állítottak elő, melyek az LH-RH potenciális antagonistái, de közülük legtöbb nem volt hatásos, vagy az LH-RH decapeptidokkal kevert agonista és antagonisták tulajdonságot mutattak. Az eddig előállított fontosabb antagonisták tulajdonképpen módosított struktúrájú LH-RH vegyületek. Ilyenek például a (D-Phe²)-LH-RH, [R. A. W. Rees et. al., *J. Med. Chem.*, 17, 1016 (1974)]; (D-Phe², D-Phe⁶)-LH-RH, (D-Phe², Phe³, D-Phe⁶)-LH-RH és (D-Phe², D-Trp³, D-Phe⁶)-LH-RH, [D. H. Coy et. al., *Peptides* 1976, A. Loffet, Ed., Editions de l'Université de Bruxelles, Brüsszel, Belgium, 1977, p. 463]; (D-p-F-Phe²-D-Ala⁶)-LH-RH, [C. W. Beattie et. al., *J. Med. Chem.*, 18, 1247 (1975)] és (Ac-D-Phe¹-D-Phe²-D-Trp^{3,6})-LH-RH, [K. Channabasavaiah és J. M. Stewart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 1266 (1979)].

A találmány szerint előállított tiszta LH-RH antagonisták sokkal hatékonyabbak, mint az eddig között LH-RH antagonisták bármelyike.

A találmány szerint előállított (I) általános képletű vegyületekben, azaz az LH-RH analógokban

- X jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkanoilcsoport, HOOC-(CH₂)_n-CO csoport, amelyben n értéke 2-6-ig terjedő egész szám;
- R¹ jelentése Gly, L-Ala, D-Ala, D-Trp, D-Phe vagy D-Phe, amely szubsztituensként para-helyzetben halogénatomot tartalmaz;
- R² jelentése D-Phe, mely a fenil-csoportban szubsztituensként halogénatomot tartalmaz;
- R³ jelentése D-Trp,
- R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe és
- R⁵ jelentése Gly vagy D-Ala.

Azok az (I) általános képletű vegyületek előnyösek, amelyekben X jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkanoilcsoport, HOOC-(CH₂)_n-CO csoport, amelyben n jelentése 2-6-ig terjedő egész szám, R¹ jelentése D-Trp, D-Phe vagy olyan D-p-Z-Phe, amelyben Z jelentése halogénatom; R² jelentése D-p-Z-Phe amelyben Z jelentése a fenti; R³ jelentése D-Trp; R⁴ jelentése D-Trp, D-Phe vagy olyan D-p-Z-Phe, amelyben Z jelentése a fenti és R⁵ jelentése D-Ala.

Az (I) általános képletű vegyületek másik előnyös csoportjába azok tartoznak, amelyekben X jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkanoilcsoport, vagy HOOC-(CH₂)_n-CO, amelyben n értéke a fenti; R¹

jelentése D-Trp, D-Phe vagy D-p-halo-Phe; R² jelentése D-p-halo-Phe; R³ jelentése D-Trp; R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe; R⁵ jelentése D-Ala.

Az (I) általános képletű vegyületek további előnyös csoportjába azok tartoznak, amelyekben X jelentése acetil-csoport, vagy HOOCCH₂CH₂CO-csoport; R¹ jelentése D-Trp, D-Phe vagy D-p-Cl-Phe; R² jelentése D-p-Cl-Phe; D-p-Br-Phe vagy D-p-F-Phe; R³ jelentése D-Trp; R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe; és R⁵ jelentése D-Ala.

A találmány tárgyát képezik az (I) általános képletű vegyületek gyógyászatiilag elfogadható sóinak az előállítása is.

Az (I) általános képletű vegyületeket a szokásos peptid szintézissel, vagy szilárdfázisú eljárással állítjuk elő.

Az (I) általános képletű vegyületek előállíthatók, ha eltávolítjuk a védőcsoportot, vagy (védőcsoportokat) valamely (II) általános képletű adott esetben védett N-terminális aminocsoportot tartalmazó peptidről, amelyben R¹, R², R³, R⁴ és R⁵ jelentései a fentiek és R⁶, R⁷ és R⁸ jelentései hidrogénatom vagy valamely védőcsoport, és Y jelentése aminocsoport vagy gyantához kötött amin rész, azzal a feltétellel, ha Y jelentése aminocsoport, akkor R⁶, R⁷ és R⁸ csoportok közül legalább egy védőcsoport vagy az N terminális aminocsoport védett, továbbá adott esetben az olyan (I) általános képletű peptidet, amelyben X jelentése hidrogénatom, kívánt esetben acilezzük, ily módon olyan (I) általános képletű peptidet kapunk, amelyben X jelentése a tárgyi körben megadott acilcsoport és/vagy a kapott peptidet gyógyászatiilag elfogadható sóvá alakítjuk.

A (IV) általános képletű vegyületekben, amelyek valamely szilárd hordozógyantához kapcsolódnak és α-amino-védőcsoportot tartalmaznak, R¹-R⁸ jelentése a fenti és R⁹ jelentése valamely α-amino-védőcsoport, amely a polipeptidok lépcsős szintézisének hasznosnak ismert. Alkalmos csoportokat a későbbiekben említünk, és A jelentése hordozógyantához kötött NH-CHPh-Ph-csoport, vagy hordozógyantához kötött OCH₂-Ph-csoport.

A gonadotropin hormonokat antagonizáló gyógyászati készítményeket úgy állítjuk elő, hogy valamely (I) általános képletű vegyületet a szokásos gyógyászati hordozókkal elkeverünk.

A fentiekben használt „rövidszénláncú alkanoilcsoport” olyan egyenes szénláncú alkanoilcsoportokat jelent, melyek 1-4 szénatomosak, például formil-, acetil-, propionil-, vagy butirilcsoport, továbbá elágazó szénláncú alkanoilcsoportok, például izobutirilcsoport.

A „szerves proton akceptor” kifejezés szerves bázisokat vagy aminokat jelent, mint például trietil-amin, piridin, N-etilmorfolin, imidazol és hasonlóak.

A „halogén” kifejezés klór-, bróm-, fluor- vagy jód-atomot jelent.

Valamely aminosav „acilrésze” kifejezés olyan csoportot jelent, melyet a megfelelő aminosavból kapunk, ha annak karboxilcsoportjából a hidroxil csoportot eltávolítjuk.

Az „aminosav rész” olyan csoportokra utal, melyeket a megfelelő aminosavból úgy kapunk meg, hogy a karboxilcsoport hidroxilcsoportját és az aminocsoport egyik hidrogénjét eltávolítjuk.

N^G az arginin oldal láncában levő nitrogénatomot jelenti.

A Ph-szimbólum jelentése fenilcsoport, és a -Ph- jelentése 1,4-fenilén-csoport.

Ac jelentése „acetylcsoport”. Succ jelentése „HOOC-(CH₂)₂-CO” csoport, azaz succinil-csoport, egy 3-karboxi-1-propionilcsoport.

Az itt használt rövidítések, melyeket az aminosavak és a védőcsoportok jelölésére használunk, általában az IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature ajánlásain alapulnak. ld. Biochemistry II, 1726 (1972.). Például a t-Boc jelentése t-butil-oxi-karbonil-csoport, Z jelentése benziloxi-karbonilcsoport, Tos jelentése tozil-csoport és Bzl jelentése benzilcsoport. A különböző aminosavak jelölésére használt rövidítések a következők: Ala, alanin; Arg, arginin; Gly, glicin; Leu, leucin; Phe, fenil-alanin; Pro, prolin; Ser, serin; Trp, triptofán; és Tyr, tirozin. Az összes itt leírt aminosav L-konfigurációjú, hacsak másként nem jelöljük. Például D-Ala a D-alanil-csoport, a D-Phe viszont D-fenilalanilcsoport, D-Trp egy D-triptofil csoport.

A találmány szerinti LH-RH analógokat sav-addíciós sók alakjában is előállíthatjuk. A sóképzésre alkalmas szerves savak közül megemlíthetjük pl. az ecetsavat, tejsavat, borostyánkősavat, benzoéssavat, szalicilsavat, metán-szulfonsavat, és a p-toluol-szulfonsavat, valamint polimer savakat, mint például cseersav, vagy karboxi-metil-cellulóz. A sóképzésre alkalmas szerves savak közül a következőket említjük; halogénhidrogénsavak, például sósav, továbbá kénsav, vagy foszforsav. Adott esetben egy bizonyos sav-addíciós só más sav addíciós sójává is átalakítható, az átalakítás úgy történhet, hogy a nem-mérgező, gyógyászatiilag elfogadható savval alkotott sót a megfelelő ioncserélő gyantával kezeljük, R. A. Boissonnas és munkatársai által leírt módszer szerint [Helv. Chim. Acta., 43, 1349 (1960)]. Alkalmas ioncserélő gyanták például a cellulóz kationcserélők, például karboxi-metilcellulóz, vagy a kémiaiilag módosított hálós szerkezetű dextrans kationcserélők, mely utóbbiakat Sephadex C kereskedelmi néven árulják. Továbbá, az erősen bázikus anioncserélő gyanták, például azok, melyeket J. P. Greenstein és M. Winitz sorolnak fel a „Chemistry of the Amino Acids” (John Wiley and Sons, Inc., New York and London, 1961, Vol. 2. p. 1456) című könyvben. Ezeknek a gyógyászatiilag elfogadható sav-addíciós sóknak az előállítása is a találmány tárgyát képezi.

Igy tehát a találmány tárgyát képezik azoknak az (I) általános képletű vegyületeknek az előállítása is, amelyekben a HOOC-(CH₂)_n-CO- csoport, amelyben n értéke 2-6-ig terjedő egész szám, valamely gyógyászatiilag elfogadható szerves és szerves bázissal alkotott sóinak előállítása is. Ezek a sók ugyanolyan hatékonyak, mint azok a savak, amelyekből származnak. A savak nagyon jó kihozattal alakíthatók át a megfelelő gyógyászatiilag elfogadható sókká úgy, hogy az illető savat a megfelelő szerves bázissal közömbösítjük. Ezen savak előállítására alkalmas szerves bázisok például a hidroxidok, karbonátok, hidrogén-karbonátok, a gyógyászatiilag elfogadható alkáli-fémek vagy alkáliföldfémek, pl. nátrium, kálium, magnézium, kalcium és hasonló alkoxidjai. Az alkalmas szerves bázisok közül megemlíthetjük az aminosavakat, köztük a mono-, di- és trialkilaminokat, azokat az alkilcsoportokat, melyek legfeljebb 3 szénatomot tartalmaznak, például metil-amin, dimetil-amin, trimetil-amin, etilamin, di- és trietil-amin, N-metil-N-etilamin, és hasonlókat, továbbá mono-, di- és

trialkanolaminokat, amelyek alkohol csoportjai legfeljebb három szénatomot tartalmaznak, például mono-, di-, és trietanol-amin.

A (II) általános képletű vegyületek közül azokat használhatjuk előnyösen, amelyekben X, R¹-R⁵-ig bezárólag, valamint Y jelentése a fenti, R⁶ jelentése a szerin hidroxilcsoportját védő csoport, amely lehet 2-bróm-benziloxi-karbonil-, benzil-, acetyl-, tozil-, benzoil-, terc-butil-, tetrahidropira-2-yl-, tritil-, 2,4-diklórbenzil- vagy benziloxi-karbonil-csoport; R⁷ jelentése hidrogénatom, vagy a tirozin hidroxil csoportját védő csoport, mely az R⁶ védőcsoportjai közül választható és R⁸ jelentése az arginin N^δ, N^ω és N^{ω'} nitrogén atomjait védő csoport, amely tozil-, nitro-, benziloxi-karbonil-, vagy adamantil-oxi-karbonil-csoport. A (II) általános képletű vegyületek másik célszerű alakja olyan, ahol a szerin és tirozil csoportok: nincsenek védve és az arginin csoportot valamely erős sav addíciós só formájába védjük, például sósavval, p-toluolszulfonsavval, vagy kénsavval alkotott sav-addíciós sók formájában.

A találmány szerint előállított vegyületek értékes LH-RH antagonistáz tulajdonságát a szabványos farmakológiai eljárással demonstráljuk. A hatás demonstrálható például A. de la Cruz et. al., Science, 191, 195 (1976), által leírt vizsgálattal. Ennél a módszerrel ivarérett nőstény patkányokat használunk (Charles River Breeding Laboratories, Boston, Mass., USA) melyek körülbelül 200 g súlyúak és normális 4 napos ciklussal rendelkeznek. Az analógokat 20 %-os propilén-glikolban, fiziológiai só oldatban adagoljuk (ld. 2. táblázat), vagy kukorica olajban szuszpendálva (ld. 1. táblázat) az oestrus előtti napon déli 12 órakor. Másnap a patkányokat elpusztítjuk, a petevezetéküket és az uterusot sós vízzel ki-mossuk és a mosófolyadékot megvizsgáljuk, van-e benne pete.

A különböző analógokkal elvégzett vizsgálati eredményeket a II. táblázat mutatja. Az I. táblázatban azokat az (I) általános képletű vegyületeket hasonlítjuk össze a (7). példa szerint előállított vegyülettel, illetve a korábban ismert (Ac-D-Phe¹, D-Phe², D-Trp^{3,6})-LH-RH vegyületekkel, amelyekben X jelentése acetylcsoport, R¹ jelentése D-Phe, R² jelentése D-p-Cl-Phe, R³ jelentése D-Trp, R⁴ jelentése D-Trp és R⁵ jelentése Gly. Mint fent megjegyeztük, az I. és 2. táblázatban között vegyületeket különböző hordozók kíséretében adagoltuk.

I. táblázat

Peteérést gátló hatások összehasonlítása

Peptid	Dózis mcg	Ovuláció %-os kimaradása
(Ac-D-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ^{3,6})-LH-RH	31	100
(Ac-D-Phe ¹ , D-Phe ² , D-Trp ^{3,6})-LH-RH*	15	100
(Ac-D-Phe ¹ , D-Phe ² , D-Trp ^{3,6})-LH-RH*	250	100
(Ac-D-Phe ¹ , D-Phe ² , D-Trp ^{3,6})-LH-RH*	100	40

*K. Channabasavaiah és J. M. Stewart, Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 1226 (1979).

II. táblázat

Az (I) általános képletű vegyületek peteérést gátló hatása.

Peptid	Dózis mg	Az ovuláció %-os kimaradása
(D-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ³ , D-Phe ⁶)-LH-RH	0,25 0,125	82 11
(D-Phe ¹ , D-p-Br-Phe ² , D-Trp ³ , D-Phe ⁶)-LH-RH	0,25	50
(D-Phe ¹ , D-p-F-Phe ² , D-Trp ³ , D-Phe ⁶)-LH-RH	0,25	10
(Succ-D-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ³ , D-Phe ⁶)-LH-RH	0,125 0,062	80 50
(Ac-D-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ^{3,6})-LH-RH	0,062 0,031	100 64
(N-Ac-D-p-Cl-Phe ^{1,2} , D-Trp ^{3,6})-LH-RH	0,015	70
(N-Ac-D-Trp ^{1,3,6} , D-p-Cl-Phe ²)-LH-RH	0,015	90
(N-Ac-D-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ^{3,6} , D-Ala ¹⁰)-LH-RH	0,015	100
(N-Ac-D-p-Cl-Phe ^{1,2} , D-Trp ³ , D-Phe ⁶ , D-Ala ¹⁰)-LH-RH	0,0075	88
(N-Ac-D-Trp ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ³ , D-Phe ⁶ , D-Ala ¹⁰)-LH-RH	0,0075 0,0050	75 38
(N-Ac-D-p-F-Phe ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ^{3,6} , D-Ala ¹⁰)-LH-RH	0,0075	50
(N-Ac-Ala ¹ , D-p-Cl-Phe ² , D-Trp ^{3,6} , D-Ala ¹⁰)-LH-RH	0,010	18

A találmány szerinti vegyületek LH-RH antagonizáló tulajdonságai alkalmassá teszik őket az ember- és az állatorvosi gyakorlatban való alkalmazásra. Például az (I) általános képletű vegyületek alkalmasak arra, hogy emlősöknek enyhítsük a hipofízis gonadotrop hormonjainak nemkívánt fiziológiai hatásából eredő komplikációkat. Ilyen komplikációk például az idő előtti pubertás, a hormontól függő rosszindulatú és jóindulatú prosztata tumorok, az emlő, a petefészek és hererák; a hirszutizmus; akne; amenorrhoea; például második amenorrhoea; endometriózis valamint a petefészek és emlők tisztás megbetegedései mind állatok, mind pedig emberek esetében. Az (I) általános képletű vegyületek használhatók továbbá az ovuláció szabályozására, így alkalmasak a termékenység szabályozásánál mint például prekoitális, vagy postkoitális fogamzásgátlók, használhatók továbbá az oestrusz szinkronizálására, és a „ritmus” módszer tökéletesítésére. Ezek a vegyületek használhatók továbbá az emberi menopauzális gonadotrop hormon, follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) szabályozására, a perimenopauzális és postmenopauzális periódusok alatt nőknél.

Amikor az (I) általános képletű vegyületeket célszerűen savadidációs sói formájában az emberi vagy állati gyógyászatban alkalmazzuk, ezek rendszeresen adagol-

hatók akár orálisan, vagy szubkután, illetve intramuszkuláris injekció formájában, vagy nyelv alatti, nazális vagy vaginális adagolásban, a gyógyászatilag elfogadható adalékanyagok vagy segédanyagok kíséretében.

5 Az (I) általános képletű vegyületek dózissai függenek az adagolás módjától és a kezelés alatt álló páciénstől magától. A kezelést általában kis dózissal kezdjük, lényegesen kisebbekkel mint az illető vegyület optimális adagja. Ezután kis lépcsőkben növeljük a dózist, amíg az illető körülmények között az optimumot el nem érjük. Általában a vegyületeket olyan koncentrációban célszerű adagolni, amely gátolja az LH- és az FSH felszabadítását anélkül azonban, hogy bármely káros, vagy veszélyes mellékhatás lépne fel és célszerűen 10 mcg-tól 1000 mcg/testsúly kg tartományban adagoljuk, bár mint korábban már említettük, változtatás lehetséges. A 25 mcg-tól 250 mcg/testsúly kg adagolási szint azonban kívánatosabb, a kellő hatás kiváltása érdekében.

20 A nazális úton történő adagolás cseppek, vagy permet formájában történhet és ez alkalommal célszerű az (I) általános képletű vegyületet steril vizes oldatban használni, amely más egyéb oldószereket, például puffereket, vagy konzerváló anyagokat, valamint elegendő mennyiségű gyógyászatilag elfogadható sókat, vagy glukózt tartalmaz, amivel az oldatot izotóniássá tesszük. Az intranasális úton történő adagolásnál a dózisek 100 mcg-tól 10 mg/kg tartományban vannak, vagy célszerűen 100 mcg-tól 1 mg/testsúly kg tartományban.

30 Az (I) általános képletű vegyületek nazális vagy vaginális alkalmazásnál porok formájában is használhatók. Ilyen célra a decapeptidet finoman eloszlatott szilárd formában adagoljuk a gyógyászatilag elfogadható szilárd hordozókkal együtt, például finoman eloszlatott poli-
35 etilén-glikolt, melyet „Carbowax 1540” kereskedelmi néven árulnak; továbbá, finoman eloszlatott laktóz, vagy különösen vaginális alkalmazás esetén nagyon finoman eloszlatott szilikagél, például „Cab-O-Sil” kereskedelmi néven árult szilikagél használható. Ezek a kompozíciók egyéb excipienseket is tartalmazhatnak, finoman eloszlatott formában, például konzerváló anyagokat puffereket, vagy felületaktív anyagokat.

45 A nyelv alatti, vagy vaginális adagolás esetében a vegyületet szilárd dózis formában készítjük el, például nyelv alá helyezhető tabletták, vagy vaginális kúpok, melyek elegendő mennyiségű szilárd hordozót, például keményítőt, laktózt, bizonyos típusú agyagokat, puffereket, nedvesítő anyagokat, szétesést elősegítő anyagokat, vagy felületaktív anyagokat, illetve félig szilárd hordozókat tartalmazhatnak, amelyeket a kúpok készítésénél általában használnak. Az ilyen hordozóanyagokra
50 példákat találunk a szabványos gyógyászati szövegekben, például „Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1970. című könyvben.

55 Sokszor kívánatos, hogy az (I) általános képletű vegyületeket folyamatosan, hosszú időn keresztül adagoljuk, hosszan ható, lassan felszabaduló, vagy raktározott dózis formájában. Ilyen dózis formák vagy az (I) általános képletű vegyületnek valamely testnedvekben rosszul oldódó gyógyászatilag elfogadható sav adidációs sóját tartalmazza, például az alább felsorolt sók közül
60 valamelyiket, vagy magát a vízoldható só-t valamely olyan védő hordozóval együtt, ami megakadályozza annak gyors felszabadulását. Ez utóbbi esetben például a vegyületet egy nem-antigén, részben hidrolizált zselatinnal együtt, viszkózus folyadék formájában készíthet-
65

jük el; vagy adszorbeálthatjuk valamely gyógyászati-
 elfogadható szilárd hordozóra, pl. cink-hidroxidra, vagy
 valamely gyógyászati-elfogadható folyadékban szusz-
 pendálva adagolhatjuk; vagy elkészíthetjük a deka-pepti-
 det gél, vagy szuszpenzió formájában is, valamely védő,
 nem-antigén hidrokolloiddal együtt, pl. nátrium-karboxi-
 metilcellulóz, polivinil-pirrolidon, nátrium-alginát, zselatin,
 poligalakturon-sav, például pektin, vagy bizonyos
 mukopoliszaharidok kíséretében vizes, vagy nem-vizes
 gyógyászati-elfogadható folyadékokkal, konzerváló
 anyagokkal, vagy fehéretaktív anyagokkal együtt.
 Az ilyen készítmódokra a szabvány gyógyászati szöve-
 gekben találhatunk példákat, pl. a Remington's Pharma-
 ceutical Sciences, fent idézett című műben. Hosszan
 ható, lassan felszabaduló készítményeket mikro-kapszula-
 zás útján is előállíthatunk, ahol gyógyászati-elfogad-
 ható bevonóanyagokat alkalmazunk, pl. zselatint, poli-
 vinil-alkoholt, vagy etil-cellulózt. A mikro-kapszulázás
 céljaira használható bevonóanyagokra további példákat
 találunk a J. A. Herbig „Encyclopedia of Chemical
 Technology”. Vol. 13. 2. kiadás, Wiley, New York,
 1967, pp. 436–456. oldalán. Az ilyen készítmódok,
 valamint a vegyület sójának szuszpenziói, amelyek csak
 lassan oldódnak a testnedvekben, azt a célt szolgálják,
 hogy testsúly kilogrammonként kb. 10–1000 milli
 centigramm mennyiség szabaduljon fel naponta, és eze-
 ket célszerűen intramuszkuláris injekció formájában
 adagoljuk. Más változat szerint a fent felsorolt szilárd
 formájú dózisok elkészíthetők tabletták formájában pél-
 dául úgy, hogy bizonyos vízben rosszul oldódó sókat,
 vagy diszperziókat a vegyület sójára, mint szilárd hord-
 zóra abszorbeálunk, például használhatjuk az etilén-
 glikol-metakrilát, vagy hasonló monomerek hálós szer-
 kezetű polimerjének semleges hidrogéljét, melyet a
 3 551 556 lajstromszámú egyesült államokbeli szaba-
 dalmi leírás tartalmaz (1970. dec. 29. K. Kliment és
 társai). Ezekből a tablettákból a hatóanyag kb. hasonló
 mértékben szabadul fel, mint a fent említettekől és
 ezeket szubkután, vagy intramuszkuláris injekciók for-
 májában adagolhatjuk.

Megint más változat szerint hosszú ideig tartó, lassú
 hatást érhetünk el azáltal, ha a találmány szerinti vegyü-
 letet egy intra-vaginális eszköz, vagy ideiglenes implant
 formájában adagoljuk. Ez lehet például egy nem irritáló
 szilikon polimerből, például polisziloxánból készült
 tartály, amit kereskedelmi néven „Silastic” elnevezéssel
 árusítanak, vagy valamely fent említett polimer semleges
 hidrogéljéből készült tartály, amely olyan mértékű át-
 eresztő képességgel rendelkezik, hogy testsúly kilo-
 grammonként kb. 0,1 mcg-tól 50 mcg mennyiségű anyag
 felszabadulását teszi naponta lehetővé. Az ilyen intra-
 vaginális vagy implant dózis formának az az előnye
 a hosszú ideig tartó adagolásnál, hogy kívánt esetben
 eltávolíthatók, és így a kezelés megszakítható vagy határ-
 időzhető.

Annak a bizonyos oldalláncot védő csoportnak a ki-
 választásánál, melyet a találmány szerinti deka-peptid
 szintézisének használunk, a következő szabályokat kell
 figyelembe venni:

- a) a védőcsoport legyen stabil a reagenssel szemben és
 a reakció körülményei között, amelyet az α -amino védő-
 csoport eltávolítására választottunk a szintézis bármely
 lépésében; b) a védőcsoport tartsa meg a védő tulajdon-
 ságait (azaz ne hasadjon le az összekapcsolás feltételei
 mellett) és c) az oldalláncot védő csoport legyen eltávo-

lítható, amikor a kívánt aminosav sorrendet tartalmazó
 peptid szintézise befejeződött, olyan reakciókörülmé-
 nyek között, amelyik nem változtatja meg a peptid
 láncot.

Az α -amino védőcsoportokkal, így például az R^9 cso-
 porttal kapcsolatban, az alábbi használható védőcsoport-
 tokat említjük meg. 1) alifás uretán védőcsoportok, pél-
 dául t-butiloxikarbonil-, diizopropil-metoxi-karbonil-, bi-
 fenil-izopropil-oxikarbonil-, izopropil-oxikarbonil-, t-
 amil-oxikarbonil-, etoxi-karbonil- és alliloxikarbonil-
 csoportok, 2) cikloalkil-uretán típusú védőcsoportok,
 melyeket például a ciklopentil-oxikarbonil-, adamantil-
 oxikarbonil-, d-izobornil-oxikarbonil-, és ciklohexil-oxi-
 karbonil-csoportok képviselnek; továbbá a nitrofenil-
 szulfenil-csoport, tritil-szulfenil-csoport; alfa,alfa-dimetil-
 3,5-dimetoxi-benziloxikarbonil-csoport és tritilcsoport.
 α -amino-védőcsoportok gyanánt célszerűen t-butil-oxi-
 karbonil-, ciklopentil-oxikarbonil-, t-amil-oxikarbonil-,
 d-izobornil-oxikarbonil-, o-nitrofenil-szulfenil-, bifenil-
 izopropil-oxikarbonil-, vagy alfa-alfa-dimetil-3,5-dimet-
 oxi-benzil-oxikarbonil-csoportot használunk.

A szilárd fázisú technika alkalmazásánál a szintézist
 a peptid C-terminális végénél kezdjük és olyan α -amino-
 védett aminosavat használunk, amely egy szilárd gyantá-
 hoz kapcsolódik. Az ilyen kiindulási anyagot például
 úgy készítjük el, hogy egy α -amino-védett glicint vala-
 mely benzhidrilamin gyantához, klórmetilezett gyantá-
 hoz, vagy egy hidroximetil gyantához kapcsolunk.
 Az első használata célszerűbb. A benzhidril amin gyanta
 előállítását P. Rivaille, et al., írták le Helv. Chim. Acta
 54 2772 (1971)-ben, míg a hidroximetil gyanta előállítá-
 sát M. Bodanszky és J. T. Sheehan, Chem. Ind. (London),
 38, 1597 (1966) írták le. A klórmetilezett gyanta a
 kereskedelembe kapható a Bio Rad Lab. Richmond,
 California cégnél. Ha a benzhidrilamin gyantát használ-
 juk, egy amid kötő csoportot alakítunk ki az α -amino
 védett glicinnel, vagy a D-alaninnal, az (V) általános
 képlet szerint.

Ez lehetővé teszi, hogy miután az aminosav sorrend
 szintézisét befejeztük a C-terminális amid funkciót köz-
 vetlenül megkapjuk azáltal, hogy a kapcsolódó peptid
 hordozógyantáját és kötő-csoportját lehasítjuk és így
 a kívánt vegyület C-terminális részén aminosav-amidot
 alakítunk ki. Ebben a lépésben a hordozógyanta lehasítá-
 sására használt hidrogénfluorid az oldalláncot védő
 csoportot is eltávolítja és a találmány szerinti deka-
 peptidet kapjuk meg.

Ha más gyantákat használunk, a kötőcsoport benzil-
 észter-csoport, mint azt korábban illusztráltuk. Ebben
 az esetben az összekapcsolt védett peptidnek C-terminá-
 lis amiddá történő átalakítására alkalmas módszer az,
 hogy a védett peptidet ammonolízissel választjuk le a
 gyantáról; majd ezután a keletkező amid védőcsoportjait
 folyékony ammóniában oldott nátriummal történő keze-
 léssel, vagy hidrogén-fluoridos hasítással távolítjuk el.
 Egy más eljárás szerint a lehasítást úgy is végezhetjük,
 hogy valamely rövidszénláncú alkanollal, célszerűen
 metanollal vagy etanollal trietilamin jelenlétében át-
 észteresítünk és a kapott észtert amiddá alakítjuk át,
 majd ezt követően eltávolítjuk a védőcsoportokat a fent
 leírtak szerint. Lásd még J. M. Steward és J. D. Young,
 „Solid Phase Peptide Synthesis”, W. H. Freeman and
 Co., San Francisco, 1969 pp. 40–49. oldalon.

Speciális esetben a találmány szerinti eljárás értelmé-
 ben valamely α -amino-védett aminosavat, nevezetesen

egy α -amino-védett glicint, célszerűen t-butil-oxikarbonil-glicint, vagy valamely α -amino-védett D-alanint, célszerűen t-butil-oxikarbonil-D-alanint hozzákapcsolunk a benzhidrilamin gyantához valamely karboxil csoportot aktiváló vegyület, célszerűen diciklohexil-karbodiimid, vagy diizopropil-karbodiimid segítségével. Az α -amino-védett aminosavnak és a hordozógyantának összekapcsolása után az α -amino-védőcsoportot eltávolítjuk például trifluor-ecetsav metilén-kloridos oldatával, vagy trifluor-ecetsavval egyedül, vagy dioxánban oldott sósavval. A védőcsoport eltávolítása 0°C és szobahőmérséklet között történik (például $20-24^\circ\text{C}$ -on). Az α -amino-védőcsoportok eltávolítására egy másik szabványos reagenst és a hozzátartozó reakció körülményeket E. Schroder és K. Lubke írták le „The Peptides” c. könyvben. Vol. 1., Academie Press, New York, 1965. pp. 72-75. Az α -amino védőcsoport eltávolítása után a visszamaradó α -amino-védett aminosavakat a kívánt sorrendben lépésről lépésre összekapcsolva megkapjuk a peptidet. Az összes védett aminosavat kb. 3-szoros feleslegben juttatjuk be a szilárd fázisú reaktorba és az összekapcsolást metilén-klorid vagy dimetil-formamid és metilén-klorid elegyében végezzük. Abban az esetben, ha az összekapcsolás nem teljes, az összekapcsoló folyamatot megismétljük, mielőtt az α -amino-védőcsoportot eltávolítanánk, mielőtt még a következő aminosavat hozzákapcsolnánk a szilárd fázisú reaktorhoz. Az összekapcsolási reakció eredményét a szintézis minden lépésében ninhidrin reakció segítségével ellenőrizzük, ahogy azt E. Kaiser és társai leírták az *Analyt. Biochem.*, 34 595 (1970)-ben. Ily módon megkapjuk azt a (II) általános képletű vegyületet, amelyben X jelentése hidrogénatom.

Miután a kívánt aminosav sorrendet szintetizáltuk, a peptidet eltávolítjuk a hordozógyantáról alkalmas reagenssel, például hidrogén-fluoriddal kezelve, amely nemcsak a peptidet hasítja le a gyantáról, de lehasítja az összes, még visszamaradt oldallánc védő-csoportot is, és így közvetlenül megkapjuk azt az (I) általános képletű peptidet, amelyben X jelentése hidrogénatom, amennyiben az eljárásnál benzhidrilamin gyantát használunk.

Ha klórmetilézett gyantát használunk, a peptidet valamely rövidszénlancú alkanollal, célszerűen metanollal vagy etanollal történő átészterítés segítségével választjuk le a gyantáról. Ezután a kapott terméket szilikagélen kromatografáljuk és az összegyűjtött frakciót ammóniával kezelve a rövidszénlancú észtert, célszerűen a metil- vagy etil-észtert, C-terminális amiddá alakítjuk. Ily módon olyan (II) általános képletű vegyületeket kapunk, amelyekben X jelentése hidrogénatom. Az oldalláncot védő csoportokat ezután a fent leírt módon távolítjuk el, például folyékony ammóniában oldott nátriummal való kezeléssel, vagy hidrogénfluorid segítségével. Így megkapjuk az (I) általános képletű vegyületet, amelyben X jelentése hidrogénatom.

Az olyan (I) általános képletű peptid vegyületeket, amelyekben X jelentése hidrogén atomtól különböző, úgy kapjuk meg, ha a (II) általános képletű vegyületeket, amelyben X jelentése hidrogénatom, valamely alkalmas acilező szerrel acilezzük. Ezután a fent leírt eljárást lehasítjuk a hordozógyantát a kötő-csoporttal együtt, valamint az acilezett termék összes, még rajta levő oldallánc védő csoportjait is. Az olyan (II) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben X jelentése rövidszénlancú alkanoil-csoport, célszerűen valamely rövidszénlancú alkánsav-kloridot, vagy -bromidot vagy vala-

mely rövidszénlancú alkánsav-anhidridet használunk acilező szer gyanánt egy szerves proton akceptor, például piridin, vagy imidazol jelenlétében. Hasonlóképpen ugyancsak valamely szerves proton akceptor jelenlétében készíthetjük el az olyan (II) általános képletű vegyületeket, amelyekben X jelentése $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}$ vagy benzoilcsoport, ha az X csoportnak megfelelő sav-kloridot vagy sav-bromidot használjuk. Például ha olyan (II) általános képletű vegyületeket kívánunk készíteni, amelyben X jelentése $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ csoport, borostyánkősav-kloridot használhatunk.

Az olyan (I) általános képletű peptid vegyületek, amelyben X jelentése hidrogénatom, szintén használhatók az olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben X jelentése hidrogénatomtól különbözik azáltal, hogy az előbbi vegyületet a megfelelő acilező szerrel kezeljük.

Bár az előzőkben a szilárd fázisú szintézist írtuk le az (I) általános képletű vegyületek előállítására, de ezeknek a vegyületeknek az előállítására a klasszikus oldószeres eljárással is megoldható.

A következő példák tovább kívánják illusztrálni a találmány szerinti eljárást. A példákban az oldószer elemekkel kapcsolatban megadott arányok az illető oldószerek térfogatának relatív arányait jelzik.

1. példa

D - Fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - seril(O - benzil) - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L-arginil-(N^G-tozil)-L-prolilglicil-benzhidrilamin-gyanta előállítása

1 g (0,5 mmol) benzhidrilamin gyantát helyezünk egy Beckman Model 990 típusú automata peptid szintetizáló reakció edénybe, melyet a következő műveletek elvégzésére programozunk be: a) metilénklorid; b) metilénkloridban oldott 33 %-os trifluor-ecetsav (2 részletben 1 és 25 percig); c) metilén-klorid; d) etanol; e) kloroform; f) 10 %-os trietil-amin kloroformban (2 részletben mindegyik 3 percig); g) kloroform; h) metilén-klorid.

A gyantát 263 g (1,5 mmol) t-butil-oxikarbonil-glicinrel keverjük metilén-kloridban majd 1,5 mmol diizopropil-karbodiimidet adunk hozzá, az elegyet szobahőmérsékleten 1 óráig keverjük, és az aminosav gyantát metilén-kloriddal, etanollal majd ismét metilén-kloriddal mossuk, (mindegyikkel háromszor). A védett, összekapcsolt aminosavat ezután végigvisszük a b-től a h, lépéseken a fenti megadott program szerint. A következő aminosavakat (mindegyikből 1,5 mmol-t) kapcsolunk ezután hozzá egymás után az alábbi sorrendben: t-Boc-L-prolin, t-Boc-L-arginin(N^G-Tos); t-Boc-L-Leucin; t-Boc-D-triptofán, t-Boc-L-tirozin, t-Boc-L-serin(O-Bzl), t-Boc-D-triptofán, t-Boc-D-p-klórifenil-alanin, t-Boc-D-fenilalanin. Az N-terminális t-Boc csoporttal befejezett gyantát eltávolítjuk, metanollal mossuk és csökkentett nyomáson szárítjuk. 1,42 g cím szerinti vegyületet kapunk.

2. példa

N - Acetil - *D* - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril(*O* - benzil) - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - (*N*^G - tozil) - *L* - prolil-glicil-benzidril-amin-gyanta előállítás

Az 1. példa szerint előállított decapeptid gyantának egy részét (0,76 g-ot) 30 percig kezelünk olyan 30 ml-nyi oldattal, amely 100 ml metilén-kloridban 5 g imidazolt és 3,54 ml ecetsavanhidridet tartalmaz. Az acetilezett peptid gyantát ezután háromszor metilén-kloriddal, majd háromszor metanollal mossuk és vákuumban megszáritjuk. A cím szerinti vegyületet kapjuk meg.

3. példa

D - Fenilalanil - *D* - *p* - bróm - fenil - alanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - (*O* - benzil) - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - (*N*^G - tozil) - *L* - prolil - glicil - benzidril-amin-gyanta előállítás

A peptid gyantát az 1. példában leírt feltételek mellett és hasonló elrendezésben készítjük el azzal a kivétellel, hogy a t-Boc-D-klórfenil-alanin helyett t-Boc-D-p-bróm-fenilalanint használunk és hogy a t-Boc-D-triptofán helyett t-Boc-fenilalanint használunk a lánc 6-os helyzetében. A cím szerinti vegyületnek megfelelő befejezett száraz peptid-gyanta súlya 1,42 g.

4. példa

D - Fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - (*O* - benzil) - *L* - triptofil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - (*N*^G - tozil) - *L* - prolil - glicil - benzidril-amin-gyanta előállítás

A peptidet az 1. példában leírt feltételek mellett és hasonló sorrendben készítjük el azzal a kivétellel, hogy a lánc 6-os helyzetében levő t-Boc-D-triptofán helyett t-Boc-fenilalanint használunk. A cím szerinti vegyületnek megfelelő, befejezett száraz peptid-gyanta súlya 1,41 g.

5. példa

N - Szukcinil - *D* - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - (*O* - benzil) - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - (*N*^G - tozil) - *L* - prolil-glicil-benzidril-amin-gyanta előállítás

A 4. példa szerint előállított decapeptid gyantának 0,76 g-ját 30 ml olyan oldattal reagáltatjuk, amely metilén-kloridban imidazolt és szukcinil-kloridot tartalmaz. A reakciót 30 percig végezzük. Acetilezett peptid gyantát ezután metilén-kloriddal és metanollal mossuk, majd vákuumban megszáritva a cím szerinti vegyületet kapjuk meg.

6. példa

D - Fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prolil-glicinamid-(*D*-Phe¹, *D*-*p*-Cl-Phe², *D*-Trp^{3,6})-LH-RH acetát sójának előállítás

Az 1. példában leírt gyantáról a decapeptid lehasítása és a védő-csoportok eltávolítása úgy történik, hogy 0,7 g anyagot 20 ml hidrogén-fluoriddal, 5 ml anizollal és 50 mg 1,4-dithiothreitollal reagáltatunk 1 óráig 0 °C-on. A hidrogén-fluoridot ezután nitrogén atmoszféra alatt eltávolítjuk és a peptidet dietil-éter hozzáadásával kicsapjuk.

A nyers peptidet 50 %-os ecetsavval extraháljuk. Finom eloszlású, kémiaileg módosított térhálós szerkezetű dextrans, kereskedelmi néven „Sephadex G-50”-et tartalmazó 2,5 × 95 cm-es oszlopon leszűrjük és 50 %-os ecetsavval eluáljuk. Az UV abszorpciónál 280 nm-es fő csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és szárazra pároljuk.

A kapott olajat egy szilikagélt tartalmazó 1,5 × 145 cm-es oszlopra öntjük fel, majd 5 rész 1-butanol és 1 rész ecetsav és 1 rész víz elegyével eluáljuk. A fő csúcsot tartalmazó terméket összegyűjtjük, olajjára pároljuk be és hígított ecetsavból liofilizáljuk. 86 mg cím szerinti terméket kapunk fehér, pelyhes por alakjában. A termék vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat során homogénnek bizonyult. A vizsgálatot 20–30 mcg anyaggal 4 különböző oldószer rendszerrel szilikagélen végeztük. A foltokat Cl₂-keményítő reagenssel és Ehrlich-féle reagenssel hívtuk elő. Az alábbi R_f értékeket kaptuk: (A) 1-butanol:ecetsav:víz (4:1:5, felső fázis), 0,51; (B) etil-acetát:piridin:ecetsav:víz (20:5:13) 0,16; (C) 1-butanol:ecetsav:víz:etil-acetát (1:1:1:1), 0,66; (D) 1-butanol:piridin:ecetsav:víz (15:10:3:12), 0,65.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,82; Pro, 1,09; Gly, 1,00; Leu, 1,01; Tyr, 1,05; Phe, 1,05; p-Cl-Phe, 0,97; Trp, 1,82; Arg, 1,08.

7. példa

N - Acetil - *D* - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prolil-glicinamid, (*Ac*-*D*-Phe¹, *D*-*p*-Cl-Phe², *D*-Trp^{3,6})-LH-RH acetát sójának előállítás

A 2. példában leírt gyantáról (0,73 g) a védő csoportokat (az N-acetil-félék kivételével) és a hordozó gyantát (a kötőcsoporttal együtt) a 6. példában leírt feltételek mellett távolítjuk el. A nyers peptidet a 6. példa szerinti oszlopon kromatográfiásan tisztítjuk, azzal a különbséggel, hogy a szilikagélt most 1-butanol:ecetsav:víz 6:1:1 arányú elegyével eluáljuk. A liofilizált peptidet, azaz a cím szerinti vegyületet fehér, pelyhes por alakjában kapjuk meg (66 mg). Szilikagélen történt vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatnál a termék homogénnek bizonyult. A vékonyréteg kromatográfiát 4 oldószer rendszerrel a 6. példa szerint végeztük. A következő R_f értékek adódtak: (A) 0,63; (B) 0,28; (C) 0,71; (D) 0,67.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,85; Pro, 1,03; Gly, 0,99; Leu, 1,00; Tyr, 1,02; Phe, 1,01; p-Cl-Phe, 0,96; Trp, 1,83; Arg, 0,98.

8. példa

D - Fenilalanil - D - p - bróm - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - L - tirozil - D - fenilalanil - L - leucil - L - arginil-L-prolil-glicinamid, (D-Phe¹, D-p-Br-Phe², D-Trp³, D-Phe⁶)-LH-RH előállítása

A 3. példában leírt peptid gyantáról (1,42 g) a védő-csoportok és a hordozó gyanta eltávolítása a kötőcsoportokkal együtt, a 6. példában leírt feltételek mellett történik. A nyers peptidet a 6. példa szerinti oszlopon kromatográfiásan tisztítjuk és a tiszta, liofilizált, pelyhes por alakjában megkapott peptid súlya 203 mg. A termék, azaz a cím szerinti vegyület vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat során homogénnek bizonyult. Ezt a vizsgálatot szilikagélén végeztük négy oldószer rendszer felhasználásával a 6. példában leírt módon. A következő Rf értékeket kaptuk: (A) 0,48, (B), 0,54; (C), 0,79; (D), 0,59.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,79; Pro, 0,94; Gly, 1,00; Leu, 1,02; Tyr, 0,94; Phe, 1,84; Trp, 0,93; Arg és p-Br-Phe, 1,84.

9. példa

D - Fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - L - tirozil - D - fenilalanil - L - leucil - L - arginil-L-prolil-glicinamid-(D-Phe¹, D-p-Cl-Phe², D-Trp³, D-Phe⁶)-LH-RH előállítása.

A 4. példa szerint előállított peptid gyantáról (0,76 g) a védő-csoportokat és a hordozó gyantát a 6. példában leírt feltételek mellett távolítjuk el a kötő csoporttal együtt. A nyers peptidet a 6. példában leírt oszlop kromatográfiával tisztítjuk, azzal a kivétellel, hogy most 5:1:1 arányú 1-butanol:ecetsav:víz elegyét használjuk eluáláshoz. A tiszta cím szerinti vegyületet pelyhes fehér por formájában kapjuk meg, liofilizálás után (94 mg). Ez a termék a vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat során homogénnek bizonyult. A vizsgálatot szilikagél lemezek felhasználásával végeztük a 6. példában leírt oldószer rendszer alkalmazásával. A következő Rf értékeket kaptuk. (A) 0,42; (B) 0,46; (C) 0,72; (D) 0,60.

Az aminosav analízis eredménye: Ser 0,83; Pro, 0,94; Gly, 1,00; Leu, 1,01; Tyr, 0,93; Phe, 1,93; p-Cl-Phe, 0,95; Trp, 0,85; Arg, 0,98.

10. példa

N - Szukcinil - D - fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - L - tirozil - D - fenilalanil - L - leucil-L-arginil-L-prolil-glicinamid, (Succ-D-Phe¹, D-p-Cl-Phe², D-Trp³, D-Phe⁶)-LH-RH előállítása

Az 5. példában leírt 0,75 g peptid-gyantáról a védő-csoportok (N-szukcinil csoportok kivételével) és a hordozógyanta eltávolítása a kötőcsoportokkal együtt, a 6. példában leírt feltételek mellett történik. A nyers peptid tisztítását a 6. példa szerinti kromatográfiás oszlop felhasználásával és az ott leírt feltételek mellett végezzük. A tisztított cím szerinti vegyületet liofilizálás után fehér, pelyhes por alakjában kaptuk meg (78 mg). A termék vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat alapján homogénnek bizonyult. A vizsgálatot a 6. példában leírt oldószer rendszerrel végeztük. A következő Rf értékeket kaptuk:

(A) 0,52; (D) 0,71, 2-propanol:1 mól ecetsav (2:1); 0,70; etil-acetát:piridin:ecetsav:víz (5:5:1:3), 0,94.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,86; Pro, 0,98; Gly, 1,00; Leu, 1,09; Tyr, 1,06; Phe, 1,98, p-alfa-Phe, 0,97; Trp, 0,94; Arg, 1,01.

11. példa

N - Acetil - D - p - klór - fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - (O - benzil) - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L - arginil(N^G - tozil) - L - prolil-glicil-benzhidril-amin-gyanta előállítása

A peptid-gyantát az 1. példában leírt sorrendben és feltételek mellett állítjuk elő azzal a különbséggel, hogy a t-Boc-D-fenilalanil helyett t-Boc-D-p-klórfenilalanint használunk, majd a deka-peptid-gyantát a 2. példában leírt feltételek mellett acilezzük. A kész, acetilezett száraz peptid-gyanta (azaz a cím szerinti vegyület) súlya 1,58 g.

12. példa

N - Acetil - D - triptofil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - (O - benzil) - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L - arginil - (N^G - tozil) - L - prolil - glicil-benzhidril-amin-gyanta előállítása

A peptid gyantát ugyanolyan sorrendben és feltételek között állítjuk elő mint ahogy az 1. példában leírtuk, azzal a kivétellel, hogy t-Boc-D-triptofánt viszünk be az 1-es pozícióba a t-Boc-D-fenilalanin helyett. A kész, acilezett, szárított peptidgyanta (azaz a címbeli vegyület) súlya 1,62 g.

13. példa

N - Acetil - D - fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - (O - benzil) - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L - arginil - (N^G - tozil) - L - prolil - D-alanil-benzhidril-amin-gyanta előállítása

A peptid-gyantát ugyanolyan sorrendben és feltételek mellett állítjuk elő, mint ahogy azt az 1. példában leírtuk, azzal a kivétellel, hogy t-Boc-D-alanint viszünk be a molekulába a t-Boc-glicin helyett, majd a kapott deka-peptid-gyantát a 2. példában leírt feltételek mellett acilezzük. A kész, acilezett, szárított peptid-gyantát (azaz a cím szerinti vegyületet) lemérve 1,61 g-ot kapunk.

14. példa

N - Acetil - D - p - klór - fenilalanil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L - arginil - L - prolil - glicin - amid, (N - ac - D - p - Cl - Phe^{1,2}, D - Trp^{3,6})-LH-RH előállítása

A 11. példában leírt gyantáról a 6. példában leírt feltételek mellett eltávolítjuk a védő-csoportokat (az N-acetil típusúak kivételével) és a hordozógyantát a kötő-csoporttal együtt. A kivétel az, hogy most a szilikagél eluáláshoz 17:5:1:3 arányú etilacetát:piridin:ecetsav:víz elegyet használunk. A liofilizált peptid, azaz a cím szerinti vegyület fehér, pelyhes por, (118 mg)

amely a szilikagélén négy oldószer rendszerben végzett vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat során homogénnek bizonyult. A következő R_f értékeket kaptuk: (A) 1-butanol:ecetsav:víz (4:1:5, felső fázis), 0,51; (B) 1-butanol:ecetsav:víz:etilacetát (1:1:1:1) 0,83; (C) etilacetát:piridin:ecetsav:víz (5:5:1:3) 0,95; és izopropanol: 2 mólos ecetsav (2:1) 0,72.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,86; Pro, 1,00; Gly, 1,00; Leu, 1,02; Tyr, 0,93; p-Cl-Phe, 2,02; Trp, 1,40; Arg, 0,99.

15. példa

N - Acetil - *D* - triptofil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - glicinamid, (*N* - Ac - *D* - Trp^{1,3,6}, *D* - *p* - Cl - Phe²) - LH-RH előállítása

A 12. példa szerint előállított gyantáról eltávolítjuk a védőcsoportokat és a hordozógyantát a kötőcsoporttal együtt. A szabad peptidet a 14. példában leírt feltételek mellett tisztítjuk. A liofilizált peptid, azaz a cím szerinti vegyület fehér, pelyhes por (88 mg), amely szilikagélén négy oldószer rendszerben végzett vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat alapján homogénnek bizonyult. Az alábbi R_f értékeket kaptuk: (A) 1-butanol:ecetsav:víz (4:1:5) felső fázis, 0,52; (B) 1-butanol:ecetsav:víz:etilacetát (1:1:1:1) 0,78; (C) etilacetát:piridin:ecetsav:víz (20:5:1:3), 0,22; (D) izopropanol: 2 mólos ecetsav (2:1) 0,70.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,81; Pro, 0,97; Gly, 1,02; Leu, 1,03; Tyr, 1,03; p-Cl-Phe, 0,97; Trp, 3,06; Arg, 0,99.

16. példa

N - Acetil - *D* - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - Ac - *D* - Phe¹, *D* - *p* - Cl - Phe², *D* - Trp^{3,6}, *D* - Ala¹⁰) - LH-RH előállítása

A 13. példa szerint előállított gyantáról eltávolítjuk a védőcsoportokat és a hordozógyantát a kötőcsoporttal együtt. A szabad peptidet a 14. példában leírt feltételek mellett tisztítjuk. A liofilizált peptid fehér, pelyhes por, (159 mg), amely a 15. példában leírt négy oldószeres rendszerben homogénnek bizonyult. (A) 0,56; (B), 0,83; (C), 0,24; (D), 0,68.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,88; Pro, 1,00; Ala, 1,06; Leu, 1,00; Tyr, 0,97; Phe, 0,95; p-Cl-Phe, 0,96; Trp, 2,08; Arg, 0,93.

17. példa

D - Fenilalanil - *D* - *p* - fluor - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - (*O* - benzil) - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - (*N*^G - tozil) - *L* - prozil - glicil - benzil - hidril - amin - gyanta előállítása.

A peptid gyantát az 1. példában leírt sorrendben és feltételek mellett állítjuk össze azzal a kivétellel, hogy t-Boc-D-fluorfenilalanint viszünk be a t-Boc-D-klórfenilalanin helyett és hogy t-Boc-fenilalanint viszünk be a

láncc 6-os helyzetébe a t-Boc-D-triptofán helyett. A kész, száraz peptid-gyanta, azaz a cím szerinti vegyület súlya 1,41 g.

18. példa

D - Fenilalanil - *D* - *p* - fluor - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - glicinamid, (*D* - Phe¹, *D* - *p* - F - Phe², *D* - Trp³, *D* - Phe⁶) - LH-RH előállítása

A 17. példa szerint előállított peptid-gyanta 1,41 g-járól eltávolítjuk a védőcsoportokat és a hordozógyantát a kötőcsoporttal együtt a 6. példában leírt feltételek mellett. A nyers peptidet a 6. példában leírt oszlopon kromatográfiásan tisztítjuk, majd a tiszta, liofilizált pelyhes fehér port lemérve 153 mg-ot kapunk. A termék, azaz a cím szerinti vegyület, szilikagélén végzett vékonyréteg kromatográfia szerint homogénnek bizonyult. A kromatográfiánál a 15. példában leírt három oldószer rendszert használtuk, melynek R_f értékei a következők: (A) 0,48; (B) 0,81; (C) 0,52.

Az aminosav analízis eredménye: Ser, 0,88; Pro, 1,03; Gly, 1,10; Leu, 1,00; Tyr, 0,98; Phe, 1,95; p-F-Phe, 0,98; Trp, 0,93; Arg, 1,02.

A megfelelő R_f értékeket a következő összetételű eluálószer alkalmazásával határoztuk meg:

- (A) 1-butanol:ecetsav:víz:etilacetát (1:1:1:1)
 (B) etilacetát:piridin:ecetsav:víz (5:5:1:3)
 (C) izopropanol:1 mól ecetsav (2:1)
 (D) 1-butanol:ecetsav:víz (4:1:1)

a) *N* - acetil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - ac - *D* - *p* - Cl - Phe^{1,2}, *D* - Trp³, *D* - Phe⁶, *D* - Ala¹⁰) LH-RH R_f értékek:

- (A) 0,66; (B) 0,94; (C) 0,71; (D) 0,53

b) *N* - acetil - *D* - triptofil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - fenilalanil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - Ac - *D* - Trp¹, *D* - *p* - Cl - Phe², *D* - Trp³, *D* - Phe⁶, *D* - Ala¹⁰) LH-RH R_f értékek:

- (A) 0,76; (B) 0,96; (C) 0,70; (D) 0,54

c) *N* - acetil - *D* - *p* - fluor - fenilalanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - Ac - *D* - *p* - F - Phe¹, *D* - *p* - Cl - Phe², *D* - Ala¹⁰) LH-RH R_f értékek:

- (A) 0,77; (B) 0,95; (C) 0,73; (D) 0,57

d) *N* - acetil - alanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - Ac - Ala¹, *D* - *p* - Cl - Phe², *D* - Trp^{3,6}, *D* - Ala¹⁰) LH-RH R_f értékek:

- (A) 0,64; (B) 0,89; (C) 0,67; (D) 0,47

e) *N* - acetil - *D* - alanil - *D* - *p* - klór - fenilalanil - *D* - triptofil - *L* - szeril - *L* - tirozil - *D* - triptofil - *L* - leucil - *L* - arginil - *L* - prozil - *D* - alaninamid, (*N* - Ac - *D* - Ala¹, *D* - *p* - Cl - Phe², *D* - Trp^{3,6}, *D* - Ala¹⁰) LH-RH

R_f értékek:

(A) 0,70; (C) 0,62; (D) 0,54

f) N - acetil - glicil - D - p - klór - fenilalanil - D - triptofil - L - szeril - L - tirozil - D - triptofil - L - leucil - L - arginil - L - prolin - D - alaninamid, (N-Ac-Gly¹, D-p-Cl-Phe², D-Trp^{3,6}, D-Ala¹⁰) LH-RH

R_f értékek:

(A) 0,65; (B) 0,88; (C) 0,69; (D) 0,46

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek, valamint azok gyógyászatilag elfogadható sóinak előállítására, amelyben

X jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomszámú alkanólcsoport, vagy HOOC-(CH₂)_n-CO- csoport, amelyben n értéke 2–6-ig terjedő egész szám;

R¹ jelentése Gly, L-Ala, D-Ala, D-Trp, D-Phe vagy D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;

R² jelentése D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;

R³ jelentése D-Trp;

R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe és

R⁵ jelentése Gly vagy D-Ala

azzal jellemezve, hogy valamely (II) általános képletű adott esetben védett N-terminális aminosoprotot tartalmazó peptidről – ahol a képletben X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ jelentése a tárgyi körben megadott, R⁶, R⁷ és R⁸ jelentései hidrogénatom vagy valamely védőcsoport, és Y jelentése aminosoprot vagy gyantához kötött aminosoprot, azzal a feltétellel, ha Y jelentése aminosoprot, akkor az R⁶, R⁷ és R⁸ csoportok közül legalább egy védőcsoport vagy az N-terminális aminosoprot védett – eltávolítjuk a védőcsoportot(ka)t és/vagy a gyantát, ezután a kapott olyan (I) általános képletű peptidet, amelyben X jelentése hidrogénatom kívánt esetben acilezzük, ily módon olyan (I) általános képletű peptidet kapunk, amelyben X jelentése a tárgyi körben megadott acilcsoport és/vagy a kapott peptidet gyógyászatilag elfogadható sóvá alakítjuk.

(Elsőbbsége: 1981. 06. 01.)

2. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek, valamint azok gyógyászatilag elfogadható sóinak előállítására, amelyben

X jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomszámú alkanólcsoport, vagy HOOC-(CH₂)_n-CO- csoport, amelyben n értéke 2–6-ig terjedő egész szám;

R¹ jelentése D-Trp, D-Phe vagy D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;

R² jelentése D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben halogénatomot tartalmaz;

R³ jelentése D-Trp,

R⁴ jelentése D-Trp vagy D-Phe és

R⁵ jelentése Gly vagy D-Ala

azzal jellemezve, hogy valamely (II) általános képletű adott esetben védett N-terminális aminosoprotot tartal-

mazó peptidről – ahol a képletben X, R¹, R², R³, R⁴ és R⁵ jelentése a tárgyi körben megadott R⁶, R⁷ és R⁸ jelentései hidrogénatom vagy valamely védőcsoport és Y jelentése aminosoprot vagy gyantához kötött aminosoprot, azzal a feltétellel, ha Y jelentése aminosoprot, akkor az R⁶, R⁷ és R⁸ és n csoportok közül legalább egy védőcsoport vagy az N-terminális aminosoprot védett – eltávolítjuk a védőcsoportot(ka)t és/vagy a gyantát, ezután a kapott olyan (I) általános képletű peptidet, amelyben X jelentése hidrogénatom kívánt esetben acilezzük, ily módon olyan (I) általános képletű peptidet kapunk, amelyben X jelentése a tárgyi körben megadott acilcsoport és/vagy a kapott peptidet gyógyászatilag elfogadható sóvá alakítjuk.

(Elsőbbsége: 1980. 06. 02.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja azzal jellemezve, hogy olyan, az N terminálison védőcsoporttól mentes (II) általános képletű kiindulási anyagot használunk, amelyben R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸, X és Y jelentése az 1. igénypontban megadott.

(Elsőbbsége: 1981. 06. 01.)

4. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja azzal jellemezve, hogy olyan, az N terminálison védőcsoporttól mentes (II) általános képletű kiindulási anyagot használunk, amelyben R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸, X és Y jelentése a 2. igénypontban megadott.

(Elsőbbsége: 1980. 06. 02.)

5. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja azzal jellemezve, hogy a szintézisnél olyan (II) általános képletű kiindulási anyagot használunk, amelyben R¹ jelentése D-Trp, D-Phe vagy D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben klóratomot tartalmaz, R² jelentése D-Phe, amely szubsztituensként para helyzetben fluor-, klór-, brómatomot tartalmaz, R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸, X és Y jelentése a 2. igénypontban megadott.

(Elsőbbsége: 1980. 06. 02.)

6. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja az N-acetil-D-Phe-D-p-Cl-Phe-D-Trp-L-Ser-L-Tyr-D-Trp-L-Leu-L-Arg-L-Pro-D-Ala-NH₂ előállítására, azzal jellemezve, hogy N-acetil-D-Phe-D-p-Cl-Phe-D-Trp-L-Ser(R⁶)-L-Tyr(R⁷)-D-Trp-L-Leu-L-Arg(NG-R⁸)-L-Pro-D-Ala-Y általános képletű kiindulási anyagot használunk, amelyben R⁶, R⁷, R⁸ és Y jelentése a 2. igénypontban megadott.

(Elsőbbsége: 1980. 06. 02.)

7. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja az N-acetil-D-p-Cl-Phe-D-p-Cl-Phe-D-Trp-L-Ser-L-Tyr-D-Phe-L-Leu-L-Arg-L-Pro-L-Ala-NH₂ előállítására, azzal jellemezve, hogy N-acetil-D-p-Cl-Phe-D-p-Cl-Phe-D-Trp-L-Ser(R⁶)-L-Tyr(R⁷)-D-Phe-L-Leu-L-Arg(NG-R⁸)-L-Pro-L-Ala-Y általános képletű kiindulási anyagot használunk, amelyben R⁶, R⁷, R⁸ és Y jelentése a 2. igénypontban megadott.

(Elsőbbsége: 1980. 06. 02.)

8. Eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely 1. igénypont szerint előállított (I) általános képletű vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját, a képletben X, R¹, R², R³, R⁴ és R⁵ jelentése az 1. igénypontban megadott, gyógyszerészeti célra alkalmas vivőanyaggal és/vagy gyógyászati

60

segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

(Elsőbbsége: 1981.06.01.)

9. Eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 2. igénypont szerint előállított (I) általános képletű vegyületet vagy annak gyógyászati-

lag elfogadható sóját, a képletben X, R¹, R², R³, R⁴ és R⁵ a 2. igénypontban megadott jelentésű, gyógyszerészeti célra alkalmas vivőanyaggal és/vagy gyógyászati segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

(Elsőbbsége: 1980.06.02.)

1 db ábra

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent: a Műszaki Könyvkiadó gondozásában

COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet

