



HU000229701B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 701**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 02633**(22) A bejelentés napja: **2001. 12. 19.**(40) A közzététel napja: **2003. 12. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2014. 05. 28.**(51) Int. Cl.: **C07K 1/04** (2006.01)**C07K 1/06** (2006.01)**C07K 7/23** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/IE 01/00159

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02051861

(30) Elsőbbségi adatok:

2000/1079**2000. 12. 22.****IE**

(72) Feltaláló(k):

Jackson, Steven Allen, Holliston, Massachusetts (US)

(73) Jogosult(ak):

**Ipsen Manufacturing Ireland Limited, Dublin
(IE)**

(74) Képviselő:

**dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54)

Eljárás Trp aminosavat tartalmazó peptid szintézisére

(57) Kivonat

A találmány tárgyát Trp aminosavat tartalmazó peptidek szintézisére szolgáló, szilárd fázisú eljárás képezi.

A találmány szerinti eljárás során - a technika állása szerinti jelenlegi irányzattal ellentétben — a szintézis során a triptofán aminosavak oldalláncai ideiglenesen védve vannak, ami a triptofán-tartalmú LHRH analógok (például a [D-Trp⁶]-LHRH) esetén javítja a kitermelést.

Eljárás Trp aminosavat tartalmazó peptid szintézisére

A találmány tárgyát Trp aminosavat tartalmazó peptidok szintézisére szolgáló, szilárd fázist alkalmazó eljárás képezi.

A luteinizáló hormont felszabadító hormon (LHRH) a hipotalamusz által termelt neurotranszmitter, amely stabilizálja a luteinizáló hormon (LHRH) és a tüsző stimuláló hormon (FSH) szekrécióját az agyalapi mirigyből, amelyek viszont szteroid hormonok - mint például tesztoszteron - szintézisét stimulálják az ivarmirigyekben. Sok LHRH peptid analóg (azaz például agonisták és antagonisták) megtalálható jelenleg a kereskedelemben, az endometriózis, prosztata rák, precocius pubertás és más hormon-közvetített rendellenesség kezelésére. Az ilyen LHRH analógok szintézise bonyolult és költséges.

A szilárd fázisú peptid szintézist az 1963-as évben vezették be, azzal a szándékkal, hogy megoldják az oldatfázisú peptidszintézissel kapcsolatos sok közti-termék tisztítási problémát [Stewart és Mitsunaga, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., 2. kiadás, (1984)]. A szilárd fázisú peptid szintézis során az aminosavakat bármely kívánt szekvenciájú peptiddé állítjuk össze (azaz összekapcsoljuk) oly módon, hogy a peptidlánc egyik vége (mint például a C-terminális) oldhatatlan hordozóhoz van rögzítve. Miután a kívánt szekvenciát a hordozón összekapcsoltuk, a peptidet utána leválasztjuk (például lehasítjuk) a hordozóról.

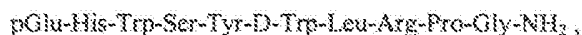
A 4,010,125 lajstromszámú US szabadalom (1977) írja le a [D-Trp⁶]-LHRH szintézisét, amelyben az LHRH agonista tíz aminosavából négynek az oldalláncai védettek (azaz: L-hisztidin(tózil), szeril(benzil), tirozil(2,6-di-Cl-Bzl) és L-arginil(tózil)). Azonban Coy és munkatársai [Coy és Mitsunaga: Int. J. Peptide Protein Res. 14 359 (1979)] később számos további LHRH analóg szintéziséről számoltak be, amelyben minimális oldallánc védelem - mint például sóképzéses védelem az arginin esetében (azaz Arg x HCl) kiváló kitermeléseket mutatott a megfelelő védett szintézissel összehasonlítva. A találmányi gondolat azon a felfedezésen alapszik, hogy - ellentétben a technika állása szerint azon irányzattal, hogy ne védjük az aminosavak oldalláncait az LHRH analógok szintézise során - a triptofán aminosav védelme a szilárd fázisú szintézis során valóban javítja a triptofán aminosavval rendelkező LHRH analógok (mint például a [D-Trp⁶]-LHRH) kitermelését.

A 4,569,927 lajstromszámú USA-beli szabadalom feltár peptidokat, köztük decapeptideket. Ezekben a peptidekben követelmény, hogy a D-Phe legyen a második aminosav a szekvenciában. Nincsenek feltárva olyan bioaktív LHRH -származékok, amelyekben hisztidin van a második pozícióban.

A DE 3,931,731 számú szabadalmi dokumentum feltárja [D-Trp⁶]-LHRH szilárd fázisú szintézisét poliakril gyantán. A szintézis kihasználja a poliakril gyanta hidrofíli tulajdonságát, mellyel a polisztirol gyanta nem rendelkezik.

A BE 904,458 számú szabadalmi dokumentum feltárja [D-Trp⁶]-LHRH szilárd fázisú szintézisét, ahol a triptofán indoleszoportját formilcsoport véd, és amiben a peptid benzhidril-amino-polisztirol-1%-divinil-benzol kopolimer benzhidril-amino-polimerjéhez kötődik. A benzhidril-amino-polimer hidrofíli tulajdonságokkal rendelkezik.

A találmány egy aspektusa szerint a találmány tárgyát képezi az (I) általános képletű peptid előállítására szolgáló eljárás:



(I) képlet

ahol

a His aminosavat tozilcsoport védí és valamennyi Trp aminosav indol-NH-csoportja védett, és az eljárás a következő lépésekből áll:

- (a) Boc-Gly céziúmsóját klórmetilézett polisztirol gyantára kapcsoljuk, miáltal Boc-Gly-gyantát kapunk;
- (b) a Boc-Gly-gyantát védőcsoport-mentesítjük úgy, hogy a Boc-Gly-gyantát összekeverjük Boc eltávolítására szolgáló szerves savkeverékkel, miáltal H_2N -Gly-gyanta szerves savval képzett sóját kapjuk;
- (c) bázissal semlegesítjük a H_2N -Gly-gyanta szerves savval képzett sóját, miáltal H_2N -Gly-gyantát kapunk;
- (d) a H_2N -Gly-gyantát Boc- α -amin védett aminosavval kapcsoljuk, amely védett aminosav megfelel az (I) általános képlet szerinti következő aminosavnak a C-terminálisról az N-terminális irányába haladva, amely kapcsolás a következő lépésekből áll:

- (i) a H_2N -Gly-gyantát Boc- α -amin védett aminosavval reagáltatjuk peptid kapcsoló ágens jelenlétében, miáltal Boc-védett kapcsolt terméket kapunk;
- (ii) a Boc csoportot lehasítjuk a Boc-védett kapcsolt termékről oly módon, hogy a Boc-védett kapcsolt terméket Boc-lehasító szerves savval keverjük össze, miáltal kapcsolt terméket kapunk;
- (iii) a kapcsolt terméket a következő Boc- α -amin védett aminosavval reagáltatjuk peptid kapcsoló ágens jelenlétében, miáltal Boc-védett kapcsolt terméket kapunk;
- (iv) a Boc csoportot lehasítjuk a Boc-védett kapcsolt termékről oly módon, hogy a Boc-védett kapcsolt terméket Boc-lehasító szerves savval keverjük össze, miáltal megkapjuk a következő kapcsolt terméket;
- (v) a (d)(iii) és a (d)(iv) lépéseket addig ismételjük, míg az (I) általános képletű peptid N-terminális aminosavát is hozzákapcsoljuk és az N-terminális aminosav Boc-csoportját is lehasítjuk, és

a His aminosav tozil oldallánc-védőcsoportját eltávolítjuk, miáltal védett befejezett peptid-gyantát kapunk;

(e) a védett befejezett peptid-gyantát hasítjuk és a védőcsoportokat eltávolítjuk, miáltal megkapjuk az (I) általános képletű peptidet, hasítás és védőcsoport-eltávolítás során a következő lépéseket hajtjuk végre:

- (i) a védett befejezett peptid-gyantából oldatot készítünk metanol/közömbös poláris aprotikus oldószer keverékben;
- (ii) az oldatot mintegy 0 °C és mintegy 10 °C közé hűtjük;
- (iii) ammónia gázt vagy etilamin gázt buborékoltatunk lassan az oldatba a hűtés fenntartása mellett, amíg az oldat kellőképpen telítődik ammóniával, miáltal telített oldatot kapunk;
- (iv) a telített oldatot hűtés nélkül mintegy 15-36 órán át kevertetjük, míg a szabad metilészter több, mint 95%-a átalakul a megfelelő amiddá - amennyiben ammónia gázt használunk - vagy a megfelelő etilamiddá, amennyiben etilamin gázt alkalmazunk; és
- (f) a peptidet az oldatból izoláljuk.

A fenti, találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során egymást követően előnyösen a következő Boc- α -amin aminosavakat kapcsoljuk össze a C-terminálisról az N-terminális felé haladva: N- α -Boc-L-prolin, N- α -Boc-L-arginin x HCl, N- α -Boc-L-leucin, N- α -Boc-D-triptofán(N'-indol-formil), N- α -Boc-L-tirozin, N- α -Boc-L-szerin hidrát, N- α -Boc-triptofán(N'-indol-formil), N- α -Boc-L-hisztidin(tozil)-ciklohexilamin só és piroglutaminsav.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző

eljárás során előnyösen a Trp oldallánc formil védőcsoportját ammóniát, primer amint vagy szekunder amint és alkoholt tartalmazó oldattal végzett kezeléssel távolítjuk el.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során előnyösen ammóniát és metanolt tartalmazó oldatot alkalmazunk.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárásban előnyösen az oldatból történő peptid izolálás során:

- (i) az oldatot leszűrjük és ezzel szűrletet állítunk elő; és
- (ii) a szűrletet koncentráljuk.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) is alkalmazunk, amikor N- α -Boc-D-triptofán(N'-indol-formil)-t, N- α -Boc-L-tirozint, N- α -Boc-L-szerin hidrátot és N- α -Boc-triptofán(N'-indol-formil)-t kapcsolunk.

A találmány egy másik aspektusa szerint a találmány tárgyát a fent megadott és definiált (I) általános képletű peptid szilárd fázisú szintézisére szolgáló eljárás képezi,

ahol az eljárás során ideiglenesen mindegyik triptofán aminosavat olyan oldallánc védőcsoporttal látjuk el, amely bázisra labilis, ahol a védőcsoportot az (I). általános képletű peptid szilárd fázisról történő lehasítása során távolítjuk el bázissal végzett reakcióban.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során Trp vagy D-Trp oldallánc védőcsoportként acil csoportot alkalmazunk.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során a Trp vagy D-Trp oldallánc védőcsoport eltávolítását ammóniát, primer amint vagy szekunder amint és alkoholt tartalmazó oldattal történő kezeléssel végezzük.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja szerint az ezt közvetlenül megelőző eljárás során oldallánc védőcsoportként formilcsoportot alkalmazunk és a felhasznált bázis ammóniát tartalmazó metanol oldat.

Rövidítések:

BOC = t-butoxi-karbonil

Cit = citrullin

pPzACA1a = cisz-3-(4-pirazinil-karbonilamino-ciklohexil) alanin

hArg(Bu) = N-guanidino-(butil)-homoarginin

hArg(Et)₂ = N,N'-guanidino-(dimetil)-homoarginin

hArg(CH₂CF₃)₂ = N,N'-guanidino-bisz-(2,2,2-trifluoroetil)-homoarginin

HOBt = 1-hidroxi-benzotriazol

Lys(iPr) = N^ε-izopropil-lizin

β-Nal = β-1-naftilalanin vagy β-2-naftilalanin, amennyiben másként nem jelezzük

NicLys = N^ε-nikotinoil-lizin

Pal = piridilalanin

p-Cl-Phe = 3-(4-klórfeil)alanin

p-F-Phe = 3-(4-fluorfeil)alanin

PicLys = N^ε-pikolinoil-lizin

Qal = kinolil-alanin

Amennyiben másként nem jelöljük, az itt alkalmazott összes technikai és tudományos kifejezés alatt a szakember számára általánosságban ismert jelentést értjük.

Az (I) általános képletű peptid előállítható szilárd fázisú peptidszintézis segítségével Boc-kémiát alkalmazva Merrifield-gyantán, majd a peptidet a gyantáról ammóniát, primer amint vagy szekunder amint tartalmazó alkoholos oldattal lehasítva, hogy a kívánt peptidet megkapjuk.

A találmány szerinti ilyen eljárásban az első lépés a C-terminális aminosav - Boc-Gly cézium sójának kapcsolása a Merrifield-gyantára észter kötésen keresztül. A Boc-Gly cézium sójának kialakításához a Boc-Gly aminosavat cézium-karbonáthoz adjuk hozzá metanol és víz keverékében. A Boc-Gly cézium sóját vákuumban megszáritjuk és utána reagálni hagyjuk a polisztirol klórmetil-benzil csoportjaival vízmentes poláris aprotikus oldószerben, mint például dimetil-formamidban (DMF). Ezt a reakciót mintegy 24-48 órán keresztül végezzük, előnyösen 36 órán keresztül mintegy 45-60 °C hőmérsékleten, előnyösen 50 °C-on. A reakcióba vitt gyantát le-szűrjük, vízzel, poláris aprotikus oldószerrel - mint például DMF - és alkohollal - mint például metanol - mos-suk, majd súlyállandóságig szárítjuk, előnyösen csökkentett nyomás alatt. A szárított gyantát megvizsgálhatjuk a Boc-Gly aminosav tartalomra, amelyet mmol Gly aminosav per gramm száraz gyanta értékben fejezzük ki. A számított értéket használjuk fel a kapcsolási reakció méretének meghatározására az ezt követő anyagfelhasználásokhoz és az elméleti kitermelés kiszámításához.

Az (I) általános képletű peptid szintézise végrehajtható üveg reaktorba helyezett Boc-Gly gyantán, ahol a reaktor alján zsugorított üvegszűrő helyezkedik el. A reaktort mechanikus keverővel kevertetjük és az ürtítéshez inert gáz nyomást alkalmazunk - mint például nitrogén nyomást - hogy a folyadékot a reaktor alján elhelyezett zsugorított üvegszűrőn keresztül nyomjuk, míg a gyanta visszamarad a reaktorban. Először eltávolítjuk a Boc-Gly Boc csoportját a Gly gyantáról (azaz lehasítjuk a védőcsoportot) oly módon, hogy a Gly gyantát kétszer összekeverjük klórozott oldószerben készült szerves sav oldattal - előnyösen 25% trifluor-ecetsav (TFA) diklórmetánban (DCM) - először mintegy 2 perc időtartamra és utána mintegy 25 perc időtartamra, amit nitro-gén nyomással segített szűrés követ. A Gly gyantát háromszor mossuk DCM-ben és kétszer alkohollal, mint például izopropil alkohollal (IPA), és az eredményül kapott aminos-TFA sót kétszer semlegesítjük közömbös ol-dószerben készült bázis oldattal, előnyösen 10% trietilamin bázissal DCM-ben, egyenként mintegy 5 percig majd ismét háromszor mossuk DCM-ben. A gyantát utána 2,5 moláris ekvivalens Boc α -amino védett aminosav keverékkel kapcsoljuk - ahol az aminosav megfelel az (I) általános képlet szerinti aminosavaknak a C-terminálisról az N-terminális vég felé haladva - lépésenként peptid kapcsoló ágenszt használva - előnyösen diizopropil-karbodlimid (DIC) - poláris aprotikus oldószerrel képzett - előnyösen DMF/DCM keverék - reakció elegyben. Minden egyes kapcsolást DMF és DCM mosások követnek. A gyantát Kaiser-féle ninhidrin teszttel vizsgálhatjuk az egyes kapcsolások teljességére, kivéve az arginin esetében, amikor izatint alkalmazhatunk a visszamaradó nem-kapcsolt prolin szekunder aminjának kimutatására. A Boc csoportot eltávolítjuk az egyes kapcsolt aminosavakról a fentebb leírt tesztelést követően. Előnyösen a találmány szerinti szintézis során a kö-vetkező, az (I) általános képlet aminosavainak megfelelő védett aminosavakat alkalmazzuk: N- α -Boc-L-prolin, N- α -Boc-L-arginin x HCl, N- α -Boc-L-leucin, N- α -Boc-D-triptofán(N'-indol-formil), N- α -Boc-L-tirozin, N- α -Boc-L-szerin hidrát, N- α -Boc-L-hisztidin(tozil)-ciklohexilamin só és piroglutaminsav.

1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) is alkalmazható (3-5 ekvivalens) amikor D-Trp, Tyr, Ser és Trp védett származékait kapcsoljuk. A hisztidin tozil oldallánc védőcsoportját két HOBt/DMF kezeléssel távolítjuk el - egyenként egy óra időtartamban - az utolsó aminosav kapcsolás után. A Boc-D-triptofán és a Boc-L-triptofán

aminosavak oldalláncukon védettek formil csoporttal az indolgyűrű nitrogénjén. A formil csoportot később a peptid gyantáról történő lehasítása során bázis segítségével végezzük.

A befejezett peptid-gyantát előre lemerített zsugorított üveg szűrőtölcsérbe mossuk közömbös klórozott oldószerekkel - mint például DCM - kétszer mossuk alkohollal - mint például metanol - és vákuumban megszáritjuk. A megszáritott peptid-gyantát egyliteres háromnyakú gömblombikba vesszük át. A gömblombikhoz 9:1 arányú metanol/DMF keveréket adunk, mintegy 15 milliliter per gramm peptid-gyanta mennyiségben. Az oldatot mintegy 10 °C alá hűtjük, és amennyiben a peptid C-terminális amidjára van szükségünk, ammónia gázt buborékoltatunk át lassan, erőteljes hűtés közben, míg az oldat jól telített nem lesz (mintegy 1 óra további időtartam) amikor a peptid a gyantáról felszabadul szabad metilészter köztitermék formájában. Az oldatot tovább kevertetjük hűtés nélkül mintegy 15-36 órán keresztül; ezen időtartam alatt a szabad metilészter több mint mintegy 95 százaléka alakul át a megfelelő amid terméké. A reakció előrehaladása követhető - például nagynyomású folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazásával - és leállítható, amikor a kívánt mértékű átalakítás megtörtént. A terméket oldatban leszűrjük zsugorított üvegcsűrő segítségével és a gyantát metanollal valamint DMF-dal többször átmossuk. Az összes mosást és a szűrleteket nagyon sűrű olajig bepároljuk. Etilacetátot adunk hozzá és az oldat eldörzsölésével a terméket szilárd állapotba hozzuk, az oldószert leöntjük és az eldörzsölést etilacetáttal megismételjük. A nyers terméket metanolban feloldjuk és egyenlő térfogatú 4N ecetsavat adunk hozzá. Az oldatot koncentrálnak az összes metanol elválogatására. A terméket 4N ecetsavval hígítjuk.

A peptid C-terminális etilamid formáját úgy állíthatjuk elő, hogy az ammóniát etilaminnal helyettesítjük a jelen bekezdést közvetlenül megelőző bekezdés szerinti eljárásban, amelyben az oldat hőmérsékletét mintegy 16 °C alatt tartjuk az oldat etilaminnal történő telítése során és előnyösen mintegy 5 °C és mintegy 15 °C között tartjuk.

A nyers terméket megtisztíthatjuk ismételt fordított fázisú preparatív kromatográfiás futtatásokkal és liofilizáljuk a végtermék előállítására.

A szakember számára egyértelmű, hogy más oldószerek rendszerek is alkalmazhatók, nem korlátozó értelemben beleértve a következőket: alacsony molekulatömegű alkoholok, mint például etanol, propanol, izopropanol, butanol, izobutanol, terc-butanol és más hasonlóak, további poláris aprotikus oldószerek és ezek keverékei.

A találmány megvalósítási módjai:

1. példa

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ ([D-Trp⁶]LHRH-NH₂) szintézise

[D-Trp⁶]LHRH-NH₂ peptidet állítottunk elő szilárd fázisú peptid szintézis segítségével Boc kémia alkalmazásával Merrifield-gyantán, amit a peptid gyantáról történő lehasítása követett metanolos ammóniával, hogy előállítsuk a kívánt peptidet.

Az eljárás során az első lépésben a C-terminális aminosav - Boc-glicin - cézium sóját kapcsoltuk hozzá a Merrifield-gyantához egy észter kötésen keresztül. A Boc-glicin cézium sójának előállításához Boc-glicint (40,9 g) reagáltattunk cézium karbonáttal (37,9 g) metanol-víz keverékben (80 ml/40 ml). A Boc-glicin cézium sóját vákuumban megszáritottuk és utána reagálni hagytuk a polisztirol gyöngyökön (Merrifield-gyanta, Advanced Chemtech, 88,2 g) található klórmetil-benzil csoportokkal vízmentes dimetil-formamidban (DMF, 200 ml). Ezt a reakciót mintegy 36 órán keresztül végeztük mintegy 50 °C-on egy Buchi™ Model 110 rotációs bepárlókészülékben. A reagáltatott gyantát utána leszűrjük, vízzel, DMF-dal és metanollal mostuk, és utána súlyállan-

dóságig szárítottuk 35 °C alatt vákuumban. A szárított gyantát utána megvizsgáltuk, hogy meghatározzuk a Boc-glicin tartalmát, amelyet mmol glicin per gramm száraz gyanta értékben fejezünk ki. Úgy találtuk, hogy a számított 0,872 mmol/gramm mennyiséget érte el és ezt használtuk fel a kapcsolási reakció pontos méretének meghatározására az egymást követő anyagfelhasználások és elméleti kitermelés számítások során.

A peptid szintézisét a Boc-glicin gyantán végeztük el (12,5 g) amelyet 500 ml térfogatú üveg reaktorba töltöttünk, a reaktornak mind a felső és az alsó végén zsugorított üvegszűrő van elhelyezve. A reaktort az alsó része felől töltöttük fel és átfordítással kevertettük (180 fokot fordul el 3 másodperc alatt). Először a Boc csoportot távolítottuk el (azaz lehasítottuk) a glicin gyantáról oly módon, hogy a gyantát kétszer 175 ml, diklórmétánban (DCM) készült 25 százalékos trifluor-ecetsavval (TFA) kevertük össze (2 perc és 25 perc), amit nitrogén nyomással segített leszűrés követett. A gyantát háromszor mostuk 125 ml diklórmétánnal és kétszer 125 ml izopropil alkohollal (IPA) és utána háromszor mostuk 125 ml diklórmétánnal. Az eredményül kapott amino-TFA sőt kétszer 125 ml, DCM-ben készült 10% trietilamin bázissal semlegesítettük alkalmanként öt percig és ismét háromszor mostuk diklórmétánnal.

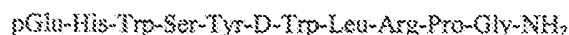
A gyantát ez után kapcsolási reakcióba vittük majd a védőcsoportot eltávolítottuk az alább következő Boc-védett aminosavak 2,5 moláris ekvivalens mennyiségével a következő keverékben: 4,2 ml diizopropil-karbodiimid (DIC) 16 ml DMF-ben és 47 ml DCM-ben; 5,84 g Boc-L-prolín, 8,93 g Boc-L-arginin x HCl, 6,77 g Boc-L-leucin, 9,0 g Boc-D-triptofán(formil), 7,64 g Boc-L-tirozin, 9,0 g Boc-L-triptofán(formil), 6,06 g Boc-L-szerin hidrát, 16 g Boc-L-hisztidin(tozil)-ciklohexilamin só és 13,5 g piroglutaminsav. 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT) is alkalmaztunk (3-5 ekvivalens) a D-Trp, Tyr, Ser és Trp kapcsolások esetében. 75 ml dimetil-acetamidot (DMA) használtunk a DMF és a DCM helyett az Arg kapcsolására. A gyantát DMF és DCM alkalmazásával mostuk és Kaiser-féle ninhidrin reakcióval vizsgáltuk a kapcsolás teljességére. A Boc csoportot az egyes kapcsolt aminosavakról a fentebb leírtak szerint távolítottuk el. A hisztidin oldalláncot tozil csoporttal védjük, amelyet kétszeri 4,16 g HOBT kezeléssel távolítottunk el DMF-ben egy-egy órás időtartammal az utolsó aminosav kapcsolását követően. A Boc-D-triptofán és a Boc-L-triptofán oldalláncokat formil csoporttal védjük, amelyet a peptid gyantáról történő lehasítása során távolítottunk el.

A befejezett peptid-gyantát előre lemerített zsugorított üveg szűrőtölcsérbe mostuk DCM segítségével, kétszer mostuk metanollal és vákuumban megszáritottuk. A megszáritott peptid-gyantát egyliteres háromnyakú gömblombikba vittük át. A gömblombikhoz 9:1 arányú metanol/DMF keveréket adtunk 15 ml/gramm peptid-gyanta mennyiségben (380 ml 10,9 mM méretben). Az oldatot mintegy 10 °C alá hűtöttük és ammónia gázt buborékolattunk át lassan, erőteljes hűtés közben, míg az oldat jól telített nem lett (mintegy 1 óra további időtartam). Az oldatot tovább kevertettük hűtés nélkül mintegy 15-36 órán keresztül; ezen időtartam alatt a szabad metilészter több mint 95 százaléka alakult át a megfelelő amid terméké, ahogyan ezt nagynyomású folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazásával követni lehet. A terméket oldatban leszűrtük zsugorított üvegszűrő segítségével és a gyantát metanollal valamint DMF-dal többször átmostuk. Az összes mosást és a szűrleteket nagyon sűrű olajig bepároltuk rotációs bepárlókészüléken 40 °C hőmérséklet alatt. Etilacetátot adtunk hozzá (80 ml) és az oldat eldörzsölésével a terméket szilárd állapotba hoztuk, az oldószert leöntöttük és az eldörzsölést 80 ml etilacetáttal megismételtük. A kemény, gumyszerű terméket éjszakán át etilacetátban áztattuk és az oldószert leöntöttük. A nyers terméket metanolban (70 ml) feloldottuk és egyenlő térfogatú 4N ecetsavat adtunk hozzá. Az oldatot rotációs bepárlókészüléken 40 °C hőmérséklet alatt koncentráltuk az összes metanol eltávolítására. A terméket mintegy 35 gramm termék/liter koncentrációig hígítottuk 4N ecetsavval.

A nyers terméket utána ismételt fordított fázisú kromatográfiás futtatásokkal tisztítottuk meg és liofilizáltuk a végtermék előállítására (8,4 g, 59% kitermelés) szilárd, fehér anyag formájában, amelynek tisztasága több, mint 99% mértékű.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az alábbi, I. általános képletű peptid előállítására:



(I)

ahol

a His aminosavat tozilcsoport védi és valamennyi Trp aminosav indol-NH-csoportja védett,

azzal jellemezve, hogy:

- (a) Boc-Gly céziumsóját klórmetilézett polisztirol gyantára kapcsoljuk, miáltal Boc-Gly-gyantát kapunk;
- (b) a Boc-Gly-gyantát védőcsoport-mentesítjük úgy, hogy a Boc-Gly-gyantát összekeverjük Boc eltávolítására szolgáló szerves savkeverékkel, miáltal $\text{H}_2\text{N-Gly}$ gyanta szerves savval képzett sóját kapjuk;
- (c) bázissal semlegesítjük a $\text{H}_2\text{N-Gly}$ -gyanta szerves savval képzett sóját, miáltal $\text{H}_2\text{N-Gly}$ -gyantát nyerünk;
- (d) a $\text{H}_2\text{N-Gly}$ -gyantát Boc- α -amin védett aminosavval kapcsoljuk, amely védett aminosav megfelel az (I) általános képlet szerinti soron következő aminosavnak a C-terminálisról az N-terminális irányába haladva, amely kapcsolás a következő lépésekből áll:
 - (i) a $\text{H}_2\text{N-Gly}$ -gyantát peptid kapcsoló ágens jelenlétében Boc- α -amin védett aminosavval reagáltatjuk, miáltal Boc-védett kapcsolt terméket kapunk;
 - (ii) a Boc csoportot lehasítjuk a Boc-védett kapcsolt termékről oly módon, hogy a Boc-védett kapcsolt terméket Boc-lehasító szerves savval keverjük össze, miáltal kapcsolt terméket kapunk;
 - (iii) a kapcsolt terméket peptid kapcsoló ágens jelenlétében a következő Boc- α -amin védett aminosavval reagáltatjuk, miáltal Boc-védett kapcsolt terméket kapunk;
 - (iv) a Boc csoportot lehasítjuk a Boc-védett kapcsolt termékről oly módon, hogy a Boc-védett kapcsolt terméket Boc-lehasító szerves savval keverjük össze, miáltal megkapjuk a következő kapcsolt terméket;
 - (v) a (d)(iii) és a (d)(iv) lépéseket addig ismételjük, míg az I. általános képletű peptid N-terminális aminosavát is hozzákapcsoljuk, és az N-terminális aminosav Boc-csoportját is lehasítjuk, és
- a His aminosav tozil oldallánc-védőcsoportját eltávolítjuk, miáltal védett, befejezett peptid-gyantát kapunk;
- (e) a védett befejezett peptid-gyantát hasítjuk és a védőcsoportokat eltávolítjuk, miáltal megkapjuk az (I) általános képletű peptidet, mely hasítás és védőcsoport-eltávolítás során a következő lépéseket hajtjuk végre:
 - (i) a védett befejezett peptid-gyantából oldatot készítünk metanol/közömbös poláris aprotikus oldószer keverékben;
 - (ii) az oldatot mintegy 0 °C és mintegy 10 °C közé hűtjük;
 - (iii) ammónia gázt vagy etilamin gázt buborékolatunk lassan az oldatba a hűtés fenntartása mellett, amíg az oldat kellőképpen telítődik ammóniával, miáltal telített oldatot kapunk;
 - (iv) a telített oldatot hűtés nélkül mintegy 15-36 órán át kevertetjük, amíg a szabad metilészter több mint 95%-a átalakul a megfelelő amiddá - amennyiben ammónia gázt használunk - vagy a megfelelő etilamiddá, amennyiben etilamin gázt alkalmazunk; és

(f) a peptidet az oldathól izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a soron következő Boc- α -amin aminosavakat kapcsoljuk össze a C-terminálisról az N-terminális felé haladva: N- α -Boc-L-prolin, N- α -Boc-L-argininHCl, N- α -Boc-L-leucin, N- α -Boc-D-triptofán(N'-indol-formil), N- α -Boc-L-tirozin, N- α -Boc-L-szerin hidrát, N- α -Boc-triptofán(N'-indol-formil), N- α -Boc-L-hisztidin(tozil)-ciklohexilamin só és piroglutaminsav.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Trp oldallánc formil védőcsoportját ammóniát, primer amint vagy szekunder amint és alkoholt tartalmazó oldattal végzett kezeléssel távolítjuk el.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ammóniát és metanolt tartalmazó oldatot alkalmazunk.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) is alkalmazunk, amikor N- α -Boc-D-triptofán(N'-indolil-formil)-t, N- α -Boc-L-tirozint, N- α -Boc-L-szerin hidrátot és N- α -Boc-triptofán(N'-indolil-formil)-t kapcsolunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban megadott és definiált (I) képletű peptid szilárd fázisú szintézisére, *azzal jellemezve*, hogy az eljárás során ideiglenesen mindegyik triptofán aminosavat olyan oldallánc védőcsoporttal látjuk el, amely bázisra labilis, és ahol a védőcsoportot az (I) általános képletű peptid szilárd fázisról történő lehasítása során távolítjuk el bázissal végzett reakcióban.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Trp vagy D-Trp oldallánc védőcsoportként acil csoportot alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Trp vagy D-Trp oldallánc védőcsoport eltávolítását ammóniát, primer amint vagy szekunder amint és alkoholt tartalmazó oldattal történő kezeléssel végezzük.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oldallánc védőcsoportként formil csoportot alkalmazunk, és a felhasznált bázis ammóniát tartalmazó metanol oldat.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és jogi iroda Kft.

Dr. Póthó Árpád

szabadalmi ügyvivő