

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) 185 263

A bejelentés napja: (22) 81. 06. 12.

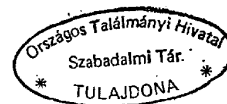
(21) 1755/81

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₃

C 07 C 103/52

A közzététel napja: (41) (42) 84. 01. 28.

Megjelent: (45) 87. 10. 20.



Feltaláló(k): (72)

dr. KISFALUDY Lajos, okl. vegyészmérnök, 17%, NYÉKI Györgyné, okl. vegyész,
17%, dr. SCHÖN István, okl. vegyész, 16%, dr. DÉNES László, gyógyszerész, 15%,
dr. EMBER Júlia, biológus, 15%, dr. HAJÓS György, gyógyszerész, 7%, dr.
SZPORNÝ László, orvos, 7%, dr. SZENDE Béla, orvos, 6%, Budapest

Szabadalmaz: (73)

Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapest

(54)

ELJÁRÁS AZ IMMUNSZABÁLYOZÁST BEFOLYÁSOLÓ, TP5-ANALÓG PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képlettű, az immunszabályozást befolyásoló új peptidek

X-L-arginil-L-lizil-Y (I)

– ahol X hidrogénatomot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin-, L-aszparaginil-L-valin-, L-aminoszukcinil-L-valin-, L-alanil-L-valin-, L-aszparagil-L-alanin-, L-glutamil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-izoleucin-csoportot vagy pedig X L-piroglutamils csoportot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-valil-L-tirozin-csoportot képvisel – valamint sóik, amidjaik és rövidszénláncú alkilészterek, valamint az arginils csoport guanidinocsoportján nitro-, a lizil-csoport ε-aminocsoportján és az N-terminális aminocsoporton benziloxikarbonil- és a C-terminális karboxilcsoporton adott esetben benziloxi- vagy 4-nitro-benziloxi-védőcsoportot, továbbá az adott esetben jelen levő aszparagil- és/vagy glutamilcsoport láncvégi karboxilcsoportján benziloxi- és a tirozin fenolos hidroxilcsoportján benzil-védőcsoportot tartalmazó védett származékaik előállítására oly módon, hogy a peptidlánc tagjait a C-terminális aminosavból, illetőleg annak amidjából, rövidszénláncú alkilészteréből vagy N-védett származékából kiindulva lépésenkénti acilezéssel kondenzáljuk, célszerűen az aktív-észteres és/vagy vegyes anhidrides acilezési módszer alkalmazásával és kívánt esetben a védőcsoportot tartalmazó peptidtermékről a védőcsoportot lehasítjuk és a só alakjában kapott peptidből a bázist felszabadítjuk és/vagy kívánt esetben a kapott terméket valamely gyógyszeralkalmazható sóvá alakítjuk.

A találmány tárgya eljárás az immunszabályozást befolyásoló új peptidek előállítására.

Az utóbbi években végzett vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a timuszhormonok közvetlenül részt vesznek a T-limfocitafüggő immunológiai egyensúlyt szabályozó folyamatokban. Feltehetően a fiatal T-sejteket érett, differenciálódott sejtekké alakítják, melyek viszont központi szerepet játszanak a sejtközvetített immunitásban és az immunválaszok különböző típusainak szabályozásában. A timuszhormonok nemcsak a timusban, hanem ezen kívül is hatnak, és szerepet játszanak a citotikus, szupresszor és helper sejtek kialakulásában. A timuszkivonatokkal immundeficiens és rákos betegeken végzett előzetes klinikai vizsgálatok eredményei további lendületet adtak a kutatásnak. A módszerek fejlődésével megállapították továbbá, hogy a szérum timuszsztintje csökkent például Di-George-szindrómában, IgA-hiányban és az általános bőrtuberkulózisban, viszont nőtt rheumatoid arthritisben szenvedőknél. Kézenfekvő tehát az elképzelés, hogy a hormonszint szabályozásával ezek a betegségek is kedvező irányban lesznek befolyásolhatóak (E. Arrigoni-Martelli: *Drugs of Today* 16, 203 [1980]).

Ma már több timuszhormont sikerült egységes állapotban izolálni, szerkezetüket felderíteni, sőt szintetizálni is. Ezek közé tartozik a 49 aminosavból felépülő timopoietin (Goldstein és munkatársai: *Nature* 247, 11 [1974]; Goldstein és munkatársai: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 249, 177 [1975]; 4 002 740 és 4 071 949 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A természetes, majd a szintetikus termékkel (Fujino és munkatársai: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 1486 [1977]; Bliznakov és munkatársai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 631 [1978]) egyértelműen igazolni lehetett in vitro és in vivo a timopoietinnek a T-sejtek differenciálódását indukáló hatását.

Míthogy a természetes forrásból származó anyag nem elegendő a szükségletek fedezésére, a szintetikus terméknek viszont a magas ára gátolja a gyakorlati alkalmazást, azonnal megindult a kutatás a timopoietin aktív centrumának földerítésére. Először egy tridecapeptidről, a timopoietin-(24-41)-ről (Schlesinger és munkatársai: *Cell* 5, 631 [1978]) majd a TP5-nek elnevezett pentapeptidről, a timopoietin-(32-36)-ról állapították meg, hogy rendelkezik a teljes hormon valamennyi biológiai tulajdonságával (Goldstein és munkatársai: *Science* 204, 1309 [1979]; 4 190 646 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Újabban leírták a TP5 egyes fragmenseit és analógjait is, de ezek a vizsgált rendszerben nem voltak hatékonyak (Abiko és munkatársai: *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2507 [1980]).

Azt találtuk, hogy ha a TP5 láncrövidítését nem az N-terminális részből kezdjük, ahogyan ezt a japán kutatók tették (Abiko és munkatársai: *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2507 [1980]), hanem a C-terminális részből, akkor a H-Arg-Lys-Asp-Val-OH tetrapeptid, sőt a H-Arg-Lys-Asp-OH tripeptid is aktívnak bizonyul, növeli az E-rozettát képző limfociták számát. A jelen találmány a fenti tetra- és tripeptidnek, valamint ezen néhány analógjának szintézisére

vonatkozik. Az analógok között meglepő módon találtunk olyan származékokat is, amelyek ellentétes biológiai hatást mutattak. Ezzel elsőnek szolgáltatunk példát arra, hogy immunválaszt indukáló és gátló hatás igen közeli szerkezeti elemekkel kapcsolatos. Valamennyi előállított vegyület új termék.

A találmány szerinti vegyületek szintézisét oldatban, a lépésenkénti felépítés elvét követve, ismert peptidkémiai módszerekkel végeztük. A szintézis során olyan védőcsoportkombinációt alkalmaztunk, amely lehetővé teszi a szelektív eltávolítást és a védett peptidről a védőcsoportok lehetőleg egy lépésben való eltávolítását. A peptidkötés kialakítására a legtöbb esetben az általunk kidolgozott pentafluor-fenil-észteres eljárást alkalmaztuk (Kisfaludy és munkatársai: 168 431 sz. magyar szabadalmi leírás; Kisfaludy és munkatársai: *Tetrahedron Letters* 1785 [1974]).

A találmány tehát eljárás az immunszabályozást befolyásoló (I) általános képletű peptidek

X-L-arginil-L-lizil-Y (I)

– ahol X hidrogénatomot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin-, L-aszparaginil-L-valin-, L-2-aminoszukcinil-L-valin-, L-alanil-L-valin-, L-aszparagil-L-alanin-, L-glutamil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-izoleucin-csoportot vagy pedig X L-pirolglutamilcsoportot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-valil-L-tirozin-csoportot képvisel – valamint sóik, amidjaik és rövidszénláncú alkilészterek, valamint az arginilcsoport guanidinocsoportján nitro-, a lizilcsoport α -aminocsoportján és az N-terminális aminocsoporton benziloxikarbonil- és a C-terminális karboxilcsoporton adott esetben benziloxi- vagy 4-nitro-benziloxi-védőcsoportot, továbbá az adott esetben jelen levő aszparagil- és/vagy glutamilcsoport láncvégi karboxilcsoportján benziloxi- és a tirozin fenolos hidroxilcsoportján benzil-védőcsoportot tartalmazó védett származékaik előállítására, amelynek során a peptidlánc tagjait a C-terminális aminosavból, illetőleg annak amidjából, rövidszénláncú alkilészteréből vagy N-védett származékából kiindulva lépésenkénti acilezéssel kondenzáljuk, célszerűen az aktiv-észteres és/vagy vegyes anhidrides acilezési módszer alkalmazásával és kívánt esetben a védőcsoportot tartalmazó peptidtermékről a védőcsoportot lehasítjuk és a só alakjában kapott peptidből a bázist felszabadítjuk és/vagy kívánt esetben a kapott terméket valamely gyógyászati alkalmas sósó alakítjuk.

Az eljárás egy különösen előnyös megvalósítási módját a H-Arg-Lys-Asp-Val-OH tetrapeptid szintézise szemlélteti. L-Valin-p-nitro-benzil-észtert N-tercier-butil-oxi-karbonil-L-aszparaginsav-béta-benzil-észter-alfa-pentafluor-fenilészterrel acilezzük, a kapott védett dipeptidről szelektíven eltávolítjuk a terciér-butil-oxi-karbonil-csoportot, majd a szabad dipeptidet N-alfa-tercier-butil-oxi-karbonil-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-L-lizin-pentafluor-fenilészterrel acilezzük. A védett tripeptid trifluor-ecetsavas kezelése az N-terminálison szabad tripeptidet eredményez, amelyet N-benzil-oxi-karbonil-G-nitro-L-arginin-pentafluor-fenil-észterrel acilezzük. Az így kapott védett tetrapeptid valamennyi védőcsoportja egy lépésben eltávolít-

ható katalitikus hidrogenolízissal. A kapott szabad peptidek az esetek többségében nem igényelnek további tisztítást. Egyes esetekben szilikagél-oszlopkromatográfiás módszert is alkalmazhatunk a szabad peptidek tisztítására. Ilyenkor a végterméket egyszerű bepárlással vagy liofilizációval kapjuk meg. A kapott peptidek tetszőleges sóvá alakíthatók.

A találmány szerinti új peptidek, valamint azok amidjai, észterei és gyógyászati szempontból elfogadható sói – amint ez az alábbi biológiai vizsgálati adatokból is kitűnik – az immunszabályozást eredményesen befolyásoló gyógyszer-hatóanyagok. E peptideknek a fentebb felsorolt védőcsoportokat tartalmazó védett származékai gyógyászati alkalmazásra önmagukban nem jönnek tekintetbe, de értékes közbelső termékek gyógyhatású peptidek előállítására.

A találmány szerinti eljárással készült peptidek biológiai vizsgálatát az alábbi módszerekkel végeztük.

I. In vitro módszer: az aktív E-rozetta vizsgálatot Wybran és munkatársai módosított módszere szerint (Wybran és munkatársai: New Engl. J. Med. 292, 475 [1975]) végeztük részben egészséges, részben autoimmun betegek (rheumatoid arthritis és szisztémás lupus erythematosus) limfocitáival. 50 μ l limfocita-sejtszuszpenzióhoz 100 μ l külön-külön hígított 10^{-3} – 10^{-11} mól/l koncentrációjú vizsgálati anyagot adtunk, majd az elegyet 60 percig 5,0% szén-dioxid-tartalmú levegőben 37 °C-on inkubáltuk. Ezután hozzáadtunk 50 μ l 1%-os birka-vörösvértest szuszpenziót, és percenként 1000 fordulat-számmal 10 percig centrifugáltuk, majd a módosított Gallenkampf-rázógépre helyeztük (rázási idő: 30 mp, lökethossz: 8 cm, rázási frekvencia: percenként 65). Ezután a rozettákat 0,1%-os glutáraldehiddel rögzítettük (csővenként 50 μ l 3 perc). Mikroszkóp alatt megszámloltuk a három birka-vörösvértestnél többet megkötő limfocitákat, és négyszer 100 sejtet értékeltünk. A szeparált limfociták szennyezésként makrofágokat és polimorfonukleáris sejteket (maximálisan 10%-ot) tartalmaznak. Ezzel az értékkel a rozettát képző sejtek számát

minden esetben korrigáltuk. Az eredményeket az 1. és 2. táblázatban foglaltuk össze.

II. In vivo módszer:

(1) Az antitest-termelésre gyakorolt hatás vizsgálatát Ceglowski módszere szerint végeztük (Ceglowski: Ann. N. Y. Acad. Sci. 249, 343 [1975]). Újszülött H. Wistar patkányokat a születés után legfeljebb a 12. órában i. p. egyszeri 25 μ l $4 \cdot 10^{-3}$ – $4 \cdot 10^{-7}$ mól/l töménységű vizsgálati anyaggal (dózisonként 9–9 állatot) kezeltünk. Ezután az állatokat 14 napos korukban birka-vörösvértest szuszpenzióval immunizáltuk (állatonként 0,5 ml 5%-os birka-vörösvértest szuszpenzió i. p.), és az immunizálást követő 7. napon az állatokat dekapi-tulációval elvéreztettük. 3–3 állat vérért összekevertük, és az ebből nyert savókból (percenként 3000 fordulattal történő, 10 perces centrifugálás után) meghatároztuk az antitest-titeret Takátsy módszerével (Takátsy: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 3, 191 [1955]). Az eredményeket agglutinációs titerben fejeztük ki. Titernek fogadtuk el azt a legnagyobb savóhígítást, amelynél még észlelhető az agglutináció. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

(2) A specifikus ellenanyagot termelő sejtek számának meghatározását Canningham módszere (Handbook of Experimental Immunology [szerkesztő: D. M. Weir] 2. kötet, 285. oldal, Blackwell, Oxford–London [1978]) szerint végeztük. A módszer lényege, hogy immunizált állatok lépsejtjeivel, birka-vörösvértest szuszpenzióval és komplementtel homogén szuszpenziót készítettünk és egysejt-reteg kialakítására alkalmas kamrába helyeztük. Az ellenanyagot termelő lépsejtek körül lítikus udvarok képződnek, melyek száma azonos a specifikus ellenanyagot termelő sejtek (plaque forming cells, PFC) számával.

A kísérleti állatok legkésőbb 12 órával a születés után egyszeri i. p. kezelést kaptak a vizsgálandó anyagokból. Az (1) módszer szerint mindegyik anyagot 3 adagban vizsgáltunk meg. Az immunizálást követő 7. napon megvizsgáltuk az állatokból kinyert lépsejtek plaque-képzését. A kezelt és kezelenl (kontroll) állatok plaque-képzésének hányadosát a 4. táblázatban adtuk meg.

Rheumatoid arthritises betegek limfocitáinak E-rozettaképző aktivitása*

1. táblázat

	kontroll	Dózisok (mól/l)				
		10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
1. H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (TP5)	23,6	26,7	26,8	29,9	26,7	–
2. H-Arg-Lys-Asp-Val-OH	29,4	32,6	36,8	34,4	31,5	36,2
3. H-Arg-Lys-Asp-OH**	26,4	28,4	30,7	28,8	28,6	27,2
4. H-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	26,4	28,2	34,8	26,9	29,8	31,5
5. H-Arg-Lys-Asp-Val-OMe	26,4	26,5	27,9	32,4	30,8	31,2
6. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val	23,7	20,4	19,4	21,4	23,2	22,8
7. H-Glp-Arg-Lys-Asp-OH**	23,7	18,4	19,7	19,5	18,7	20,6
8. H-Arg-Lys-Asn-Val-OH	27,7	24,3	23,7	24,6	21,9	22,3
9. H-Arg-Lys-Asu-Val-OH	20,8	25,0	28,6	24,3	22,5	23,6
10. H-Arg-Lys-Ala-Val-OH	20,8	23,1	25,5	21,7	23,4	20,3
11. H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH	26,4	27,9	25,3	25,8	24,5	28,6
12. H-Arg-Lys-Asp-Ile-OH	27,7	24,5	28,7	23,2	25,4	25,5
13. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH	20,8	24,9	26,6	22,6	22,7	24,1

* Az aktív limfociták száma %-ban kifejezve (n=4);

** P 0,05 F teszt (TP5-höz viszonyítva 1. szempontos variancia-analízissal); P 0,005 Student t teszttel

Egészséges egyének limfocitáinak E-rozettaképző aktivitása*

2. táblázat

	kontroll	10 ⁻¹¹	Dózisok (mól/l)		10 ⁻⁵	10 ⁻³
			10 ⁻⁹	10 ⁻⁷		
1. H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (TP5)	27,8	25,2	27,1	24,4	23,7	29,4
2. H-Arg-Lys-Asp-Val**	33,8	33,7	43,0	38,5	39,1	41,3
3. H-Arg-Lys-Asp-OH	30,3	35,9	39,3	41,7	34,1	29,9
4. H-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	30,3	38,1	26,6	35,1	33,8	29,0
5. H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH	35,3	40,5	36,4	40,8	39,6	41,2
6. H-Arg-Lys-Asp-Val-OMe	29,7	23,8	24,8	29,4	27,2	26,8
7. H-Glp-Arg-Lys-Asp-OH	30,3	38,1	26,6	35,1	33,8	29,1
8. H-Arg-Lys-Ala-Val-OH	34,7	30,9	34,5	35,8	30,5	33,3
9. H-Arg-Lys-Asu-Val-OH	29,7	31,5	32,3	29,0	29,7	29,3
10. H-Arg-Lys-Glu-Val-OH**	31,9	33,0	35,4	36,2	32,9	33,2
11. H-Arg-Lys-Asn-Val-OH**	32,1	36,7	35,4	—	39,1	35,5
12. H-Arg-Lys-Asp-Ile-OH**	33,2	30,7	35,0	34,9	32,0	35,5
13. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH	24,1	29,9	25,5	29,4	22,5	29,9

* Az aktív limfociták száma %-ban (n=4);

** P 0,05 F teszt (TP5-höz viszonyított egyponos variancia-analízissel); P 0,05 Student t szignifikáns hatás

3. táblázat

Antitest-termelésre gyakorolt in vitro hatás* az agglutinációs titerrel kifejezve

	4·10 ⁻³	4·10 ⁻⁴	Dózis (mól/l)		4·10 ⁻⁷	4·10 ⁻⁸
			4·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁶		
0						
H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (TP5)	12,0±0	8,7±2,3	10,7±2,3	9,0±1,7	—	—
9,3±1,5						
H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH	10,5±1,5	—	11,5±0,9	—	12,0±0	—
9,3±1,5						
H-Arg-Lys-Asp-OH	—	6,0±0	—	7,3±0,6	—	6,0±1,2
5,2±1,3						
H-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	—	5,2±2,2	—	6,2±2,0	—	6,8±0,8
5,2±1,3						
H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH**	3,0±1,0 ^x	—	5,2±0,8 ^y	—	—	—
5,5±0,6 ^y						
5,2±1,3						
H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-OH	9,0±2,6	—	8,3±0,6	—	7,2±1,3	—
9,3±1,5						
H-Arg-Lys-Asp-Val-OMe	6,0±1,7	—	4,5±0,5	—	5,5±2,6	—
5,2±1,3						

* Antitest-titer = $\bar{X} \pm S. D.$

** P 0,05 Student t teszttel

^x) a vizsgált anyag koncentrációja az oszlopban megadott érték fele^y) koncentráció 2·10⁻¹ mól/l

4. táblázat

A plaque-képző lépsejtekre kifejtett hatás			PFC sejtszám (kezelt)	
			Dózis (mmól)	PFC sejtszám (kezeletlen)
H-Arg-Lys-Asp-OH	1,0·10 ⁻⁴	0,7	NH ₂	1,0·10 ⁻⁶
	1,0·10 ⁻⁶	2,1		1,0·10 ⁻⁸
	1,0·10 ⁻⁸	1,8	H-Arg-Lys-Asp-Val-	2,5·10 ⁻³
	1,0·10 ⁻⁴	0,3	OH	2,5·10 ⁻⁴
H-Arg-Lys-Asp-Val-			H-Arg-Lys-Asp-Ala-	1,0·10 ⁻⁴
			OH	1,0·10 ⁻⁶
				1,0·10 ⁻⁸
				3,0

Az 1. táblázat adatai mutatják, hogy a rheumatooid arthritis betegségben szenvedők limfocitáinak E-rozettaképző aktivitását szignifikánsan stimulálja az H-Arg-Lys-Asp-Val-OH tetrapeptid (2. sz. vegyület), ennek amidja (4. sz. vegyület), a H-Arg-Lys-Asp-OH tripeptid (3. sz. vegyület), a H-Arg-Lys-Asu-Val-OH tetrapeptid (9. sz. vegyület) 10^{-9} mól/l koncentrációban, valamint a H-Arg-Lys-Asp-Val-Ome tetrapeptidészter (5. sz. vegyület) 10^{-7} mól/l koncentrációban. Szignifikánsan gátló hatást mutatott a pirogutaminsav-kezdettű pentaés tetrapeptid (6. és 7. sz. vegyületek) 10^{-9} , illetve 10^{-5} mól/l koncentrációban, valamint az aszparagint tartalmazó tetrapeptid (8. sz. vegyület) 10^{-5} mól/l koncentrációban.

A 2. táblázat adatai szerint az egészséges egyének limfocitáinak E-rozettaképző aktivitására szignifikáns stimuláló hatással bír a H-Arg-Lys-Asp-Val-OH tetrapeptid (2. sz. vegyület) 10^{-9} mól/l koncentrációban, a H-Arg-Lys-Asp-OH tripeptid (3. sz. vegyület) 10^{-7} mól/l koncentrációban. Ugyancsak stimuláló hatása a 2. sz. vegyület amidja (4. sz. vegyület) 10^{-11} mól/l koncentrációban, valamint a H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH tetrapeptid (5. sz. vegyület) és a H-Glp-Arg-Lys-Asp-OH tetrapeptid (7. sz. vegyület) 10^{-11} mól/l koncentrációban. Ebben a tesztben gátló hatású volt a 2. sz. vegyület metilésztere (7. sz. vegyület) 10^{-11} mól/l koncentrációban.

Az antitest-termelésre gyakorolt, agglutinációs titerrel kifejezett in vivo hatást a 3. táblázat adatai mutatják. Eszerint szignifikánsan stimuláló hatású az Arg-Lys-Asp tripeptid $4 \cdot 10^{-6}$ mól/l koncentrációban; az Arg-Lys-Asp-Ala tetrapeptid $4 \cdot 10^{-7}$ mól/l koncentrációban, továbbá a H-Arg-Lys-Asp-Val-NH₂ $4 \cdot 10^{-8}$ mól/l koncentrációban mutatott stimuláló hatást. Gátló hatást mutatott ebben a tesztben is a pirogutaminsavval kezdődő két peptid: a H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-OH $4 \cdot 10^{-7}$ mól/l és a H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH $2 \cdot 10^{-3}$ mól/l koncentrációban.

A plaque-képző lépsejtekre kifejtett in vivo hatás eredményeit a 4. táblázat tartalmazza. Eszerint a H-Arg-Lys-Asp-OH tripeptid, valamint a H-Arg-Lys-Asp-Val-NH₂ tetrapeptidamid kisebb dózisokban mintegy kétszeres növelést, a H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH tetrapeptid pedig minden dózisban jelentős növelést mutatott.

A találmány szerint előállított peptideket, valamint azok sóit a szokásos gyógyszerkészítmények alakjában használhatjuk fel a gyógyászatban. Az ilyen gyógyszerkészítmények a találmány szerint vegyületeket enterális vagy parenterális beadásra alkalmas, szervesen vagy szervetlen vivőanyag kíséretében tartalmaznak. A gyógyszerkészítmények lehetnek szilárd liofilizátumok, amelyekhez vivő anyagként peptidekkel nem reagáló vegyületeket, például szénhidrátokat alkalmazunk, lehetnek továbbá híg vagy tömény szuszpenziók vagy emulziók, de lehetnek tabletták vagy injekciók is, a szokásos kiszerelési formákban.

A találmány szerinti eljárás foganatosítási módjait közelebbről az alábbi példákkal szemléltetjük. A példákban alkalmazott rövidítések a kémiai iro-

dalomban használt rövidítéseknek felelnek meg (J. Biol. Chem. 247, 977 [1972]). További rövidítések: Z = benziloxikarbonil-, Boc = terc-butiloxikarbonil-, O'Bu = terc-butiloxi-, OPfp = pentafluor-fenoxi-, Asu = L-2-amino-szukcinil-, OMe = metoxi-, OBzl = benziloxi-, ONB = 4-nitro-benziloxi-csoport.

Az olvadáspont-meghatározások dr. Tottoli-féle készülékben (Büchi, Svájc) történtek. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokat előre gyártott kovásvégél-adszorbensen (DC Fertigplatten, Merck) végeztük az alábbi oldószerkeverégekben:

1. etil-acetát : (piridin : ecetsav : víz = 20 : 6 : 11) = 95 : 5
2. etil-acetát : (piridin : ecetsav : víz = 20 : 6 : 11) = 9 : 1
3. etil-acetát : (piridin : ecetsav : víz = 20 : 6 : 11) = 4 : 1
4. etil-acetát : (piridin : ecetsav : víz = 20 : 6 : 11) = 3 : 2
5. n-butanol : (piridin : ecetsav : víz = 20 : 6 : 11) = 3 : 7
6. kloroform : metanol = 9 : 1
7. n-butanol : ecetsav : víz = 1 : 1 : 1
8. n-butanol : ecetsav : víz = 4 : 1 : 5 felső fázisa.

A kromatogramok előhívását ninhidrinnel, valamint klórozás után KJ-tolidinnel végeztük. A fajlagos optikai forgatóképesség mérése Perkin-Elmer 141 számkijelzésű fotoelektromos polariméteren történt. Valamennyi oldószer eltávolítását, illetve bepárlását Büchi-féle Rotavapor bepárlón végeztük 40 °C-nál nem magasabb hőmérsékletű vízfürdő alkalmazásával.

1. példa (A módszer)

Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB
1,73 g (6 mmól) H-Val-ONB. HCl 15 ml dimetilformamidban készült oldatához 0,84 ml (6 mmól) trietil-amin és 2,45 g (5 mmól) Bos-Asp(OBzl)-OPfp-t adunk. A reakcióelegyet 30 percig szobahőmérsékleten keverjük, az oldatot bepároljuk és a maradékot 30 ml etil-acetátban oldjuk. Az oldatot 15–15 ml 1 n sósavoldattal, 5%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd vízzel kirázzuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd vákuumban bepároljuk. A maradékként kapott védett dipeptidet ($R_f^1 = 0,9$) 10 ml 8 n sósavas dioxánban állni hagyjuk, majd 15 perc múlva az oldatot 40 ml vízmentes éterrel hígítjuk és szárazra pároljuk. A maradékként kapott szabad dipeptidet ($R_f^2 = 0,5$) 10 ml dimetil-formamidban oldjuk, az oldat pH-értékét trietil-aminnal 8-ra állítjuk, és 3,1 g (5,5 mmól) Boc-Lys(Z)-OPfp-t adunk hozzá. A reakcióelegyet 30 percig szobahőmérsékleten keverjük, miközben az oldat pH-értékét trietil-aminnal 8-on tartjuk. Az oldatot ezután 60 ml kloroformmal hígítjuk, majd 15–15 ml n sósav-oldattal és vízzel kirázzuk. A szerves fázist szárítás után szárazra pároljuk és a maradékot vízmentes éterrel megszilárdítjuk. A kapott védett tripeptidet ($R_f^1 = 0,4$) 100 ml vízmentes éterrel kicsapjuk, leszűrjük és éterrel kétszer mossuk. A kapott terméket 20 ml dimetil-

formamidban oldjuk, az oldat pH-értékét trietil-aminnal 8-ra állítjuk és 3,3 g (7 mmól) Z-Arg(NO₂)-OPfp-t adunk hozzá. A reakcióelegyet 30 percig szobahőmérsékleten keverjük, miközben az oldat pH-értékét trietil-aminnal 8-on tartjuk. Ezután az oldószert elpárologtatjuk, a maradékot 50 ml etanollal eldörzsölve szűrjük és kétszer 10 ml etanollal mossuk. Így 3,85 g védett tetrapeptidet kapunk (73%) összhozam a kiindulási Boc-Asp(OBzl)-OPfp-re számítva. Olvadáspontja: 135–148 °C, R_f² = 0,80.

2. példa (B módszer)

Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl

1,62 g (3,3 mmól) Boc-Lys(Z)-OPfp, 1,40 g (4,0 mmól) Asp(OBzl)-OBzl. HCl és 0,98 ml (7,0 mmól) trietil-amin elegyét 10 ml etil-acetátban szobahőmérsékleten egy óra hosszat állni hagyjuk, majd a reakcióelegyet 20 ml etil-acetáttal hígítjuk, 10–10 ml n sósavoldattal és 5%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal kirázzuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, az oldószert vákuumban bepároljuk, a maradékot n-hexánnal megszilárdítva szűrjük és n-hexánnal mossuk. A kapott védett dipeptidet (termelés: 81,2%; olvadáspont: 92–95 °C; R_f² = 0,75) 30 ml 4 n sósavas dioxánnal kezeljük és 30 perc múlva az oldatot szárazra pároljuk. A szabad dipeptidet (R_f² = 0,10) 10 ml dimetil-formamidban oldjuk, az oldatot 0,35 ml trietil-aminnal semlegesítjük, majd a kapott szuszpenziót az alábbi módon készített vegyes anhidridhez adagoljuk: 10,6 g (3,0 mmól) Z-Arg(NO₂)-OH és 0,42 ml (3,0 mmól) trietil-amin 5 ml dimetil-formamidban készült oldatát –10 °C-ra hűtjük, és az oldathoz ezen a hőmérsékleten 0,36 ml (3,0 mmól) pivaloil-kloridot csöpögtetünk. Az így kapott vegyes anhidrid oldatához 5 perc múlva kezdjük adagolni –10 °C-on a szabad dipeptid oldatát. A reakcióelegyet további 30 percen keresztül 0 °C-on keverjük, éjjelen át állni hagyjuk, majd másnap szárazra pároljuk. A maradékot 50 ml kloroformban oldjuk, 10–10 ml n sósavoldattal, 5%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és vízzel kirázzuk. A szerves fázist szárítás után szárazra pároljuk, és a kapott maradékot éter-n-hexán 1 : 1 arányú elegyével megszilárdítjuk. Így 1,82 g (84%) védett tripeptidet kapunk, R_f² = 0,70.

3. példa (C módszer)

Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asu-Val-OH

2,51 g (12 mmól) Val-O^tBu. HCl-et 50 ml kloroformban oldunk, majd 3,86 g (10 mmól) Boc-Asp(O^tBu)-OSu-t és 1,68 ml (12 mmól) trietil-amin adunk hozzá. Másnap az oldatot 10–10 ml n sósavoldattal és 5%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal háromszor kirázzuk. Szárítás után az oldószert bepároljuk, és a maradékként kapott védett dipeptidet (R_f² = 0,80) 30 ml 5 n hidrogén-bromid

ecetsavas oldatában egy hétig állni hagyjuk. Ezután a reakcióelegyet szárazra pároljuk és a maradékot vízmentes éterrel megszilárdítjuk. Így 2,65 g (98,2%) H-Asu-Val-OH. HBr-et kapunk (R_f⁴ = 0,15), amelyet az 1. példában leírt módon acilezünk tovább. A védett tetrapeptid adatai az 5. táblázatban találhatók.

4. példa

H-Arg-Lys-Asp-Val-OH

2,25 g (2,22 mmól) Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB-t (1. példa) 50 ml 90%-os ecetsavban szuszpendálunk, majd hozzáadunk 1 g 5%-os palládiumos aktív-szén-katalizátort, és 14 órán keresztül hidrogéngázt buborékolatunk át az elegyen. Ezután a katalizátort kiszűrjük, kétszer 10 ml 90%-os ecetsavval mossuk és a szűrletet szárazra pároljuk. A maradékot vízzel és etanollal újból bepároljuk, majd 2 ml vízben oldjuk, és 30 ml etanollal adunk hozzá. A kapott szuszpenziót szűrjük és a csapadékot etanollal mossuk. Így 0,92 g (80%) szabad tetrapeptid-monoacetátot kapunk. Aminosavanalízis: Lys: 1,05 (1,00), Arg: 0,95 (1,00), Asp: 1,04 (1,00), Val: 0,95 (1,00), [α]_D²² = –24,8° (c = 1,0; 10%-os ecetsavban), R_f⁸ = 0,10.

5. példa

L-Arginil-L-lizil-L-aszparaginsav-citrát

1,0 g (2,1 mmól) Arg-Lys-Asp-acetátot 15 ml vízben oldunk és citrát-ciklusba vitt Dowex 2 × 8 gyantával ioncseréljük. A gyantás szuszpenziót szűrjük, a szűrletet vákuumban bepároljuk, a maradékot etanollal megszilárdítjuk, majd a csapadékot leszűrjük és etanollal alaposan mossuk, 0,98 g (97%) Arg-Lys-Asp-citrátot kapunk; op.: 83–86 °C (bomlik). [α]_D²⁴ = +6,75 (c = 1, 10%-os vizes ecetsav).

6. példa

L-Arginil-L-lizil-L-aszparagil-L-valin-citrát

1,0 g (1,75 mmól) Arg-Lys-Asp-Val-acetátot 15 ml vízben oldunk és citrát-ciklusba vitt Dowex 2 × 8 gyantával ioncseréljük. A gyantás szuszpenziót szűrjük, a szűrletet vákuumban bepároljuk, a maradékot etanollal megszilárdítjuk, majd a csapadékot leszűrjük és etanollal alaposan mossuk, 0,92 g (91%) Arg-Lys-Asp-Val-citrátot kapunk; op.: 112–115 °C (bomlik). [α]_D²⁴ = –15,74 (c = 1, 10%-os vizes ecetsav).

A fenti 1–3. példában leírt A, B, illetve C módszerrel, a megfelelő kiindulási anyagok ekvivaláris mennyiségének felhasználásával az alábbi 5. és 6. táblázatban ismertetett további hasonló vegyületeket állítottuk elő.

5. táblázat

A védett peptidek előállításának és tulajdonságai

	Termelés, % (összes) (lépésenként)		Módszer	Olvadáspont	R _f	Tisztítás
1. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB	73	90	A	135–148	0,8(2)	80%-os ecetsav
2. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl	68	82	B	amorf	0,70(2)	éter-n-hexán (mosás)
3. Z-Arg(Z ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-NH ₂	52	81	A	214–216	0,70(2)	etanol (kifőzés)
4. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-OMe	52	80	B	125–135	0,60(2)	etanol
5. Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB	59	84	A	166–172	0,80(3)	etanol
6. Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl	60	85	A	100–104	0,60(2)	etanol-éter (1 : 2)
7. Z-Arg(Z ₂)-Lys(Z)-Asn-Val-OBzl	41	74	A	193–195	0,70(3)	etanol (kifőzés)
8. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Ala-Val-ONB	68	87	A	157–159	0,45(1)	60%-os ecetsav
9. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asu-Val-OH	62	85	C, A	94 (b)	0,30(3)	etanol-éter
10. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Ala-ONB	50	80	A	124–126	0,45(1)	60%-os ecetsav
11. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Ile-OBzl	64	86	B	136–138	0,70(2)	etanol
12. Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONB	68	87	A	199–205	0,80(3)	60%-os ecetsav
13. Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Glu(OBzl-4-Cl)-Val-OBzl	39	73	B	124–127	0,65(2)	etil-acetát

6. táblázat

A szabad peptidek tulajdonságai

	Termelés (%)	R _f	[α] _D ^{22a)}
1. H-Arg-Lys-Asp-Val·AcOH ^{b)}	80	0,10(8)	– 24,8
2. H-Arg-Lys-Asp·AcOH	83	0,20(7)	0
3. H-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂ ·2 AcOH	84,3	0,20(7)	– 26,5
4. H-Arg-Lys-Asp-Val-OMe·2 AcOH	84,6	0,35(5)	– 28,3
5. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val ^{b)}	93	0,40(5)	– 51,3
6. H-Glp-Arg-Lys-Asp·AcOH ^{b)}	70	0,35(5)	– 31,4
7. H-Arg-Lys-Asn-Val·2 AcOH	79,5	0,10(5)	– 23,0
8. H-Arg-Lys-Ala-Val·3 AcOH	88,5	0,45(5)	– 34,6
9. H-Arg-Lys-Asu-Val·2 AcOH	68	0,15(5)	– 31,0
10. H-Arg-Lys-Asp-Ala·AcOH	88	0,25(5)	– 19,9
11. H-Arg-Lys-Asp-Ile·AcOH	48,6	0,15(5)	– 19,5
12. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr ^{b)}	80,0	0,20(8)	– 51,5
13. H-Arg-Lys-Glu-Val·AcOH	97	0,30(7)	– 21,4

a) c = 1, 10%-os ecetsavban

b) Kieselgel SI-100 töltetű oszlopon kromatografáltuk metanol-víz 1 : 1 eleggyel; AcOH = ecetsav

Az előállított peptidek analízis-adatai

Peptid	Talált aminosavak (mól)
1. H-Arg-Lys-Asp-Val-OH	Arg 1,04, Lys 1,02, Asp 1,01, Val 1,00
2. H-Arg-Lys-Asp-OH	Arg 1,02, Lys 1,02, Asp 1,00
3. H-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	Arg 0,99, Lys 1,03, Asp 1,00, Val 1,00
4. H-Arg-Lys-Asp-Val-OMe	Arg 1,04, Lys 1,02, Asp 0,97, Val 1,00
5. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val	Glu 1,04, Arg 1,02, Lys 1,02, Asp 0,98, Val 1,00
6. H-Glp-Arg-Lys-Asp-OH	Glu 1,04, Arg 1,01, Lys 0,99, Val 1,00
7. H-Arg-Lys-Asp-Val-OH	Arg 1,00, Lys 1,03, Asp 1,02, Val 1,00
8. H-Arg-Lys-Ala-Val-OH	Arg 1,03, Lys 0,97, Ala 1,01, Val 1,00
9. H-Arg-Lys-Asp-Val-OH	Arg 1,04, Lys 1,01, Asp 0,98, Val 1,00
10. H-Arg-Lys-Asp-Ala-OH	Arg 1,03, Lys 0,99, Asp 0,98, Ala 1,00
11. H-Arg-Lys-Asp-Ile-OH	Arg 1,02, Lys 1,04, Asp 0,98, Ile 1,00
12. H-Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH	Glu 1,01, Arg 1,04, Lys 1,02, Asp 0,97, Val 1,00, Tyr 0,97
13. H-Arg-Lys-Glu-Val-OH	Arg 1,04, Lys 1,01, Glu 1,02, Val 1,00

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az (I) általános képletű, az immunszabályozást befolyásoló peptidek

X-L-arginil-L-lizil-Y (I)

– ahol X hidrogénatomot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin-, L-aszparaginil-L-valin, L-2-aminoszukcinil-L-valin-, L-alanil-L-valin-, L-aszparagil-L-alanin-, L-glutamil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-izoleucin-csoportot vagy pedig X L-pi-roglutamilcsoportot és Y L-aszparaginsav-, L-aszparagil-L-valin- vagy L-aszparagil-L-valil-L-tirozin-csoportot képvisel – valamint sóik, amidjaik, rövidszénláncú alkilészterek, valamint az arginilcsoport guanidinocsoportján nitro-, a lizilcsoport ε-aminocsoportján és az N-terminális aminocsoporton benziloxikarbonil- és a C-terminális karboxilcsoporton adott esetben benziloxi- vagy 4-nitro-benziloxi-védőcsoportot, továbbá az adott esetben jelen levő aszparagil- és/vagy glutamincsoport láncvégi karboxilcsoportján benziloxi- és a tirozin fenolos hidroxilcsoportján benzil-védőcsoportot tartalmazó védett származékaik előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a peptidlánc tagjait a C-terminális aminosavból, illetőleg annak amidjából, rövidszénláncú alkilészteréből vagy N-védett származékából

25 kiindulva lépésenkénti acilezéssel kondenzáljuk, célszerűen az aktiv-észteres és/vagy vegyes anhidrides kapcsolási módszer alkalmazásával és kívánt esetben a védőcsoportot tartalmazó peptid-termékről a védőcsoportot lehasítjuk és a só alakjában kapott peptidből a bázist felszabadítjuk és/vagy kívánt esetben a kapott terméket valamely gyógyászatiilag alkalmazható sóvá alakítjuk.

30 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy az előállítani kívánt peptid C-terminális aminosavát vagy annak a karboxilcsoporton védett származékát vagy amidját vagy rövidszénláncú alkilészterét a kívánt termék aminosav-szekvenciájában előtte álló aminosav aminocsoporton és adott esetben oldalfunkción védett és karboxilcsoporton aktivált származékával kondenzáljuk, majd a terméknek a további lépésben acilezendő aminocsoportját felszabadítjuk és az acilezési műveletet a szekvencia következő aminosavának védett és a karboxilcsoporton aktivált származékával a kívánt szekvencia eléréséig megismételjük és kívánt esetben a kapott peptidet sóvá alakítjuk.

45 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a kondenzálást az acilező aminosav aktiv észterével vagy vegyes anhidridjével végezzük.

Ábra nélkül

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent a Műszaki Könyvkiadó gondozásában
Szedte a Nyomdaipari Fényszedő Üzem (868717/09)
COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet