

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 186 729

A bejelentés napja: (22) 78. 11. 23.

(21) WE-591

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
GB

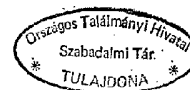
(32)
77. 11. 24.

(31)
(48980/77)

A közzététel napja: (41) (42) 84. 05. 28.

Megjelent: (45) 87. 10. 20.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 07 K 7/06



Feltaláló(k): (72)

Wilkinson Samuel kutató vegyész, Beckenham, Kent, GB

Szabadalmaz: (73)

The Wellcome Foundation Ltd., London, GB

(54)

ELJÁRÁS BIOLÓGIAILAG AKTÍV PENTAPEPTID-SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű pentapeptid-származékok, valamint savaddíciós sóik előállítására.

Az (I) általános képletben

X₃ jelentése L-tirozil-csoport,

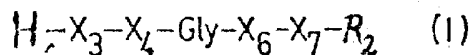
X₄ jelentése D-metionil-, D-metionil-szulfoxid- vagy D-metionil-szulfon-csoport,

X₆ jelentése L-(4-halogén-fenil)-alanil-, L-(4-trifluor-metil-fenil)-alanil- vagy L-(4-nitro-fenil)-alanil-csoport,

X₇ jelentése L-prolil-, D-prolil- vagy D-metionil-csoport,

R₂ jelentése -NH₂ vagy -OH képletű csoport.

Az új vegyületeknek morfinszerű hatásuk van, ezért a gyógyászatban alkalmazhatók például fájdalomcsillapításra, nyugtatásra, köhögéscsillapításra, légzési zavarok enyhítésére, a széklet visszatartásának előidézésére, depressziós állapotok kezelésére és anesztézia előidézése és fenntartására.



A találmány tárgya eljárás az új (I) általános képletű peptidek, valamint savaddíciós sók előállítására – ahol a képletben

- X₃ jelentése L-tirozil-csoport,
 X₄ jelentése D-metionil-, D-metionil-szulfoxid- vagy D-metionil-szulfon-csoport,
 X₆ jelentése L-(4-halogén-fenil)-alanil-, L-(4-trifluor-metil-fenil)-alanil- vagy L-(4-nitro-fenil)-alanil-csoport,
 X₇ jelentése L-prolil-, D-prolil- vagy D-metionil-csoport,
 R₂ jelentése –NH₂ vagy –OH képletű csoport.

A találmány szerinti új vegyületeket úgy állítjuk elő, hogy

a) egy H–Y₁–OH általános képletű, adott esetben ismert módon védett és/vagy aktivált vegyületet – a képletben Y₁ jelentése az (I) általános képletű pentapeptid-származék aminosavgyök(ök)ből álló N-terminális szekvenciája – egy H–Y₂R₂ általános képletű, adott esetben ismert módon védett és/vagy aktivált vegyülettel – a képletben Y₂ jelentése az (I) általános képletű pentapeptid-származék az N-terminális részhez kapcsolódó, aminosavgyök(ök)ből álló szekvenciája – reagáltatunk, és adott esetben a védőcsoportokat ismert módon eltávolítjuk, vagy

b) olyan (I) általános képletű pentapeptid-származékok előállítására, amelyek képletében R₂ jelentése –NH₂-csoport, X₃, X₄, X₆ és X₇ jelentése a megadott, egy (I) általános képletű pentapeptid-származékok – a képletben X₄ jelentése D-metionil-csoport – szelektíven oxidálunk, és kívánt esetben az a)–c) eljárások bármelyikével kapott terméket ismert módon bázissá vagy savaddíciós sóvá alakítjuk.

c) olyan (I) általános képletű pentapeptid-származékok előállítására, amelyek képletében X₄ jelentése D-metionil-szulfoxid-csoport, X₃, X₆, X₇ és R₂ jelentése a megadott, egy (I) általános képletű pentapeptid-származékok – a képletben X₄ jelentése D-metionil-csoport – szelektíven oxidálunk, és kívánt esetben az a)–c) eljárások bármelyikével kapott terméket ismert módon bázissá vagy savaddíciós sóvá alakítjuk.

A találmány szerinti peptidek és származékaik morfin-szerű hatást fejtenek ki és az ember- és állatgyógyászatban alkalmazhatók. Az általánosan elfogadott terminológiának megfelelően morfinszerű hatást kifejtő vegyületek alatt olyan anyagokat értünk, melyek biológiai aktivitása természetes alkaloidáéhoz hasonló.

A morfin farmakológiai tulajdonságait és terápiás felhasználását számos irodalmi helyen ismertetik, így például: Goodman, L. S., Gilman, A.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, The MacMillan Company, New York, 247–266 (1965), és Blacow, N. W.: *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, Pharmaceutical Press, London, 1100–1106 (1972). Az is jól ismert a Goodman és Gilman is leírják fent említett művük 16. fejezetében, hogy a morfin tartós alkalmazása erős hozzászokást eredményezhet és morfinistává teheti a beteget, akinél az adagolás abbahagyásakor megvonási tünetek jelentkezhetnek. Évek óta folynak kutatások, hogy a morfin-

hoz hasonló hatású vegyületet találjanak, mely azonban nem rendelkezik a morfin hátrányos tulajdonságaival.

Azt találtuk, hogy a találmányunk szerinti új (I) általános képletű vegyületek – ahol a peptid általános képletében az egyes molekularészeket jelölő betűk jelentése a megadott –, valamint sóik és savaddíciós sóik *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt morfinszerű hatást mutatnak.

Leírásunkban az aminosavak jelölésére alkalmazott rövidítések az irodalomban általánosan alkalmazott jelölések, melyek magyarázata megtalálható például a következő irodalmi helyen: *Biochemistry*, 11., 1726 (1972). Aminosavak alatt a leírásban L-aminosavakat kell érteni, kivéve ha glicinről van szó, vagy ha kifejezetten mást nevezünk meg.

Az (I) általános képletű peptidek savaddíciós sóinak biológiai aktivitása a bázis aktivitásától függ elsősorban és csak csekély mértékben befolyásolja azt a sav milyensége, bár terápiás célokra előnyös olyan savakkal képzett savaddíciós sók alkalmazása, melyek gyógyászatilag elfogadhatók. Ilyen savak például a következők:

1. Ásványi savak, például: sósav, brómhidrogénsav, foszforsav, metáfoszforsav, salétromsav és kénsav.

2. Szerves savak, például: borkősav, ecetsav, citromsav, almasav, tejsav, fumársav, benzoészav, glikolsav, glukonsav, gulonsav, borostyánkősav és aril-szulfonsavak, például p-toluol-szulfonsav.

A gyógyászatilag jól és kevésbé elfogadható savaddíciós sók (utóbbiakra példák a fluorhidrogénsavval vagy perklorssavval képzett sók) egyaránt felhasználhatók a bázisok elválasztására és tisztítására, és a gyógyászatilag nem elfogadható sók ismert módszerekkel átalakíthatók gyógyászatilag elfogadható sókká. A több szabad aminos csoportot tartalmazó peptidekből előállíthatók mono- és poli-savaddíciós sók is, valamint – többfajta sav felhasználásával – vegyes savaddíciós sók is.

A kationnak a peptidek egyéb sói esetében is (melyek a peptidből, mint karboxilát anionból és egy kationból állnak) csekély szerepe van a hatás tekintetében, bár terápiás célokra előnyösebb gyógyászatilag elfogadható kationokkal képzett sók alkalmazása. Ilyen kationok például a nátrium- és a káliumion.

A találmányunk szerinti (I) általános képletű peptidek és savaddíciós sóik a következő hatásokat mutatják.

A) *In vitro* hatások

a) Az idegi eredetű izomösszehúzódnások gátlása, melyet Hughes és munkatársai módszerével vizsgáltunk [*Brain Research*, 88. 296 (1975); a vizsgálatához 0,1 Hz frekvenciát alkalmaztunk] erekekből kivett ondókevezető csövön. A gátlást az ismert narkotikumantagonista naloxonnal (1-N-allil-7,8-dihidro-14-hidroxinormorfinon) lehetett megszüntetni.

b) Az elektromos stimulálással kiváltott izomösszehúzódnások csökkentése, melyet tengerimalacokból kivett csípőbőlen vizsgáltunk; a csípőbőlet Paton módszerével [*Brit. J. Pharmacol.*, 12., 119–127 (1957)] készítettük elő az elektromos kezelésre. A beldarabokat felhúztuk az anódra és mindegyikre 2–3 g-os súlyt tettünk. Az alkalmazott frekvencia 0,1 Hz, a kezelés időtartama 0,4 msec, a feszültség 30–40 V volt, az összehúzódnásokat izotóniánál alakítottuk át.

B) *In vivo* hatások

a) A vegyületek gátolják az analgetikus aktivitást, például hatékonynak bizonyultak egereken végzett úgynevezett „hot plate” kísérletekben, melyek leírása megtalálható az irodalomban. A vizsgálatot Eddy és munkatársai módosított módszerével végeztük [J. Pharm. Exp. Therap., 107., 385 (1953)]. A találmányunk szerinti vegyületeket intracerebroventrikuláris injekció formájában alkalmaztuk, a gátlást a naloxon oldotta fel.

A vegyületek továbbá hatékonyak az ecetsav redukálásában, mely egereken görcsös állapotot vált ki. A vizsgálatot Hendershot és társainak módosított módszerével végeztük [J. Pharm. Exp. Therap., 125., 237 (1959)], a találmányunk szerinti vegyületeket orálisan adagoltuk; a görcsös állapot naloxon hatására visszaállt.

b) A vegyületek köhögéscsillapítóként is hatékonyak; a vizsgálatot tengerimalacokon végeztük, Boura és munkatársai módszere szerint [Brit. J. Pharmacol., 39., 225 (1970)].

c) A vegyületek antidiarrhoeás hatást is mutatnak, így például redukálják a patkányoknál hasmenést okozó ricinusolajat.

Számos általánosan ismert farmakológiai vizsgálatnak alávetve a találmányunk szerinti (I) általános képletű peptideket, sóikat és savaddíciós sóikat azt találtuk, hogy laboratóriumi állatoknál, beleértve a patkányokat és az egereket, ezek a vegyületek hatékony érzéstelenítők és egyaránt alkalmasak az anesztéziás állapot előidézésére és fenntartására. Erre a célra számos módon juttathatók a szervezetbe, például parenterálisan, intravénás vagy intracerebroventrikuláris injekció formájában. A vegyületek anesztéziás hatását az alábbi példákkal kívánjuk szemléltetni, anélkül, hogy alkalmazási területüket korlátoznánk.

1. A normális testhelyzet visszanyerésére irányuló reflex gátlása

Ez a hatás jellemző az ismert anesztéziát előidéző szerekre, például a klorál-hidrátra (2,2,2-triklór-1,1-etándiol), az uretánra (etilkarbamát) és a barbiturátra (barbitursav-származékok). Az az állat, amelynél ez a reflex gátolt, nem fordul át és nem próbálja meg visszanyerni normális testhelyzetét ha a hátára fordítják.

2. A fülkagylóreflex gátlása

A fülkagylóba egy drót alakú eszközt vezetünk be; a kontroll (a vegyülettel nem kezelt) állatoknál ennek hatására reflexszerűen pislogás tapasztalható. Ennek a reflexnek az ember esetében a gyógyászatban nagy jelentősége van, mert ez egyike az utolsó reflexeknek a teljes anesztézia beállása előtt.

3. A szaruhártyareflex gátlása

A szaruhártyát könnyedén megérintjük egy drót alakú eszközzel; a kontroll (a vegyülettel nem kezelt) állatoknál ennek hatására reflexszerű pislogás tapasztalható. Ennek a reflexnek az ember esetében a gyógyászatban nagy jelentősége van, mert ez egyike az utolsó reflexeknek a teljes anesztézia beállása előtt.

Az 1., 2. és 3. pontban leírt hatások egyaránt feloldhatók az ismert narkotikum antagonistá naloxon alkalmazásával. Figyelemre méltó azonban az, hogy a találmányunk szerinti vegyületekkel ellentétben maga a morfin laboratóriumi állatoknak, például egereknek injekcióban adva bármilyen nagy dózisban sem gátolja a normális testhelyzet visszanyerésére irányuló reflex működését.

Az (I) általános képletű peptidek, valamint sóik és savaddíciós sóik kisebb csoportjait alkotják azok a vegyületek, melyek képletében X_3 jelentése a megadott, és

5 a) X_4 jelentése D-metionil- vagy D-metionil-szulfid-csoport, legcélszerűbben D-metionil-szulfid-csoport,

b) X_6 jelentése L-(4-nitro-fenil)-alanil-csoport,

c) X_7 jelentése L-prolil- vagy D-prolil-csoport, előnyösen L-prolilcsoport,

10 d) R_2 jelentése $-OH$ vagy $-NH_2$ képletű csoport.

További alcsoportja az (I) általános képletű peptideknek és savaddíciós sóiknak az (V) általános képletű vegyületek, melyek képletében X_4 és R_2 jelentése a megadott,

X_6 jelentése L-(4-klór-fenil)-alanil vagy L-(4-nitro-fenil)-alanil-csoport,

20 X_7 jelentése D-prolil-csoport.

Az (V) általános képletű vegyületek szűkebb csoportját képezik azok a vegyületek, melyek képletében

25 X_8 jelentése L-4-nitro-fenilalanil-csoport, és a többi szubsztituensek jelentése a következő:

X_4 jelentése D-metionilszulfid- vagy D-metionilsulfon-csoport,

X_7 jelentése L-prolil- vagy D-prolil-csoport,

30 R_2 jelentése amino- vagy hidroxilcsoport.

Az (I) általános képletű peptidek és savaddíciós sóik előállíthatók bármely, az analóg szerkezetű vegyületek előállítására az irodalomban leírt módszerrel. Így előállíthatók a megfelelő aminosavval egymástani összekapcsolásával akár a peptidszintézis klasszikus módszereivel, akár szilárd fázisban végrehajtott reakcióval, vagy a megfelelő aminosavak előállításával, majd összekapcsolásával.

Ezek a reakciók végrehajthatók például a beépíteni kívánt aminosav karboxilcsoportjának aktiválásával és azoknak a karboxil- és aminocsoportoknak a megvédésével, melyek reagálását nem kívánjuk. A módszerek általánosan ismertek a peptidkémiaiban; a megfelelő aktiváló- és védőcsoportok, a reakciókörülmények (az aminosav-összekapcsolási reakcióra és a védőcsoportok eltávolítására), melyek mellett a legkisebb mértékű a racemizálódás, a következő irodalmi helyeken találhatók meg:

I 042 487, I 048 086 és I 281 383 számú nagy-britanniai szabadalmi leírások;

50 Schröder és Lüebke: The Peptides, Academic Press (1965);

Bellean és Malek: J. Am. Chem. Soc., 90., 165 (1970);

Tilak: Tetrahedron Letters, 849 (1968);

Beyermann: Helv. Chim. Acta, 56., 1729 (1973);

55 Stewart és Young: Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman and Co. (1969).

A reakciókörülményektől függően az (I) általános képletű peptideket szabad bázis vagy savaddíciós só alakjában nyerjük. A savaddíciós só átalakítható szabad bázissá vagy más savakkal képzett sókká, a bázis pedig átalakítható savaddíciós sóvá az irodalomban leírt ismert módszerekkel.

Az (I) általános képletű peptidek, valamint farmakológiailag és gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sóik már említett morfin-szerű hatásuk miatt felhasználhatók

emlősök, mind emberek, mind pedig emlősállatok kezelésére minden olyan esetben, amikor morfinszerű hatást akarunk elérni. Alább felsorolunk néhány alkalmazási területet példaként:

1. Fájdalomcsillapítás (analgezia), például simaizomgörcs okozta fájdalom esetén, úgy mint vese- és csepőgörcsnél, halálos betegségek, például rák esetén, posztoperatív fájdalomnál és szülési fájdalomnál.

2. Nyugtató, például anesztézia előtti gyógyszerelésnél, trankvilláció; altatóként való alkalmazás, különösen abban az esetben, ha az álmatlanság oka fájdalom vagy köhögés; általában a szorongás, nyugtalanság csökkentése.

3. Köhögéscsillapítás.

4. Légzési zavarok enyhítése, például hirtelen fellépő halszívkamra-görcs vagy tüdővízenyő esetén.

5. A széklet visszatartása, például vékonybélspoly létesítése vagy vastagbélmetzés után, valamint hasmenés és vérhas kezelésére.

6. Eufória érzés előidézése és depresszió kezelése, például halálos betegségek, úgymint rák esetében, a fájdalomcsillapítással egybekötve.

7. Az ember- és állatgyógyászatban egyaránt az anesztézia előidézésére és fenntartására emlősök esetében.

A peptid vagy savaddíciós sója alkalmazható önmagában, egyedül anesztéziát előidéző szerként vagy egy vagy több más vegyülettel kombinálva. Ezek az anyagok alkalmazhatók a peptid vagy savaddíciós sója beadása előtt, azzal egyidejűleg, vagy azután beadva; az egyidejű adagolás esetén ezek az anyagok beadhatók külön vagy a peptiddel vagy savaddíciós sójával összekevert formában.

A peptid vagy savaddíciós sója alkalmazható például valamint benzodiazepin trankvilláns beadását követően: ilyen trankvillánsok például a klórdiazepoxid (7-klór-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid), a diazepam (7-klór-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) és az oxazepam (7-klór-1,3-dihidro-3-hidroxi-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on).

Alkalmazható a peptid és savaddíciós sója az anesztéziás állapot fenntartására is abban az esetben, ha az anesztéziás állapotot valamilyen más anesztéziát előidéző szer beadásával idéztük elő; ilyenek például a barbiturátok, mint a tiopental-nátrium (5-etil-5-[1-metilbutil]-2-tiokarbitursav-metilészter).

Az anesztézia területén való alkalmazhatóságukon belül is különösen alkalmasak a találmány szerinti (I) általános képletű peptidek, valamint sóik és savaddíciós sóik, valamint farmakológiailag és gyógyászatiilag alkalmazható sóik és savaddíciós sóik az úgynevezett „neuroleptanalgezia” előidézésére és fenntartására, mely állapotot nyugodtság, fizikai érzéketlenség a környezeti hatásokkal szemben és a fájdalomérzés hiánya jellemző (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 25. kiadás, W. B. Saunders kiadó [1964]. 1041. és Goodman és Gilman korábban már hivatkozott műve, 8. fejezet, 97-101. oldal). Az orvosok szerint ez az állapot igen alkalmas olyan műveletek elvégzésére, mint például a hörgőtúkrözés (bronhoszkópia), röntgenvizsgálatok, égési sebek bekötözése, hólyagtúkrözés (citoszkópia), ahol a beteg bizonyos fokú együttműködése kívánatos. Erre a célra alkalmasnak találta egy olyan készítményt, mely meghatározott arányban tartalmaz fentanil-citrát narkotikus analgetikumot (N-[1-fenil-4-piperidil]-propionanilid-citrát) és droperidol neuroleptikumot [1-1-(3-[p-fluor-

benzoi]-propil)-1,2,3,6-tetrahidro-4-piridil-2-benzimidazolinon].

Az állatgyógyászatban két készítményt találtak alkalmazni olyan esetekben való beadásra, amikor neuroleptanalgetikus hatást kívánnak elérni, például törött tagok helyretelezése, sebek összevarrása, herélés. Mindkét készítmény meghatározott mennyiségben tartalmaz etorpin-hidroklorid narkotikus analgetikumot (4,5 α -epoxi-3-hidroxi-6-metoxi- α -17-dimetil- α -propil-6,14-etenomorfina - 7 α (R) - metanoi - hidroklorid), emellett acepromazint [1-10-(3-[dimetilamino]-propil)-10H-fenotiazin-2-il/-etanon], illetve metotrimetrazint (2-metoxi-N,N, β -trimetil-10H-fenotiazin-10-propánamin).

Mind ez ideig a neuroleptanalgeziát csak a fent említett vagy ahhoz hasonló gyógyszerkombinációkkal lehetett előidézni. Ezért az (I) általános képletű peptidek, valamint gyógyászatiilag elfogadható savaddíciós sóik nagy fontossággal bírnak az ember- és állatgyógyászatban egyaránt, mivel ezt a hatást egymagukban, más hatóanyagokkal való kombinálás nélkül is képesek kifejezni, ezért gyógyszerként való alkalmazásuk igen előnyös.

A korábban felsorolt célok bármelyikére használjuk az (I) általános képletű peptideket, valamint savaddíciós sóikat (a továbbiakban ezekre hatóanyag megjelöléssel hivatkozunk), az alkalmazott mennyiség az alkalmazás módjától és a kívánt hatás jellegétől és mértékétől függ; az alkalmazandó mennyiséget végső soron a gyógyszerész vagy az állatorvos határozza meg. Általánosságban azt lehet mondani, hogy bármilyen hatást akarunk is elérni, az alkalmazott mennyiség 0,0025 μ g-40 mg/testsúlykilogramm nagyságrendbe esik, előnyösen 0,025 μ g-10,0 mg/testsúlykilogramm, még célszerűbben 0,01 μ g-4,0 mg/testsúlykilogramm, legelőnyösebben 0,25-400 μ g/testsúlykilogramm (mintegyik adag peptid bázisra vonatkozik). Diarrhoea-ellenes szerként orálisan adagolva embereknek naponta kétszer vagy háromszor 3 mg beadása előnyös; köhögéscsillapítóként a hatásos orális dózis 30 mg kétszer vagy háromszor naponta.

A hatóanyag bármilyen, a kívánt hatást kiváltó módon a szervezetbe juttatható; beadható orálisan, rektálisan, nazálisan, helyileg (bukálisan), vaginálisan vagy parenterálisan (beleértve a szubkután, az intramuszkuláris és az intravénás adagolást is). Azt, hogy melyik beadási mód a legelőnyösebb, az elérni kívánt hatás szabja meg, így például szülési fájdalmak enyhítésére legmegfelelőbb a hatóanyagot egyenesen a gerincvelőbe juttatni.

Bár a hatóanyag önmagában is kifejti hatását, előnyösebb gyógyászati készítmények formájában alkalmazni.

Az ember- és állatgyógyászati célokra előállított készítmények egyaránt egy hatóanyagból és egy vagy több gyógyászatiilag elfogadható hordozóból állnak. Az, hogy a hordozónak gyógyászatiilag elfogadhatónak kell lennie, azt jelenti, hogy nem léphet kölcsönhatásba a készítményben jelenlevő egyéb anyagokkal és nem kótheti meg a hatóanyagot. A készítménynek nem szabad oxidálószerket és egyéb olyan anyagokat tartalmaznia, melyek a peptidekkel nem összeférhetők.

A készítmények formulázhatók minden olyan formában, mely a fentebb felsorolt beadási módokkal a szervezetbe juttatható; a legelőnyösebb forma minden esetben a hatóanyag milyenségétől és a kezelés körülményeitől függ. A formulázás előnyösen egységadagok formájában, bármilyen, a gyógyszerészetben ismert és alkalmazott módon végrehajtható. Mindegyik formulázási mód

lényege az, hogy a hatóanyagot összekeverjük az egy vagy több segédanyagot tartalmazó hordozóanyaggal. Ezt általában úgy hajtjuk végre, hogy a finoman és egyenletesen elosztott hatóanyagot összekeverjük egy folyékony hordozóval, egy finoman elosztott szilárd hordozóval, vagy ezek elegyével, majd, ha szükséges, a terméket a kívánt formájúra alakítjuk.

A találmány szerinti vegyületekből előállított gyógyszerkészítmények orális beadás céljára lehetnek azonos mennyiségű hatóanyagot tartalmazó egységek, például tabletták vagy kapszulák vagy ostyák, porok vagy granulátumok; ezenkívül lehetnek folyékony halmazállapotúak is, például oldatok, vizes vagy nemvizes szuszpenziók, és olaj/víz vagy víz/olaj típusú emulziók. A hatóanyag adagolható nagyobb pirulák, szirupok vagy kenőcsök formájában is.

A tabletták előnyösen préseléssel vagy sajtolással állíthatók elő, egy vagy több adalékanyag alkalmazásával. A préselt tabletták megfelelő gép segítségével állíthatók elő, melybe a hatóanyagot szabadon folyó formában, például porként vagy granulátumként adagoljuk be, előnyösen kötő-, kenő-, közömbös hígító-, síkosító-, felületaktív vagy diszpergálóanyagokkal összekeverve. A sajtolott tablettákat erre a célra szolgáló berendezés segítségével lehet előállítani úgy, hogy a porra tört komponenseket megnedvesítjük egy közömbös, folyékony halmazállapotú hígítószerszel.

Rektális beadás céljára szuppozitóriumokat állíthatunk elő az általában használt hordozóanyagok, úgymint kakaóvaj alkalmazásával, míg nazális beadás céljára az aktív anyagot vizes vagy olajos oldatban tartalmazó orrcsepp a legalkalmasabb.

A szájban való helyi alkalmazás céljára legmegfelelőbbek a hatóanyagot valamilyen ízesített hordozóval, például szacharózzal, akáciagumival vagy tragantgyantával keverten tartalmazó szögletes tabletták vagy a hatóanyagot és valamilyen közömbös hordozót, például zselatint tartalmazó, vagy glicerín-, szacharóz- vagy akáciagumi-tartalmú pasztillák.

Vaginális beadás céljára pesszáriumok, krémek, paszták vagy spray-k formájában legalkalmasabb formulálni a hatóanyagot valamilyen, az irodalomban leírt hordozóanyaggal kombinálva.

A parenterálisan beadható készítmények előnyösen a hatóanyag steril vízzel készített oldatait, melyek előnyösen a kezelt vérével izotóniásak. Ezek az oldatok előállíthatók a szilárd hatóanyag vízben való feloldásával és a kapott oldat sterilizálásával és a kezelt vérével izotóniásra állításával. Legcélszerűbben egy vagy több adagot tartalmazó formában szerelhetők ki, ampullák formájában.

Nazális beadás céljára olyan készítmények is előállíthatók, melyekben a hordozó szilárd anyag; a kapott, 20–500 mikron részecskeméretű porokat a tubákhoz hasonló módon, azaz az orrhoz közel tartott dobozból való gyors felszippanással juttatják az orrüregbe.

Az előbb felsorolt adalékanyagokon kívül a találmány szerinti vegyületeket hatóanyagként tartalmazó készítmények más adalékanyagokat is tartalmazhatnak, például hígítószereket, puffereket, ízesítőanyagokat, kötőanyagokat, sűrítőanyagokat, síkosítóanyagokat, konzerválóanyagokat (beleértve az antioxidánsokat is) és más hasonló adalékokat.

Ha a formulázás, akár ember-, akár állatgyógyászati készítmény előállítására, egységadagok formájában történik, például a korábban leírt kiszerelési módok vala-

melyikében, minden egyes egységadag előnyösen 0,125 μg –2 g, még célszerűbben 1,25 μg –200 mg, legelőnyösebben 12,5 μg –20 mg hatóanyagot tartalmaz (peptid bázisra számítva).

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal kívánjuk szemléltetni, anélkül, hogy oltalmi körét a példákra kívánnánk korlátozni.

Alkalmazott rövidítések és vizsgálati módszerek

A példákban a következő rövidítéseket alkalmazzuk:

HOBT	1-hidroxi-benzotriazol
DDCI	diciklohexil-karbodiimid
DCU	diciklohexil-karbamid
NMM	N-metil-morfolin
DMF	dimetil-formamid
Pr	i-propanol
Pr ₂ O	di-izopropil-éter
Pc	petroléter
EtOAc	etil-acetát
Z	benzil-oxi-karbonil-csoport
Bu	terc-butil-csoport
BOC	terc-butil-oxi-karbonil-csoport
Bzl	benzilcsoport
THF	tetrahidrofuran
DCHA	diciklohexil-amin

A nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárás jellemzői:

Csziploz:	Zorbax C-8, 4,6 mm × 25 cm
Mozgó fázis:	Acetonitril/0,1 M ammónium-acetát, pH 4,0
Átfolyási sebesség:	2 ml/perc
Detektálás:	254 nm

A peptideket vékonyréteg-kromatográfián mutatjuk ki, Merck szilikagél-lemezeken, a következő oldószerszereket alkalmazva futtatószerként:

1	metil-etil-keton
2	n-butanol:ecetsav:víz = 3:1:1
3	kloroform:metanol:32 %-os ecetsavoldat = 120:90:40
4	kloroform:metanol:32 %-os ammóniaoldat = 120:90:40
5	n-butanol:ecetsav:etil-acetát:víz = 1:1:1:1
6	kloroform:metanol = 1:1
7	kloroform:metanol:32 %-os ecetsavoldat = 120:90:5
8	kloroform:metanol:32 %-os ammóniaoldat = 120:90:5

Az optikai forgatóképességet Bendix NPL típusú automata polariméteren mértük.

A peptid hidrolizátumok aminosav-összetételét (hidrolízis 6n sósavoldattal, 110 °C-on, 24 órán keresztül, légtelenített lezárt csövekben) Beckman-Spinco Model 1200 aminosavanalizátorral vagy Rank Chromostak aminosavanalizátorral határoztuk meg.

A peptidok szintézise során a következő, általánosan ismert módszereket alkalmaztuk:

a) A kondenzálást DMF-ben, DCCI jelenlétében hajtottuk végre.

b) Az aminosavészter-hidrokloridokat tercier bázis, előnyösen trietil-amin vagy NMM hozzáadásával alakítottuk át szabad észterekké.

c) Ha a kondenzálás során a részleges kondenzációhoz olyan peptidre volt szükség, melynek optikailag aktív C-terminális aminosavgyöke van, HOBT-t adtunk az elegyhez.

d) A kondenzálást 24 órás reakcióidővel, +4 °C hőmérsékleten hajtottuk végre.

e) A kondenzálás után a termék tisztítását savas és lúgos mosással hajtottuk végre, hogy eltávolítsuk a reagálatlan vegyszereket.

f) A lúgos elszappanosítást vizes metanolban, 11,5–12,0 pH-n hajtottuk végre nátrium-hidroxiddal, autotitrátorban.

g) A benzil-oxi-karbonil védőcsoportot metanol és ecetsav oldószerkeletben, 10 % palládiumot tartalmazó, aktív szénre felvitt palládium katalizátorral végzett hidrogenolizissal távolítottuk el.

h) A fenti hidrolízis során kapott acetátot a megfelelő hidrokloriddá metanolos hidrogén-klorid hozzáadásával alakítottuk át.

i) A benzil védőcsoportokat metanolban 10 % palládiumot tartalmazó aktív szénre felvitt palládium katalizátorral végrehajtott hidrogenolizissal távolítottuk el.

j) A terc-butil és terc-butoxikarbonil védőcsoportokat ecetsavban, 1 n sósavoldattal kezelve távolítottuk el, anizol jelenlétében, 60–90 perc reakcióidővel.

k) A treonin és szerin alkoholcsoportjait védő OBU védőcsoportokat 10 % vizes tartalmazó trifluoecetsavval kezelve távolítottuk el, 60–90 perc reakcióidővel.

l) A kapott peptideket hidrokloridjuk formájában izoláltuk és vizes oldatukból liofilizáltuk.

1. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂ előállítás

A peptidet az 1. ábrán vázolt módon állítjuk elő, hidroklorid sója formájában izoláljuk és karboximetilcellulóz (CMC 52) tisztítjuk; a fokozatos eluálást 0,001–0,5 mol/l ammónium-acetát oldatokkal végezzük. A hozam: 56,7 %. A vizes oldatból liofilizált acetát savaddíciós só jellemző adatai:

Rf: 0,52²; 0,83³; 0,47⁴;
[α]_D²⁵: +8,1° (c = 0,2, metanolban).

Az 1. példában ismertetett eljárás 1. ábrán ismertetett reakcióvázlatának egyes lépései az alábbi hozamokkal végezhetőek el:

1. lépés 84 %; 2. lépés 99 %; 3. lépés 91 %;
4. lépés 89 %; 5. lépés 91 %; 6. lépés 92,5 %;
1a lépés 91 %; 2a lépés 93 %.

A teljes reakciósor 56,7 %-os hozammal végezhető el.

2. példa

H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂ előállítására

A cím szerinti peptidet az 1. példában kapott acetát savaddíciós sóból jégecetben végrehajtott hidrogén-peroxidos oxidálással állítjuk elő. A hozam 100 %. A vizes oldatból liofilizált acetát savaddíciós só jellemző adatai a következők:

Rf: 0,40²; 0,68⁴;
[α]_D²⁵: +6,1° (c = 0,12, metanolban).

Az ezekben a példákban leírt peptidekkel analóg módon állítottuk elő a következő peptideket, melyek jellemző adatait is feltüntettük. A C-terminális származékokat a szokásnak megfelelően jelöltük, a következőképpen:

–NH ₂	amid
–NH ₂ Et	etil-amid
–OMe	metil-észter

A DL aminosavakat Colescott és munkatársai módszerével [J. A. C. S., 79, 4232 (1957)] állítottuk elő. Az egyes reakciókat feltüntettük az A reakcióvázlaton és a vegyületek számozása megfelel az ezen publikációban használtnak.

Mindegyik előállított DL aminosavat acetileztük és sertésvese-acilázsal rezolváltuk [Biochim. Biophys. Acta, 148, 414 (1967) és Helv. Chim. Acta, 59, 2181 (1976)]. A reakciót a B reakcióvázlaton szemléltettük.

Az L-aminosavakat terc-butil-oxi-karbonil származékaikká alakítottuk és a peptidkémiai általánosan alkalmazott módszerekkel beépítettük a peptidláncba. A módszer általános vázlata az 1. ábrán látható. A különböző összekapcsolási lépéseket vagy DCCI/HOBT reagenssel, vagy a vegyes anhidrid-eljárással hajtottuk végre.

Az L-(–)-pipekolinsav származékainak [L-(–)-hexahidropiridin-2-karbonsav] előállítását a 2. ábra szemlélteti. A pikolinsav pipekolinsavvá alakítása megtalálható: H., C. Beyerman Recueil, 78, 134 (1959). Az L-(–)-pipekolinsav jellemző adatai: op. 268 °C, [α]_D²⁰ –26,6° (c = 2,58, vízben). Az L-(–)-pipekolinsav átalakítása megtalálható a következő irodalmi helyen: E. Schanabel Liebig's Ann. Chem., 702, 188 (1967). Ez a publikáció az általános eljárást ismerteti, melynek alapján az L-(–)-pipekolinsavat BOC-L-(–)-pipekolinsavvá alakíthatjuk.

A β-homoprolin (pirrolidin-2-ecetsav) származékainak előállítását a 3. ábra szemlélteti. A BOC-L-prolint M. A. Ondetti és S. L. Engel: J. Med. Chem., 18, 761 (1975) szerint állítottuk elő. A BOC-L-homoprolint a fentebb leírt vegyes anhidrid-eljárással alakítjuk át BOC-L-homoPro-NH₂-dá, amelyből 1 n sósavval ecetsavban végzett reakcióval (a védőcsoport eltávolítása) L-homoPro-NH₂·HCl-t kapunk.

3. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-OH-HClRf: 0,44²; 0,46⁸;
[α]_D²⁵: -2,8° (c = 0,2, metanolban).

4. példa

H-Tyr-D-Met(O₂-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂HOOCCH₃Rf: 0,32²; 0,65³; 0,64⁴;
[α]_D²⁵: +6,3° (c = 0,2, metanolban).

5. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-Cl)-Pro-NH₂HClRf: 0,49²; 0,92³; 0,82⁴;
[α]_D²⁵: +10,0° (c = 0,2, metanolban).

6. példa

H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-Cl)-Pro-NH₂HClRf: 0,60⁴;
[α]_D²⁵: +11,6° (c = 0,1, metanolban).

7. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-NO₂)-D-Met-NH₂HOOCCH₃Rf: 0,53²; 0,56⁷;
[α]_D²⁵: +35,4° (c = 0,2, metanolban).

8. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-NO₂)-D-Pro-NH₂-HClRf: 0,49²; 0,55⁷; 0,54⁸;
[α]_D²⁵: +45,3° (c = 0,2, metanolban).

9. példa

H-Tyr-D-Met-(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-D-Pro-NH₂HOOCCH₃Rf: 0,52⁷;
[α]_D²⁵: +17,3° (c = 0,2, metanolban).

10. példa

H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-CF₃)-Pro-NH₂HClRf: 0,35²; 0,50⁷; 0,63⁸;
[α]_D²⁵: +6,43° (c = 0,4, metanolban).

11. példa

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe(4-CF₃)-Pro-NH₂-HCl5 Rf: 0,48²; 0,45⁷; 0,42⁸;
[α]_D²⁵: +4,1° (c = 0,4, metanolban).

A 3–11. példák termékeit az 1. és 2. példákban megadott hozammal nyerjük.

10

12. példa

H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

A kívánt termék előállításának vázlatát a 4. ábrán mutatjuk be.

20

1. BOC-D-Met-Gly-OMe
előállítása

25 28,38 g BOC-D-Met-DCHA-sót 150 ml etil-acetátban szuszpendálunk és 75 ml vízben oldott 13,5 g kálium-hidrogén-szulfáttal összekeverjük. A kapott elegyből a szerves fázist elkülönítjük, kétszer 60 ml vízzel mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, majd bepároljuk. A kapott olajos anyagot 90 ml THF-ban oldjuk, -25 °C-ra hűtjük és 6,66 g NMM-nal és 8,60 g izobutil-klór-formiáttal kezeljük. A reakcióelegyet -15 °C-on 2 percig keverjük, majd 90 ml DMF-ban lévő 7,53 g Gly-OMe-HCl és 6,06 g NMM előzetesen -25 °C-ra hűtött oldattal kezeljük. A reagáltatást 2 órán át -15 °C-on végezzük, majd a reakcióelegyet jégfürdőbe helyezzük, 72 ml 2 mol/l kálium-hidrogén-karbonát-oldatot adunk hozzá és 30 percig keverjük. Az elegyből ezután az oldószeret vákuumban eltávolítjuk és a visszamaradó anyagot 350 ml etil-acetát és 75 ml víz között megosztjuk. A szerves fázist kétszer 50 ml 5 %-os citromsavoldattal, kétszer 50 ml 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd kétszer 50 ml vízzel mossuk. Az extraktumot vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, majd bepároljuk. A kapott szilárd anyagot petroléterrel eldörzsöljük.

45 94 %-os hozammal 18,12 g terméket nyerünk. A termék 2, 7 és 8 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal is egyetlen foltot adott.

50

2. H-D-Met-Gly-OMe-HCl
előállítása

55 18,1 g BOC-D-Met-Gly-OMe-t 150 ml anizolban szuszpendálunk és 440 ml 1 mol/l hidrogén-klorid, ecetsav elegyet adunk hozzá. Az elegyet szobahőmérsékleten 30 percig keverjük, majd száraz éterrel kicsapjuk belőle a terméket, melyet ezután szűrünk és száraz éterrel mosunk. A kapott nyersterméket 450 ml vízben oldjuk, majd a maradék anizol eltávolítására éterrel kétszer mosunk. A vizes oldatot fagyaszttva szárítjuk, így módon 95 %-os hozammal 13,77 g terméket kapunk. A termék 2, 7 és 8 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal tisztának bizonyult.

65

3. BOC-Tyr-D-Met-Gly-OMe előállítása

16,59 g BOC-Tyr-t 80 ml THF-ban oldunk és az oldatot -25°C -ra hűtjük. 5,96 g NMM-t, majd 7,69 g izobutil-klór-formiátot adunk hozzá gyors keveréssel. Az elegyet 2 percig -15°C -on tartjuk, majd 13,77 g D-Met-Gly-OMe-HCl és 5,42 g NMM 80 ml DMF-ben készült, -15°C -ra előhűtött oldatát adjuk hozzá, majd az elegyet -15°C -on 2,5 órán át keverjük. Ezután az elegyet jég-fürdőbe helyezzük és 65 ml 2 mol/l kálium-hidrogén-karbonát-oldattal 30 percig kezeljük. Ezután az oldószereket vákuumban eltávolítjuk és a visszamaradó anyagot 360 ml etil-acetát és 70 ml víz elegyében oldjuk. A szerves fázist elkülönítjük és kétszer 50 ml 5 %-os citromsavval, kétszer 50 ml 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül kétszer 50 ml vízzel mossuk. Ezután az oldatot vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk és eltávolítjuk belőle az oldószert, majd a visszamaradó szilárd anyagot éterrel eldörzsöljük. Ily módon 81,6 %-os hozammal 21,16 g védett tripeptidet nyerünk, mely termék 2, 7 és 8 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal tisztának bizonyult.

4. BOC-Tyr-D-Met-Gly előállítása

21,1 g, az előző lépésben nyert védett tripeptidet 350 ml metanol és 150 ml víz elegyében oldunk és 55 ml 2 mol/l nátrium-hidroxiddal elszappanosítjuk. A reakció lefolyását 7 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás eljárással nyomon követve, 45 perc elteltével a reakciót befejezettnak találtuk. Ezután a metanolt vákuumban eltávolítjuk az elegyből, és a visszamaradó vizes oldatot jégbe hűtve 110 ml 1 mol/l hidrogén-klorid-oldattal semlegesítjük. A kiváló csapadékot kiszűrjük, néhányszor vízzel mossuk, majd foszfor-pentoxidon szárítjuk. 98 %-os hozammal 20,18 g terméket nyerünk. A termék 2, 7 és 8 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat során egyetlen foltot ad.

Elemzési eredmények a $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ képlet alapján:

Számított: C % = 53,73, H % = 6,61, N % = 8,96.
Talált: C % = 53,55, H % = 6,62, N % = 8,76.

5. BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly előállítása

5,48 g BOC-Tyr-D-Met-Gly-t 120 ml metanolban oldunk, majd 2 ekvivalens hidrogén-peroxiddal – ez 2,7 ml 29,4 %-os hidrogén-peroxid-oldatnak felel meg – kezeljük. A reakció lefolyását nagynyomású folyadék-kromatográfiás eljárással követjük nyomon. 20 perces szobahőmérsékleten végzett reagáltatás után az elegyet szárazra pároljuk, majd a visszamaradó anyagot éterrel eldörzsöljük. 96,5 %-os hozammal 5,46 g terméket nyerünk, mely $186\text{--}188^{\circ}\text{C}$ -on bomlás közben elvad.

Egyéb fizikai jellemzői:

$[\alpha]_{\text{D}}^{23,5} + 1,0^{\circ}$ (c = 1, DMF);
 $[\alpha]_{\text{D}}^{23,5} + 1,3^{\circ}$ (c = 1, DMF).

Elemzési eredmények a $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ képlet alapján:

Számított: C % = 51,96, H % = 6,39, N % = 8,66.
Talált: C % = 52,13, H % = 6,38, N % = 8,53.

6. BOC-Phe(4-NO₂)-Pro-OMe előállítása

31,0 g BOC-Phe(4-NO₂)-t 150 ml DMF-ban oldunk, 27,0 g HOBT-t adunk hozzá és az elegyet -5°C -ra hűtjük, majd 20,6 g DCCl-et adunk hozzá. A reakcióelegy hőmérsékletét 30 percig -5°C -on tartjuk, majd 16,55 g Pro-OMe-HCl és 10,1 g NMM 30 ml DMF-ban készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet 20 órán át 5°C hőmérsékleten keverjük, majd a DCU-t kiszűrjük belőle. A szűrletet vákuumban bepárolva olajos anyagot kapunk. Ezt az anyagot 1500 ml etil-acetátban oldjuk, majd kétszer 250 ml 5 %-os citromsavoldattal, kétszer 250 ml nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd kétszer 250 ml félig telített nátrium-klorid-oldattal mossuk. Ezután a szerves fázist szárítjuk, majd 500 ml-re bepároljuk. A reakcióelegyből a DCU-t kiszűrjük és a szűrletet bepároljuk. Ily módon gumiszzerű anyagot kapunk, melyet fizikai adatokkal nem jellemeztünk.

7. H-Phe(4-NO₂)-Pro-OMe-HCl előállítása

21,41 g védett dipeptidet 300 ml etil-acetátban oldunk és az oldatot 0°C -ra hűtjük. Ezután a hőmérsékletet változtatlanul 0°C -on tartva 45 percen át száraz hidrogén-klorid-gázt vezetünk az oldatba. Ezt követően az oldatot 50 ml-re bepároljuk és 300 ml száraz éterrel meghígítjuk. Az elegyet hűtőszekrényben hűtjük, majd a csapadékot kiszűrjük, száraz éterrel gondosan átmossuk, majd foszfor-pentoxid és nátrium-hidroxid felett szárítjuk. 85 %-os hozammal 15,65 g terméket nyerünk.

A termék fizikai jellemzői:

Olvadáspont: $145\text{--}148^{\circ}\text{C}$.
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25,5} -15,7^{\circ}$ (c = 1, MeOH).
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25,5} -17,6^{\circ}$ (c = MeOH).

Elemzési eredmények a $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cl}$ képlet alapján:

Számított: C % = 50,35, H % = 5,59, N % = 11,75.
Talált: C % = 50,03, H % = 5,81, N % = 11,45.

8. BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-OMe előállítása

1,0 g BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly 30 ml DMF-ban készült oldatát -5°C -ra hűtjük, majd 0,56 g HOBT-lal és 0,42 g DCCl-el kezeljük. Az elegyet -5°C -on 40 percig keverjük, majd 0,74 g Phe(4-NO₂)-Pro-OMe-HCl és 0,21 g NMM 5 ml DMF-ban készült oldatát adjuk hozzá és a kondenzálási reakciót 5°C hőmérsékleten 20 órán át végzzük. Ezután a DCU-t kiszűrjük az elegyből és a szűrletet vákuumban bepároljuk. A kapott nyerterméket 100 ml etil-acetát és 20 ml víz között megosztjuk. A szer-

ves fázist elkülönítjük, majd kétszer 20 ml 5 %-os citromsavoldattal, kétszer 20 ml nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül kétszer 20 ml vízzel mossuk. Ezután az oldatot vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, majd bepároljuk. A kapott amorf szilárd anyagot éterrel eldörzsölve 62 %-os hozammal 1,0 g terméket kapunk. A termék a 2 jelölésű oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat szerint kevés DCU-t is tartalmaz. A terméket nem tisztítjuk tovább.

9. BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

1,0 g minden funkciós csoportján védett pentapeptidet 150 ml metanolban oldunk, az oldatot sózott jégben lehűtjük és ammóniával telítjük. A lombikot lezárjuk, és az elegyet 6 napon át szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Ezután az ammóniát és a metanolt gondosan eltávolítjuk, majd a terméket etil-acetát, éter elegyből kinyerjük. 83 %-os hozammal 0,81 g terméket nyerünk. A termék 2, 7 és 8 oldószerrendszerben végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat szerint DCU-t és kevés kiindulási anyagot tartalmaz. Ezt az anyagot további tisztítás nélkül visszük a következő reakciólépésbe.

10. H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

0,81 g BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂-t 14 ml anizolban szuszpendálunk és 80 ml 1 mol/l hidrogén-klorid-oldat, ecetsav eleggyel kezeljük. A reagáltatást szobahőmérsékleten 45 percen át folytatjuk, majd a reakcióelegyet szárazra pároljuk és a visszamaradó anyagot éterrel eldörzsöljük. A kapott nyers-terméket 2,5×25 cm-es oszlopba töltött karboxi-metil-cellulóz gyantán ioncserélő kromatográfiás eljárással tisztítjuk. A lineáris gradiens eluálást pH 5,1-es 0,005–0,2 mol/l ammónium-acetáttal végezzük. 0,33 g terméket nyerünk, mely mind vékonyréteg-kromatográfiás, mind nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással vizsgálva tisztának bizonyul.

Elemzési eredmények
a C₃₀H₃₉N₇O₉S·CH₃CO₂H·H₂O képlet alapján:

Számított: C % = 51,13, H % = 6,00, N % = 13,05.
Talált: C % = 50,83, H % = 6,06, N % = 12,91.

13. példa

H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

A kívánt termék előállításának vázlatát az 5. ábrán mutatjuk be. A 12. példa 5. reakciólépésében előállított BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-t és a 6. lépésben előállított BOC-Phe(4-NO₂)-Pro-OMe-t a következő eljárással alakítjuk a kívánt terméké.

11. BOC-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

22,9 g, a 6. reakciólépés szerint előállított BOC-Phe(4-NO₂)-Pro-OMe-t 250 ml metanolban oldunk, és az

oldatot jégbe hűtjük, majd ammóniát buborékolatunk át rajta, míg telítette nem válik. Ezután a lombikot lezárjuk és szobahőmérsékleten 7 napig állni hagyjuk. A reakcióelegyet ezután vákuumban bepároljuk, és az így kapott nyers-terméket etil-acetátból kristályosítjuk. A kapott termék mind vékonyréteg-kromatográfiás, mind nagynyomású folyadékkromatográfiás vizsgálat alapján tisztának bizonyult.

A termék fizikai jellemzői:

Olvadáspont: 176–178,5 °C;
[α]_D²⁵ –29,4° (c = MeOH);
[α]_D²⁵ –35,7° (c = 1, MeOH).

Elemzési eredmények
a C₁₉H₂₆N₄O₆ képlet alapján:

Számított: C % = 56,16, H % = 6,40, N % = 13,79.
Talált: C % = 55,60, H % = 6,33, N % = 14,04.

12. H-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂-HCl
előállítás

8,0 g BOC-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂-t 20 ml metanol, 40 ml izopropil-alkohol és 375 ml etil-acetát elegyében oldunk. Az oldatot jégbe hűtjük, majd hőmérsékletét 15 °C-on tartva 1 órán át száraz hidrogén-klorid-gázt buborékolatunk át rajta. Ezután a reakcióelegyet nitrogéngázt vezetünk 5 percen át, majd az elegyet 450 ml száraz éterrel meghígítjuk. A kapott terméket kiszűrjük, éterrel gondosan kimossuk, majd vákuumban, foszfor-pentoxid és nátrium-hidroxid fölött szárítjuk. 93 %-os hozammal 6,28 g terméket nyerünk.

A termék fizikai jellemzői:

Olvadáspont: 156–159 °C;
[α]_D^{24,5} –13,5° (c = 1, MeOH);
[α]_D^{24,5} –15,3° (c = 1, MeOH).

13. BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

1,0 g, az 5. reakciólépés szerint előállított BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-t 20 ml DMF-ban oldunk, és az oldatot –25 °C-ra hűtjük, majd erőteljes keverés közben, a hőmérsékletet –15 °C-on tartva 2 perc alatt 0,21 g NMM-t és 0,28 g izobutil-klór-formiátot adunk hozzá. Ezután 0,71 g Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂-HCl és 0,33 g NMM előzetesen –25 °C-ra lehűtött oldatát adjuk az elegyhez, és –15 °C-on 2,5 órán át keverjük. Ezt követően a reakcióelegyet jégfürdőbe visszük át és 2,5 ml 2 mol/l kálium-hidrogén-karbonáttal 30 percig kezeljük. Az oldószerket vákuumban eltávolítjuk, és a visszamaradó anyagot 270 ml etil-acetát és 40 ml víz között megosztjuk. A szerves fázist elkülönítjük és kétszer 40 ml 5 %-os citromsav-oldattal, kétszer 40 ml 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül kétszer 40 ml vízzel mossuk. Az extraktumot szárítjuk, szárazra pároljuk, majd a maradékot éterrel eldörzsöljük. 35 %-os hozammal 0,56 g terméket nyerünk. Az így kapott anyagot további tisztítás nélkül visszük a következő reakciólépésbe.

14. H-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂
előállítás

0,56 g BOC-Tyr-D-Met(O)-Gly-Phe(4-NO₂)-Pro-NH₂ védőcsoportjait 56 ml 1 mol/l hidrogén-klorid-oldat, ecetsav elegyben 20 ml anizol jelenlétében eltávolítjuk. A reakcióelegyet 30 percig szobahőmérsékleten tartjuk, majd a reagenseket vákuumban eltávolítjuk belőle, és a visszamaradó anyagot éterrel eldörzsöljük. Az így kapott nyersanyagot 2,5 × 25 cm-es, karboxi-metil-cellulózzal töltött oszlopon kromatografáljuk, eluensként pH = 5,1-es lineáris gradiens szerint 0,005 mol/l-ről 0,02 mol/l-re növekvő ammónium-acetát-oldatot alkalmazunk. A részben tisztított peptidet karboxi-metil-cellulózzal töltött 2,5 × 50 cm-es oszlopra visszük, melyről pH = 5,1-es, lineáris gradiens szerint 0,005 mol/l-ről 0,1 mol/l-re növekvő koncentrációjú ammónium-acetát-oldattal eluáljuk. Az eluátumból az illékony puffert ismételt fagyaszttva szárítással eltávolítjuk. Így módon 91 %-os hozammal 50 mg tiszta peptidet nyerünk. A peptid tisztaságát vékonyréteg-kromatográfián a 2, 7 és 8 oldószerrendszerben, valamint nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással ellenőrizzük.

Elemzési eredmények
a C₃₀H₃₉N₇O₉S·CH₃CO₂H·2,5H₂O
képlet alapján:

Számított: C % = 50,52, H % = 6,05, N % = 12,89.
Talált: C % = 50,59, H % = 5,96, N % = 12,97.

14. példa

0,108 g, az 1. példa szerinti eljárással előállított acetát-hoz 1,506 ml (1 ekvivalens) 0,1 n vizes nátrium-hidroxid-oldatot, majd 10 ml metanolt adunk. A szabad bázist tartalmazó oldat optikai forgatóképessége:

$[\alpha]_D^{21} + 19,34^\circ$;
 $[\alpha]_{546}^{21} + 23,60^\circ$.

15. példa

0,1095 g, a 2. példa szerinti eljárással előállított acetát-trihidráthoz 1,391 ml (1 ekvivalens) 0,1 n vizes nátrium-hidroxid-oldatot, majd 10 ml metanolt adunk. A szabad bázist tartalmazó oldat optikai forgatóképessége:

$[\alpha]_D^{21} + 17,34^\circ$;
 $[\alpha]_{546}^{21} + 25,28^\circ$.

16. példa

Farmakológiai vizsgálatok

Az előző példákban előállított peptidok alább leírt biológiai aktivitását ismert farmakológiai módszerekkel határoztuk meg.

A) Analgetikus hatás egereken „hot plate” teszt során. A peptidet intracerebroventrikuláris injekció formájában alkalmaztuk.

B) Antidiarrhoeás hatás patkányokon. A patkányokat 24 órán keresztül éhezettük, ezután a peptidet szubkután vagy orálisan beadtuk, és 15 perc múlva orálisan 1 ml ricinusolajat adtunk nekik.

C) Köhögéscsillapító hatás tengerimalacokon. A tengerimalacoknak orálisan vagy szubkután beadjuk a peptidet, majd 30 perc múlva 20 % citromsavat tartalmazó aeroszollal kezeljük őket. A köhögések számát egy öt-perces időtartam alatt figyeljük, és kiszámítjuk 6 állatra.

D) Analgetikus hatás egereken rángógörcsvizsgálat során. A peptidet orálisan alkalmaztuk.

Az A), C) és D) alatt leírt vizsgálatokat az ezen vizsgálatokra korábban leírt módszerek szerint végeztük, és leírásuk is ugyanazon irodalmi helyeken található meg.

A kapott adatokból kiszámítottuk a megfelelő ED₅₀ értékeket. NV jelentése nem vizsgált. Az eredmények az 1. táblázatban láthatók.

17. példa

Gyógyászati készítmények előállítása

A) Formulázás tabletták formájában (20 mg/tabletta hatóanyagú tabletták):

(I) általános képletű vegyület	20 mg
laktóz	76 mg
kukoricakeményítő	10 mg
zselatin	2 mg
magnézium-sztearát	2 mg

Az (I) általános képletű vegyületet, a laktózt és a kukoricakeményítőt összekeverjük. A zselatin vizes oldatával granuláljuk. A granulátumokat megszáritjuk, hozzáadjuk a magnézium-sztearátot és tablettákká préseljük. 110 mg-os tablettákat kapunk.

B) Formulázás szuppozitóriumok alakjában (5 mg hatóanyag-tartalmú szuppozitóriumok):

(I) általános képletű vegyület	250 mg
szuppozitóriumbázis (Eszterinum C)	100 g-ig

A szuppozitóriumbázist 40 °C-on megolvasszjuk. Fokozatosan hozzáadjuk a finom por formájú (I) vegyületet, és homogénre keverjük. Megfelelő formákba öntjük (2 g/forma) és állni hagyjuk.

Az Eszterinum C kereskedelemben kapható szuppozitóriumbázis, mely telített növényi zsírsavak mono-, di- és trigliceridjeinek elegyéből áll. Gyártja a Henkel International, Düsseldorf.

C) Pesszárium (5 mg hatóanyag-tartalommal):

(I) általános képletű vegyület	5 mg
laktóz	400 mg
povidon	5 mg
magnézium-sztearát	5 mg

Összekeverjük a peptidet és a laktózt. Granuláljuk a povidon 50 %-os vizes etanollal készített oldatával. A granulátumokat megszáritjuk, hozzáadjuk a magnézium-sztearátot és megfelelő alakúra préseljük. 415 mg-os pesszáriumokat kapunk.

C) Fagyaszttva szárított injekció (100 mg/ampulla):

(I) általános képletű vegyület	100 mg
steril víz	2,0 ml-ig

A peptidet feloldjuk a steril vízben. Az oldatot 0,2 µm pórusméretű szűrőn átengedve sterilizáljuk, a szűrletet steril edénybe gyűjtjük. Aszeptikus körülmények közt steril üvegampullákba töltjük (2 ml/ampulla) és fagyaszti-va szárítjuk. Az ampullákat steril gumisapkával és alu-míniumfedővel zárjuk le.

Az injekcióhoz beadás előtt a megfelelő mennyiségű steril vizet vagy steril konyhasóoldatot adunk, ezzel újra oldatba visszük.

A peptid mennyiségét valamennyi példában bázisra számítva adtuk meg.

letben Y₂ jelentése az (I) általános képletű pentapeptid-származéknak az N-terminális részhez kapcsolódó, aminosavgyök(ök)ből álló szekvenciája – reagáltatunk, és adott esetben a védőcsoportokat ismert módon eltávolítjuk, vagy

b) olyan (I) általános képletű pentapeptidszármazékok előállítására, amelyek képletében R₂ jelentése –NH₂-csoport, X₃, X₄, X₆ és X₇ jelentése a megadott, egy (I) általános képletű védett pentapeptidszármazékot – a képletben R₂ jelentése –OH képletű csoport – ammóniával kezelünk, majd a védőcsoportot eltávolítjuk, vagy

1. táblázat

Farmakológiai hatás – vizsgálati eredmények

Példa	ED ₅₀ értékek				
	Analgetikus hatás, µg/egér i. c. v.	Antidiarrhoeás hatás, mg/kg (patkány) s. c.		Köhögéscsillapító hatás (tengerimalac) mg/kg	Analgetikus hatás – rángógörcs (egér) mg/kg
1.	0,007	0,05	2	0,7 p. o.	35 p. o.
2.	0,005	0,02	0,05	0,7 p. o. 0,02 s. c.	2 p. o.
3.	0,07	0,2	10-nél nincs	NV	NV
4.	0,00008	0,05	0,3	3 p. o.	NV
5.	0,005	0,2	10	NV	NV
6.	0,0008	0,02	1	>10 p. o.	NV
7.	0,005	1	>10	>10 p. o.	NV
8.	0,003	0,02	0,2	<10 p. o.	NV
9.	0,003	0,02	0,1	10 p. o.	3 p. o.
10.	0,003	0,03	2	3 p. o.-nál nincs	NV
11.	0,07	0,1	8	NV	NV

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az (I) általános képletű pentapeptidszármazékok, valamint savaddíciós sóik előállítására – a képletben

X₃ jelentése L-tirozil-csoport,

X₄ jelentése D-metionil-, D-metionil-szulfoxid- vagy D-metionil-szulfon-csoport,

X₆ jelentése L-(4-halogén-fenil)-alanil-, K-(4-trifluor-metil-fenil)-alanil- vagy L-(4-nitro-fenil)-alanil-csoport,

X₇ jelentése L-prolil-, D-prolil- vagy D-metionil-csoport,

R₂ jelentése –NH₂ vagy –OH képletű csoport,

azzal jellemezve, hogy

a) egy H–Y₁–OH általános képletű, adott esetben ismert módon védett és/vagy aktivált vegyületet – a képletben Y₁ jelentése az (I) általános képletű pentapeptid-származék aminosavgyök(ök)ből álló N-terminális szekvenciája – egy H–Y₂R₂ általános képletű, adott esetben ismert módon védett és/vagy aktivált vegyülettel – a ké-

40 c) olyan (I) általános képletű pentapeptidszármazékok előállítására, amelyek képletében X₄ jelentése D-metionil-szulfoxid-csoport, X₃, X₆, X₇ és R₂ jelentése a tárgyi körben megadott, egy (I) általános képletű pentapeptid-származék savaddíciós sóját – a képletben X₄ jelentése D-metionil-csoport – szelektíven oxidáljuk,

45

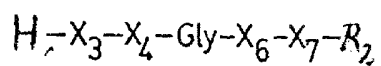
és adott esetben az a)–c) eljárások bármelyikével kapott nyersterméket ismert eljárással tisztítjuk és kívánt esetben a terméket bázissá vagy savaddíciós sóvá alakítjuk.

50

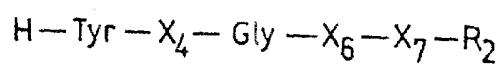
2. Eljárás hatóanyagként az (I) általános képletű – a képletben a helyettesítők jelentése az 1. igénypontban megadott – pentapeptidszármazékokat vagy gyógyászati célra alkalmas savaddíciós sóikat tartalmazó gyógyszer-készítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, az 1. igénypont szerint előállított (I) általános képletű pentapeptidszármazékot vagy annak savaddíciós sóját a gyógyszerhatóanyag hordozó- és/vagy segédanyagokkal keverünk össze és a keveréket gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

55

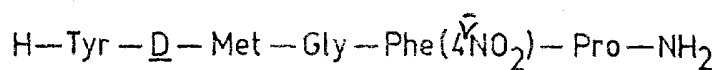
60



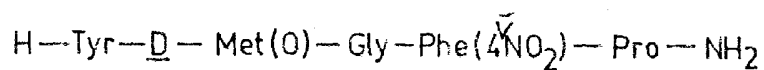
(I)



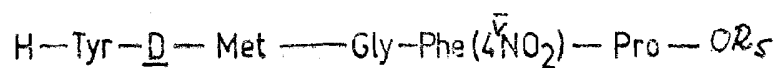
(V)



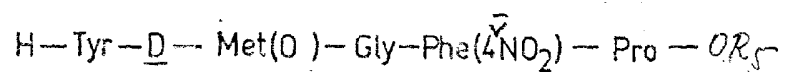
(II)



(III)

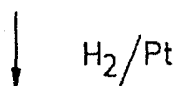


(IV)

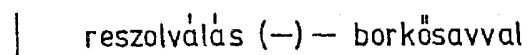


(VI)

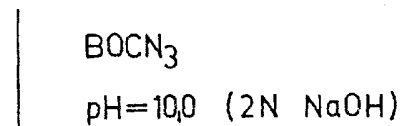
Pikolinsav



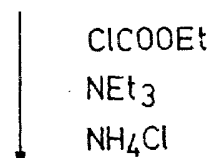
Pipekolinsav



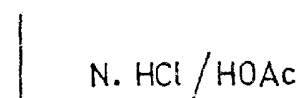
L-(-)-pipekolinsav



BOC-L-(-)-pipekolinsav

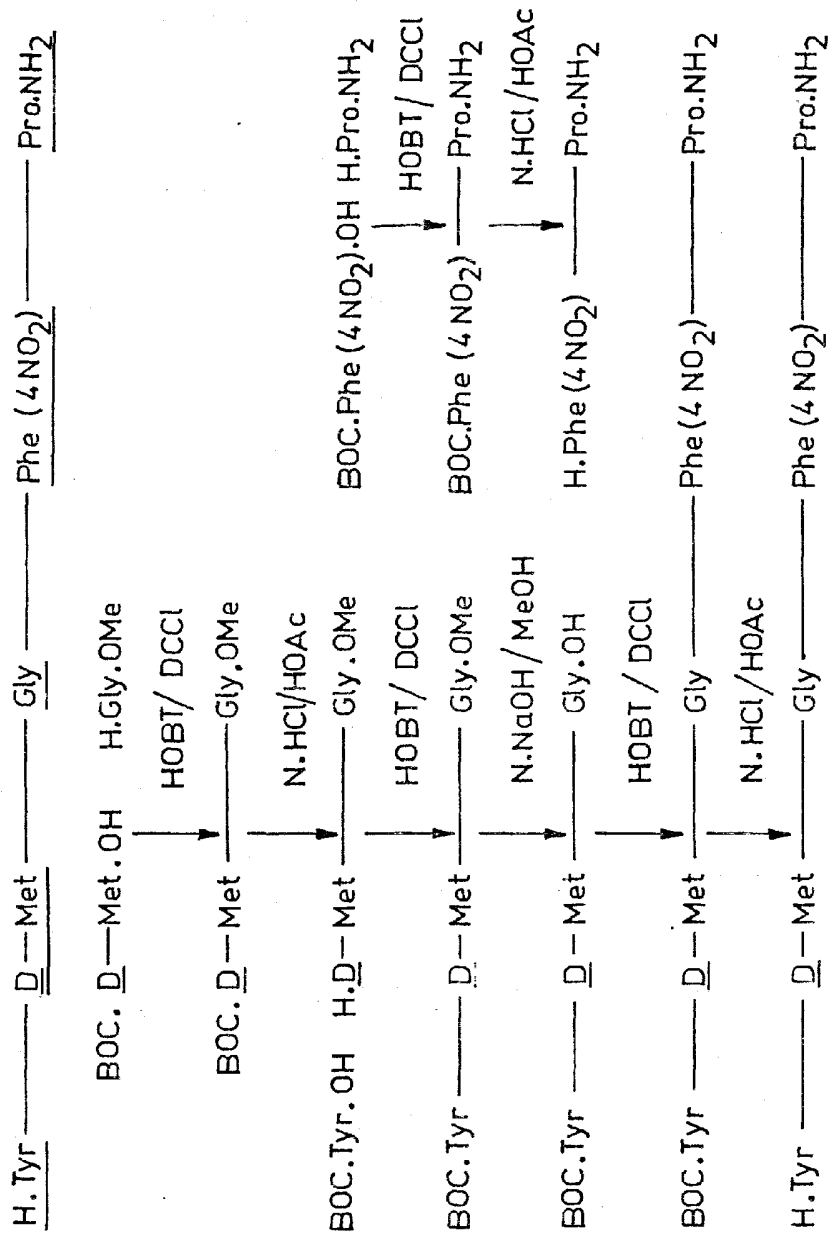


BOC-L-(-)-pipekolinsavamid



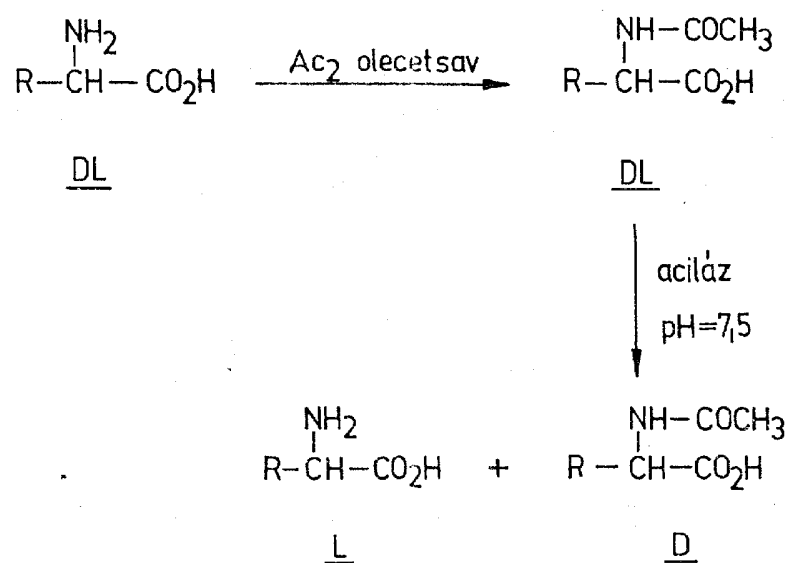
L-(-)-pipekolinsavamid - hidroklorid

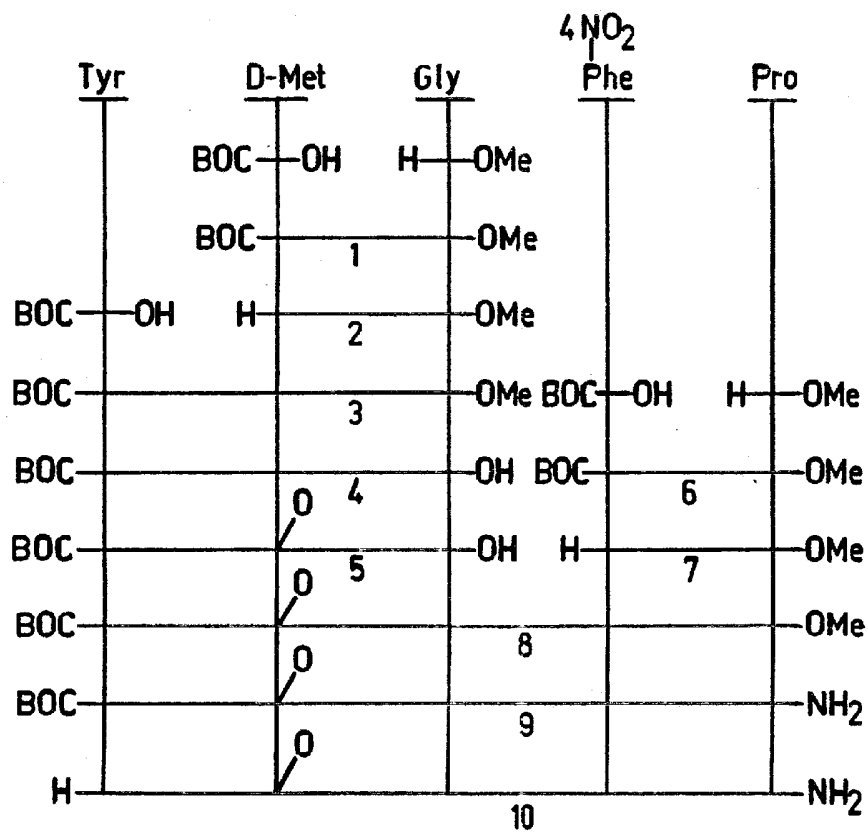
2. ábra



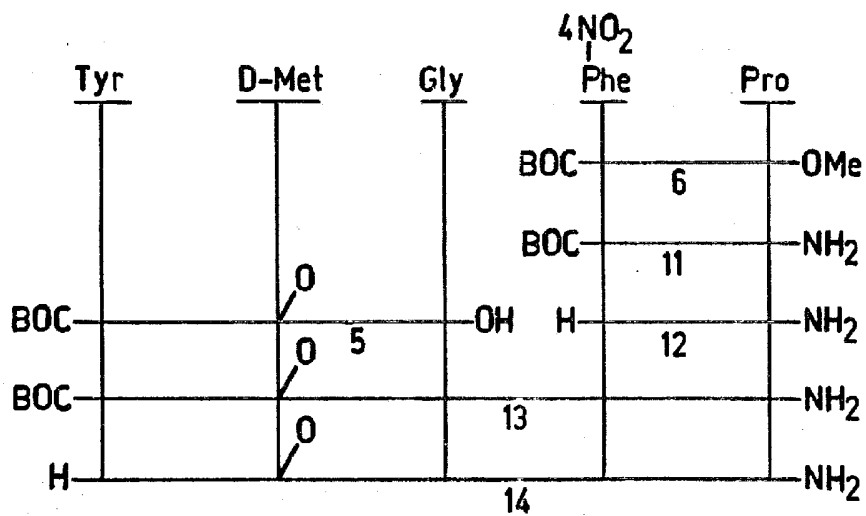
3. ábra

B reakcióvázlat





4. ábra



5. ábra

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

COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet
