

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 564 A9

(21) A kérelem ügyszám: P/P 00191

(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 13.

(30) Elsőbbségi adatok:

810 985 1991. 12. 20. US

92/20543 1992. 09. 29. GB

92/20761 1992. 10. 02. GB

Az alapul szolgáló szabadalom

száma: 92/9866 országkódja: ZA

Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak

az oltalmi idő számítása szempontjából

figyelembe veendő kezdő napja: 1992. 12. 18.

Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 7/06

A 61 K 38/08

(72) Feltalálók:

Pierson, Myles Edward, Pittsford, New York (US)

Rosamond, James Donald, Rochester, New York (US)

(73) Szabadalmaz:

ASTRA AB., Södertälje (SE)

(74) Képviselő:

Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó Szabadalmi
és Védjegy Iroda, Budapest

(54)

Terápiás hatású peptid vegyületek

Az átmeneti oltalom a(z) 1–9. és 14–15. igénypontokra vonatkozik.

A találmány terápiás hatása (különösen táplálkozást gátló) peptid vegyületekre, a vegyületek gyógyászati és kozmetikai terápiás szerekként való alkalmazására és a vegyületeket tartalmazó készítményekre vonatkozik.

A CCK-8-ről, amelynek szerkezete: Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ ismert, hogy táplálkozást gátló tulajdonságú [ld. például J. E. Morley, Minireview: The ascent of cholecystokinin – from gut to brain, Life Sciences, 30 (6), 479–493 (1982)].

A WO 91/08 225 számú közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben (Fisons Corporation) több olyan peptidvegyületet írnak le, amelyeket táplálkozás gátlásában való alkalmazásra javasolnak.

A jelen találmány szerint (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható származékát (a későbbiekben együttesen „találmány szerinti vegyületeket”) bocsátunk rendelkezésre, a képletben

R¹ jelentése OH vagy OSO₃H csoport;

M jelentése Met, Ahx vagy Ile;

G jelentése Gly vagy Sar;

X jelentése Met, Ahx, Ile, Phe vagy Lys(R²);

J jelentése Asp, Asp(OBn), DAsp, MeAsp vagy MeDAsp;

L jelentése Phe vagy MePhe;

R² jelentése egy (II) általános képletű csoport, amelyben

E jelentése NH, CH=CH vagy CH₂CH₂ csoport, és

R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, hidroxilcsoport, halogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy OSO₃H csoport;

azzal a megkötéssel, hogy amikor R¹ jelentése OSO₃H képletű csoport, G jelentése Gly csoport és

(a) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ahx, akkor X jelentése Ahx-től eltérő;

(b) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ile, akkor X jelentése Ile-től eltérő;

(c) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ile, akkor X jelentése Ahx-től eltérő;

(d) J jelentése Asp, L jelentése Phe és M jelentése Met, akkor X jelentése Met-től eltérő;

(e) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Met, akkor X jelentése Met-től eltérő;

(f) J jelentése DAsp, L jelentése MePhe és M jelentése Met, X jelentése Met-től eltérő.

A találmány szerinti vegyületeket, az aminosavakat, peptideket és védőcsoportokat a szakterületen általánosan használt, például a IUPAC és az IUB által meghatározott szimbólumokkal jelöljük.

Minden optikailag aktív aminosav L-konfigurációjú, kivéve ha másképp határozzuk meg.

A szimbólumokra példaként az alábbiakat említjük:

Ahx	2-amino-hexánsav
Asn	aszparagin
Asp	aszparaginsav
Asp(OBn)	aszparaginsav-β-benzil-észter
Asp(OtBu)	aszparaginsav-β-(terc-butil)-észter

Boc terc-butil-oxi-karbonil

BrCH₂-Pam 4-(bróm-metil)-fenil-acetamido-metil

DAsp D-aszparaginsav

Fmoc 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil

5 Gly glicin

HOBt 1-hidroxi-benzotriazolil

Hpa 4-hidroxi-fenil-ecetsav

Hpa(SO₃H) O-szulfo-4-oxi-fenil-acetil

Ile izoleucin

10 Lys lizin

MeAsp N-metil-aszparaginsav

MePhe N-metil-fenil-alanin

MePhe-NH₂ N-metil-fenil-alanin-amid

Met metionin

15 Nle norleucin (vagy 2-amino-hexánsav)

OBt 1-benzotriazolil-észter

OCH₂Pam 4-oxi-metil-fenil-acetamido-metil

OSu szukcinimidil-oxi-észter

OtBu terc-butil-észter

20 Phe fenil-alanin

Phe-NH₂ fenil-alanin-amid

gyanta polisztirol

Sar szarkozin

tBu terc-butil

25 Tyr(SO₃H) O-szulfo-tirozin

Így a Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂ (A) olyan (I) általános képletű vegyület, amelyben R¹ jelentése OH, M jelentése Met, G jelentése Gly, X jelentése Met, J jelentése Asp és L jelentése MePhe.

30 A Lys(R²) szimbólummal olyan lizincsoportot jelölünk, amelyben az ε-aminocsoport egy fentebb meghatározott (II) általános képletű csoporttal amidkötést képez. Két speciális (II) általános képletű csoportot említünk, ezek egyikében E jelentése NH, R³ jelentése metilcsoport és R⁴⁻⁷ mindegyikének jelentése hidrogénatom, erre a későbbiekben „Tac”-ként utalunk; és a másik csoportban E jelentése transz-CH=CH csoport, R⁵ jelentése OH és R³, R⁴, R⁶ és R⁷ jelentése egyaránt hidrogénatom.

40 Az (I) általános képletű vegyületek gyógyászatilag elfogadható származékai a jelenlevő bármelyik karbonsavcsoporttal alkotott észtert és amidot és a gyógyászatilag elfogadható sokat foglalják magukban. A gyógyászatilag elfogadható származékok közül a karbonsavcsoportok helyettesítetlen amidszármazékaként (például az Asp helyettesítetlen amid-származékaként, azaz Asn-ként lehet jelen) és a karbonsavcsoportok 1–6 szénatomos alkilcsoporttal alkotott észter-származékait említhetjük. A gyógyászatilag elfogadható sok közül a nátrium- és ammóniumsókat emeljük ki. Az (I) általános képletű vegyület gyógyászatilag elfogadható származékait a megfelelő (I) általános képletű vegyületekből a szokásos módszerekkel állíthatjuk elő.

45 50 A „gyógyászatilag elfogadható” kifejezés azt jelenti, hogy a vegyület, származék, só vagy más anyag, amelyre utal, alkalmas arra, hogy a testnek gyógyászati vagy kozmetikai terápiás szerként beadják. Hasonlóképpen, a „gyógyszerként történő alkalmazás” és a „gyógyászati készítmény” magában foglalja a kozmeti-

55 60

kai terápiás szerként történő alkalmazást, illetve a kozmetikai terápiás készítményt is.

Előnyösen M jelentése Ahx vagy Ile; G jelentése Gly; X jelentése Ahx, Ile vagy Lys(R²); J jelentése Asp, DAsp, MeAsp vagy MeDAsp; és R¹ jelentése OSO₃H.

A találmány további tárgya eljárás (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható származékainak az előállítására, amely abban áll, hogy a) egy (III) általános képletű vegyületet szulfatálunk, a képletben M, G és L jelentése a fenti; Ja jelentése azonos J fentebb megadott jelentésével, azzal az eltéréssel, hogy az Asp, DAsp, MeAsp vagy MeDAsp közül bármelyik jelenlevő csoportnak a β-karboxilcsoportja adott esetben védett; Xa jelentése azonos X fentebb megadott jelentésével, azzal az eltéréssel, hogy még Lys-t is jeleníthet, és bármelyik hidroxil- vagy aminocsoport védett formában van jelen (kivéve azokat a hidroxilcsoportokat, amelyeket szulfátszterré kívánunk alakítani); és Za jelentése NH₂ vagy karboxil-védőcsoport;

b) egy (IV) általános képletű vegyületről egy vagy több védőcsoportot eltávolítunk, a képletben R¹, M, G, Xa, Ja és Za jelentése a fenti, és az Xa, Ja és Za legalább egyike védőcsoportot jelent;

c) egy (V) általános képletű vegyületet, a képletben M, G, J és L jelentése a fenti és Xb jelentése Lys, egy (VI) általános képletű vegyülettel reagáltatunk, a képletben R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése a fenti, így olyan (I) általános képletű vegyületet kapunk, amelyben X jelentése Lys(R²) és E jelentése NH₂; vagy

d) egy (V) általános képletű vegyületet, amelyet fentebb már meghatároztunk, egy (VII) általános képletű vegyülettel kapcsolunk, a képletben E jelentése CH₂CH₂ vagy CH=CH csoport és R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése a fenti, így olyan (I) általános képletű vegyületet kapunk, amelyben X jelentése Lys(R²) és E jelentése CH₂CH₂ vagy CH=CH csoport.

A találmány körébe tartoznak a (IV) általános képletű közbenső vegyületek is.

Az a) eljárásban a szulfatáló szer például kén-trioxid vagy annak egy komplexe, például kén-trioxid-piridin lehet. A szulfatálást különösen előnyösen poláris aprotikus oldószerben, például dimetil-formamidban vagy piridinben végezzük. A reakcióhoz előnyösen a szulfatálószer feleslegét, például 1–40 mólos, előnyösen 5 mólos feleslegét használjuk.

Az a) és b) eljárásban alkalmazható peptid-védőcsoportok és azok eltávolítására megfelelő eljárások a szakterületen jól ismertek, például a T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis* (Wiley-Interscience, 1981) kézikönyvből. A védőcsoportok megválasztása és az eltávolításukra alkalmazott eljárások többek között a (III) általános képletű peptid előállítására használt szintézismódszertől és a peptidben levő aminosavaktól függ. Alkalmas amino-védőcsoportok például a benzil-oxi-karbonil-csoport, amely hidrogenolízissel vagy ecetsavas hidrogén-bromiddal könnyen eltávolítható; a terc-butil-oxi-karbonil-csoport (Boc), amely úgy hasítható le, hogy a peptidet hideg trifluor-ecetsavban állni hagyjuk; Fmoc, amely híg piperidinnel (20% dimetil-formamidban) eltávolítható; a

(4-metoxi-benzil)-oxi-karbonil- és a 2-nitro-fenil-szulfenilcsoport. A Boc és a Fmoc csoportok különösen előnyösek.

Megfelelő karboxil-védőcsoport Za jelentéseként például a metil-, terc-butil-, benzil- és a 4-metoxi-benzil-csoport. A benzilcsoportot különösen előnyben részesítjük, amely alkoholos aminnal vagy ammóniával kezelve könnyen eltávolítható. Hasonló csoportokat használhatuk a lizinben levő aminocsoport és az aszparaginsavban levő karboxilcsoport megvédésére.

Ha a peptidet szilárdfázisú módszerrel állítjuk elő, például úgy, hogy a peptid karboxil-végét a szilárdfázisú gyantához kapcsoljuk, a peptid és a gyanta közötti kapcsolat úgy hat, mint egy karboxil-védőcsoport. A peptid-gyanta kötés hasítása után a (II) általános képletű vegyület karboxil-vége szabadabbá válik. Mivel a találmány szerinti, szulfát-észtert tartalmazó peptid végtermékek a karboxilterminálison amidok, a peptidlánc és a gyanta közötti kémiai kötésnek olyannak kell lennie, amelynek megfelelő reagenssel történő hasítása könnyen amidot eredményez. A szulfát-észter erős sav (például folyékony hidrogén-fluorid) jelenlétében labilis, ezért a peptidil-gyanta kötésnek vagy gyengébb savakkal (például trifluor-ecetsavval történő rövid kezeléssel) és/vagy nukleofilekkel (például ammóniával, aminokkal, hidroxidokkal és alkoxidokkal) hasíthatónak kell lennie.

A c) eljárást közömbös oldószerben, például dimetilformamidban, bázis, így N-metil-morfolin jelenlétében, és például 0 és 50 °C közötti hőmérsékleten végezhetjük.

A d) eljárást a sav egy aktivált észterének alkalmazásával valósíthatjuk meg. Egy megfelelő aktív észter származék az N-hidroxi-szukcinimidil-észter. A reakciót bázis, például N-metil-morfolin jelenlétében, a fentebb a c) eljárásra leírt körülmények között végezhetjük.

A megfelelő gyanta-származékok közül például az oximetil-polisztirol, a 4-(oxi-metil-fenil)-(CH₂)_n-amino-metil-polisztirol (n = 0–3) és a 4-(oxi-metil-fenil)-oxi-metil-polisztirol említetjük. A hasonlóképpen helyettesített poliakril-amid gyanták a célnak ugyanúgy megfelelnek, mint a fenti polisztirol alapúak. A „polisztirol” magában foglal kis mennyiségű, általában 1% telítetlen monomert, például divinil-benzolt tartalmazó kopolimereket is.

A 4-(oxi-metil-fenil)-CH₂CO-amino-metil-polisztirol [a leírásban 4-(oxi-metil-fenil)-acetamido-metil-polisztirolként vagy OCH₂-Pam-gyantaként említjük] különösen alkalmas a peptid-amidok előállítására. Ezt a kötetést – szükség szerint – metanolos ammónia-, alkilamin- vagy dialkilamin-oldattal könnyen hasíthatjuk (I) általános képletű peptidek képződése közben.

Egy másik említésre méltó gyanta egy polisztirol gyanta (P), amelyben a peptidhez való kapcsolódás az (a) képleten látható, és a leírásban.

{ {5-[(Fmoc-amino-metil)-3,5-dimetoxi-fenoxi]-valeroil} norleucil }-4'-metil-benzhidril-amin-divinil-benzol polisztirol vagy PAL gyantaként utalunk rá. A PAL gyanta különösen előnyös olyan peptid-amidok előállí-

tására, amelyekben X jelentése Lys-től eltérő. Az összeállított peptid és ezen gyanta közötti kötés trifluor-ecetsav, fenol, tioanizol, víz és etánditiol 8,5:0,5:0,5:0,5:0,2 arányú elegyével könnyen hasítható.

Egy további gyanta, amellyel a PAL gyantát helyettesíthetjük, egy polisztirol gyanta (P) amelyben a peptidhez való kapcsolódás a (b) képleten látható, és a gyantát a továbbiakban

4-[(2,4-dimetoxi-fenil)-(Fmoc-amino)-metil]-fenoxi-divinil-benzol polisztirol vagy Rink gyantaként említjük.

A (III), (IV) és (V) általános képletű peptideket a szakember számára jól ismert módszerekkel, például úgy állíthatjuk elő, hogy az egyes aminosavakat szilárdfázisú gyantán lépésenként kapcsoljuk, vagy szilárdfázisú gyantán aminosavak csoportjait kapcsoljuk, így a kívánt peptidilgyanta közbelső terméket kapjuk. Az ilyen addíciót, amint ismeretes, úgy végezzük, hogy az aminosav vagy egy aminosavakból álló csoport aminocsoportját például terc-butil-oxi-karbonil- (Boc) vagy 9-fluorenil-metil-oxikarbonil- (Fmoc) származékká alakítva védjük, majd az aminosav vagy aminosavakból álló csoport karboxilcsoportját aktiváljuk, például hidroxibenzotriazol (HOBt) vagy N-hidroxiszukcinimid (HOSu) észter-származék formájában. Az ilyen védett-aktivált közbelső termékeket azután hagyjuk egy aminosav-gyanta vagy peptidil-gyanta szabad aminocsoportjával reagálni, így módon a peptidláncot meghosszabbítjuk, és a kívánt peptidil-gyantát kapjuk.

Az előállítandó peptidben majd C-terminális helyzetben levő aminosavat többféleképpen kapcsolhatjuk az $\text{OCH}_2\text{-Pam}$ -gyantához. Például Boc-védett N-metil-fenil-alanint reagáltathatunk egy megfelelő 4-(bróm-metil)-fenil-acetátészterrel (például fenacil-észterrel), és azután a terméket tovább alakítva Boc-MePhe-(4-oxi-metil-fenil)-ecetsavhoz jutunk, amelyet amino-metil-polisztirolhoz kapcsolhatunk, így Boc-MePhe-(4-oxi-metil-fenil)-acetamido-metilpolisztirolt. Boc-Me-Phe- $\text{OCH}_2\text{-Pam}$ -gyantát kapunk. Úgy is eljárhatunk, hogy 4-(bróm-metil)-fenil-ecetsavat kapcsolunk az amino-metil-polisztirolhoz, így 4-(bróm-metil)-fenilacetamido-metil-polisztirolt. $\text{BrCH}_2\text{-Pam}$ -gyanta képződik, amelyet Boc-MePhe-

OH céziúmsójjával reagáltatva Boc-Phe- $\text{OCH}_2\text{-Pam}$ -gyantát kapunk.

A C-terminális aminosavat a PAL gyantához köthetjük az Fmoc védőcsoport bázissal, például piperidinnel, alkalmas oldószerben vagy oldószerek keverékében, például dimetilformamidban és toluolban történő eltávolításával, majd a védett aktivált aminosavnak a szilárd fázisú szintézisének szokásos módon végzett kapcsolásával. Különösen előnyös karboxilcsoport aktiválási módszer az N-hidroxibenzotriazol (HOBt) észter diizopropil-karbodiimid jelenlétében történő előállítása. Alkalmas oldószerrendszer, például dimetilformamid és metilén-diklorid használható ehhez az előaktiválási eljárásához.

Az alkalmas aktiváló csoportok közül bármely olyan csoportkombináció megemlíthető, amely az aminosav savcsoportját reakcióképesebbé teszi, ilyenek a savkloridok, vegyes vagy szimmetrikus anhidridek, a karbodiimiddel (például diciklohexil-karbodiimiddel, DCC-del) képezett reakciótermékek, és az aktív észterek, például a HOBt-ból és a HOSu-ból, 2- vagy 4-nitro-fenolból és 2,4,5-triklórfenolból származtatható észterek. A DCC és a HOBt és HOSu észterek alkalmazása különösen előnyös abból a szempontból, hogy melléktermékek nem képződnek, következésképpen tisztításuk igen egyszerű.

A találmány szerinti szulfatált peptidek szilárdfázisú szintéziséhez automata peptidszintetizátort alkalmazhatunk. Az (I) általános képletű, szulfát-észtert tartalmazó peptideket sómentesíthetjük és a szokásos módszerekkel tisztíthatjuk. Például a terméket Trisacryl M DEAE, DEAE-cellulóz vagy hasonló ioncserélőn kromatográfián, vagy Sephadex LH-20, Sephadex G-25 vagy hasonló adszorbensen megoszlási, Amberlite XAD-2 (vagy Biorad SM-2), ODS-szilika-gél vagy hasonló adszorbensen fordított fázisú, szilika-gélen vagy hasonló adszorbensen normál fázisú kromatográfiás eljárással vagy nagynyomású folyadék-kromatográfiás eljárással (HPLC) tisztíthatjuk.

Az amino-metil-gyantára vagy peptidil- $\text{OCH}_2\text{-Pam}$ -gyantára (1 mmol hozzáférhető nitrogén) történő kapcsolásra, a védőcsoportok eltávolítására, szulfatálásra, hasításra és a termék tisztítására vonatkozó előírást az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Szulfatált peptid-amidok szilárdfázisú, Pam-gyantán (1 mmol nagyságrendben) történő szintézisére vonatkozó előírás

Lépés	Reagens vagy oldószer	Cél	Keverési idő
1	DCM	Mosás	1 perc
2	Folytatás a 3, 5 vagy 8 lépéssel		
3	Mérje be 3 mmol védett aminosav vagy védett dipeptid, 4,5 mmol HOBt és 3 mmol DCC szűrt és előaktivált (0 °C, 1 óra) keverékét 1:4 DMF/DCC-ben	Előaktivált DCC/HOBt kapcsolás	2–15 óra

Lépés	Reagens vagy oldószer	Cél	Keverési idő
4	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		
5	Mérjen be 3 mmol védett aminosavat vagy védett dipeptidet és 4,5 mmol HOBt-t 30 ml DMF/DCM 1:2 elegyben, majd 3 mmol DCC-t 20 ml DCM-ben	In situ aktivált DCC/HOBt kapcsolás	2–15 óra
6	2-propanol	Mosás	1 perc
7	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		
8	Mérjen be 3 mmol aktív észtert vagy anhidridet DCM, DMF oldószerben vagy ezek elegyében	Nem DCC/HOBt aktivált kapcsolás	2–15 óra
9	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		
10	DCM	Mosás	1 perc
11	Kezelés TFA/anizol/DCM 49:1:50 eleggyel	Boc és tBu eltávolítás	30 perc
12	DCM	Mosás	1 perc
13	Kezelés DIEA/DCM 1:19 eleggyel	Semlegesítés	1 perc
14	DCM	Mosás	1 perc
15	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		
16	DMF	Mosás	1 perc
17	Kezelés piperidin/DMF 1:4 eleggyel	Fmoc eltávolítása	3 perc
18	Kezelés piperidin/DMF 1:4 eleggyel	Fmoc eltávolítása	7 perc
19	DMF	Mosás	1 perc
20	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		
21	DMF	Mosás	1 perc
22	Piridin/DMF 1:2	Mosás	1 perc
23	Mérjen be 40 mmol kén-trioxid-piridin komplexet 60 ml piridin/DMF 1:2 elegyben	Szulfatálás	20–24 óra
24	DMF	Mosás	1 perc
25	Folytatás a 10, 16, 21 vagy 26 lépéssel		

Lépés	Reagens vagy oldószer	Cél	Keverési idő
26	Metanol	Mosás	1 perc
27	250 ml ammóniával telített (~20 °C) metanol vagy 20%-os metanolos amin-oldat	Gyanta hasítás	2–5 nap
28	Metanol	Mosás	1 perc
29	Egyesítse és párolja be a 27–28 lépések szűrleteit	Elkülönítés	
30	Kromatografálja a maradékot Amberlite XAD-2 oszlopon (Rohm and Haas, 2,5 × 60 cm, metanol gradiens 0,1 M ammóniában). Trisacryl M DEAE (LKB Inc., 2,5 × 47 cm, ammónium-hidrogén-karbonát gradiens) és/vagy P-40 ODS-3 (Whatman, 4,8 × 50 cm, metanol gradiens 0,2% ammónium-acetátban)	Tisztítás	

DIEA = diizopropil-etil-amin

A nem-szulfatált peptid-amidok PAL-gyantán történő szintézisére (1 g-os mennyiségre) a 2. táblázatban adunk általános leírást.

2. táblázat

Lépés	Reagens vagy oldószer	Cél	Keverési idő
1	DCM	Mosás	1 perc
2	DCM/DMF (1:1)	Mosás	1 perc
3	30% piperidin	Fmoc	3 perc
	35% DMF	eltávolítás	
	35% toluol		
4	Ismételje meg a 3. lépést	Fmoc eltávolítás	7 perc
5	DCM/DMF (1:1)	Mosás (10×)	25 mp
6	Folytatás a 7 vagy 11 lépéssel		
7	Előaktivált-védett aminosav [szobahőmérséklet, Fmoc-aa-OH, 1 ekvivalens DIPCDI, 1 ekvivalens HOBt, DMF:DCM(1:4) elegyben	Előaktiválás (Ha az előző aminosav Me-Asp, MeDAsp vagy MePhe hagyja el, a HOBt-t)	10 perc válás
8	Adja a gyantához vagy a gyanta-peptidhez	Kapcsolás	1–2 óra
9	DCM/DMF (1:1)	Mosás (4×)	1 perc
10	Folytatás a 3 lépéssel (Ismételje a 3–10 lépéssort ahogy a peptidszekvencia kialakításához szükséges)		
11	Előaktivált Hpa-OSu [1 ekvivalens Hpa-OH, 1 ekvivalens HO-Su	DMF]	Előaktiválás
12	Adja a gyanta-peptidhez	Kapcsolás	1–2 óra
13	DCM	Mosás (4×)	1 perc
14	MeOH	Mosás (4×)	1 perc

Lépés	Reagens vagy oldószer	Cél	Keverési idő
15	TFA/fenol/tioanizol/víz/etán-ditiol 8,5:0,5:0,5:0,5:0,2	Hasítás a gyantáról	2–3 óra
16	TFA	A gyanta kiszűrése és mosás	
17	A 16 lépésben kapott szűrleteket egyesítse és párolja be	A peptid elkülönítése	
18	Kromatografálja a maradékot Amberlite XAD-2 oszlopon (Biorad SM-2 200–400 mesh, metanol gradiens 0,1 M ammóniában), és/vagy C-18 ODS-3 oszlopon (Amicon, metanol gradiens 0,1% trietil-aminban, 0,1% jégecetben) és/vagy Amberlite XAD-2 oszlopon (metanol gradiens)	Tisztítás	
19	A tisztított frakciókat egyesítse és koncentrálja 0,1 M ammóniából fagyasztva szárítással	Elkülönítés	

Az 1. és 2. táblázat előírásainak a gyakorlatban alkalmazható módosításai kísérletek segítségével könnyen meghatározhatók.

Hasonló eljárások, amelyekben a reakciót szilárdfázisú komponens (gyanta) nélkül valósítják meg, szintén jól ismertek a szakterületen, és igen megfelelnek a nagy mennyiségben való előállításra (ld. például a 3 892 726 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

A találmány szerinti vegyületek képesek emlískében a táplálkozást gátolni, és a cholecisztokinin receptorokhoz kötődni. A perifériás és agyszövetekben található eltérő CCK receptorokat a CCK-A és CCK-B receptorok csoportjára osztották. A CCK-receptorokkal való agonista és antagonisták kölcsönhatás funkciók vizsgálatakkal megkülönböztethető. A perifériás szövetekben a CCK-A receptorok aktiválása fontos szerepet játszik a hasnyálmirigy kiválasztásának, a belek motilitásának és az epehólyag összehúzódásának szabályzásában. A CCK-A receptorokkal szemben agonista hatású vegyületek az elhízás és motilitási rendellenességek, míg a CCK-B receptorokkal szemben antagonisták hatású vegyületek a gyomor-bél rendellenességek, fgy a túlérzékeny bélszindróma, fekélyek, túlzott hasnyálmirigy vagy gyomorsav kiválasztás, akut hasnyálmirigygyulladás és motilitási rendellenességek kezelésénél nyernek alkalmazást. Ezért a vegyületek, amelyeket terápiás szerként a táplálkozás gátlására kívánunk használni, valószínűleg mentesek a nem-kívánatos mellékhatásoktól, ha szelektíven kötődnek a CCK-A receptorokhoz (inkább, mint a CCK-B receptorokhoz).

A találmány szerinti vegyületek gyógyászati hatását az alábbi A-D) vizsgálatban mutathatjuk meg:

A) vizsgálat

A táplálkozás gátlása

Hím Sprague-Dawley patkányokat, amelyeknek testtömege 300–350 g, egyenként ketrecekbe helyeztünk. 12 óra világos, 12 óra sötét ciklusban tartottunk, és legalább 14 napon át arra szoktattunk, hogy a sötét ciklus egy három órás szakaszában táplálkozzanak, és a három órás szakaszt megelőző 21 órában pedig ne.

A vizsgálat napján a patkányoknak intraperitoneálisan sóoldatot (kontroll) vagy vizsgálandó vegyületet adtunk sóoldatban oldva, általában 0,3 és 300 µg közötti mennyiségű vizsgálandó vegyület/kg patkánytömeg dózisban. A sóoldat vagy vizsgálandó vegyület beadása után 10 perccel adtuk a táplálékot. A vizsgálandó vegyületeket hatásosnak tekintettük, ha a vizsgálati csoport a táplálkozási időszak alatt, amely 0,5 vagy 3 órával a táplálék behelyezése után ért véget, szignifikánsan kevesebb táplálékot fogyasztott, mint a sóoldattal kezelt kontroll csoportok.

B) vizsgálat

CCK-A kötődés

A vizsgált vegyületeknek a CCK-A receptorokhoz való kötődését patkány hasnyálmirigy membránokban mértük a Bolton Hunter ¹²⁵I-CCK-8 és ³H-L364 718 anyagok patkány hasnyálmirigyhez való kötődésével szemben a Chang, Lotti, Chan és Kinkel által leírt eljárásnak megfelelően (Molecular Pharmacology, 30: 212–216, 1986).

C) vizsgálat

CCK-B kötődés

A vizsgált vegyületeknek a CCK-B receptorokhoz való kötődését patkány agykéreg membránokban mértük ¹²⁵I-CCK-8 anyaggal szemben Chang és Lotti módszerével (Soc. Natl. Acad. Sci. Vol. 83, 4923–4926).

D) vizsgálat

A CCK-A agonista/antagonista hatás funkciók vizsgálata

A vizsgálandó vegyületek azon képességének értékelésére, hogy gátolják vagy stimulálják patkány hasnyálmirigy szövet fragmentumok (acinusos sejtek) amiláz felszabadítását, Lin és munkatársai (J. of Pharm. and Exper. Therapeutics, 1986, 729–734) valamint Jung (Clinica Chemica Acta, 1980, 100, 7–11) módszerét használtuk.

A fentieknek megfelelően a találmány tárgyát képező a találmány szerinti vegyületek gyógyszerként való alkalmazása is.

A találmány kiterjed az (I) általános képletti vegyületek és gyógyászati elfogadható sóik elhízás kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására való alkalmazására is.

A találmány a továbbiakban elhízás kezelésére alkalmas eljárásra is vonatkozik, amely abban áll, hogy a találmány szerinti vegyület terápiásan hatásos mennyiségét egy ilyen kezelést igénylő betegnek adagoljuk; és egy emlős testi megjelenésének javítására szolgáló eljárást is magába foglal, amely szerint az emlősnek egy találmány szerinti vegyületet addig adagolunk, amíg a testtömeg kozmetikailag előnyös csökkenése bekövetkezik. A leginkább érdekelt emlősök emberek.

A találmány tárgyát képezi olyan gyógyászati készítmény is, amely (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászati elfogadható sóját (előnyösen 80 tömeg%-nál kisebb, és még előnyösebben 50 tömeg%-nál kisebb mennyiségben) tartalmazza gyógyászati elfogadható adjuvánssal, hígító- vagy hordozóanyaggal együtt.

A találmány szerinti vegyületek különféle módon, például orálisan, intraperitoneálisan, intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután vagy intranazálisan adagolhatók. A találmány szerinti vegyületek dózisa több tényezőtől, többek között a recipiens szükségleteitől függ, jellemzően azonban napi 0,3 µg és 3,0 mg/kg testtömeg között változik, amelyet egyetlen dózisban vagy 2–4 részre osztva adhatunk be.

Az alkalmas adjuvánsok, hígító- vagy hordozóanyagok például tabletták vagy drazsék esetében a laktóz, keményítő, talkum vagy sztearinsav; kapszulák esetében a borkősav vagy laktóz; injekciós oldatok esetében a víz, alkoholok, glicerin vagy növényi olajok.

A készítmények megfelelő tartósítóanyagokat, stabilizáló- és nedvesítő szereket, oldódást elősegítő anyagokat (például vízzoldható cellulóz polimert, így hidroxipropil-metil-cellulózt vagy vízzoldható glikolt, például propilén-glikolt), édesítő-, színező- és aromaanyagokat is tartalmazhatnak. A készítményeket kívánt esetben nyújtott hatóanyagleadású formában is előállíthatjuk.

A találmány szerinti vegyületek azzal az előnnyel rendelkeznek, hogy hatékonyabbak, hatásosabbak, hosszabb ideig hatnak, stabilabbak, különösen enzimatis lebonthatással szemben, szelektívebbek, kevésbé toxikusak, kevesebb mellékhatást idéznek elő, jobban felszívódnak és gyorsabban hatnak vagy más előnyös hatással bírnak a technika állása szerinti vegyületekhez viszonyítva.

A találmányt a következő példák szemléltetik, amelyekben automata peptidszintetizátort alkalmaztunk a szilárd fázisú szintézishez.

1. példa

Boc-MePhe-(4-oxi-metil-fenil)-ecetsav

27,93 g Boc-MePhe-OH és 33,32 g 4-(bróm-metil)-fenilecetsav-fenacil-észter 1000 ml acetonitril kiegészítéssel oldatához 18,28 g kálium-fluorid-dihidrátot adunk. A szuszpenziót egy éjszakán át keverjük, majd szűrjük és a szűrletet szárazra pároljuk. A maradékot, a

Boc-MePhe-(4-oxi-metil-fenil)-ecetsav-fenacil-észter 1200 ml 85%-os ecetsavban oldjuk, 128 g cinkporral kezeljük és 2–4 órán át keverjük. A reakcióelegyet szűrjük, a szűrletet kb. 400 ml térfogatra bepároljuk és 3200 ml vízzel hígítjuk. Ekkor olaj válik ki, amelyet etil-acetátban oldunk és diciklohexil-aminnal (DCHA-nal) kezelünk, így 41,31 g mennyiségben a cím szerinti vegyület DCHA sóját kapjuk, amely 120–122 °C-on olvad.

2. példa

H-MePhe-OCH₂-Pam-gyanta

1,82 g (3 mmol) DCHA sóból felszabadított Boc-MePhe-(4-oxi-metil-fenil)-ecetsavat és 6,9 g (4,5 mmol) HOBt-t 40 ml DMF:DCM = 1:3 térfogatarányú elegyben, majd 0,62 g (3 mmol) DCC-t 20 ml DCM oldószerben 1,34 g (1 mmol hozzáférhető nitrogén) amino-metil-polisztirol-gyantához adunk, és a keletkeztet szuszpenziót 2–15 órán át rázzuk. A Boc-MePhe-OCH₂-Pam-gyantát szűrővel elkülönítjük, 2-propanollal és DCM-nal mossuk, majd az 1. táblázatban megadott (10–14 lépés) módon kezeljük, így a cím szerinti vegyületet szabad bázisként kapjuk.

3. példa

H-Phe-OCH₂-Pam-gyanta

0,83 g (2 mmol) Boc-Phe-(4-oxi-metil-fenil)-ecetsavat, 0,46 g (3 mmol) 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) és 0,41 g (2 mmol) DCC-t 50 ml DCM:DMF = 4:1 térfogatarányú elegyben oldunk, és az oldatot 0 °C-on 1 órán át keverjük. 1,34 g amino-metil-polisztirol-gyantát (1 mmol hozzáférhető nitrogén) szuszpendálunk a reakcióelegyben, amelyből a kivált diciklohexil-karbamidot szűrővel eltávolítottuk, és az elegyet 2–15 órán át rázzuk. A terméket, a Boc-Phe-OCH₂-Pam-gyantát szűrővel elkülönítjük és az 1. táblázatban megadott (10–14 lépések) módon kezeljük, így a cím szerinti vegyületet kapjuk.

4. példa

Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH

14,87 g Fmoc-Met-OH, 5,52 g HOSu és 8,26 g diciklohexil-karbodiimid 200 ml tetrahydrofuranban 0 °C-on 3,5 órán át történő reagáltatásával in situ Fmoc-Met-OSu-t állítunk elő.

A kivált diciklohexil-karbamidot (DCU-t) szűrővel eltávolítjuk és a tetrahydrofuranos szűrletet H-Asp(OtBu)-OH 220 ml víz:tetrahydrofuran = 10:1 térfogatarányú eleggyel készült hideg oldatához adjuk, amelyhez előzőleg már 40 ml 1 n nátrium-hidroxid-oldatot hozzáadtunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd 20 g szilárd citromsavat és 600 ml etil-acetátot mérünk hozzá. Az etil-acetátos réteget elválasztjuk, 10%-os citromsavoldattal, majd telített vizes nátrium-kloridoldattal mossuk és magnézium-szulfáton szárítjuk. Az etilacetátos oldatot bepároljuk, a maradékot 200 ml etilacetátban oldjuk és 7,84 ml DCHA-nal reagáltatjuk. Ily módon 17,93 g anyag válik ki, amely a cím szerinti vegyület DCHA sója és 159–162 °C-on olvad.

5. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-Phe-NH₂

H-Phe-OCH₂-Pam-gyantát, a 3. példa termékét egymást követően Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal kapcsoljuk az 1. táblázatnak megfelelően (5–7 kapcsolási lépések, majd a 16–20 lépések az Fmoc védőcsoport eltávolítására), így H-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-Phe-OCH₂-Pam-gyantát kapunk, amelyet Hpa-OSu észterrel kapcsolunk az 1. táblázat szerint (8–9 kapcsolási lépések), a termékként, kapott Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-Phe-OCH₂-Pam-gyantát a védőcsoport eltávolítása után szulfatáljuk és lehasítjuk a gyantáról az 1. táblázatnak megfelelően (10–15 lépések, 21–25 lépés és azután a 26–29 lépések ammóniával), így a cím szerinti vegyülethez jutunk, amelyet egymást követően SM-2 és ODS-3 oszlopon kromatográfiásan tisztítunk a 2. táblázat szerint (18 lépés). A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,03(1), Gly 1,05 (1), Ahx 1,94(2), Phe 0,99(1), Trp 0,74 (1), NH₃ 2,16. MS(FAB): m/e 961 (M+H)⁺.

6. példa

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-Phe-NH₂

PAL-gyantáról a védőcsoportot eltávolítjuk, majd a 2. táblázatnak megfelelően egymást követően Fmoc-Phe-OH, FmocDAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, FmocMet-OH aminosavakkal és Hpa-OSu észterrel kapcsoljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,04(1), Gly 1,07 (1), Met 1,79(2), Phe 1,10(1), Trp 0,71(1,0), NH₃ 1,40. MS (FAB): m/e 919 (M+H)⁺.

7. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-Phe-NH₂

PAL-gyantáról a védőcsoportot eltávolítjuk, majd a 2. táblázatnak megfelelően egymást követően Fmoc-Phe-OH, FmocAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, FmocAhx-OH aminosavakkal és Hpa-OSu észterrel kapcsoljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,00(1), Gly 1,08(1,0), Ahx 1,85(2), Phe 1,10(1), Trp 0,68(1,0), NH₃ 1,00. MS (FAB): m/e 883 (M+H)⁺.

8. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-Phe-NH₂

PAL-gyantáról a védőcsoportot eltávolítjuk, majd a 2. táblázatnak megfelelően egymást követően Fmoc-Phe-OH, FmocMe Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal és Hpa-OSu észterrel kapcsoljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Gly 0,89 (1), MeAsp 1,04(1), Ahx 1,99(2), Phe 1,09(1), Trp 0,71(1,0), NH₃ 0,91. MS (FAB): m/e 897 (M+H)⁺.

9. példa

Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂

PAL-gyantáról a védőcsoportot eltávolítjuk, majd a 2. táblázatnak megfelelően egymást követően Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-DAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH aminosavakkal és Hpa-OSu észterrel kapcsoljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,00(1), Gly 1,14 (1), Ile 1,91(2), MePhe 0,96(1), Trp 0,64(1), NH₃ 1,44. MS (FAB): m/e 897 (M+H)⁺.

10. példa

Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-Phe-NH₂

114 mg, a 6. példa szerint előállított Hpa-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-Phe-NH₂ peptidet 1,4 ml piridinben oldunk és az oldathoz 130 mg kén-trioxid-piridin komplexet adunk. A reakcióelegyet 2 órán át keverjük, majd újabb 80 mg kén-trioxid-piridin komplexet adunk hozzá. 4 óra eltelte után a reakcióelegyet 20 ml 5%-os ammónium-hidroxid-oldattal hígítjuk és azután szárazra pároljuk. A nyers maradékot egymást követően SM-2, ODS-3, SM-2 oszlopokon – a 2. táblázat 18 lépésének megfelelően – kromatográfiásan tisztítjuk. Az elkülönített terméket 0,1 M ammóniából fagyaszttva szárítjuk, így 89 mg cím szerinti vegyületet kapunk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye a következő: Asp 1,03(1), Gly 1,11(1), Met 1,83(2), Phe 1,04(1), Trp 0,59(1), NH₃ 2,2. MS (FAB): m/e 997 (M+H).

11. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-Phe-NH₂

55 mg, a 8. példa szerint előállított Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Me Asp-Phe-NH₂ peptidet lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatálunk, így 15 mg tisztított cím szerinti vegyületet kapunk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye a következő: Me Asp 1,07(1), Gly 1,04(1), Ahx 1,90(2), Phe 0,98(1), Trp 0,61(1), NH₃ 0,79. MS(FAB): m/e 975 (M+H).

12. példa

Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂

58 mg, a 9. példa szerint előállított Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂ peptidet lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatálunk, így 16 mg tisztított cím szerinti vegyületet kapunk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye a következő: Asp 1,08(1), Gly 1,08(1), Ile 1,97(2), MePhe 0,87(1), Trp 0,75(1), NH₃ 1,39. MS(FAB): m/e 975 (M+H).

13. példa

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂

A cím szerinti vegyületet a 2. táblázatban leírt eljárást, követve, Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH és HpaOSu egymás utáni kapcsolásával állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,06(1), Gly 1,04(1), MePhe 1,00(1),

Met 1,90(2), Trp 0,84(1), NH₃ 30,51. MS(FAB): m/e 931 (M-H).

14. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂

PAL-gyantát a 2. táblázatnak megfelelően egymást követően Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-DAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal és HpaOSu észterrel kapcsolunk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,03(1), Gly 1,04 (1), Ahx 1,95(2), MePhe 0,99(1), Trp 0,77(1,0), NH₃ 0,94. MS (FAB): m/e 895 (M-H).

15. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂

PAL-gyantát a 2. táblázatnak megfelelően, egymást követően Fmoc-Phe-OH, Fmoc-DAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal és HpaOSu észterrel kapcsolunk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye a következő: Asp 1,03(1), Gly 1,04(1), Ahx 0,96(1), Ile 0,98(1), Phe 1,00(1), Trp 0,67(1), NH₃ 0,99. MS(FAB): m/e 881 (M-H).

16. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂

PAL-gyantát a 2. táblázatnak megfelelően, egymást követően Fmoc-Phe-OH, Fmoc-MeAsp(Ot Bu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal és HpaOSu észterrel kapcsolunk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Me Asp 1,19(1), Gly 1,00(1), Ahx 1,02(1), Phe 0,91(1), Ile 0,89(1), Trp 0,65(1), NH₃ 0,60. MS(FAB): m/e 895 (M-H).

17. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂

PAL-gyantát a 2. táblázatnak megfelelően, egymást követően Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakkal és HpaOSu észterrel kapcsolunk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,10(1), Gly 1,09(1), Ahx 1,06(1), Ile 1,05(1), MePhe 0,71(1), Trp 0,76(1), NH₃ 0,80. MS(FAB): m/e 895 (M-H).

18. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂

41 mg, a 15. példában a 2. táblázat szerint előállított Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂ peptidet lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatálunk, így 22 mg tisztított cím szerinti vegyületet kapunk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,07(1), Gly 1,04(1), Ile 0,97(1), Phe 0,80(1), Trp 0,46(1), NH₃ 1,88. MS(FAB): m/e 961 (M-H).

19. példa

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-As(OBn)-MePhe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat eljárásait követve és egymást követően Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OBn)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH aminosavakat és HpaOSu észtert kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. MS(FAB): m/e 1023 (M+H)⁺.

20. példa

Hpa-(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBn)-MePhe-NH₂

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBn)-MePhe-NH₂ peptidet, a 19. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a tisztított cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,07(1), Gly 0,99(1), Met 1,91 (2), MePhe 1,02(1), Trp 0,47(1). MS(FAB): m/e 1101 (M-H).

21. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-DAsp(Ot Bu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,96(1), Gly 1,04(1), Ile 0,96(1), MePhe 1,07(1), Ahx 0,98(1), Trp 0,61(1), NH₃ 0,89. MS (FAB): m/e 895 (M-H).

22. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂ peptidet, a 21. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,98(1), Gly 1,07(1), Ile 0,95(1), MePhe 1,41(1), Ahx 0,81(1). MS(FAB): m/e 975 (M-H), m/e 895 (M-SO₃H).

23. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂ peptidet, a 17. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,98(1), Gly 1,08(1), Ile 0,96(1), MePhe 1,55(1), Ahx 0,84(1). MS(FAB): m/e 975 (M-H), m/e 895 (M-SO₃H).

24. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂ peptidet, a 14. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,00(1), Gly 0,98(1), MePhe 1,10(1), Ahx 1,93(2), Trp 0,96(1), NH₃ 0,30. MS(FAB): m/e 975 (M-H).

25. példa

Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-Phe-OH, Fmoc-DAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,02(1), Gly 1,03(1), Phe 1,01(1), Ile 1,94(2), Trp 0,72(1), NH₃ 0,85. MS (FAB): m/e 881 (M-H).

26. példa

Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂

A Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂ peptidet, a 25. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,92(1), Gly 1,03(1), Phe 0,99(1), Ile 1,93(2). MS(FAB): m/e 961 (MH), m/e 881 (M-SO₃H).

27. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Phe-DAsp-MePhe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-DAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,01(1), Gly 0,99(1), Phe 1,06(1), Ahx 1,02(1), Trp 1,06(1), Phe 0,94(1), NH₃ 0,82. MS (FAB): m/e 931 (M-H).

28. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Phe-DAs-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Phe-DAsp-MePhe-NH₂ peptidet, a 27. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,98(1), Gly 1,06(1), MePhe 0,97(1), Ahx 0,95(1), Trp 0,61(1), Phe 1,04(1), NH₃ 1,10. MS(FAB): m/e 1009 (M-H), m/e 929 (M-SO₃H).

29. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-Phe-NH₂

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-Phe-NH₂ peptidet állítunk elő a 2. táblázat szerinti módszerrel, és lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,02(1), Gly 1,05(1), Phe 1,02(1), Ahx 1,92(2), Trp 0,81(1), NH₃ 1,48. MS(FAB): m/e 961 (M-H), 881 (M-SO₃H).

30. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-MePhe-NH₂

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-MePhe-NH₂ peptidet állítunk elő a 2. táblázat szerinti módszerrel, és lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye:

MeAsp 0,92(1), Gly 1,00(1), MePhe 1,29(1), Ahx 0,77(1), Ile 1,02(1). MS(FAB): m/e 989 (M-H), 909 (M-SO₃H).

31. példa

Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂

Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂ peptidet állítunk elő a 2. táblázat szerinti módszerrel, és lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: MeAsp 1,11(1), Gly 1,00(1), Phe 1,06(1), Ile 1,83(2), Trp 0,73(1), NH₃ 1,48. MS(FAB): m/e 975 (M-H), 897 (M-SO₃H).

32. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeDAsp-Phe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-Phe-OH, Fmoc-MeDAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert egymás után kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: MeAsp 0,78(1), Gly 1,10(1), Phe 1,05(1), Ahx 2,07(2), Trp 0,76(1), NH₃ 0,71. MS(FAB): m/e 895 (M-H)*.

33. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeDAsp-Phe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeDAsp-Phe-NH₂ peptidet, a 32. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: MeAsp 1,00(1), Gly 1,02(1), Phe 1,06(1), Ahx 1,91(2), Trp 0,86(1), NH₃ 1,48. MS(FAB): m/e 975 (M-H), m/e 896 (M-SO₃H).

34. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-MePhe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-MeAsp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert egymás után kapcsoljuk a Rink-amid gyantához. Ezután a peptidet a szokásos eljárással lehasítjuk a gantárról, majd a Lys E-amino-csoportján o-tolil-izocianáttal kialakítjuk a 2-metil-fenil-acetamidocsoportot. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: MeAsp 1,01(1), Gly 1,05(1), MePhe 0,91(1), Ahx 2,02(2), Trp 0,84(1), NH₃ 0,82. MS(FAB): m/e 909 (M-H).

35. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Lys(Tac)-Asp-MePhe-NH₂

Lényegében a 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert egymás után kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,01(1), Gly 1,03(1), MePhe 0,98(1), Lys 0,94(1), Ahx 1,04(1), Trp 0,96(1). MS(FAB): m/e 1046 (M-H)*.

36. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Lys(Tac)-Asp-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Gly-Trp-Lys(Tac)-Asp-MePhe-NH₂ peptidet, a 35. példa termékét lényegében a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,01(1), Gly 1,04(1), MePhe 0,92(1), Lys 0,93(1), Ahx 1,10(1), Trp 0,84(1). MS(FAB): m/e 1123 (M-H)⁺.

37. példa

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂

A 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ahx-OH peptidket és a Hpa-OSu észtert egymás után a gyantához kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,00(1), Gly 1,02(1), MePhe 1,05(1), Ahx 2,1(2), Trp 0,53(1), NH₃ 0,69. MS(FAB): m/e 897 (M+H)⁺.

38. példa

Hpa-Ahx-Sar-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂

A 2. táblázat szerinti eljárást követve és az Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Ahx-OH aminosavakat és a Hpa-OSu észtert egymás után a gyantához kapcsolva a cím szerinti vegyületet állítjuk elő. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 0,93(1), Sar 1,12(1), MePhe 0,95(1), Ahx 1,99(2), Trp 1,06(1), NH₃ 0,88. MS(FAB): m/e 909 (M-H)⁺.

39. példa

Hpa(SO₃H)-Ahx-Sar-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂

A Hpa-Ahx-Sar-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂ peptidet, a 38. példa termékét a 10. példában leírt eljárással szulfatáljuk, így a cím szerinti vegyületet kapjuk. A savas hasítást követő aminosav analízis eredménye: Asp 1,04(1), Sar 0,87(1), MePhe 0,86(1), Ahx 2,23(2), Trp 0,89(1), NH₃ 1,31. MS(FAB): m/e 989 (M-H)⁺.

40. példa

A 32. példa szerinti vegyülettel a fenti B) vizsgálatot elvégeztük, és azt találtuk, hogy a CCK-A receptorokhoz való kötődésére jellemző kötődési állandó (K_i) 0,03 nM.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) általános képletű vegyület, a képletben R¹ jelentése OH vagy OSO₃H csoport;
- M jelentése Met, Ahx vagy Ile;
- G jelentése Gly vagy Sar;
- X jelentése Met, Ahx, Ile, Phe vagy Lys(R²);
- J jelentése Asp, Asp(OBn), DAsp, MeAsp vagy MeDAsp;
- L jelentése Phe vagy MePhe;

R² jelentése egy (II) általános képletű csoport, amelyben

E jelentése NH, CH=CH vagy CH₂CH₂ csoport, és

- 5 R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, hidroxilcsoport, halogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy OSO₃H csoport;

azzal a megkötéssel, hogy amikor R¹ jelentése

- 10 OSO₃H képletű csoport, G jelentése Gly csoport és

(a) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ahx, akkor X jelentése Ahx-tól eltérő;

(b) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ile, akkor X jelentése Ile-től eltérő;

- 15 (c) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Ile, akkor X jelentése Ahx-tól eltérő;

(d) J jelentése Asp, L jelentése Phe és M jelentése Met, akkor X jelentése Met-től eltérő;

- 20 (e) J jelentése Asp, L jelentése MePhe és M jelentése Met, akkor X jelentése Met-től eltérő;

(f) J jelentése DAsp, L jelentése MePhe és M jelentése Met, X jelentése Met-től eltérő;

vagy gyógyászati lag elfogadható származéka.

- 25 2. Az 1. igénypont szerinti olyan vegyület, amelyben M jelentése Ahx vagy Ile.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti olyan vegyület, amelyben X jelentése Ahx, Ile vagy Lys(R²).

- 30 4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti olyan vegyület, amelyben J jelentése Asp, DAsp, MeAsp vagy Me DAsp.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti olyan vegyület, amelyben R¹ OSO₃H csoport.

- 35 6. Az 1. igénypont szerinti

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-Phe-NH₂;

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-Phe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-Phe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-Phe-NH₂;

Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-Phe-NH₂;

- 40 Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-Phe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂;

- 45 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂;

Hpa-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBn)-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBn)-MePhe-

- 50 NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂;

- 55 Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂

Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-DAsp-Phe-NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Phe-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Phe-DAsp-MePhe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-MePhe-NH₂;

- 60 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-DAsp-Phe-NH₂;

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-MePhe-NH₂;
 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ile-MeAsp-MePhe-NH₂;
 Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂;
 Hpa-Ile-Gly-Trp-Ile-MeAsp-Phe-NH₂;
 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeDAsp-Phe-NH₂;
 Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeDAsp-Phe-NH₂;
 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-MeAsp-MePhe-NH₂;
 Hpa-Ahx-Gly-Trp-Lys(Tac)-Asp-MePhe-NH₂;
 Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Lys(Tac)-Asp-MePhe-

NH₂;

Hpa-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂;
 Hpa-Ahx-Sar-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂;
 Hpa(SO₃H)-Ahx-Sar-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂;
 vegyület vagy bármelyiknek egy gyógyászati el-

fogadható származéka.
 7. Egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati el fogadható származéka gyógyszerként való alkalmazásra.

8. Egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati el fogadható származéka elhízás kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállításában való alkalmazásra.

9. Gyógyászati készítmény, amely egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászati el fogadható sóját gyógyászati el fogadható adjuvánssal, hfgítóanyaggal vagy hordozóval együtt tartalmazza.

10. Eljárás emlős testi megjelenésének javítására, amely abban áll, hogy az emlősnek egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászati el fogadható származékát addig adagoljuk, amíg a kozmetikailag előnyös testtömeg-veszteség bekövetkezik.

11. Eljárás az 1. igénypont szerinti (I) általános képletti vegyület vagy gyógyászati el fogadható származékának előállítására, amely abban áll, hogy a) egy (III) általános képletű vegyületet szulfatálunk, a képletben M, G és L jelentése a fenti; Ja jelentése azonos J fentebb megadott jelentésével, azzal az eltéréssel, hogy az Asp, DAsp, MeAsp vagy MeDAsp közül bármelyik jelenlevő csoportnak a B-karboxilcsoportja adott esetben védett; Xa jelentése azonos X

fentebb megadott jelentésével, azzal az eltéréssel, hogy még Lys-t is jelenthet, és bármelyik hidroxil- vagy aminocsoport védett formában van jelen (kivéve azokat a hidroxilcsoportokat, amelyeket szulfátészterré kívánunk alakítani); és Za jelentése NH₂ vagy karboxil-védőcsoport;

5

b) egy (IV) általános képletű vegyületről egy vagy több védőcsoportot eltávolítunk, a képletben R¹, M, G, Xa, Ja és Za jelentése a fenti, és az Xa, Ja és Za legalább egyike védőcsoportot jelent;

10

c) egy (V) általános képletű vegyületet, a képletben M, G, J és L jelentése a fenti és Xb jelentése Lys, egy (VI) általános képletű vegyülettel reagáltatunk, a képletben R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése a fenti, így olyan (I) általános képletű vegyületet kapunk, amelyben X jelentése Lys(R²) és E jelentése NH; vagy

15

d) egy (V) általános képletű vegyületet, amelyet már fentebb meghatároztunk, egy (VII) általános képletű vegyülettel kapcsolunk, a képletben E jelentése CH₂CH₂ vagy CH=CH csoport és R³, R⁴, R⁵, R⁶ és R⁷ jelentése a fenti, így olyan (I) általános képletű vegyületet kapunk, amelyben X jelentése Lys(R²) és E jelentése CH₂CH₂ vagy CH=CH csoport.

20

12. Egy (IV) általános képletű közbenső vegyület, ahogy a 11. igénypontban meghatároztuk.

25

13. Egy anyag vagy anyagösszetétel, amely egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati el fogadható származéka emlős testi megjelenésének javítására alkalmas eljárásban való alkalmazásra, amely eljárás abban áll, hogy a fenti anyagot vagy anyagösszetételt az emlősnek addig adagoljuk, amíg a kozmetikailag előnyös testtömeg-veszteség bekövetkezik.

30

14. Új vegyület, lényegében ahogy itt leírtuk.

35

15. Új gyógyászati készítmény, lényegében ahogy itt leírtuk.

16. Új eljárás emlős testi megjelenésének javítására, lényegében ahogy itt leírtuk.

40

17. Új eljárás egy vegyület előállítására, lényegében ahogy itt leírtuk.

18. Anyag vagy készítmény kezelési eljárásban való új alkalmazásra, lényegében ahogy itt leírtuk.



