

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201098 B

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 7/54
C 61 K 37/02

(22) Bejelentés napja: 1988.03.28. (21) 1539/88

(30) Bejelentés elsőbbsége:
(31.632) 1987.03.30. US

(40) Közzététel napja: 1988.11.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.09.28.

(72) Feltalálók:

DANHO Waleed, Wayne, N.J.,
MADISON Vincent Stewart, Mountain Lakes, N.J.,
TRISCARI Joseph, North Caldwell, N.J.,
(US)

(73) Szabadalmaz:

F.Hoffmann-La Roche et CO.
Aktiengesellschaft, Bazel,
(CH)

(54) ELJÁRÁS GYÜRÜS PEPTIDEK, VALAMINT EZEKET HATÓANYAGKÉNT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

Eljárás (XI) általános képletű a Tyr(SO₃H) és R² között vagy Tyr(SO₃H) és R³ között vagy R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékok /mely képletben

X jelentése CO-CH₃, H

R¹ jelentése Lys, Met

R² jelentése Gly, Glu

R³ jelentése Met, Glu

R⁴ jelentése Asp, Thr(SO₃H),

azzal a feltétellel, hogy Tyr(SO₃H) és R² között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Glu

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy

Tyr(SO₃H) és R³ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Gly

R³ jelentése Glu

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy

R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése CO-CH₃

R¹ jelentése Lys

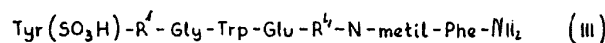
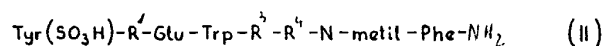
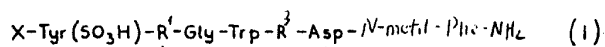
R² jelentése Gly

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Asp/

előállítására, oly módon, hogy a megfelelő nemszulfatált terméket valamely szulfatálószerezrel kezeljük.

A fenti új peptidek táplálékfelvétel-
-visszaszorító vagy étvágy szabályozó hatással rendelkeznek.



HU 201098 B

A leírás terjedelme: 12 oldal, 3 rajz, 11 ábra

ki, minthogy tömör szerkezetük következtében kémiai és enzimes lebontással szemben kevésbé érzékenyek. A gyűrűs peptidok biológiai értékesíthetősége a védett belső aminosav-maradékok által előidéztett szöveti eloszlás következtében nagyobb. Ezenkívül a gyűrűs peptidok jól meghatározott alakjuk miatt a megcélzott receptorhoz nagyobb specifikussággal kapcsolódnak és ezáltal a kívánt hatást kísérő nemkívánatos biológiai aktivitások valószínűsége csökken. Ezzel ellentétben egy lineáris peptid általában mind központi mind perifériális receptorokkal rendelkezik és ezért egy adott peptid számottevő kereszt-reakcióképeséget mutat egy másik peptid receptoraival szemben.

Találmányunk a leírásban meghatározott specifikus szekvenciával rendelkező lineáris peptidokra és e peptidok gyűrűs formáira vonatkozik.

Állatok táplálékfelvételét oly módon szoríthatjuk vissza, hogy az állatnak a takarmányfelvételt csökkentő mennyiségben valamely találmányunk szerint előállított peptidet adjuk be.

Találmányunk tárgya eljárás (XI) általános képletű a Tyr(SO₃H) és R² között vagy Tyr(SO₃H) és R³ között vagy R¹ és R⁴ között ciklizált peptid-származékok mely képletben

X jelentése CO-CH₃, H

R¹ jelentése Lys, Met

R² jelentése Gly, Glu

R³ jelentése Met, Glu

R⁴ jelentése Asp, Thr(SO₃H),

azzal a feltétellel, hogy Tyr(SO₃H) és R² között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Glu

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy

Tyr(SO₃H) és R³ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Gly

R³ jelentése Glu

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy

R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése CO-CH₃

R¹ jelentése Lys

R² jelentése Gly

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Asp/

előállítására, oly módon, hogy a megfelelő nemsulfatizált terméket valamely szulfatálószerezrel kezeljük.

A jelen találmányi leírás értelmében gyűrűs peptidnek olyan peptidet tekintünk, amelyben a peptid láncban levő egyik aminosav béta- vagy gamma-végállású karboxilcsoportja a peptidláncban levő másik aminosav alfa-, delta- vagy epsilon-végállású aminosocsoportjához kapcsolódik. A jelen találmányi

leírásban az alábbi konfigurációk szerepelnek feltéve, hogy mást nem közlünk.

Aminosav	Ciklikus peptidet kialakító aminosav végállású csoportja
5. a láncban Lys	ε amino (ε = epsilon)
Orn	Δ amino (Δ = delta)
Tyr (SO ₃ H)	α amino (α = alfa)
Asp	β karboxi (β = béta)
10 Glu	γ karboxi (γ = gamma)

A találmányunk szerinti specifikus gyűrűs peptidokat oly módon állítjuk elő, hogy a láncban levő aminosavak funkcionális csoportjait azokon a helyeken, amelyeken gyűrűs kapcsolódást nem kívánunk kialakítani, megvédjük és a védetlen aminosavakat gyűrűs szerkezet kialakítása céljából reagálni hagyjuk.

A szilárdfázisú szintézis módszereknél a különböző aminosavak reakcióképes oldallánc-csoportjait megfelelő védőcsoportokkal megvédjük, ezek a védőcsoportok az adott helyen a kémiai reakció lejtárszódását megakadályozzák, majd a védőcsoportokat a kívánt reakció lejtárszódása után eltávolítják.

A láncban levő egyes aminosavak az adott aminosavra kidolgozott oldatfázisú szintéziseknél általánosan használatos szokásos védőcsoportokkal védhetők meg. A láncban levő védetlen aminosavak megfelelően reagálva kialakítják a találmányunk szerinti gyűrűs peptidet.

A leírásban az aminosavak, aktív csoportok, védőcsoportok és hasonlóak megjelölésére az alábbi rövidítéseket alkalmazzuk:

Szimbólum	Megjelölt molekula vagy csoport
AA	aminosav
40 Ac	acetyl
Orn	ornitin
2-klór-Z	2-klór-benziloxikarbonil
Z	benziloxikarbonil
DMF	dimetil-formamid
45 Boc	tert. butoxikarbonil
TFA	trifluorecetsav
CH ₃ CN	acetonitril
Phe-NH ₂	(VII)
N-metil-Phe-NH ₂	(VIII)
50 Phe-NHCH ₃	(IX)
N-metil-Phe-NHCH ₃	(X)

Az aminosavakat az általánosan használatos 3 betűs rövidítésekkel jelöljük és mindenkor az L-izomert értjük feltéve, hogy mást nem közlünk.

Találmányunk az alábbi gyűrűs peptidok előállítására vonatkozik:

(I) általános képletű peptidok

60 ahol

X = CO-CH₃

R¹ = Lys,

R³ = Met,

65 Különösen előnyösek az alábbi képletű peptidok:

CH₃-CO-Tyr(SO₃H)-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-

-metil-Phe-NH₂

(II) általános képletű peptidek

ahol

R¹ = Met,

R³ = Met,

R⁴ = Thr(SO₃H),

Különösen előnyös az alábbi képletű peptid:

Tyr(SO₃H)-Met-Glu-Trp-Met-Thr(SO₃H)-N-

-metil-Phe-NH₂

(III) általános képletű peptidek

ahol

R¹ = Met,

R⁴ = Thr(SO₃H),

Különösen előnyös az alábbi képletű peptid:

Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Glu-Thr(SO₃H)-N-

metil-Phe-NH₂

A R¹ = Lys jelentésnek megfelelő (I) általános képletű peptidek esetében a Lys epszilon-végállású aminos csoportja kapcsolódik az Asp béta végállású karboxil csoportjához és ily módon gyűrűs peptid jön létre.

A (II) általános képletű peptidek esetében a Tyr(SO₃H) alfa végállású aminos csoportja kapcsolódik a Glu gamma végállású karboxil csoportjához, kialakítva a gyűrűs peptidet.

A (III) általános képletű peptidek esetében a Tyr(SO₃H) alfa végállású aminos csoportja kapcsolódik a Glu gamma végállású karboxil csoportjához és ily módon alakítja ki a gyűrűs szerkezetet.

Találmányunk továbbá az alábbi lineáris peptidekre vonatkozik:

(IV) általános képletű peptidek

ahol

X = 1-4 COCH₃

R¹ = Lys,

R³ = Met,

(V) általános képletű peptidek

ahol

R¹ = Met,

R³ = Met,

R⁴ = Thr(SO₃H),

(VI) általános képletű peptidek

ahol

R¹ = Met,

R⁴ = Thr(SO₃H).

A találmányunk szerint előállított peptidok állaton telítettségű érzést idéznek elő és a táplálékfelvétel visszaszorítására használhatók. Ezeket a vegyületeket állatok testsúlyának beállítására vagy csökkentésére alkalmazhatjuk.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás gyógyászati készítmények - különösen a táplálékfelvétel szabályozására vagy visszaszorí-

tására alkalmas gyógyászati készítmények - előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, a fenti eljárással előállított (XI) általános képletű peptid Tyr(SO₃H) és R² között vagy Tyr(SO₃H) és R³ között vagy R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékát inert gyógyászati hordozóanyagokkal összekeverjük és a keveréket galenikus formára hozzuk.

A leírásban használt „táplálékfelvételt visszaszorító mennyiség” kifejezésen a peptid azon mennyiségét értjük (tömegben kifejezve, az állat 1 kg testtömegére vonatkoztatva), amelyet a táplálékfelvétel visszaszorítása céljából az állatnak be kell adni. A fenti mennyiségek meghatározása az alkalmazás módja, a kezelendő állat fajtája és testtömege alapján a szakember kötelező tudásához tartozik. A CCK-8 telítettségét előidéző (fogyasztó) szerként történő alkalmazásával kapcsolatban az alábbi, a korábbi ismereteket összefoglaló irodalmi helyre hivatkozunk: Morley, J. E., „Minireview The Ascent of Cholecystokinin (CCK) From Gut to Brain” Life Sciences, 1982, 30, 479-493, különösen 485-488. oldal (1982).

Találmányunk tárgya továbbá eljárás a fentiekben meghatározott peptidek előállítására, oly módon, hogy

- a.) szilárdfázisú gyantához kapcsolódó, megfelelő blokkolt lineáris peptidet készítenk;
- b.) a lineáris peptidet a gyantáról eltávolítjuk és HPLC úton tisztítjuk;
- c.) a lineáris peptidet valamely ciklizáló szerrel kezeljük és amidkötés képzésével és HPLC tisztítással gyűrűs peptidet nyerünk;
- d.) a gyűrűs peptidet szulfatáljuk és HPLC úton tisztítjuk.

a.) Szilárd fázisú gyantához kapcsolódó megfelelő blokkolt lineáris peptid előállítása:

A peptideket szilárdfázisú szintézissel, a Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963) irodalmi helyen leírt általános módszerrel állíthatjuk elő, azonban az irodalomban ismert bármely más ekvivalens kémiai szintézist is alkalmazhatunk. A szilárdfázisú szintézist az előállítandó peptid végállású karboxil csoportján kezdjük oly módon, hogy valamely védett alfa-aminosavat amidkötéssel megfelelő gyantához kapcsolunk. E célra pl. benzil-hidrilamin (BHA) vagy metil-benzil-hidrilamin (MBHA) gyantát alkalmazhatunk. A BHA és MBHA gyantahordozók kereskedelmi forgalomban levő termékek és általánosan használatosak a végállású karboxil csoporton helyettesítetlen amidot tartalmazó peptidek szintézise esetén.

A találmányunk szerinti eljárásnál felhasználunk oldószereket - pl. metilén-klorid (CH₂Cl₂), 2-propanol és dimetil-formamid (DMF) - mindegyike a Burdick és Jackson „Distilled in Glass” minőségnek felel meg és

további desztilláció nélkül felhasználható. A trifluor-ecetsav (TFA), diizopropil-etilamin (DIPEA) és a d ciklohexil-karbodiimid (DCC) a Chemical Cyanamid Corporation cégtől vásárolt „szekvenciális” tisztaságú termék. Az etán-ditiolt (EDT) a Sigma Chemical Co. cégtől vásároltuk és további tisztítás nélkül használtuk fel. Találmányunk során L-konfigurációjú és a Bachem cégtől vásárolt védett aminosavakat alkalmazunk feltéve, hogy más nem közlünk.

A szilárdfázisú szintézis módszereknél a különböző aminosav-egységek reakcióképes oldallánc-csoportjait olyan tipikus védőcsoportokkal védjük meg, amelyek megakadályozzák a kémiai reakció lejátszódását az adott helyen, majd a védőcsoportot a kívánt reakció lejátszódása után eltávolítjuk. Bár a szilárdfázisú szintézis kapcsán bizonyos védőcsoportokat kiemeltünk, megjegyezzük, hogy az egyes aminosavak az oldatfázisú szintéziseknél használt bármely szokásos megfelelő aminosav-védőcsoporttal megvédhetők. A fenti védőcsoportok közül a karboxilcsoport megvédésére szokásos védőcsoportok példáulként az észtereket, pl. aril-észtereket, különösen fenil-észtereket vagy kis szénatomszámú alkil-, halogén-, nitro-, tio- vagy kis szénatomszámú (1-7 szénatomos) alkil-tio-helyettesítőt hordozó fenilésztereket említjük meg. Az összes alfa-amino-csoportot tercier butoxikarbonil-csoporttal (BOC) védjük meg. Az oldallánc csoportokat a következőképpen védjük: Asp, Glu, Thr benzilcsoporttal; Trp formilcsoporttal és Tyr 2,6-diklór-benzilcsoporttal; Lys 2-klór-Z vagy Z-csoporttal. A fenti vegyületek tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiával (TLC) és az optikai forgatóképesség mérésével igazoljuk. Benzil-hidril-amin (BHA) gyantaként a Beckman Instruments cégtől beszerzett, szemcse alakban (200-400 mesh) levő, 1% divinil-benzol tartalmazó sztírol) divinil-benzol kopolimert alkalmazunk. Az összes nitrogéntartalom 0,654 milliekvivalens/g.

Az alábbi berendezéseket alkalmazzuk. A vékonyréteg-kromatografálást (TLC) üvegre felvitt, előre bevont szilikagél 60 F254 lemezek (Merck) megfelelő oldószer-rendszerek felhasználásával végezzük el. A foltokat UV fluoreszcencia segítségével (254 nm abszorpció), jódos megfestéssel vagy ninhidrines permetezéssel (primer és szekunder aminok esetében) mutatjuk ki.

Az aminosav-analízis céljából a peptideket fenolt tartalmazó 6 n sósavban 115 °C-on 24 órán át vákuum alá helyezett Reacti-Therm hidrolízis csövekben hidrolizáljuk (Wheaton Scientific Company, Milville N.J. 08332). Az analízist Beckman 121 M aminosav analízátorral hajtjuk végre.

A nagy teljesítőképességű folyadék-kromatografálást (HPLC) Laboratory Data Control (LDC) márkájú készülékben végezzük el, amely Constametric I szivattyúból,

Constametric III szivattyúból, Gradient Master oldószer programozóból és keverőből, valamint Spectromonitor III változtatható hullámhosszú UV detektorból áll. Az analitikai HPLC-t Waters Micro Bondapack C₁₈ fordított fázisú oszlopok (0,4 x 25 cm) segítségével végezzük el. A preparatív HPLC szétválasztásokat Whatman (2,5 x 50 cm) Partisil M20 10/50 ODS-3 oszlopon vagy (2,3 x 30 cm) mikro Bondapack C₁₈ oszlopon futtatjuk; mindkét esetben Whatman Co; Pell ODS pelli-culáris töltetet tartalmazó elő-oszlopot alkalmazunk.

A peptideket lépésenként szilárd hordozón, Vega 250 peptid szintetizátor felhasználásával kapcsoljuk össze. A kémiai modul Model 300 mikroprocesszorral (Vega Biochemicals) a 16. és 20. lépés műveleteinél pedig kézi működtetéssel szabályozzuk.

5 g Boc-N-metil-Phe-t (17 millimól) benzhidrilamin gyantához (5 g) kapcsolunk, 1,8 g DCC (9 millimól) felhasználásával, 0 °C-on. A felvételt aminosav-analízissel határozzuk meg; a mért érték 0,20 millimól/g gyanta. A reagálatlan aminocsoportokat 6-6 ekvivalens ecetsavanhidriddel és piridinnel történő kezeléssel blokkoljuk.

Egy, a gyantával kezdődő tipikus szintézis-ciklus menetét az alábbiakban ismertetjük.

Lépés	Reagens	Idő
1	1% EDT/CH ₂ Cl ₂	1x30 mp
2	50% TFA/CH ₂ Cl ₂ 1% EDT	1x1 perc
3	1. lépést megismételni	
4	50% TFA/CH ₂ Cl ₂ 1% EDT	1x15 perc
5	CH ₂ Cl ₂	1x30 mp
6	2-propanol	1x30 mp
7-8	5. és 6. lépést megismételni	
9	CH ₂ Cl ₂	2x30 mp
10	8% DIPEA	2x2 perc
11-15	5-9. lépést megismételni	
16	5 ekv. Boc-Aminosav-anhidrid	1x30 perc
17	1% DIPEA	1x5 perc
18-19	6-9. lépést megismételni	
20-21	Ha Kaiser-teszt pozitív, 16-17. lépést megismételni	
22	2-propanol	1x30 mp
23-24	5-6. lépést megismételni	
25	CH ₂ Cl ₂	1x30 mp
26	DMF	2x30 mp
27	CH ₂ Cl ₂	3x30 mp

Az összes mosási és kapcsolási műveletnél az oldószer térfogata 10-20 ml/g gyanta. A kapcsolásokat a Boc-aminosavak szimmetrikus anhidridjeivel végezzük el. A reakciókat CH₂Cl₂-ben 0 °C-on 15 percen át, 10 ekviva-

lens Boc-aminosav és 5 ekvivalens DCC felhasználásával végezzük el.

A kapcsolási reakciókat Kaiser-féle ninhidrin-tesztrel követjük nyomon és meghatározzuk, hogy a kapcsolódás a 19. lépés után teljes-e [Kaiser E. és tsai: Anal. Biochem. 34, 595-598 (1970)]. A teljes ciklus-idő 54-160 perc/aminosav

b.) *A lineáris peptid eltávolítása a gyantáról és tisztítás preparatív HPLC útján*

A teljesen kialakított peptid-gyantákat nagyvákuumban egy éjjelen át szárítjuk. A védőcsoport eltávolítását és a lehasításokat Tam és tsai: [Tetrahedron Letters 23, 4435-4438 (1982)] a CCK-8 analógokra optimalizált általános módszerének módosított körülményei között végezzük el. A peptid-gyantát teflon HF készülékben (Peninsula) hidrogén-fluorid-dal, dimetil-szulfiddal és p-krezollal (5:13:2) egy órán át 0 °C-on kezeljük, majd kis térfogatra bepároljuk és a reakcióedénybe friss vizmentes hidrogén-fluoridot (18 ml) desztillálunk be, ezt a második kezelést másfél órán át 0 °C-on végezzük. Alapos bepárlás után a száraz gyantát 3-3 térfogat Et₂O-al és EtOAc-al mossuk, majd 4x15 ml 30%-os ecetsavval titráljuk és szűrjük. A vizes szűrlet liofilizálása után nyers lineáris peptidet kapunk.

A preparatív tisztítást közvetlenül a nyers peptiddel HPLC módszerrel (2,3x30 cm) mikro. Bondapack C₁₈ vagy (2,5x50 cm) Whatmann ODS-3 oszlopon végezzük el. A peptideket minimális térfogatú 50%-os AcOH-ban visszük fel és 5-65%-os lassú gradiens szerint (4 óra) 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel, 8,0 ml/perc átfolyási sebességgel eluáljuk. A frakciókat háromperces időközökben gyűjtjük össze és analitikai HPLC meghatározás után egyesítjük. A 97%-osnál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtjük és liofilizáljuk.

A peptidek tisztaságát HPLC segítségével határozzuk meg; minden esetben 99%-os tisztaságot mértünk. Az egyes peptidek aminosav-analízisét elvégeztük és minden esetben a várt értéket kaptuk. Az analógok UV, IR és MS értékeit meghatározzuk és így módon is igazoljuk a peptidek kémiai szerkezetét.

c.) *A lineáris peptidet ciklizáló szerrel kezelve amid-kötésen keresztül, majd HPLC tisztítás útján gyűrűs peptidet kapunk.*

A lineáris peptidet DMF-ben oldjuk és 3 n sósav/dioxán eleggyel kezelve a szabad aminos csoportot hidroklorid só alakjában protonáljuk. A sót difenil-foszfénil-aziddal kezeljük és egy órán át -20 °C-on aktiváljuk. A reakcióelegyet DMF-el (15 térfogat) hígítjuk és a pH-t N-metil-morfolinnal 7,5-re áll-

lítjuk be. A ciklizációs reakciót 2 napon át +5 °C-on végezzük el és ez alatt a pH-t ellenőrizzük és N-metil-morfolin hozzáadásával semleges értéken (pH=7,4) tartjuk. A szerves oldószerben a „pH-t” oly módon határozzuk meg, hogy az oldat aliquot részét megnevesített keskeny pH-papírcsíkra visszük fel.

A gyűrűzés előrehaladását a reakcióelegy aliquot részének HPLC analizisével követjük nyomon. A kiindulási lineáris peptid 1-2 nap után általában ciklikus monomerré vagy a lineáris peptid polimer formájává alakul.

A kapott nyers gyűrűs peptidet preparatív HPLC módszerrel (2,3x30 cm) mikro Bondapack C₁₈ oszlopon tisztítjuk. A peptideket minimális térfogatú ecetsavban visszük fel és 5-65%-os lassú gradiens szerint (4 óra) 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel 8,0 ml/perc átfolyási sebességgel eluáljuk. A frakciókat háromperces időközökben gyűjtjük össze és HPLC analízis után egyesítjük. A gyűrűs peptidek tisztaságát analitikai HPLC, aminosav-analízis és MS meghatározásával mérjük.

d.) *A gyűrűs peptidek szulfatálása és HPLC tisztítása*

A kénsavészter-csoportot tartalmazó peptideket a hidroxilcsoportok (tirozin, szerin, treonin vagy hidroxil-prolin) kettős szulfatálásával, piridin-acetil-kénsav reagens felhasználásával állítjuk elő. A tipikus szulfatálást a következőképpen végezzük el:

60-240 mg piridinium-acetil-szulfátot (PAS) 5 ml piridinben oldunk és 60 °C-on 10 percen át keverjük. 10 mg N-acetil-CKK-8 analógot 5 ml piridinben oldunk, amelyhez a PAS reagenst hozzáadjuk. A reakcióelegyet 60 °C-on 45-60 percen át melegítjük és keverjük, majd 2 térfogat 0,05 mólos ammónium-hidrogén-karbonáttal semlegesítjük, liofilizáljuk és HPLC tisztításnak vetjük alá.

A szulfatált peptideket preparatív fordítottfázisú HPLC úton tisztítjuk; C₁₈-10 μ (ES Industries) (1,25x30 cm) oszlopon 10-40%-os 2 órás gradiens szerint, 0,05 mólos ammónium-hidrogén-karbonát és acetonitril elegyeiben, átfolyási sebesség 5 ml/perc, kimutatás 240 nm-nél. Az összegyűjtendő frakciók meghatározása és a peptid-tisztaság mérése analitikai HPLC módszerrel, Bondapack C₁₈, 10 μ Waters-oszlopon (0,30x30 cm), acetonitril/ammónium-hidrogén-karbonát gradienssel 2 ml/perc átfolyási sebességgel történik; kimutatás 215 nm-nél.

A szulfatált peptidek tisztaságát analitikai HPLC, aminosav-analízis, UV, IR, MS és NMR segítségével határozzuk meg.

Eljárásunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük anélkül, hogy találmányunkat a példákra korlátoznánk. Az étvágy-szabályozó hatású peptideket a fenti eljárás-

sal állítjuk elő. A példákban a peptidok jellemzését és tisztaságuk meghatározását aminosav-analízis, analitikai HPLC, UV, IR és MS segítségével végezzük el.

1. példa

Ac-Tyr(SO₃H)-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-
-Phe-NH₂ előállítás

5 g (17,8 millimól) Boc-N-metil-Phe-t 50 ml metilén-klorid és 50 ml dimetil-formamid 0 °C-ra hűtött elegyében oldunk, majd keverés közben 1,8 g (9 millimól) diciklohexilkarbodiimidet adunk hozzá és az elegyet 60 percen át 0 °C-on keverjük.

Másik lombikban 5 g benzilhidril-amin-gyantát (0,56 millimól N/g; sztírol és 1% divinil-benzol térhálósított kopolimerje) 10% diizopropil-etil-amin tartalmazó metilén-kloriddal 30 percen át mossuk, majd szűrjük és metilén-kloriddal, dimetil-formamiddal és metilén-kloriddal mossuk. A lehűtött elegyet a gyantához adjuk és 24 órán át szobahőmérsékleten keverjük. A gyantát szűrjük, metilén-kloriddal, dimetil-formamiddal, izopropanollal, metilén-kloriddal, dimetil-formamiddal, izopropanollal és metilén-kloriddal mossuk, majd nagyvákuumban szárítjuk.

A gyanta aminosav-analízis szerint 0,20 millimól N-metil-fenil-alanin/g gyanta tartalmaz. A reagálatlan aminocsoportokat oly módon fogjuk be, hogy a gyantát 5 ml ecetsavanhidriddel és 5 ml diizopropil-etil-amin metilén-kloridos oldatával 60 percen át rázatjuk. A gyantát szűrjük és metilén-kloriddal, izopropanollal dimetil-formamiddal és metilén-kloriddal mossuk. 4,8 g (0,96 millimól) Boc-N-metil-fenil-alanin gyantát az alábbiakban ismertetésre kerülő eljárás szerint szekvenenciális szilárdfázisú szintézisnek vetjük alá. Az összes kapcsolást a Boc-aminosavak szimmetrikus anhidridjeinek felhasználásával, a leírt módon végezzük el. A 16. és 20. lépésben az aktivált aminosavakat az alábbi megfelelő reakcióidőkkel adagoljuk: hat különálló ciklust végzünk, és pedig Boc-aszparaginsav-β-benzil-észterrel (1,6 g 5 millimól, 60 perc; 1,6 g 5 millimól, 60 perc); Boc-metioninnal (1,25 g, 5 millimól, 30 perc; 1,25 g 30 perc, 5 millimól); Boc-N¹-formil-triptofánnal (1,70 g, 5 millimól, 30 perc; 1,70 g, 5 millimól, 30 perc); Boc-glicinnel (900 mg, 5 millimól, 30 perc, 900 mg, 5 millimól, 30 perc); Boc-ε-2-klor-Z-lizinnel (2,10 g, 5 millimól, 30 perc; 2,10 g, 5 millimól, 30 perc) és Boc-2,6-diklor-benzil-tirozinnal (2,2 g 5 millimól, 30 perc; 2,2 g, 5 millimól, 30 perc).

A Boc-védőcsoportok lehasítása és a gyanta 20 ml ecetsavanhidriddel 20 ml piridinben és metilén-kloridban végzett acetilezése után 5,2 g acetilezett heptapeptidil-gyantát kapunk.

8

1,9 g peptidil-gyantát - 2 ml dimetil-szulfidot, 1 ml anizolt és 0,7 ml ditioetánt tartalmazó - 25 ml hidrogén-fluoriddal egy órán át 0 °C-on végzett kezeléssel hasítunk. 5 Az elegyet alaposan bepároljuk, a gyantát 2 térfogat etil-acetáttal mossuk, majd 4x15 ml 30%-os ecetsavval titráljuk, szűrjük és liofilizáljuk. 300 mg nyers peptidet kapunk.

150 mg nyers peptidet preparatív HPLC segítségével mikro Bondapack C₁₈ oszlopon (2,3x30 cm) tisztítunk. A peptidet 5-65%-os lineáris grádiens szerint 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel eluáljuk; átfolyási sebesség 8 ml/perc. A kimutatást 280 nm-nél végezzük. A főcsúcsot összegyűjtjük és liofilizáljuk. 20 mg (11%) Ac-Tyr-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-Phe-NH₂-t kapunk. A kapott termék HPLC szerint homogén és a megfelelő aminosav-analízist és MS-t adja.

19 mg (0,02 mól) lineáris peptidet 1 ml dimetil-formamidban oldunk és 0,1 ml 3 mólosósavas dioxánt adunk hozzá. A reakcióelegyet szárazra pároljuk és a maradékot 1 ml DMF-ben oldjuk. Ezután 0,13 ml (0,005 millimól) difenil-foszforil-azidot adunk hozzá, majd az elegyet -20 °C-ra hűtjük és egy órán át -20 °C-on keverjük. A reakcióelegyet 15 ml DMF-al hígítjuk, majd a pH-t N-metil-morfinnal 7,5-re állítjuk be (megnedvesített pH papírcsikkal mérjük). A reakcióelegyet 5 °C-ra hagyjuk felmelegedni, majd ezen a hőmérsékleten pH=7,4 értéken két napon át állni hagyjuk. A pH-t N-metil-morfolin kis aliquot részeinek hozzáadásával ezen az értéken tartjuk.

A reakcióelegyet vákuumban bepároljuk, a maradékot 1 ml ecetsavban oldjuk és mikro Bondapack C₁₈ oszlopra (2,3x30 cm) visszük fel. Az oszlopot 5-65%-os lassú gradiens szerint (4 óra) 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel eluáljuk, 8,0 ml/perc átfolyási sebesség mellett. A kimutatást 280 nm-nél végezzük el. A frakciókat 3 perces időközökben gyűjtjük össze és a vágásokat analitikai HPLC meghatározás után végezzük. A gyűrűs peptidnek megfelelő csúcsot összegyűjtjük és liofilizáljuk.

8 mg (45%) Ac-Tyr-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-Phe-NH₂ képletű terméket kapunk.

A fenti termék HPLC szerint homogén és az alábbi aminosav-analízist adja: Asp 1,00 (1); Gly 1,07 (1); Met 1,00 (1); Tyr 1,12 (1); Lys 1,00 (1); a Trp-t és N-metil-Phe-t nem határozzuk meg; a termék a várt MS-t mutatja.

Összegképlet: C₄₉H₆₂N₁₀O₁₀S, molekulatömeg 982,14.

190 mg piridin-acetil-szulfáthoz (PAS) 10 ml frissen desztillált piridint adunk. A kapott elegyet 60 °C-on keverés közben 10 percen át melegítjük. Az oldatot hűlni hagyjuk, majd 8,0 mg Ac-Tyr-Lys-Gly-Trp-Met-

65 -Asp-N-metil-Phe 10 ml piridinnel képezett

oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet egy órán át 60 °C-on keverjük, majd 2 térfogat ammónium-hidrogén-karbonáttal semlegesítjük és liofilizáljuk. A tisztítást fordított fázisú preparatív HPLC segítségével ES Industries C₁₈-10 μ oszlopon (1,25x30 cm) végezzük el, 0,05 mólos NH₄HCO₃/CH₃CN elegyekkel 10-40%-os lineáris gradiens szerint, 5 ml/perc átfolyási sebesség mellett; a kimutatást 240 nm-nél végezzük el.

7,0 mg (87%)

Ac-Tyr(SO₃H)-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-

Phe-NH₂-t kapunk.

Aminosav-analízis: Asp 1,00 (1); Gly 1,00 (1); Met 1,00 (1); Tyr 1,12 (1); Lys 1,00 (1); Trp-t és N-metil-Phe-t nem határoztuk meg.

Összegképlet: C₄₉H₆₂N₁₀O₁₃S₂, molekulatömeg 1063,21.

UV-adatok: 0,1 mg peptid 1 ml 0,1 n kálium-hidroxidban

λ váll 272 nm ε = 5260

λ max 280 nm ε = 5530

λ max 288 nm ε = 4750

IR-adatok: kálium-bromidban

3325 cm⁻¹: OH, NH

1655 cm⁻¹: amid, karbonil

1530 cm⁻¹: amid II

1505 cm⁻¹: tirozin

1200 cm⁻¹: szulfát

2. példa

Tyr(SO₃H)-Met-Glu-Trp-Met-Thr(SO₃H)-N-me-

til-Phe-NH₂ előállítás

4,0 mg (0,8 millimól), az 1. példában leírt módon készített Boc-N-metil-fenil-alanin gyantát az 1. példában ismertetett szekenciális szilárdfázisú szintézisnek vetünk alá. Az összes kapcsolást a korábbiakban leírt Boc-aminosav vegyes anhidridek felhasználásával végezzük el. A 16. és 20. lépésben az aktivált aminosavakat az alábbi megfelelő reakcióidőkkel adagoljuk: hat különálló ciklust végzünk, éspedig Boc-O-benzil-treoninnal (1,5 g, 5 millimól, 60 perc; 1,5 mg, 5 millimól, 60 perc); Boc-metioninnal (1,25 g 5 millimól 30 perc; 1,25 g, 5 millimól, 30 perc); Boc-N¹-formil-triptofánnal (1,7 g 5 millimól, 30 perc; 1,7 g, 5 millimól, 30 perc); Boc-glutaminsav-γ-benzil-észterrel (1,6 g, 5 millimól, 30 perc; 1,6 mg, 5 millimól, 30 perc); Boc-metioninnal (1,25 g, 5 millimól, 30 perc; 1,25 mg, 5 millimól, 30 perc) és Boc-2,6-diklór-benzil-tirozinnal (2,2 g, 5 millimól, 30 perc; 2,2 g, 50 millimól, 30 perc). A Boc-védőcsoportok eltávolítását az 1. példában leírt módon hajtjuk végre; 4,9 g heptapeptidil-gyantát kapunk.

1 g gyantát - 12 ml dimetil-szulfidot, 2,0 ml p-krezolt és 1 ml ditio-etánt tartalmazó-hidrogén-fluoriddal (5 ml) történő keze-

léssel hasítunk. Az elegyet kis térfogatra pároljuk be, majd a reakcióedénybe 18 ml friss vízmentes hidrogén-fluoridot desztillálunk be és ezt a második kezelést 2 órán át 5 0 °C-on végezzük. Az elegyet alaposan bepároljuk, a gyantát etil-acetáttal mossuk, majd 30%-os ecetsavval titráljuk, szűrjük és liofilizáljuk. 210 mg nyers peptidet kapunk. 100 mg fenti nyers peptid preparatív HPLC segítségével mikro Bondapack C₁₈ oszlopon (2,3x30 cm) tisztítunk. A peptidet 5-65%-os lineáris gradiens szerint 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel eluáljuk, 8 ml/perc átfolyási sebesség mellett. A kimutatást (detektálást) 15 280 nm-nél végezzük el. A főcsúcsot összegyűjtjük és liofilizáljuk. 15 mg (19%) Tyr-Met-Glu-Trp-Met-Thr-N-metil-Phe-NH₂-t kapunk. A termék HPLC szerint homogén és a kívánt aminosav-analízist és MS-t adja.

15 15 mg (0,02 mól) lineáris peptidet az 1. példában ismertetett módon difenil-foszforil-azid felhasználásával ciklizálunk.

6 mg (41%) Tyr-Met-Glu-Trp-Met-Thr-N-me-

25 til-Phe-NH₂-t kapunk. A termék HPLC szerint homogén és aminosav-analízise a következő: Thr 0,90 (1); Glu 1,00 (1); Met 2,00 (2); Tyr, 1,00 (1); Trp 0,80 (1); az N-metil-Phe-t nem határoztuk meg. A termék a kívánt MS-el rendelkezik.

30 Összegképlet: C₄₉H₆₃N₉O₁₀S₂, molekulatömeg 1002,0.

80 mg piridin-acetil-szulfáthoz (PAS) 6 ml vízmentes desztillált piridint adunk. A 35 kapott elegyet 60 °C-on 10 percen át keverés közben melegítjük. Az oldatot lehűlni hagyjuk, majd 3 mg Tyr-Met-Glu-Trp-Met-

40 Thr-N-metil-Phe-NH₂ 3 ml piridinnel képezett oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet egy órán át 60 °C-on keverjük, majd 2 térfogat ammónium-hidrogén-karbonáttal semlegesítjük és liofilizáljuk. A tisztítást preparatív fordított fázisú HPLC módszerrel, ES-Industries 45 C₁₈-10 μ oszlopon (1,25x30 cm) 10-40%-os lineáris gradiens szerint 0,05 NH₄HCO₃/CH₃CN elegyekkel, 120 percen át, 5 ml/perc átfolyási sebességgel végezzük el. A kimutatás 240 nm-nél történik. Kitermelés 1,4 mg (45%)

50 Tyr(SO₃H)-Met-Glu-Trp-Met-Thr(SO₃H)-N-me-

til-Phe-NH₂

Aminosav-analízis: Thr 0,85 (1); Glu 1,00; (1); Met 1,80 (2); Tyr 1,00 (1); Trp 0,75 (1); N-

55 -metil-Phe-t nem határoztuk meg. Összegképlet: C₄₉H₆₃N₉O₁₀S₄, molekulatömeg 1162,32.

UV-adatok: 0,11 mg peptid 1 ml 0,1 n kálium-hidroxidban

60 λ váll 272/273 nm ε 4660

λ váll 280 nm ε 4760

λ váll 289 nm ε 4055

IR-adatok: kálium-bromidban

3400 cm⁻¹: OH, NH

65 1675 cm⁻¹: amid, karbonil

1530 cm⁻¹: amid II
1505 cm⁻¹: tirozin
1248 cm⁻¹: szulfát

3. példa

Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Glu-Thr(SO₃H)-N-metil-Phe-NH₂ előállítás

5,0 g (1 millimól), az 1. példában leírt módon előállított Boc-N-metil-fenil-alanin gyantát az 1. példában ismertetett eljárás szerint szekenciális szilárdfázisú szintézisnek vetünk alá. Az összes kapcsolást a korábban leírt módon, a Boc-aminosavak szimmetrikus anhidridjeinek felhasználásával végezzük el. A 16. és 20. lépés során az aktív aminosavakat a megfelelő alábbi reakcióidővel adjuk hozzá: hat különálló ciklust végzünk, és pedig Boc-O-benzil-treoninnal (1,5 g 5 millimól, 60 perc; 1,5 g 5 millimól, 60 perc); Boc-glutaminsav-γ-benzil-észterrel (1,6 g, 5 millimól, 30 perc; 1,6 g 5 millimól 30 perc); Boc-N¹-formil-triptofánnal (1,7 g 5 millimól, 30 perc; 1,7 g 5 millimól, 30 perc); Boc-glicinnel (900 mg, 5 millimól, 30 perc; 900 mg, 5 millimól, 30 perc); Boc-metioninnal (1,25 g, 5 millimól, 30 perc; 1,25 g, 5 millimól, 30 perc); és Boc-2,6-diklór-benzil-tirozinnal (2,2 g, 5 millimól, 30 perc; 2,2 g, 5 millimól, 30 perc).

A Boc-védőcsoport lehasítását az 1. példában leírt módon végezzük el és 5,80 g heptapeptidil-gyantát kapunk 2,4 g gyantát-dimetil-szulfidot, p-krezolt és ditio-etánt tartalmazó hidrogén-fluoriddal kezelünk, a 2. példában leírt módon. A gyantát etil-acetáttal mossuk, 30%-os ecetsavval titráljuk, szűrjük és liofilizáljuk. 452 mg nyers peptidet kapunk.

100 mg nyers peptidet preparatív HPLC módszerrel (2,3x30 cm) mikro Bondapack C₁₈ oszlopon tisztítunk. A peptidet 5-65%-os lineáris gradiens szerint 0,022% TFA/CH₃CN elegyekkel, 8 ml-perc átfolyási sebesség mellett eluáljuk. A kimutatás 280 nm-nél történik. A főcsúcsot összegyűjtjük és liofilizáljuk. 20 mg (23%)

Tyr-Met-Gly-Trp-Glu-Thr-N-metil-Phe-NH₂-t kapunk.

A termék HPLC szerint homogén és a kívánt aminosav-analízist és MS-t adja.

20 mg (0,02 millimól) lineáris peptidet difenil-foszforil-azid felhasználásával, az 1. példában leírt módon ciklizálunk. 4 mg (21%) Tyr-Met-Gly-Trp-Glu-Thr-N-metil-Phe-NH₂-t

kapunk.

A fenti termék HPLC szerint homogén és az alábbi aminosav-analízist adja: Thr 0,90 (1); Glu 1,00 (1); Gly 1,00 (1); Met 0,90 (1); Tyr 0,97 (1); Trp 0,63 (1); az N-metil-Phe-t nem határoztuk meg.

10

A MS a kívánt értékek felel meg.

Összegképlet: C₄₆H₅₇N₉O₁₀S, molekulatömeg 928,07.

4 mg Tyr-Met-Gly-Trp-Glu-Thr-N-metil-Phe-

5

-NH₂-t 5 ml piridinben oldunk és 80 mg piridinium-acetil-szulfát (PAS) 5 ml piridinnel képzett oldatához adjuk; utóbbi oldatot az 1. példában leírt módon készítjük el. A reakcióelegyet egy órán át 60 °C-on keverjük, majd 2 térfogat ammónium-hidrogén-karbonáttal semlegesítjük és liofilizáljuk. A tisztítást preparatív HPLC módszerrel, az 1. példában ismertetett körülmények között végezzük el.

10

3,8 g (94%)

Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Glu-Thr(SO₃H)-N-metil-Phe-NH₂-t kapunk.

Aminosav analízis: Thr 0,90 (1); Glu 1,04 (1);

20

Gly 1,01 (1); Met 0,85 (1); az N-metil-Phe-t és Trp-t nem határoztuk meg.

Összegképlet: C₄₆H₅₇N₉O₁₀S₃, molekulatömeg 1088,20.

(UV-adatok: 0,31 mg peptid 3 ml 0,1 n kálium-hidroxidban

25

λ max 249/250 nm ε 3915

λ max 256 nm ε 4125

λ max 262/263 nm ε 4170

λ váll 280 nm ε 3915

30

λ váll 287/288 nm ε 3516

IR-adatok: kálium-bromidban

3450 cm⁻¹: OH, NH

1730 cm⁻¹: észter-kötés

1630 cm⁻¹: amid, karbonil

35

1200 cm⁻¹: szulfát

4. példa

40 *In vitro* receptor kötődési teszt

Fagyasztott szarvasmarha striatumot (kb. 5 g) és friss patkány pankréaszt (kb. 5 g) a zsirtól és a külső szövetétől megtisztítjuk és HEPES 1. pufferrel homogenizáljuk (10 millimól HEPES, 130 millimól nátrium-klorid, 5 millimól magnézium-klorid, pH 7,4), 35 rész puffer (1 rész szövet arányban, nedves tömeg/térfogat-alapon (kb. 175 ml). A szövetet 2x15 mp-ig homogenizáljuk, 0 °C-on Polyttron-homogenizátorban, ülepedési érték 6. A szövetet 0 °C-on centrifugálással 10 percig izoláljuk (48 000 g mellett). A kapott szövet pelletet HEPES 2. pufferben újraszuszpendáljuk (10 millimól HEPES, 130 millimól nátrium-klorid, 5 millimól magnézium-klorid, 1 mg/l fenil-metánszulfonil-klorid (PMSF), 200 mg/l bacitracin); 1 rész striatalis szövet (eredeti nedves tömeg) per 80 rész puffer és 1 rész pankréász szövet (eredeti nedves tömeg) per 70 rész puffer arányban.

55

Az inkubálást oly módon indítjuk be, hogy különböző koncentrációjú természetes CCK-8-t vagy (1) képletű peptidet ³H-CCK-8-(SO₃H)-val (végső koncentráció =

60

65

= 0,15 nmól) és szövethomogenizátummal (striátium 0,26 mg fehérje, 2 ml végső térfogat; pankreász 0,165 mg fehérje 1 ml végső térfogatban) kombinálunk.

A mintákat 30 percen át 25 °C-on inkubáljuk és az inkubálást oly módon fejezzük be, hogy az elegyet Sandbeck-féle többszörös vákuumszűrőn előnedvesített Whatman GF/B szűrőre öntjük. Az inkubációs csöveket 2x3 ml jéghideg HEPES 2. pufferrel mossuk, majd a mosófolyadékot GF/B szűrőn átszűrjük. A szűrőt levegőn 10 percen át szárítjuk, majd 12 ml Beckman HP/b „Ready-Solv” szcintillációs cocktaillal együtt szcintillációs fiolába helyezük. A fiolákat 2-12 órán át rázatjuk, majd Beckman 7800 folyadékszintillációs spektrofotométerrel mérjük a szcintillációt. A nem-specifikus kötődést 1 μmól természetes CCK-8 jelenlétében meghatározzuk és a specifikus kötődés meghatározása céljából az összes mintából levonjuk. Az összes specifikus ³H-CCK-8-(SO₃H) kötődés 50%-os gátláshoz szükséges peptid-koncentrációt (IC₅₀) a log-probit analízissel határozzuk meg.

Az eredményeket az I. táblázatban foglaljuk össze.

I. táblázat

Peptid-szekvencia	Példa sorszám	Szarvas-marha striátium (nmól)	Patkány pankreász (nmól)	Dózis μg/kg	Táplálékfelvétel 1. étkezés 2. étkezés kontroll %-a
H-Asp-Tyr(SO ₃ H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ (CCK-8) Ac-Tyr(SO ₃ H)-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-Phe-NH ₂	1	1-4.6 3000	1-3.2 1500	32 32	27 ± 17 72 ± 10 149 ± 6 ^x 133 ± 6 ^x
Tyr(SO ₃ H)-Met-Glu-Trp-Met-Thr(SO ₃ H)-N-metil-Phe-NH ₂ Tyr(SO ₃ H)-Met-Gly-Trp-Glu-Thr(SO ₃ H)-H-metil-Phe-NH ₂	2	>1000	5400	320 320	14 ± 5 ^{xxx} 52 ± 7 ^{xxx} 145 ± 10 ^{xx} 131 ± 9 ^{xx}
	3	>10000	>10000	320	73 ± 10 ^x 114 ± 13 N.S.

A megfelelő kontrolltól szignifikánsan eltérő érték:

^{xxx}p < 0,001,

^{xx}p < 0,01,

^xp < 0,05

N.S. = nem szignifikáns

5. példa

Kétszeri etetésből álló táplálási kísérlet

180-200 g testtömegű him Sprague-Dawley (CD) patkányokat (Charles River Breeding Laboratories) 22 °C hőmérsékletű kamrában 12 órás világos/sötét ciklusokkal (reggel 6 órától délután 6 óráig) akklimatizáltunk. Az állatokat két napon át éheztetjük, majd lemérjük, egyenként külön ketrecekbe helyezük és a négynapos etetési tréninget megkezdjük. Ez alatt az idő alatt a patkányok etetőedényekben örölt laboratóriumi tápot (Purina Lab Chow) kapnak reggel 9,00 és reggel 10,00 között; az etetőedényeket reggel 10,00 és 12,00 között eltávolítjuk, majd 12,00 és délután 1,00 óra között a ketrecekbe visszahelyezzük. E „1-2-1” etetési időszak során a patkányok a két óra alatt naponta hozzávetőlegesen annyi tápot fogyasztanak mint azok a patkányok, amelyek a napi teljes 24 óra alatt ad libitum fogyaszthatnak élelmet. Az állatokat a 4. napon újra lemérjük és a több mint 5 g testtömeg-vesztéséget mutató patkányokat kizárjuk a kísérletből. Az állatokat ezután kísérleti (n=5-6) és kontroll (n=6-12) csoportokba osztjuk, testtömegüktől függetlenül.

A találmányunk szerinti eljárással előállított peptideket nátrium-klorid-oldatban (oldható peptidek esetében) vagy 1%-os gummi-arabicumban (oldhatatlan vegyületek esetében) szuszpendáljuk, 32-320 µg/ml/kg testtömeg koncentrációban, majd az etetési időszak 5. napján az első etetés előtt 15 perccel intraperitoneálisan beadagoljuk. A patkányokat ugyanúgy etetjük, mint az első négy napon és a tápot tartalmazó etetőedényeket minden egyes etetés előtt és után a táplálékfelvétel meghatározása céljából lemérjük. A táplálékfelvételt az átlagérték átlagos és standard hibájaként a különböző csoportok kontroll-értékeinek százalékában fejezzük ki. A kezelt csoportok értékeit a kontroll csoportnál mért adatokkal a „t”-teszt analízissel hasonlítjuk össze. Az eredményeket az I. táblázat tartalmazza.

6. példa

400 mikroliter gyomornedvet és 200 mg Ac-Tyr(SO₃H)-Lys-Gly-Trp-Met-Asp-N-me-

- 5 til-Phe-NH₂ képletű, az 1. példa szerinti peptidet és CCK-8-t
 [H-Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂] 37 °C-on különböző időtartamokon át
 10 inkubálunk. A lebomlást analitikai HPLC módszerrel mikro Bondapack C₁₈ oszlopon (0,4x x30 cm) 10-40% lineáris gradiens szerint 0,01 mólus NH₄Ac/CH₃CN elegyekkel 40 percen át követjük nyomon, 2 ml/perc átfolyási sebesség mellett; a kimutatás 225 nm-nél történik.
 15 Az eredményeket az 1. példa szerinti peptid esetében a szulfatátalan Ac-Tyr-Lys-
 -Gly-Trp-Met-Asp-N-metil-Phe-NH₂ feltétele-
 20 zett termelésére, míg a CCK-8 esetében a CCK-8-nak megfelelő csúcs eltűnésére alapozzuk.

25

Peptid	Inkubációs idő (perc)	%-os lebomlás (terület)
30 1. példa	0	0
	60	1.4
	180	3.6
	1380	12.8
35 CCK-8	0	0
	15	90
	60	100

40

45

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (XI) általános képletű a Tyr-(SO₃H) és R² között vagy Tyr(SO₃H) és R³ között vagy R¹ és R⁴ között ciklizált peptid-származékok 5

/mely képletben

X jelentése CO-CH₃, H

R¹ jelentése Lys, Met

R² jelentése Gly, Glu 10

R³ jelentése Met, Glu

R⁴ jelentése Asp, Thr(SO₃H);

azzal a feltétellel, hogy

Tyr(SO₃H) és R² között képezett ciklizált származékok esetében 15

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Glu

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy 20

Tyr(SO₃H) és R³ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése H

R¹ jelentése Met

R² jelentése Gly 25

R³ jelentése Glu

R⁴ jelentése Thr(SO₃H); vagy

R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékok esetében

X jelentése CO-CH₃, 30

R¹ jelentése Lys

R² jelentése Gly

R³ jelentése Met

R⁴ jelentése Asp/

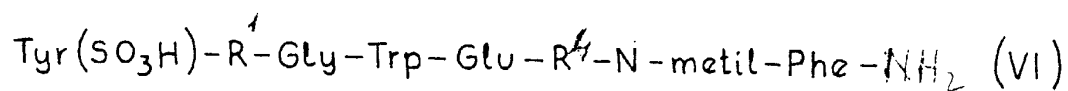
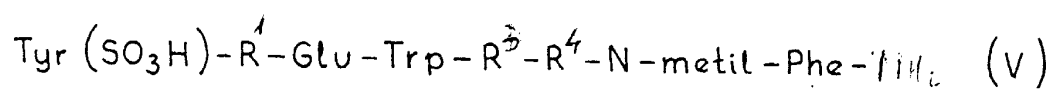
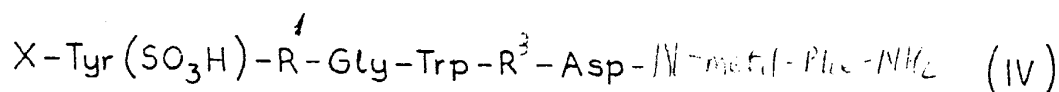
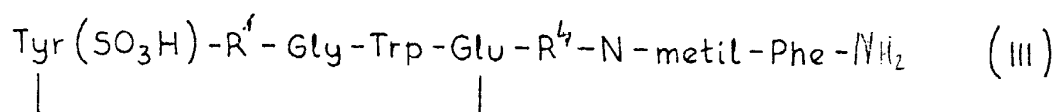
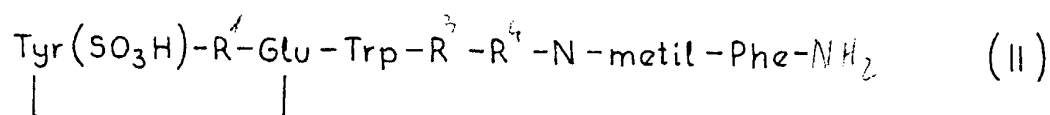
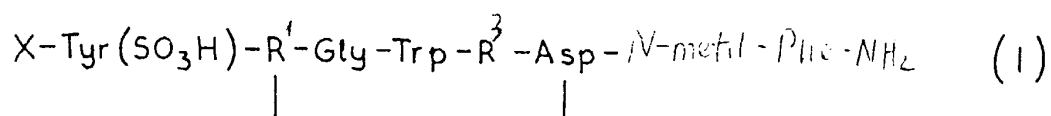
előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő nemszulfatált terméket valamely szulfatálószerezrel kezeljük. 35

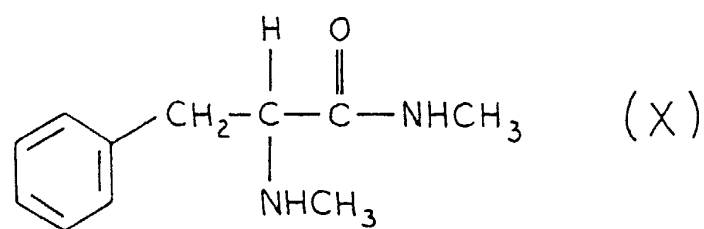
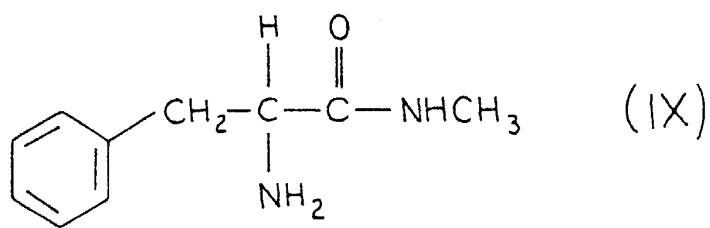
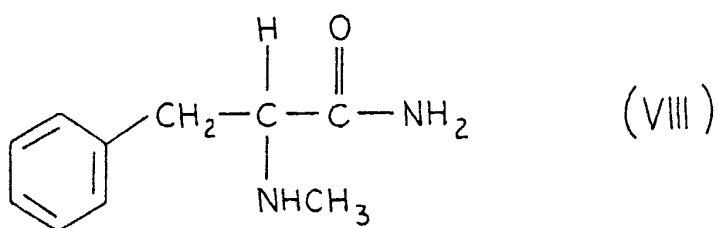
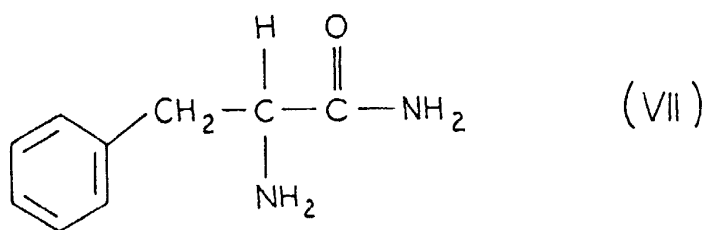
2. Eljárás gyógyászati készítmények - különösen a táplálékfelvétel szabályozására vagy visszaszorítására alkalmas gyógyászati készítmények - előállítására, azzal jellemezve, 40

hogy valamely, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (XI) általános képletű peptidet valamint a Tyr(SO₃H) és R² között vagy Tyr(SO₃H) és R³ között vagy R¹ és R⁴ között képezett ciklizált származékát inert gyógyászati hordozóanyagokkal összekeverjük és a keveréket galenikus formára hozzuk. 45

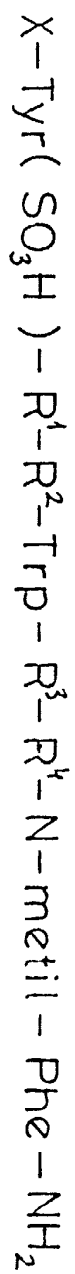
Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest -
A kiadásért felel: dr Szvoboda Gabriella osztályvezető
R 4960 - KJK

90.3346.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató





HU 201098 B
Int Cl⁵ C 07 K 7/54
C 61 K 37/02



(XI)