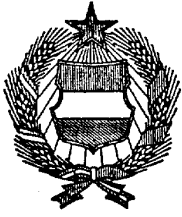


(19) HU

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 185 320

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

A bejelentés napja: (22) 81. 10. 16.

(21) (2999/81)

A bejelentés elsőbbsége: (33) US

(32)

80. 10. 20.

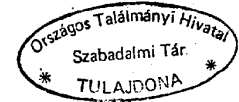
(31)

(198,900)

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

Megjelent: (45) 88. 01. 20.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 07 C 103/52;
C 07 K 7/12



Feltaláló(k): (72)

GESELLCHEN Paul David, biokémikus, Indianapolis, SHUMAN
Robert Theodore, biokémikus, Greenwood, Indiana, US

Szabadalmas: (73)

Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, US

(54)

ELJÁRÁS BIOLÓGIAILAG AKTÍV ENKEFALIN-SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az I általános képletű, ahol

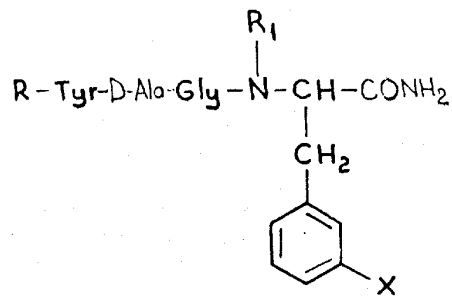
R jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport;

R₁ jelentése 1-3 szénatomot tartalmazó primer alkilcsoport vagy ciklopropil-metil-csoport; és

X jelentése bróm-, jód- vagy klóratom, vagy metilcsoport;

enkefalin-analógok és ezek gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sói előállítására.

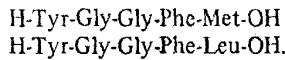
A találmány szerinti I általános képletű vegyületek olyan enkefalin-analógok, amelyek szubkután adagolásban is alkalmazhatók, erős fájdalomcsillapító hatásuk van, és emellett csekély a fizikai dependencia kapacitásuk.



(1)

A találmány tárgya eljárás egy új, fájdalomcsillapító hatást mutató vegyületcsalád előállítására.

A közelmúltban emlősök agyából és agy-gerincvelői folyadékából morfinszerű tulajdonságokkal rendelkező endogén anyagokat vontak ki. E vegyületeket enkefalinoknak nevezik, szerkezetüket Hughes és munkatársai [Nature 258, 577 (1975)] derítették fel; e szerint az enkefalinok az alábbi összetételű pentapeptidek:



E két vegyületet metionin-enkefalinnak, illetve leucin-enkefalinnak nevezik.

Habár kimutatták, hogy a metionin-enkefalin és a leucin-enkefalin fájdalomcsillapító hatást mutat, ha egerek agykamrájába adjuk be őket [Duscher és munkatársai, Nature 261, 423 (1976)], gyakorlatilag mégis használhatatlanok, mivel parenterálisan (a gyomor- és bélrendszer megkerülésével) adagolva nincs fájdalomcsillapító hatásuk.

Ezért az enkefalinok felfedezése óta sok új enkefalin-analógot állítottak elő, abban a reményben, hogy hatásuk nagyobb lesz és, hogy parenterális vagy orális (szájon át) adagolás esetén biológiai hozzáférhetőségük (bioavailability) révén a gyakorlatban is alkalmazhatók lesznek.

Dutta és munkatársai, Life Sciences 21, 559–562 (1977) leírtak bizonyos szerkezeti változtatásokat, amelyek szerintük megerősítik az új származékok biológiai hatását. Szerintük az enkefalin-származékok hatását az alábbi szerkezeti változtatások egyikének vagy összességének bevezetésével lehet felerősíteni:

- a) A 2-helyzetben lévő glicin helyettesítése bizonyos D- vagy α -aza-aminosavakkal;
- b) a terminális karboxilcsoport átalakítása metilészterré vagy amiddá;
- c) a 4-helyzetben lévő fenil-alanin módosítása α -aza helyettesítéssel, N-metilezéssel vagy az aromás gyűrű hidrogénezésével.

Felfedezték az enkefalin-analógoknak egy olyan családját, amelynek tagjai erős fájdalomcsillapító hatást mutatnak, és ugyanakkor kicsi a fizikai dependenciát (hozzászokást) okozó hatásuk (más néven fizikai dependencia kapacitásuk). Ezek az analógok egy gyűrűben helyettesített fenil-alanint tartalmazó tetrapeptidek. E vegyületek nagymértékben specifikusak a helyettesítőnek mind anyagi minősége, mind helyzete tekintetében. Különösen hatékonyak az olyan tetrapeptidek, amelyek 4-helyzetű aminosavja egy meta-helyzetben helyettesített L-fenil-alanin.

Az irodalom ismertet más, gyűrűben helyettesített 4-fenil-alanil-enkefalin-analógokat is; ezek azonban nem meta-helyzetben helyettesített 4-fenil-alanil-enkefalin-analógok. A. R. Day és munkatársai [Res. Comm. in Chem. Path. and Pharmacol. 14 (4), 597–603 (1976)] leírják a H-Tyr-Gly-Gly-pClPhe-Nle-OH-t. R. J. Miller és munkatársai [Vitamins and Hormones 36, 297–382, Academic Press (1978)] megemlítik az alábbi vegyületeket: H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-OH; H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-OMe; és H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-Nle-t. Pless és munkatársai a 15. Európai Peptid-szimposiumon tartott előadásukban („Enkefalin-analógok ópiumszerű hatása”, 1978. szeptember 4–9., Gdansk, Lengyelország) beszámoltak a H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-Met(O)-OH összetételű vegyületükről. D. H. Coy és

munkatársai [BBRC 83 (3), 977–983 (1978)] említik a H-Tyr-D-Ala-Gly-F₃Phe-Met-NH₂-t. A 77/0579. számú dél-afrikai szabadalmi leírás általánosan ismertet olyan, az enkefalinokkal analóg pentapeptideket, amelyek 5 fenil-alanin csoportjának gyűrűjén különböző helyettesítők vannak. A 886.679. számú belga szabadalmi leírás leír és igényel p-fluor-helyettesített fenil-alanint tartalmazó tetrapeptid-enkefalin-analógokat. A 870.819. számú belga szabadalmi leírás, a 77/4479. számú dél-afrikai szabadalmi leírás, továbbá McGregor és munkatársai [Life Sciences 23, 1371–1378 (1978)] leírnak tetrapeptid-enkefalin-analógokat, de ezek közül egyik sem tartalmaz a peptidlánc 4-es helyzetében gyűrűben helyettesített fenil-alanint. R. Miller az Amerikai Kémiai Társaság 176. országos kongresszusán (Miami Beach, Florida, 1978. szeptember 11–14.) tartott, „Enkefalin- és endorfin-származékok szerkezeti farmakológiája és neurobiológiája” című előadásában ismertetett egyes olyan enkefalin-analógokat, amelyek a peptidlánc 4-es 20 helyzetében p-helyettesített fenil-alanint tartalmaznak, és különösen a p-klór- és p-bróm-helyettesített származékokról beszélt. Meltzer és munkatársai [Life Sciences 22, 1931–1938 (1978)] leírtak több enkefalin-analógot, és különösen két p-klór-helyettesített és egy p-metoxi-25 helyettesített fenil-alanin-analógot.

A fenti irodalmi források egyike sem ír le az alábbiakban meghatározott I általános képletű vegyületeket. Azt találtuk, hogy az L-fenil-alanin helyettesítőjének mind anyagi minősége, mind pedig helyzete lényeges szerepet játszik az adott enkefalin-analógnak mind a 30 fájdalomcsillapító hatása, mind pedig a fizikai dependencia kapacitása tekintetében.

Ennek megfelelően a találmány tárgya eljárás az I általános képletű, ahol

- 35 R jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport;
- R₁ jelentése 1–3 szénatomot tartalmazó primer alkilcsoport vagy ciklopropil-metil-csoport; és
- X jelentése bróm-, jód- vagy klóratom vagy metilcsoport,

40 vegyületek, és ezek gyógyászati elfogadható, nem-toxikus savaddíciós sói előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelően védett I általános képletű vegyületekről valamely peptidkémiai ismert reagens segítségével lehasítjuk a védőcsoportokat, és kívánt esetben 45 egy keletkezett szabad bázist savaddíciós sójává alakítunk.

A védett peptidben jelenlévő védőcsoportok a peptid-szintézisben az aminosavak védésére szokásosan alkalmazott védőcsoportok lehetnek, továbbá a szilárd fázisú 50 szintézisek során alkalmazott gyantahordozó is lehet.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények valamely hígítószerrel és hatóanyagként valamely, a fenti I általános képletű vegyületet tartalmaznak.

A találmány oltalmi körébe tartozik az I általános 55 képletű vegyületek gyógyászati elfogadható, nem-toxikus savaddíciós sói előállítása is. A gyógyászati elfogadható savaddíciós sók lehetnek szerves vagy szervetlen savakkal képzett sók; ilyen savak például a sósav, kénsav, szulfonsav, borkősav, fumársav, brómhidrogén-60 sav, glikolsav, citromsav, maleinsav, foszforsav, borostyánkősav, ecetsav, salétromsav, benzoészav, aszkorbinsav, p-toluol-szulfonsav, benzol-szulfonsav, naftalin-szulfonsav, propionsav és más hasonlók. A savaddíciós sókat előnyösen sósavval, ecetsavval vagy borostyánkő-65 savval képezzük. A találmány szerinti vegyületek sóit

a fenti savakkal önmagában ismert módszerekkel állítjuk elő.

Az I általános képletű vegyületekben szereplő egyes helyettesítők meghatározásából kiténik, hogy e vegyületek olyan tetrapeptidok, amelyek C-terminális része egy primer alkohol vagy ennek éter-származéka, primer amid vagy rövidszénláncú alkil-észter.

Az I általános képletű vegyületekben lévő aszimmetriacentrumok konfigurációja e vegyületek igen lényeges vonása. Kényelmi okokból az I általános képletű pentapeptidokban szereplő aminosav-egységeket a terminális aminocsoporttól kezdve megszámozzuk. Az egyes aminosav-egységek aszimmetriacentrumának konfigurációja az 1-helyzettől a 4-helyzet felé haladva: L, D, - és L. A 3-helyzetben glicin szerepel, és ezért ezen egység esetében nem beszélhetünk aszimmetriacentrumról.

Az R_1 jelentése a fentiek szerint lehet „1–3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport” is. Az „1–3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport” lehet metil-, etil- vagy n-propilcsoport.

Az I általános képletű tetrapeptidokban szereplő egyes aminosav-egységek tekintetében a következő szempontok érvényesülnek:

1-helyzet

Ez a peptid N-terminális része. Ezt az egységet az L-tirozintól származtatjuk le. Ezen egység aminocsoportja lehet helyettesítetlen, ekkor R jelentése hidrogénatom. Ezenkívül ezen aminosav-egység aminocsoportja lehet egyszerűen helyettesített, tehát lehet valamely N-metil- vagy N-etil-származék. Ahhoz, hogy parenterális adagolás mellett rendkívül erős fájdalomcsillapító hatású vegyületeket kapjunk, az 1-helyzetben lévő tirozilcsoportnak előnyösen az aminocsoportján helyettesítetlennek kell lennie. Ahhoz, hogy orális adagolás mellett rendkívül erős fájdalomcsillapító hatású vegyületeket kapjunk, az 1-helyzetben lévő tirozilcsoport aminocsoportjának előnyösen helyettesítettnek kell lennie. E helyettesítő előnyösen metilcsoport.

2-helyzet

Az I általános képletű peptidok 2-helyzetében lévő aminosav a D-alanin (D-Ala).

3-helyzet

A peptid ezen helyzetében glicin (Gly) áll.

4-helyzet

A peptidlánc 4-helyzetében meta-helyzetben helyettesített L-fenil-alanin [Phe(X)] áll. E csoport aminocsoportjának helyettesítője (R_1) például metil-, etil-, n-propil- vagy ciklopropil-metil-csoport lehet. R_1 jelentése előnyösen 1–3 szénatomot tartalmazó primer alkilcsoport vagy ciklopropil-metil-csoport. Legelőnyösebben R_1 jelentése etil- vagy ciklopropil-metil-csoport.

Továbbá az L-fenil-alanin a gyűrű meta-helyzetében is

helyettesített. A helyettesítő bróm-, jód- vagy klóratom, vagy metilcsoport lehet. Előnyösen e helyettesítő bróm- vagy jódatom, és legelőnyösebben brómatom.

A jelen leírásban az alábbi, jól ismert és a szakirodalomban széles körben alkalmazott további rövidítéseket használjuk:

BOC – tercier-butoxi-karbonil-csoport

Gly – glicin

Phe – fenil-alanin

IBCF – klórhangyasav-izobutil-észter

NMM – N-metil-morfolin.

Az I általános képletű vegyületeket a peptidszintézis szokásos módszereivel állítjuk elő. Egyes I általános képletű vegyületek előállításánál részleges racemizáció következhet be. Ha ilyen racemizáció be is következik, ez sohasem olyan mértékű, hogy az I általános képletű vegyületek fájdalomcsillapító hatása ezáltal szignifikánsan megváltozzék.

Az I általános képletű vegyületeket előállíthatjuk szilárd fázisú, vagy klasszikus, oldatban lefolytatott peptidszintézis útján. Ha a szilárd fázisú módszert követjük, akkor a peptidláncot valamely gyantahordozón lépésenként építjük fel, általában valamely p-metil-benzhidril-amin típusú gyantán, vagy klór-metilezett polisztirol-gyantán. Végül a terméket 0°C hőmérsékleten hidrogén-fluoriddal vagy ecetsavval hasítjuk le a gyantáról, és általában kromatográfiás úton tisztítjuk. Az oldatban lefolytatott szintézis során a peptidláncot úgy építjük fel, hogy a különböző aktivált és védett aminosavakat majdnem tetszés szerinti sorrendben kapcsoljuk össze, majd a termékről a védőcsoportokat valamely alkalmas reagenssel, például valamely savval, mint például trifluor-ecetsavval (TFA), p-toluol-szulfonsavval (TSA), benzol-szulfonsavval (BSA), metán-szulfonsavval (MSA), naftalin-szulfonsavval, sósavval telített ecetsavval vagy hangyasavval hasítjuk le. A védőcsoportok lehasítását általában valamely, a karbonium-ionokat megkötő szer, például anizol, tioanizol vagy trietil-szilán jelenlétében, előnyösen anizol jelenlétében végezzük. E reakciókat az átlagosan képzett peptid-kémikus számára jól ismert, szokásos körülmények között végezzük. Így például a trifluor-ecetsavval végzett hasítási reakciót körülbelül -10°C és körülbelül $+30^\circ\text{C}$ közötti hőmérsékleten hajtjuk végre.

Bármelyik módszert is követjük, az I általános képletű vegyületek előállítása abban áll, hogy aminosavakat, vagy peptidfragmenseket reagáltatunk egymással oly módon, hogy az egyik aminosav vagy peptidfragmens karboxilcsoportját a másik aminosav vagy peptidfragmens aminocsoportjával reagáltatjuk, s így amidkötést hozunk létre. A hatékony kapcsolás érdekében kívánatos, hogy egyrészt a reakcióban közvetlenül részt nem vevő valamennyi reakcióképes csoportot megfelelő védőcsoportok segítségével inaktíváljuk, másrészt pedig, hogy a kapcsolni kívánt karboxilcsoportot a kapcsoláshoz megfelelő módon aktiváljuk. Ennek érdekében gondosan kell meghatározni mind az egymást követő reakciók sorrendjét és reakciókörülményeit, továbbá megfelelő védőcsoportokat kell alkalmaznunk ahhoz, hogy a kívánt peptidet elő tudjuk állítani. Az I általános képletű vegyületek előállításánál felhasznált valamennyi aminosavat, amely a szükséges védőcsoportokat és aktiváló csoportokat tartalmazza, a peptidszintézisben szokásos, ismert módszerekkel állítjuk elő.

Az I általános képletű vegyületek totálszintézisének

minden egyes lépéséhez a védőcsoportok meghatározott kombinációját alkalmazzuk. Azt találtuk, hogy a szintézist ezen kombinációk alkalmazásával lehet a legkönnyebben végrehajtani. Alkalmazhatnánk az I általános képletű vegyületek szintézise során más kombinációkat is; azonban feltehetőleg kevesebb sikerrel. Így például az I általános képletű vegyületek szintézise során amin-védőcsoportként használhatunk például benziloxi-karbonil-, tercier-butoxi-karbonil-, tercier-amiloxi-karbonil-, p-metoxi-benziloxi-karbonil-, adamantiloxi-karbonil- és izoborniloxi-karbonil-csoportot, továbbá a tirozin hidroxilcsoportjának védésére általában benzilcsoportot (Bzl) alkalmazzunk, bár jó eredménnyel alkalmazhatunk más csoportokat is, például p-nitrobenzil- (PNB), p-metoxi-benzilcsoportot (PMB) és más hasonló csoportokat.

Az I általános képletű vegyületek előállítása során a karboxilcsoportok védésére használhatunk bármilyen tipikus észterképző csoportot, így például metil-, etil-, benzil-, p-nitrobenzil-, p-metoxibenzil-, 2,2,2-triklór-etil-csoportot és más hasonló csoportokat.

Az I általános képletű vegyületek előállítása során valamely az aminocsoportján (vagy aminocsoportjain) megfelelően védett aminosavat vagy peptidfragmenst úgy kapcsolunk össze valamely, a karboxilcsoportján védett aminosavval vagy peptidfragmensevel, hogy az aminocsoportján (vagy aminocsoportjain) védett aminosav vagy peptidfragmens szabad karboxilcsoportját aktiváljuk. Ezt végrehajthatjuk többféle ismert módszer bármelyikével. Az egyik ilyen aktivális módszer során a karboxilcsoportot vegyes anhidriddé alakítjuk. E célból a szabad karboxilcsoportot valamely más sav, általában a szénsav valamely származékával, például savkloridjával reagáltatjuk. A vegyes anhidridek előállításához savkloridként használhatunk például klórhangyasav-etil-észtert, klórhangyasav-fenil-észtert, klórhangyasav-szekunder-butil-észtert, klórhangyasav-izobutil-észtert, pivaloil-kloridot vagy más hasonlókat. Előnyösen klórhangyasav-izobutil-észtert alkalmazunk.

Egy másik módszer szerint a kapcsolási reakcióhoz úgy aktiváljuk a karboxilcsoportot, hogy valamely aktív észterre alakítjuk. Ilyen aktív észterek például a 2,4,5-triklór-fenil-észter, a pentaklór-fenil-észter, a p-nitro-fenil-észter és más, hasonló észterek. Egy további alkalmazható kapcsolási módszer a jól ismert amidos kapcsolási módszer.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kivitelezési változata szerint az I általános képletű vegyületek előállítása során a szabad karboxilcsoportokat N,N'-diciklohexil-karbodiimiddel (DCC) aktiváljuk a kapcsoláshoz. Ezt az aktiválást és kapcsolást úgy végezzük, hogy a kapcsolni kívánt aminosav vagy peptidfragmens mennyiségével molárisan azonos mennyiségű DCC-t használunk, és az átalakítást 1-hidroxi-benzotriazol (HBT) molárisan azonos mennyiségének jelenlétében végezzük. Az 1-hidroxi-benzotriazol segítségével visszaszoríthatjuk a nemkívánatos mellékreakciókat, így a racemizációt is.

Az I általános képletű vegyületek előállításának bizonyos fázisaiban le kell hasítanunk a védőcsoportokat. A védőcsoportok lehasítására önmagában ismert reageneket használunk. Egy átlagosan képzett peptidkémikus könnyen ki tudja választani a védőcsoportok közül azon csoportokat, amelyek egymással összeférhetők olyan értelemben, hogy az adott aminosavon vagy peptidfragmenszen lévő egy vagy több védőcsoportot (de nem az összeset) szelektíven le lehessen hasítani. Ezek a mód-

szerek a peptidkémiaiában jól ismertek. A védőcsoportok szelektív lehasításának módszereit az irodalom részletesen ismerteti, lásd például Schröder és Lübke, *The Peptides (A peptidek)*, I. kötet, Academic Press, New York, 1965; és különösen az idézett mű 72–75. oldalán található táblázatát.

A karboxil-védőcsoportokat lúgos hidrolízis útján hasíthatjuk le. A védett karboxilcsoportok szabadrá tételeire viszonylag erősen lúgos reagenseket használunk, általában valamely alkálifém hidroxidját, például nátrium-hidroxidot, kálium-hidroxidot, lítium-hidroxidot és más hasonlókat. E hidrolízis körülményei a szakemberek által jól ismertek. Számos karboxil-védőcsoportot katalitikus hidrogenolízis útján is lehasíthatunk, például csontszén palládium katalizátor jelenlétében. Ezenkívül, ha a karboxil-védőcsoport p-nitrobenzil- vagy 2,2,2-triklór-etil-csoport, akkor e csoportokat cinkkel és sósavval végzett redukció útján is lehasíthatjuk.

Az amin-védőcsoportok közül sokat lehasíthatunk úgy, hogy a védett aminosavat vagy peptidet valamely savval, például hangyasavval, trifluor-ecetsavval (TFA), p-toluol-szulfonsavval (TSA), benzol-szulfonsavval (BSA), naftalin-szulfonsavval vagy más hasonlókkal kezeljük, és ilyenkor a termék megfelelő savaddíciós sója keletkezik. Más védőcsoportokat például oly módon hasíthatunk le, hogy a védett aminosavat vagy peptidet hidrogén-bromid és ecetsav elegyével kezeljük, akkor a megfelelő hidrobromid keletkezik. Egy adott, védett aminosav vagy peptidfragmens védőcsoportjainak eltávolítására kiválasztott módszer az adott vegyület kémiai és fizikai sajátosságaitól függ. A reakcióban keletkező savaddíciós sót átalakíthatjuk valamely, gyógyászatilag inkább elfogadható sóvá oly módon, hogy a sót valamely alkalmas ioncserélő gyantával kezeljük, például DEAE Sephadex A25-tel, Amberlyst A27-tel és más hasonlókkal.

A hidroxil-védőcsoportot a termék előállítása során végig megtarthatjuk, és a szintézis utolsó lépésében, az amin-védőcsoportokkal együtt hasíthatjuk le, a karboxil-védőcsoport lehasítása során alkalmazott reakciókörülmények függvényében azonban korábban is lehasíthatjuk. Ha a karboxil-védőcsoportot lúgos hidrolízis útján hasítjuk le, akkor a hidroxil-védőcsoport rajta marad a molekulán; ha azonban a karbonil-védőcsoportot katalitikus hidrogenolízis útján távolítjuk el, akkor a hidroxil-védőcsoport is lehasad. Ez azonban nem okoz problémát, mivel az I általános képletű vegyületeket előállíthatjuk szabad hidroxilcsoportot viselő tirozil-csoport jelenlétében is.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kivitelezési változata szerint az I általános képletű vegyületeket úgy állítjuk elő, hogy a peptidlánc 2-es és 3-as helyén lévő aminosavakból álló dipeptidet először a C-terminális aminosavval vagy ennek megfelelő származékával kapcsoljuk, majd a kapott tripeptidet az N-terminális tirozinnal kapcsoljuk. A C-terminális aminosav származéka lehet valamely amid, alkohol, éter vagy észter. Egy másik módszer szerint úgy is eljárhatunk, hogy a C-terminális aminosav valamely olyan csoportot tartalmaz, amely a kívánt aminosav-származék prekursora. A jelen eljárásváltozatot az A-reakcióvázlattal szemlélítjük. Az A-reakcióvázlatban Z jelenti a C-terminálison lévő végcsoportot, akár végső formájában, akár prekursora formájában, az AA jelzés valamely aminosav-egységet jelent, és ezen AA jelzés alsó indexeként meg-

adott szám az illető aminosav-egységnek a végtermék-ként előállított peptidláncban elfoglalt helyét jelöli.

Az A-reakcióvázlat az I általános képletű vegyületek előállításának egyik lehetőségét szemlélteti. A találmány szerinti vegyületeket előállíthatjuk azonban más úton is. Így például kapcsolhatjuk az előre elkészített N-terminális tripeptidet az előre elkészített C-terminális aminosavval, majd ezután a termékben jelenlévő védőcsoportokat lehasítjuk. Egy másik, szintén oldatban végrehajtott szintézismódszer szerint a peptidláncot úgy építjük fel, hogy a C-terminális aminosavból kiindulva az egyes aminosavakat egyenként kapcsoljuk a már meglévő részletre. Akár a fentiekben ismertetett, akár valamely más reakciósorozatot alkalmazunk, az egyes reakciókat a fentiekben ismertetett módszerekkel hajtjuk végre.

Egyes I általános képletű vegyületekben R illetve R₁ jelentése lehet alkil- vagy ciklopropil-metilcsoport. Ezen vegyületek előállítása során a megfelelő N-helyettesített aminosavakat alkalmazzuk. Az aminocsoportjukon egyszerűen helyettesített aminosavakat az aminocsoportjukon védett aminosavakból mint kiindulási anyagokból a B-reakcióvázlaton szemléltetett módon állítjuk elő.

Amint ezt a B-reakcióvázlat szemlélteti, az aminosavat először kálium-hidriddel kezeljük, valamely alkalmas koronaéter jelenlétében, és így a megfelelő dianion (kétszeres negatív töltésű ion) keletkezik. Ezután ezt a dianiont a megfelelő ciklopropil-metil vagy alkil-jodiddal kezeljük, és így a kívánt N-helyettesített aminosavhoz jutunk.

Egy átlagosan képzett peptidkémikus előtt nyilvánvaló, hogy erősen lúgos körülmények között, például a fent ismertetett alkilezés körülményei között az α -szénatomon racemizáció játszódhat le. A racemizáció mértéke az adott aminosavtól függ. A racemizáció mértékét minimálisra szoríthatjuk vissza oly módon, hogy az alkilezőszert főlegesen alkalmazzuk, és a reakciót a lehető legrövidebb idő alatt végezzük el. Ha azonban nemkívánatos mértékű racemizáció következik be, akkor a terméket úgy tisztíthatjuk meg, hogy valamely alkalmas királis aminnal, például d-(+)- α -fenil-etil-aminnal képzett sóját átkristályosítjuk.

Az I általános képletű vegyületek értékes gyógyászati hatással rendelkeznek. E vegyületeknek fájdalomcsillapító és neuroleptikus hatásuk van. Emlősöknek, beleértve az embert is, parenterálisan vagy orálisan adagolva különösen alkalmasak a fájdalom enyhítésére és érzelmi zavarok kiküszöbölésére.

Az I általános képletű vegyületek további igen előnyös tulajdonsága az, hogy fájdalomcsillapító és neuroleptikus hatásuk mellett igen csekély a fizikai dependencia kapacitásuk.

Az I általános képletű vegyületeket adagolhatjuk önmagukban, vagy gyógyászatilag elfogadható vívőanyagokkal együtt, amely vívőanyagok mennyisége az adott vegyület oldhatóságától és kémiai természetétől, az adagolás módjától és a szokásos gyógyszerészeti gyakorlatától függ.

Előnyösek a parenterálisan adagolható gyógyászati készítmények, vagyis az izomba (intramuszkuláris), bőr alá (szubkután) vagy vénába (intravénás) adható készítmények. Ilyenek a steril, injektálható oldatok vagy szuszpenziók, és a steril, injektálható depot- (lassan felszívódó) készítmények. Különösen kényelmesen alkalmazhatók az izotóniás (a vérrel azonos ozmózis nyomású) konyhasó-oldattal, vagy izotóniás dextróz-oldattal

készült steril injektálható oldatok. A steril injektálható készítményeket elkészíthetjük előre, és tárolhatjuk őket kész állapotban, vagy pedig elkészíthetjük őket közvetlenül a felhasználás előtt oly módon, hogy valamely steril közeget – például vizet – adunk valamely, egy fiolában vagy ampullában lévő, ismert mennyiségű steril hatóanyaghoz. Ez esetben a fiola vagy ampulla sterilen tartja a készítményt. A steril hatóanyag mellett jelen lehet olyan mennyiségű steril dextróz vagy nátrium-klorid, amely biztosítja, hogy a steril közeg hozzáadása után az oldat vagy szuszpenzió a vérrel izotóniás legyen.

Előnyösek az orálisan adagolható készítmények is. Ezek lehetnek például kapszulák, tabletták és más hasonló gyógyszerformák, amelyekben a hatóanyag meghatározott mennyisége van jelen. Alkalmas orális készítmények még például a porok, granulátumok, valamely vizes vagy nem vizes közeggel készült oldatok, szuszpenziók vagy emulziók.

A tablettákat préseles útján állíthatjuk elő, általában egy vagy több segédanyag felhasználásával. A tablettákat úgy készítjük el, hogy a hatóanyagot por vagy granulátum formájában általában összekeverjük egy vagy több segédanyaggal, például kötőanyagokkal, csúsztatószerekkel, semleges hígítószerekkel, felületaktív anyagokkal, sűrítőszerekkel, konzerváló szerekkel, pufferoló anyagokkal, ízesítő anyagokkal, diszpergáló szerekkel vagy más hasonlókkal, és ezt a keveréket préseljük.

Az I általános képletű vegyületek pontos dózísát a kezelőorvos állapítja meg. A kiválasztott dózis az adagolás módjától, az adott hatóanyagtól, a kezelt betegségtől és a kezelés módjától függ. Általában azonban, ha a hatóanyagot intramuszkulárisan vagy szubkután adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 0,5 μ g és körülbelül 2 mg között van, és előnyösen körülbelül 10 μ g és körülbelül 100 μ g között. Ha viszont a hatóanyagot intravénásan adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 0,1 μ g és körülbelül 200 μ g között van és előnyösen körülbelül 1 μ g és körülbelül 50 μ g között. Ha a hatóanyagot orálisan adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 100 μ g és körülbelül 100 mg között, és előnyösen körülbelül 500 μ g és körülbelül 50 mg között van. Még előnyösebben az orális dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 1 mg, és körülbelül 10 mg között van.

A találmány szerinti eljárást a továbbiakban, a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül, példákkal szemléltetjük.

1. példa

L-(N-Metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amid ecetsavas sója

a) lépés

N²-Acetil- β -ciano-DL-m-bróm-fenil-alanin-etil-észter

16,8 g (0,35 mól) nátrium-hidrid (50%-os, ásványi olajjal készült diszperzió) 260 ml vízmentes tetrahydrofuránnal készült szuszpenziójához, keverés közben, szobahőmérsékleten, kis részletekben hozzáadunk 59,56 g (0,35 mól) acetamido-cianecetsav-etil-észtert. Utána az elegyhez hozzácsepesztjük 87,48 g (0,35 mól) m-bróm-benzil-bromid 50 ml vízmentes tetrahydro-furánnal

készült oldatát. A reakcióelegyet eleinte enyhén hűtjük, majd 72 órán át szobahőmérsékleten keverjük, és ezután 4 órán át forraljuk. Lehűtés után hozzáadunk 80 ml etil-alkoholt, az elegyet további fél órán át keverjük, majd 1 normál sósavra öntjük. A vizes elegyet etil-acetáttal kirázzuk, az etil-acetátos részt elválasztjuk, és vízzel, utána 1 normál nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül megint vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Ily módon 107 g olajos terméket kapunk.

NMR-spektrum: δ 2,0 (acetil), 3,4–3,5 (metilén) és 7,1–7,5 (m-bróm-fenil).

b) lépés

DL-m-Bróm-fenil-alanin

107 g (0,32 mól), az a) lépésben leírt módon kapott termék, 58,8 g (1,47 mól) nátrium-hidroxid és 220 ml víz elegyét 24 órán át forraljuk. Utána az elegyet szobahőmérsékletre hűtjük és pH-ját 6 normál sósavval 6,5-re állítjuk. A kivált csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk, így módon 41,01 g (hozam: 53%) cím szerinti vegyületet kapunk.

c) lépés

N^α-Trifluor-acetil-DL-m-bróm-fenil-alanin

200 ml trifluor-ecetsavhoz hozzáadunk 46,53 g (0,19 mól) DL-m-bróm-fenil-alanint. Az elegyet 0 °C hőmérsékletre hűtjük, majd 5 perc alatt hozzáadunk 29,3 ml (0,21 mól) trifluor-ecetsav-anhidridet. Az elegyet másfél órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 3 órán át szobahőmérsékleten keverjük, és utána az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradékot 400 ml vízzel hígítjuk, a kapott csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. A szilárd terméket dietil-éter és petrol-éter elegyből átkristályosítva 28,4 g (hozam: 44%) cím szerinti vegyületet kapunk.

Analízis a $C_{11}H_9NO_3BrF_3$ (340,1) képlet alapján: számított: C: 38,85%, H: 2,67%, N: 4,12%; talált: C: 39,09%, H: 2,46%, N: 4,32%.

d) lépés

L-m-Bróm-fenil-alanin

500 ml vízhez hozzáadunk 28 g (0,082 mól), a c) lépésben leírt módon kapott terméket. Az elegyhez keverés közben mindaddig adunk 2 normál nátrium-hidroxid-oldatot, míg tiszta oldatot nem nyerünk (pH = 7,2). Ezután hozzáadunk 25 g karboxi-peptidáz A enzimet, és az elegyet 5 napon át enyhe keverés közben, termosztátban 37 °C hőmérsékleten és egy Radiometer gyártmányú pH-szabályozó segítségével pH = 7,2-n tartjuk. Utána az elegy pH-ját 5,0-ra állítjuk, szenezzük, és a szenet kiszűrjük. A szűrlet pH-ját 1 normál sósavval 3,0-ra állítjuk, és etil-acetáttal háromszor kirázzuk. Ezután a vizes oldat pH-ját 2 normál nátrium-hidroxid-oldattal 7,0-ra állítjuk, majd csökkentett nyomáson addig töményítjük, míg az L-izomer el nem kezd kristályosodni. Ezután hagyjuk az elegyet szobahőmérsékletre hűlni, a csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. Ily módon 10,9 g (109%) cím szerinti vegyületet kapunk.

6

e) lépés

N^α-Tercier-butoxi-karbonil-L-m-bróm-fenil-alanin

5 25 ml tercier-butyl-alkohol és 20 ml víz elegyéhez hozzáadunk 9,9 g (0,041 mól), a d) lépésben leírt módon kapott terméket, majd 20,5 ml (0,041 mól) 2 normál nátrium-hidroxid-oldatot és 8,9 g (0,041 mól) di-tercier-butyl-karbonátot. A reakcióelegyet 5 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd hozzáadunk 150 ml vizet. A vizes elegyet dietil-éterrel kirázzuk, majd a vizes rész pH-ját hideg 1 normál sósavval 2,5-re állítjuk. Ezután dietil-éterrel megint kirázzuk, az utóbbi dietil-éteres részeket vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradékként kapott olajat feloldjuk petroléterben, és az oldatot éjszakán át 4 °C hőmérsékleten állni hagyjuk. A kivált kristályokat kiszűrjük és megszáritjuk, így módon 11,3 g (hozam: 80%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 124–125 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +16,7^\circ$ (c = 1,0, etil-alkohol).

Analízis a $C_{14}H_{18}NO_4Br$ (344) képlet alapján:

számított: C: 48,85%, H: 5,27%, N: 4,07%;
talált: C: 49,25%, H: 5,59%, N: 4,04%.

25

f) lépés

N^α-Tercier-butoxi-karbonil-L-m-bróm-fenil-alanin-amid

30

50 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 11,5 g (0,033 mól) N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-m-bróm-fenil-alanint. Az elegyhez -15 °C hőmérsékleten hozzáadunk 3,63 ml (0,033 mól) N-metil-morfolint és 4,33 ml (0,33 mól) klórhangyasav-izobutil-észtert, majd az elegyet 5 percig -15 °C hőmérsékleten keverjük. Ezután 1 órán át vízmentes, gáz alakú ammóniát vezetünk az elegybe, és további 4 órán át -15 °C hőmérsékleten keverjük. Ezután az elegyet jég és 1 normál nátrium-hidrogén-karbonát elegyére öntjük, és a vizes elegyet etil-acetáttal kirázzuk. A szerves részt először vízzel, utána 1,5 normál citromsav-oldattal, végül megint vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A szilárd maradékot dietil-éterrel eldörzsöljük, a csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. Ily módon 11,3 g (hozam: 100%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 146–147 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +9,8^\circ$ (c = 0,5, metil-alkohol).

Analízis a $C_{14}H_{19}N_2O_3Br$ (343,2) képlet alapján:

számított: C: 48,99%, H: 5,58%, N: 8,16%;
talált: C: 48,85%, H: 5,33%, N: 7,91%.

50

g) lépés

L-m-Bróm-fenil-alanin-amid, sósavas sója

55

60 ml frissen készített 1 normál ecetsavas sósav-oldat és 5 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 11,1 g (0,032 mól), az f) lépésben leírt módon kapott terméket. Az elegyet fél órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd dietil-éterbe öntjük, és a kivált csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. Ily módon 8,75 g (hozam: 98%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = +13,46^\circ$ (c = 0,5, metil-alkohol).

65

Analízis a $C_9H_{12}N_2OCIBr$ (279,6) képlet alapján:
számított: C: 38,67%, H: 4,33%, N: 10,02%;
talált: C: 38,55%, H: 4,41%, N: 10,00%.

h) lépés

 N^α -Ciklopropil-metil-L-m-bróm-fenil-alanin-amid

50 ml vízmentes etil-alkoholhoz hozzáadunk 4,2 g (0,015 mól), a g) lépésben leírt módon kapott terméket, majd 5,4 g (0,06 mól) szilárd, vízmentes nátrium-hidrogén-karbonátot és 2,04 g (0,015 mól) ciklopropil-metil-bromidot. A reakcióelegyet 7 órán át forraljuk, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk 20 ml kloroformban, és a kloroformos oldatot felvisszük egy 3X40 cm méretű, Grace and Davison grade 62 szilikagél kloroformmal készült szuszpenziójával töltött oszlopra. Az oszlopot kloroform és metanol olyan elegyével eluáljuk, amelyben a metanol mennyiségét fokozatosan, 10%-ig növeljük. A kromatográfiát vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal követjük, és a megfelelő frakciókat egyesítve 2,2 g (hozam: 49%) cím szerinti vegyületet kapunk.

NMR-spektrum: δ 1,6 (–NH–), és 7,0–7,4 (m-bróm-fenil).

i) lépés

 N^α -tercier-butoxi-karbonil-D-alanil-glicil-L-(N^α -ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amid

40 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 2,1 g (7,1 mmól), a h) lépésben leírt módon kapott terméket. A termékhez 0 °C hőmérsékleten hozzáadunk 1,87 g (7,1 mmól) N^α -tercier-butoxi-karbonil-D-alanil-glicint, majd 0,96 g (7,1 mmól) 1-hidroxi-benzotriazol és 1,46 g (7,1 mmól) diciklohexil-karbodiimidet. Az elegyet 4 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 72 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 0 °C hőmérsékletre hűtjük, a kivált csapadékot kiszűrjük, és a szűrlet-ről az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradékot feloldjuk etil-acetátban, és az oldatot először 1 normál nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, utána vízzel, ezután 1,5 normál citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Ily módon olaj formájában 1,5 g (hozam: 40%) cím szerinti vegyületet kapunk.

j) lépés

 N^α -Tercier-butoxi-karbonil- N^α -metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amid

50 ml trifluor-ecetsav és 5 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,5 g (2,9 mmól), az i) lépésben leírt módon kapott terméket. Az elegyet fél órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert melegítés nélkül, csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradék olajat dietil-éterrel e'dörzsöljük, a felülúszót leöntjük, és a maradék olajat csökkentett nyomáson megszáritjuk.

15 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 0,856 g (2,9 mmól) N^α -tercier-butoxi-karbonil- N^α -metil-L-tirozint. Az elegyhez –15 °C hőmérsékleten, keverés köz-

ben, gyorsan hozzáadunk 0,32 ml (2,9 mmól) N-metil-morfolint és 0,38 ml (2,9 mmól) klórhangyasav-izobutil-észtert. A reakcióelegyet –15 °C hőmérsékleten keverjük, és ez alatt elkészítjük az alábbi elegyet:

A jelen reakciólépés első bekezdésében leírt módon kapott tripeptid-trifluor-ecetsavas sót feloldjuk 10 ml dimetil-formamidban. Az oldathoz 0 °C hőmérsékleten egyszerre hozzáadunk 0,32 ml (2,9 mmól) N-metil-morfolint, és az elegyet a reakció teljessé tétele céljából keverjük. Az így kapott elegyet ezután hozzáadjuk a jelen reakciólépés második bekezdésében leírt módon kapott vegyes anhidrid oldathoz. A reakcióelegyet 4 órán át –15 °C hőmérsékleten keverjük, majd hagyjuk lassan szobahőmérsékletre melegedni, és éjszakán át tovább keverjük. Utána 1 normál nátrium-hidrogén-karbonát-oldatra öntjük, és a vizes elegyet etil-acetáttal kirázzuk. A szerves részt elválasztjuk, és vízzel, utána 1,5 normál citromsav-oldattal, majd megint vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot (súly: 1,6 g) acetóban oldva felvisszük két preparatív vékonyréteg-kromatográfiás lemezre. A lemezeket kloroform és metanol 9:1 elegyében futtatjuk. A főterméket tartalmazó sávot lekaparjuk a lemezokről, és a terméket a szilikagélről leoldjuk. Ily módon 0,8 g (hozam: 39%) cím szerinti vegyületet kapunk.

k) lépés

 N^α -Metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amid ecetsavas sója

15 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 0,8 g (1,2 mmól), a j) lépésben leírt módon kapott terméket. Az elegyet félórán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd fagyasztva szárítjuk. Az így módon kapott szilárd anyagot feloldjuk 9,0 ml, 31% acetonitril tartalmazó, 0,1 mólos ammónium-acetát-oldatban. Az oldatot felvisszük egy 4X72 cm méretű, C_{18} fordított fázisú szilikagéllal töltött, nagy nyomású folyadék-kromatográfiás oszlopra. Az oszlopot 4,2 kg/cm² nyomás mellett eluáljuk, és a kromatográfiát 280 nm hullámhossznál spektrofotometriásan követjük. A megfelelő frakciókat egyesítjük, és fagyasztva szárítjuk. A kapott szilárd anyagot feloldjuk 10 ml, 0,2 mólos ecetsavban, és az oldatot felvisszük egy 2,5X100 cm méretű G-10 Sephadex oszlopra, amelyet előzőleg ugyanezzel az oldattal hoztunk egyensúlyba. Az elúciót 280 nm hullámhossznál spektrofotometriásan követjük, a megfelelő frakciókat egyesítjük, és fagyasztva szárítjuk. Ily módon 773 mg (hozam: 97%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = +6,64^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).

Analízis a $C_{30}H_{40}N_5O_7Br$ (662,6) képlet alapján:
számított: C: 54,38%, H: 6,09%, N: 10,57%;
talált: C: 54,30%, H: 5,99%, N: 10,28%.

A ninoszav-analízis: Ala, 0,97; Gly, 1,03; NH₃, 0,99.

Az 1. példában leírt módon állítjuk elő az alábbi vegyületeket:

2. példa

L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amid ecetsavas sója

$[\alpha]_D^{25} = +7,1^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).

Analízis a $C_{28}H_{38}N_5O_7Br$ (636,5) képlet alapján:
számított: C: 52,83 %, H: 6,02 %, N: 11,00 %;
talált: C: 53,09 %, H: 6,13 %, N: 11,18 %.
Aminosav-analízis: Ala, 0,99; Gly, 1,01; NH_3 , 1,04.

3. példa

L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = -8,3^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).
Analízis a $C_{27}H_{36}N_5O_7Br$ (623) képlet alapján:
számított: C: 52,09 %, H: 5,83 %, N: 11,25 %;
talált: C: 52,13 %, H: 6,09 %, N: 11,39 %.
Aminosav-analízis: Tyr, 1,01; Ala, 0,99; Gly, 0,99; NH_3 , 1,01.

4. példa

L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-metil-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = +9,2^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).
Analízis a $C_{29}H_{41}N_5O_7$ (571,7) képlet alapján:
számított: C: 60,93 %, H: 7,23 %, N: 12,25 %;
talált: C: 60,68 %, H: 7,00 %, N: 12,46 %.
Aminosav-analízis: Ala, 0,98; Gly, 1,02; NH_3 , 0,96.

5. példa

L-Tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-klór-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = -13,7^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).
Analízis a $C_{27}H_{36}N_5O_7Cl$ (578,1) képlet alapján:
számított: C: 56,10 %, H: 6,28 %, N: 12,12 %;
talált: C: 55,84 %, H: 6,37 %, N: 12,35 %.
Aminosav-analízis: Tyr, 1,02; Ala, 0,99; Gly, 0,98; NH_3 , 0,88.

6. példa

L-(N-Metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-klór-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = -9,2^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).
Analízis a $C_{28}H_{38}N_5O_7Cl$ (592,1) képlet alapján:
számított: C: 56,80 %, H: 6,47 %, N: 11,83 %;
talált: C: 57,11 %, H: 6,45 %, N: 12,15 %.
Aminosav-analízis: Ala, 0,99; Gly, 1,00; NH_3 , 1,01.

7. példa

L-Tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-jód-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = -14,0^\circ$ (c = 0,5, 1 normál sósav).
Analízis a $C_{27}H_{36}N_5O_7I$ (669,5) képlet alapján:
számított: C: 48,44 %, H: 5,42 %, N: 10,46 %;
talált: C: 48,40 %, H: 5,25 %, N: 10,66 %.
Aminosav-analízis: Tyr, 1,01; Ala, 0,99; Gly, 0,99; NH_3 , 1,05.

8. példa

L-Tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amid ecetsavas sója

$[\alpha]_D^{25} = +1,18^\circ$ (c = 0,5, 1 mólos ecetsav).

Analízis a $C_{29}H_{38}N_5O_7I$ képlet alapján:
számított: C: 50,08 %, H: 5,51 %, N: 10,07 %;
talált: C: 50,0 %, H: 5,22 %, N: 10,23 %.
Aminosav-analízis: Tyr, 0,99; Ala, 1,01; Gly, 0,99; NH_3 , 0,95.

9. példa

L-(N-Metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amid ecetsavas sója
 $[\alpha]_D^{25} = +0,787^\circ$ (c = 0,5, 1 mólos ecetsav).
Analízis a $C_{30}H_{40}N_5O_7I$ képlet alapján:
számított: C: 50,78 %, H: 5,68 %, N: 9,81 %;
talált: C: 50,50 %, H: 5,40 %, N: 9,88 %.

Az I általános képletű vegyületek fájdalomcsillapító hatását egéren hot-plate-(fűtőlapos)-módszerrel mutatjuk ki. E célból a kísérleti állatot egy függőlegesen álló, plexi-üvegből készült hengerbe helyezük, amelynek alaplapja egy $52^\circ C$ hőmérsékletre felmelegített fűtőlap. Az egereknek szubkután injekció formájában beadjuk a vizsgálandó anyag megfelelő mennyiségének valamely vivőanyaggal készült oldatát vagy szuszpenzióját, és az állatot 15 perc múlva rátesszük a fűtőlapra. Meghatározzuk azt a másodpercekben mért késleltetési időt, amelynek elteltével az egér felugrik a forró felületről. Ha valamely anyagnak fájdalomcsillapító hatása van, akkor ezt beadva hosszabb késleltetési időt mérünk, mint azoknál az egereknél, amelyek csak a vivőanyagot kapják. A mérést olyan dózistartományban kell végeznünk, amely dózis még nem zavarja meg az állatok mozgásának koordináltságát, és nem teszi őket mozgásképtelenné.

Az alábbi táblázatban megadjuk a fent leírt módon mért ED_{50} -értékeket. Az ED_{50} -érték az a dózis, amelyben a vizsgált vegyület a vizsgált egerek 50%-ánál fájdalomcsillapító hatást mutat. Fájdalomcsillapító hatásként értékeljük azt, ha a vizsgált vegyületet beadva a kísérleti állat késleltetési ideje azonos vagy nagyobb, mint a kontroll állatok késleltetési ideje, plusz a standard szórás kétszerese. A fájdalomcsillapító hatás %-os értékeit probit-értékekké alakítottuk, és az ED_{50} -értéket a dózis-hatás adatokból regressziós analízissel számítottuk ki. Minden egyes dózis-hatás görbe legalább négy pontból áll, és minden egyes pontot legalább tíz kezelt és tíz kontroll-egér adataiból határoztuk meg.

I. táblázat

	Fájdalomcsillapító hatás, hot-plate módszer	
	Vegyület	ED_{50} , mg/kg
50		
55	1. példa	$1,2 \times 10^{-7}$
	2. példa	0,003
	3. példa	0,0049
	4. példa	0,003
	5. példa	0,0003
60	6. példa	0,0018
	7. példa	0,0019

Ezenkívül az egyes I általános képletű vegyületek fizikai dependencia kapacitása csekély. Ezt egereken a spontán motoros aktivitás mérésével mutathatjuk ki.

Megállapították, hogy valamely vegyület fizikai dependencia kapacitása szoros összefüggésben áll e vegyületnek az egerek spontán motoros aktivitására kifejtett hatásával; lásd Goldstein és munkatársai [The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 169, 175–184 (1969)]; Rethy és munkatársai [The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 176, 472–479 (1971)]; és Brase és munkatársai [The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 201 (2), 368–374 (1977)].

Az egerek spontán motoros aktivitásának méréséhez henger alakú, dróthálóból készült, 2 hüvelyk magas és 11 hüvelyk átmérőjű ketreceket használunk. Hat ilyen ketrecet helyezünk egy szellőztetett, hangtompított és egyenletesen megvilágított kamrába. A ketrecek középpontjában fénysugarat bocsátunk a ketrec másik

oldalán található fotocellára. Minden ketrecbe két egeret teszünk és hagyjuk, hogy az egerek hozzászokjanak a környezetükhöz. Ezután öt pár egernek szubkután beadjuk a vizsgálandó anyag meghatározott dózisait, a hatodik párnak pedig csak fiziológiás sóoldatot adunk. Az egereket visszatesszük a ketrecükbe, és három órán át benne tartjuk őket. Minden negyedórás időszakban, és a háromórás megfigyelés teljes tartama alatt is feljegyezzük, hogy az egerek hányszor szakítják meg a fénysugarat. Az alábbi II. táblázatban megadjuk egyes vegyületekre a fénysugár-megszakítások átlagos számát. Minden vegyületet minden dózisban 10–10 egérből álló csoporton vizsgáltunk. A táblázatból kitűnik, hogy a találmány szerinti I általános képletű vegyületek lényegesen kisebb spontán motoros aktivitást idéznek elő, mint a korábban ismert vegyületek.

II. táblázat

$R\text{-Tyr-D-Ala-Gly-N-R}_1\text{ (R}_2\text{)Phe-NH}_2$

Vegyület			Dózis, mg/kg					
R	R ₁	R ₂	4	8	16	32	64	128
H	Et	m-Cl	125	613	819	2388	3667	2807
Me	Et	m-Cl	148	304	796	1978	4477	3476
H	Et	m-Br	—	200	512	1092	2820	—
Me	Et	m-Br	142	235	358	701	2523	5153
Me	Cpm	m-Br	171	140	276	320	1888	2159
H	Et	m-I	178	174	363	852	1630	2871
Me	Et	m-Me	173	255	537	1176	3231	3852
H	Et	H*	704	1204	2916	3528	—	—
Me	Et	p-F*	431	1425	2415	2033	—	—

* = Ismert vegyületek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az I általános képletű, ahol

R jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport;
 R₁ jelentése 1–3 szénatomot tartalmazó primer alkilcsoport vagy ciklopropil-metil-csoport; és
 X jelentése bróm-, jód- vagy klóratom, vagy metilcsoport;

enkefalin-analógok, és ezek gyógyászatiilag elfogadható, savaddíciós sói előállítására, azzal *jellemezve*, hogy valamely megfelelően védett I általános képletű vegyületről a védőcsoportokat valamely peptidkémiaiban ismert reagenssel lehasítjuk és kívánt esetben egy keletkezett szabad bázist savaddíciós sójává alakítunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-N^α-metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-ciklopropil-metil)-m-bróm-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-N^α-metil-L-tirozil-D-alanil-gli-

cil-L-(N^α-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-m-bróm-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-metil)-m-metil-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-N^α-metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-metil)-m-metil-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-klór-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-m-klór-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-klór-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-N^α-metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-m-klór-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási

módja L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-etil)-m-jód-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-m-jód-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-

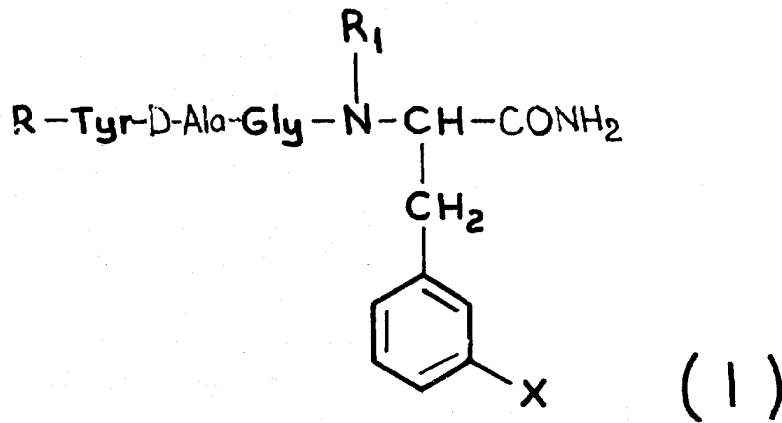
(N^α-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja L-(N-metil)-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amid előállítására, azzal *jellemezve*, hogy az N^α-tercier-butoxi-karbonil-N^α-metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-ciklopropil-metil)-m-jód-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval reagáltatjuk.

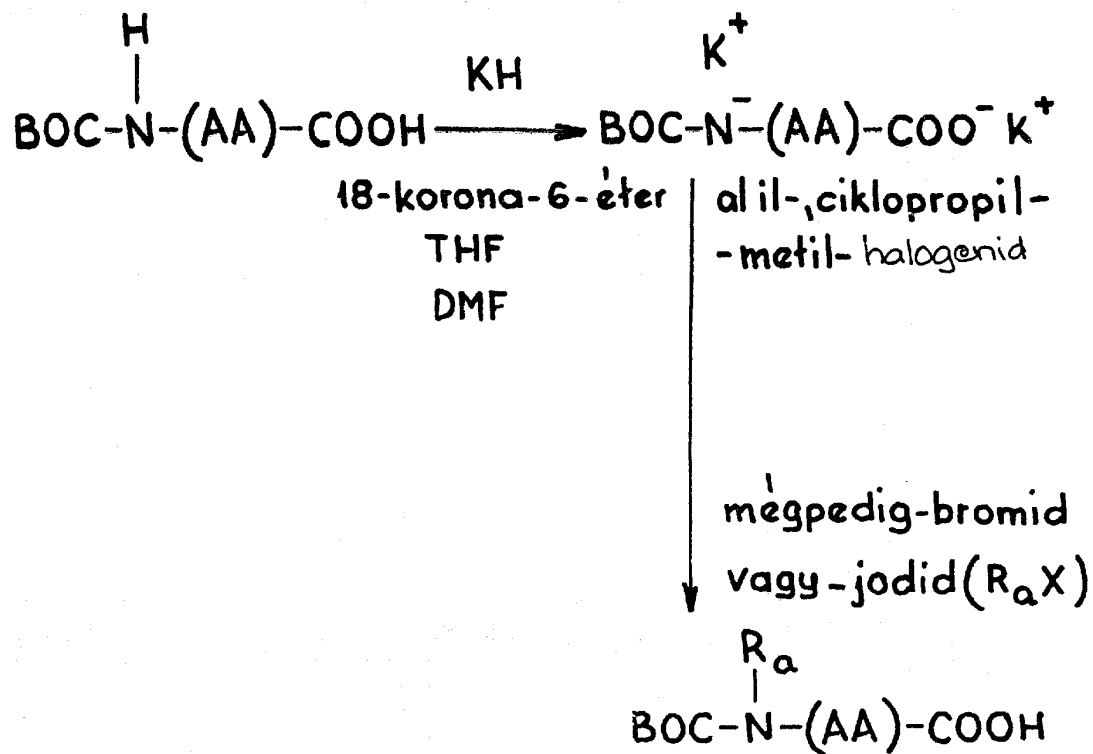
2 rajz

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

COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet



B-reakcióvázlat



A-reakcióvázlat

