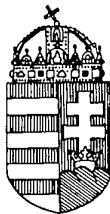


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

208 439 B

(21) A bejelentés száma: 6391/89

(22) A bejelentés napja: 1989. 10. 13.

(30) Elsőbbségi adatok:

257 998 1988. 10. 14. US

282 328 1988. 12. 09. US

317 941 1989. 03. 02. US

376 555 1989. 07. 07. US

397 169 1989. 08. 21. US

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 89/04616

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/03980

(40) A közzététel napja: 1992. 05. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 10. 28. SZKV 93/10

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 7/02

C 07 K 7/08

C 07 K 7/06

C 07 K 7/10

C 07 K 7/30

(72) Feltalálók:

Coy, David H., New Orleans, Louisiana (US)

Moreau, Jacques-Pierre, Upton, Massachusetts (US)

Taylor, John E., Upton, Massachusetts (US)

Kim, Sun Hyuk, Chestnut Hill, Massachusetts (US)

(73) Szabadalmaz:

The Administrators of the Tulane Educational
Fund, New Orleans, Louisiana (US)

(74) Képviselő:

S.B.G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,
Budapest

(54)

Eljárás gyógyászati hatású peptidek előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya:

eljárás $A^1\text{-Gln-Trp-A}^4\text{-A}^5\text{-A}^6\text{-A}^7\text{-A}^8\text{-A}^9\text{-NHR}$ (I)
általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a
képletben

A^1 D-Phe, halogén-D-Phe, D-Nal vagy pGlu,

A^4 és A^5 egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile
vagy Nle,

A^6 Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val vagy D-Nle,

A^7 His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A^8 Phe, Gly, Ala, Leu, β -Leu, gamma-Leu, Ile, Val,
Sta vagy cSta,

A^9 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Phe vagy halogén-Phe,
vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogy ha
 A^4 kémiai kötéstől eltérő, az A^8 és A^9 között pep-
tidkötés CO-csoportja CH_2 csoporttá redukált for-
mában van jelen, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1-6 szénatomos al-
kilcsoport.

A találmány olyan terápiás hatású peptidekkel foglalkozik, melyeket jó- és rosszindulatú szövetburjánzások és gasztrointesztinális betegségek kezelésére alkalmazunk.

A kétéltűek pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ összetételű bombezinnal peptidje [Anastasi és munkatársai, *Experientia* 27: 166–167 (1971)] szoros rokonságban van az emlősök gasztrint felszabadító peptidjeivel (gastrin-releasing peptid, GRP), mint amilyen például az NH₂-Ala-, Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH₂) összetételű sertés GRP [McDonald és munkatársai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90: 227–233 (1979)] és a humán GRP, melynek összetétele, NH₂-Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Thr-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH₂). A bombezinnel kimutatták, hogy számos humán ráksejt-vonalnál növekedési faktor, így például a kis-sejtes tüdőráknál (small-cell lung carcinoma, SCLC), és a humán mell-, prosztataráknál [Haveman és munkatársai szerkesztésében: *Recent results in cancer research – Peptide hormones in Lung cancer*; Springer-Verlag, New York, 1988]. Sok ilyen ráknál ismert, hogy a GRP-vel vagy a bombezinnel rokon peptidhormonok kiválasztása történik. Következésképpen, a bombezinnal antagonistákról feltehető volt, hogy felhasználhatók ezeknek a rákoknak a kezelésére.

Cuttitta és munkatársai kimutatták, hogy a bombezinnel egy speciális monoklonális antitest in vivo gátolta a mezelen egérbe oltott humán kis-sejtes tüdőrák sejtjeit [Cuttitta és munkatársai, *Cancer Survey*, 4: 707–727 (1985)].

Az egérfélék 3T3 fibroblasztjainál, melyek érzékenyek a bombezinnel mitózist befolyásoló hatására, Zachary és Rozengurt megfigyelte, hogy a P-anyag (span-tide) bombezinnal-antagonistaként hat [Zachary és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82: 7616–7620 (1985)]. Heinz-Erian és munkatársai a bombezinnel 12. helyén lévő His-t D-Phe-vel cserélte ki, és e peptidnél bombezinnal-antagonista hatást tapasztalt tengerimalac hasnyálmirigyből származó diszpergált acinusoknál. [Heinz-Erian és munkatársai, *Am. J. of Physiol.*, 252: G 439–G 442 (1987)]. Rivier intramolekuláris diszulfid-híd beépítésével korlátozta a bombezinnal bioaktív C-terminális dekapeptid részének konformációs szabadságát, de ezzel a módosítással nem kapott olyan analógokat, amelyek antagonistát aktivitást mutattak volna [Rivier és munkatársai, „Competitive antagonist of peptide hormones”, *Abstracts of the International Symposium on bombezinnal-like peptides in health and disease*; Róma (1987. október)].

Rövidítések, kifejezések:

pGlu = piroglutaminsav (IV. képlet)

Nle = norleucin; NH₂-CH[-(CH₂)₃-CH₃]-COOH

Pal = 3-piridil-alanin

β-leu = β-homoleucin

γ-leu = gamma-homoleucin

D-Cpa = D-p-klór-fenil-alanin

cSta = ciklosztarin

HyPro = hidroxil-prolin

Nal = naftil-alanin

Sar = szarkozin

5 Sta = sztatin; (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metil-heptán-sav, (II. képlet)

AHPPA = (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-5-fenil-pentán-sav

10 ACHPA = (3S,4S)-4-amino-5-ciklohexil-3-hidroxi-pentán-sav

R = D-konfiguráció (jobb)

S = L-konfiguráció (bal)

racemát = R és S azonos arányú keveréke

15 1-metil-His, 3-metil-His = az 1-es vagy 3-as helyű nitrogénatomon metilcsoportot viselő hisztidin (III. képlet).

A találmány tárgya eljárás olyan lineáris (azaz nem ciklusos) peptid előállítására, mely aktív helyel, a célsejt receptorához kötődésért felelős kötőhellyel rendelkező, a természetes peptidek aktív helyén egy, az in vivo biológiai aktivitást nem befolyásoló felszakított peptidkötésű természetes, bioaktív kétéltű-bombezinnel vagy az emlősök gasztrint felszabadító peptidjeinek (GRP) analógja, melyre az alábbi módosítások egyike jellemző:

20 a) az aktív hely egyik aminosavjának kiesése és egy másik megváltoztatása az aktív helyen kívül;

b) egy vagy két aminosav szintetikus aminosavval való helyettesítése az aktív helyen.

30 Az analóg a természetes peptidnek kompetitív inhibitora, minthogy megkötődik a receptoron, de – a módosításoknak köszönhetően – nem rendelkezik a természetes peptidek in vivo biológiai aktivitásával.

35 A természetes peptidek aktív helyének meghatározásával határozhatjuk be azokat a helyeket, ahol a módosításokat el kell végezni, hogy antagonistákat nyerjünk. Így például azoknál a peptideknél, ahol az aktivitás az aminosavlánc C-terminálisának két aminosavjához kapcsolódik, antagonistát hatást érhetünk el vagy

40 azt fokozhatjuk olyan lineáris peptidnél, ahol a két aminosav közé egy nem-peptidkötést viszünk be, vagy a két természetes aminosavat szintetikus β- vagy gamma-aminosavval helyettesítjük vagy a C-terminális aminosavakat kiejtjük („dez”). Ezért, ha a természetes

45 peptid aktív helye a C-terminális előnyösen legalább egy aminosavát tartalmazza, a találmány szerinti lineáris peptid is tartalmazza a peptid karboxilcsoportos felében azt az aminosavat. Hasonlóképpen, ahol a természetes peptid amino-terminális részén van az aktív

50 hely, a találmány szerinti megfelelő analóg az amino-terminális részen módosított.

Előnyös megvalósítási módnál az aktív hely magában foglalja a természetes, bioaktív peptid karboxil-terminális részének legalább egy aminosavját, ez az aminosav a lineáris peptid karboxil-terminális részében található.

55 Egy másik előnyös megvalósítási módnál, ahol az aktív hely a természetes, bioaktív peptid amino-terminális részének legalább egyik aminosava, ez az aminosav a lineáris peptid amino-terminális felében található.

A módosításokat végezhetjük a receptor kötőhelyen, vagy más, nem-kötő helyen. Előnyös, ha az analógok homológitása a természetes peptidekkel legalább 25%-os, még előnyösebb, ha legalább 50%-os.

A találmány tárgya tehát eljárás

A^1 -Gln-Trp- A^4 - A^5 - A^6 - A^7 - A^8 - A^9 -NHR (I)

általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A^1 D-Phe, halogén-D-Phe, D-Nal vagy pGlu

A^4 és A^5 egymástól függetlenül Gyl, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A^6 Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val vagy D-Nle,

A^7 His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A^8 Phe, Gly, Ala, Leu, β -Leu, gamma-Leu, Ile, Val, Sta vagy cSta,

A^9 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Phe vagy halogén-Phe, vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogyha A^4 kémiai kötéstől eltérő, az A^8 és A^9 között peptidkötés CO-csoportja CH_2 csoporttá redukált formában van jelen, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport.

A találmány szerint úgy járunk el, hogy a fenti (I) általános képletnek megfelelő peptidet, mely legalább egy, a peptidkémiaiában ismert védőcsoportot tartalmaz, és/vagy valamely gyantához kapcsolódik, védőcsoport-hasításnak vetünk alá és/vagy lehasítunk a gyantáról, és kívánt esetben egy keletkezett peptidet sójává alakítunk.

Előnyösek azok az (I) általános képletű peptidek, ahol

A^1 pGlu, D-Phe, β -D-Nal vagy D-Cpa,

A^4 jelentése Ala,

A^5 jelentése Val,

A^6 jelentése Gly vagy D-Ala,

A^7 jelentése His,

A^8 jelentése Leu, β -Leu, Phe vagy Sta,

A^9 kémiai kötés, és

R jelentése hidrogénatom.

E fenti vegyületcsoport közül különösen előnyös a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-sztatin-amid, és a D-p-Cl-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His- β -Leu-NH₂.

Ugyancsak előnyösek az olyan (I) általános képletű peptidek, ahol

A^1 pGlu, D-Phe, β -D-Nal vagy D-Cpa,

A^4 jelentése Ala,

A^5 jelentése Val,

A^6 jelentése Gly vagy D-Ala,

A^7 jelentése His,

A^8 jelentése Leu, Phe vagy cSta,

A^9 Leu vagy Phe,

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport, és az A^8 és A^9 közötti CO-csoport redukált.

E vegyületcsoporton belül előnyösek azok az (I) általános képletű peptidek, ahol

A^1 jelentése β -D-Nal és A^8 és A^9 jelentése egymástól függetlenül Leu vagy Phe.

Különösen előnyös e vegyületek közül a β -D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂-NH)Leu-NH₂, és a β -D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂-NH)Phe-NH₂.

[A képletben a redukált peptidkötést ψ jellel ábrázoljuk, például (CH₂NH)].

Ugyancsak előnyösek az olyan (I) általános képletű peptidek, ahol

5 A^1 pGlu, D-Phe, β -D-Nal vagy D-Cpa,

A^4 jelentése Ala,

A^5 jelentése Val,

A^6 jelentése Gly vagy D-Ala,

A^7 jelentése His,

10 A^8 jelentése Leu vagy Phe,

A^9 jelentése közvetlen kötés, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport.

Csoporton belül előnyösek az olyan (I) általános képletű peptidek, ahol

15 A^8 jelentése Leu.

E csoporton belül előnyös vegyület a

D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-etil-amid, és a

D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂.

20 E terápiás peptidek közül a legelőnyösebb: D-pCl-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)Phe-NH₂.

Előnyös, ha az itt leírt terápiás hatású peptidek aminosav-sorrendje legalább 25%-ban homológ a természetes peptidek aminosav-sorrendjével; még előnyösebb, ha a homológia legalább 50%-os.

[A képletben a redukált peptidkötést ψ jellel ábrázoljuk, ψ (CH₂NH)].

A találmány szerinti antagonisták alkalmasak olyan rosszindulatú vagy jóindulatú sejtburjánzások, a rák

30 minden olyan formájának kezelésére, ahol a bombeszinnel vagy GRP-vel rokon anyagok antokrin vagy parokrin mitotikus faktorként hatnak. A keletkező betegségek például: a gasztrointesztinális rendszer rákjai, hasnyálmirigyrák, vastagbélrák, tüdőrák – különösen a

35 kissejtes altípus –, mellrák, arterioszklerózis, a gyomorbél-rendszer gasztrint és pankreatint elválasztó, valamint mozgó szövetek a megbetegedése, például amelyik az amiláz elválasztás felfüggesztését okozza, vagy ami az étvágyérzet szabályozásával kapcsolatos.

40 Az α -aminosav meghatározó csoportja az az atom vagy atomok csoportja, ami ahhoz az aszimmetriás α -szénatomhoz kapcsolódik, melyhez az α -aminocsoport nitrogénatomja, az α -karbonilcsoport szénatomja vagy a hidrogénatom is kapcsolódik. Így például a

45 meghatározó csoport az alaninnál a CH₃, a valinnál a (CH₃)₂CH, a lizinnél H₃N⁺(CH₂)₄, a fenil-alaninnál a (C₆H₅)CH₂ csoport. A β - vagy gamma-aminosavaknál a meghatározó csoport az az atom vagy atomok csoportja, ami a β -, illetve gamma-szénatomhoz kapcsolódik.

50 Ahol a meghatározó csoport egy aminosavnál nincs jellemezve, az lehet α , β vagy gamma-helyzetű.

A találmány szerinti peptidek mindegyikének van egy nem-peptid kötése a feltüntetett helyek legalább egyikén, kivéve a sztannal helyettesített analógokat, mint például a sta⁸-desLeu⁸-Met⁹ litorin. A nem-peptid kötésen azt értjük, hogy a két aminosav közötti kötésben részt vevő szénatomnál a karboxilcsoport metilén-csoporttá redukált. A peptidkötés redukációjának módszerét Coy és munkatársai írják le a 879 348 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés-

ben. A peptid még aktív, ha a litorin antagonistánál hiányzik a 0, 1, 2 és 9 helyű bármelyik aminosav.

A találmány szerinti peptidek gyógyászati szempontból elfogadható só állapotában is lehetnek. Ilyen sók képezhetnek például az alábbi szerves, illetve szervetlen savakkal: ecetsav, tejsav, maleinsav, citromsav, almasav, aszkorbinsav, borostyánkősav, benzoosav, szalicilsav, metánszulfonsav, toluolszulfonsav, pamoionsav, csersav, karboxi-metil-cellulóz, halogénsavak – például sósav, kénsav, foszforsav.

A pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ -(CH₂NH)Leu-NH₂ litorin antagonistát az alábbiak szerint állítjuk elő (e módszer megfelelő módosításával szintetizáljuk más bombezin, litorin, neuromedin vagy GRP antagonistákat is):

Első lépésként a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His(benzil-oxi-karbonil)-Leu- ψ -(CH₂NH)Leu-benzhidril-amin-gyanta köztiterméket készítjük el.

0,97 g (0,5 mmól) klorid-ionos formában lévő benzhidril-amin-polisztirol gyantát (Vega Biochemicals, Inc.) teszünk a Beckman 990B peptid szintetizátor reakcióedényébe, és a szintetizátort a következő reakcióciklusokra programozzuk be: (a) metilén-klorid, (b) 33%-os trifluor-ecetsav (TFA) metilén-kloridban (mindegyik kétszer; 1, illetve 25 perc), (c) metilén-klorid, (d) etanol, (e) metilén-klorid és (f) 10% trietil-amin kloroformban.

A semlegesített gyantát 1,5 mmól α -terc-butoxi-karbonil (Boc)-leucinnal és 1,5 mmól diizopropil-karbodiimiddel kevertetjük metilén-kloridban 1 órán át és a kapott aminosavas gyantát a fenti (a)–(f) ciklusú mosásnak vetjük alá. 1,25 mmól Boc-leucin aldehidet [előállítva Fahrentz és Castro módszerével, Synthesis 576. old. (1983)] feloldunk 5 ml száraz dimetil-formamidban (DMF), és hozzáadjuk a gyanta trifluor-ecetsavas só szuszpenziójához, majd 100 mg (2 mmól) nátrium-ciánbór-hidridet adunk hozzá [Sasaki és Coy, Peptides 8: 119–121 (1987); Coy és munkatársai, ugyanott]. Egyórás kevertetés után a gyantakeverék ninhidrin-negatív (1 perces), jelezve, hogy megtörtént a származékképzés valamennyi szabad aminosocsoporton.

1,5 mmól diizopropil-karbodiimid jelenlétében egymást követően az alábbi aminosavakat (1,5 mmól) kapcsoljuk fel, az aminosav-gyanta rendszert a fenti (a)–(f) mosó/deblokkoló lépéseknek alávetve: Boc-His (benzil-oxi-karbonil), Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Trp, Boc-Gln (6M feleslegben alkalmazott p-nitro-fenil-észterként felkötve) és pGlu. A kész gyantát metanollal mossuk és levegőn szárítjuk.

1,6 g (0,5 mmól) fenti gyantát 5 ml anizollal és 35 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kevertetjük 0 °C hőmérsékleten 45 percen át. Száraz nitrogénáramban gyorsan eltávolítjuk a hidrogén-fluoridot és a szabad peptidet lecsapjuk és éterrel mossuk. A nyers peptidet 2 M ecetsav minimális térfogatában oldjuk és 2×5×100 mm méretű Sephadex G–25 gyantaoszlopon engedjük át. (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.).

A frakciókat, melyek az UV elnyelés és a vékonyréteg-kromatográfia szerint a főkomponenst tartalmazza, összegyűjtjük, kis térfogatra bepároljuk és

2,5×50 cm méretű oktadecil-szilán-szilikagéllal töltött (Whatman LRP-1, 15–20 μ m) oszlopra visszük.

A peptidet lineáris gradienselúcióval oldjuk le; az eluens: 0–30% acetonitril és 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó víz. A frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával és HPLC-vel analizáljuk és összegyűjtjük a maximális tisztaságra törekedve. Ismételt fagyaszttva szárítás után 60 mg terméket kapunk fehér, pelyhes por alakjában.

10 A termék a HPLC és a vékonyréteg-kromatográfiai vizsgálatok szerint homogén. A savas hidrolizátum aminosav-analízise megerősíti a peptid várt összetételét. A Leu ψ (CH₂NH)Leu kötési „fast atom bombardment” tömegspektrometriával bizonyítjuk.

15 A pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe ψ (CH₂NH)-Leu-NH₂ és a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ -(CH₂NH)Leu-NH₂, valamint más peptideket hasonló eredménnyel, analóg módon állítjuk elő a fenti módszer megfelelő módosításával.

20 A D-Phe¹, Leu⁸ ψ (CH₂NH)D-Phe⁹-litorin, D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)D-Phe-NH₂ szilárd fázisú szintézise az alábbiak szerint történik:

Először Boc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His(tozil)-Leu ψ (CH₂NH)-D-Phe-benzhidril-amin-gyantát szintetizálunk.

25 1,25 g (0,5 mmól) kloridionos állapotban lévő benzhidril-amin-polisztirol gyantát (Advanced Chem-Tech. Inc.) helyezünk az Advanced ChemTech. ACT 200 peptid szintetizátorba és a fenti (a)–(f) reakciólépéseket programozzuk be.

30 A semlegesített gyantát 1,5 mmól Boc-D-fenil-alaninnal és 1,5 mmól diizopropil-karbodiimiddel kevertetjük metilén-kloridban egy órán át, majd a nyert aminosavas gyantát a mosó program fenti (a)–(g) lépésének vetjük alá. Ezután trifluor-ecetsavas kezeléssel eltávolítjuk a Boc-csoportot 1,25 mmól, Fehrents és Castro módszerével (lásd fentebb) előállított Boc-Leucin-aldehidet feloldunk 5 ml száraz dimetil-formamidban és hozzáadjuk a gyanta trifluor-ecetsavas sójának szuszpenziójához, majd 100 mg (2 mmól) nátrium-ciánbór-hidridet (l. fentebb) adunk a szuszpenzióhoz. Egyórás keverés után a gyantakeverék ninhidrin negatív (1 perces reakció), jelezve, hogy valamennyi szabad aminosocsoporton megtörtént a származékképzés.

45 Ugyanezzel a módszerrel az aminosavakat (mindegyik 1,5 mmól) az alábbi sorrendben kötjük fel: Boc-His(benzil-oxi-karbonil), Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Trp, Boc-Gln (1 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzotriazol jelenlétében kötve fel), Boc-D-Phe (1 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzo-triazol jelenlétében kötve fel). Szárítás után a peptides gyanta súlya 1,93 g.

50 Az 1,93 g (0,5 mmól) gyantát 5 ml anizollal és 35 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kevertetjük 0 °C hőmérsékleten 45 percen keresztül. A hidrogén-fluorid felesleget gyorsan elpároljuk száraz nitrogéngáz áramban és a szabad peptidet lecsapjuk és éterrel mossuk. A nyers peptidet 2 M ecetsav minimális térfogatában oldjuk és egy 2,5×100 mm méretű Sephadex G–25 gyan-

taoszlopon engedjük át. Az UV elnyelés és a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok szerint a főterméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, kis térfogatra bepároljuk és egy 2,5×50 cm méretű Vydac oktadecil-szilános szilikagéllal (15–20 μm) töltött oszlopra visszük, amit lineáris gradienssel eluálunk. A lineáris gradienst az eluens: 15–45% acetonitril 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó vízben. A frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával és HPLC analízissel vizsgáljuk és úgy gyűjtjük össze, hogy a maximális tisztaságot érjük el. Vízből ismételt fagyasztva szárítás után 120 mg terméket kapunk fehér, pelyhes por alakjában.

Más peptideket, például a D-p-Cl-Phe-Glu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-D-Phe-NH₂ képletű peptidet is előállíthatunk lényegében ugyanazzal a módszerrel.

A Leu⁸ψ(CH₂NH)D-Phe⁹-litorin szintézise:

Először Boc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His(tolil)-Leuψ(CH₂NH)-D-Phe-benzhidril-amin-gyantát szintetizálunk.

1,25 g (0,5 mmól) kloridionos állapotban lévő benzhidril-amin-polisztirol gyantát (Advanced Chem-Tech. Inc.) helyezünk az Advanced ChemTech. ACT 200 peptid szintetizátorba és a fenti (a)–(f) reakciólépéseket programozzuk be.

A semlegesített gyantát 1,5 mmól Boc-D-fenil-alaninnal és 1,5 mmól diizopropil-karbodiimiddal kevertetjük metilén-kloridban egy órán át, majd a nyert aminosavas gyantát a mosó program fenti (a)–(g) lépésének vetjük alá. Ezután trifluor-ecetsavas kezeléssel eltávolítjuk a Boc-csoportot 1,25 mmól, Fehrentz és Castro módszerével (lásd fentebb) előállított Boc-Leucin-aldehidet feloldunk 5 ml száraz dimetil-formamidban és hozzáadjuk a gyanta trifluor-ecetsavas sójának szuszpenziójához, majd 100 mg (2 mmól) nátrium-cian-bór-hidridet (l. fentebb) adunk a szuszpenzióhoz. Egy órás keverés után a gyantakeverék ninhidrin negatív (1 perces reakció) jelezve, hogy valamennyi szabad aminosoporton megtörtént a származékképzés.

Ugyanazzal a módszerrel az aminosavakat (mind-egyik 1,5 mmól) az alábbi sorrendben kötjük fel: Boc-His(benzil-oxi-karbonil), Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Trp, Boc-Gln (1 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzotriazol jelenlétében kötve fel), Boc-D-Phe (1 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzo-triazol jelenlétében kötve fel). Szárítás után a peptides gyanta súlya 1,93 g.

Az 1,93 g (0,5 mmól) gyantát 5 ml anizollal és 35 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kevertetjük 0 °C hőmérsékleten 45 percen keresztül. A hidrogén-fluorid felesleget gyorsan elpároljuk száraz nitrogéngáz áramban és a szabad peptidet lecsapjuk és éterrel mossuk. A nyers peptidet 2 M ecetsav minimális térfogatában oldjuk és egy 2,5×100 mm méretű Sephadex G-25 gyan-taoszlopon engedjük át. Az UV elnyelés és a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok szerint a főterméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, kis térfogatra bepároljuk és egy 2,5×50 cm méretű Vydac oktadecil-szilános szilikagéllal (15–20 μm) töltött oszlopra visszük,

amit lineáris gradienssel eluálunk. A lineáris gradienst az eluens: 15–45% acetonitril 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó vízben. A frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával és HPLC analízissel vizsgáljuk és úgy gyűjtjük össze, hogy a maximális tisztaságot érjük el. Vízből ismételt fagyasztva szárítás után 120 mg terméket kapunk fehér, pelyhes por alakjában.

A termék a HPLC és vékonyréteg-kromatográfiás analízisek szerint homogén. A savas hidrolizátum aminosavösszetétele megfelel az oktapeptid aminosavösszetételének. A Leuψ(CH₂NH) peptidkötés jelenlétét a „fast atom bombardment” tömegspektrometriával bizonyítjuk.

A D-Phe¹-Des-Met⁹-litorin szintézise:

A D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂ peptid szilárdfázisú szintézisét az alábbiak szerint végezzük:

(1) lépés:

0,62 g (0,25 mmól) kloridionos állapotban lévő benzhidril-amin-polisztirol gyantát (Advanced Chem. Toh, Inc.) töltünk az ACT 200 peptidszintetizátor reakcióedényébe és a következő reakcióciklust programozzuk be: (a) metilén-klorid, (b) 33% trifluor-ecetsav metilén-kloridban (mindegyik kétszer, 1 és 25 perces idővel), (c) metilén-klorid, (d) etanol, (e) metilén-klorid, (f) 10%-os trietil-amin kloroformban.

A semlegesített gyantát 1,5 mmól Boc-leucinnal és 1,5 mmól diizopropil-karbodiimiddal kevertetjük metilén-kloridban egy órán át. Az aminosavas gyantát a fenti (a)–(g) lépésekből álló mosóprogramnak vetjük alá. Ezt követően mindegyik aminosavból 1,5 mmólt alkalmazva az alábbi sorrendben kötjük fel az aminosavakat ugyanezzel a módszerrel. Boc-His(benzil-oxi-karbonil), Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Trp, Boc-Gln (6 M p-nitro-fenil-észterként feleslegben alkalmazva) és pGlu (hidroxibenzotriazol jelenlétében felkötve). Szárítás után a peptides gyanta súlya 0,92 g.

(2) lépés:

A 0,92 g gyantát 5 ml anizollal, 200 mg ditio-treitolal és 35 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kevertetjük 0 °C hőmérsékleten 45 percen át. A hidrogén-fluorid felesleget gyorsan elpároljuk száraz nitrogén-áramban, a szabad peptidet lecsapjuk és éterrel mossuk. A nyers peptidet 2 M ecetsav minimális térfogatában oldjuk és egy 2,5×100 mm méretű Sephadex G-25 oszlopon eluáljuk.

Az UV elnyelés és a vékonyréteg-kromatográfiás analízis szerint a főterméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, kis térfogatra pároljuk és egy 2,5×50 cm méretű Vydac oktadecil-szilán (10–15 μm) oszlopra visszük. Az oszlopra vitt anyagot lineáris gradienssel eluáljuk, amire eluensként 0–30% acetonitrilt és 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó vizet használunk. A frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáljuk és a maximális tisztaságra törekedve összegyűjtjük. Az oldat vízből való ismételt fagyasztva szárítással fehér, pelyhes port kapunk. Ez a termék a HPLC és a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok szerint homogén.

A peptid savas hidrolizátumának aminosav-analízisével nyert eredmény a vártak megfelelő.

A D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂ peptid szintézisét a fenti eljárással végezhetjük el.

Az N-acetil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂ szintézisét ugyancsak a fent leírt módon hajtjuk végre az első lépésben 0,62 g (0,25 mmól) benzhidril-amino gyantát használva és a második lépésben a 0,92 g gyantát anizollal kevertetve, azzal a különbséggel, hogy az eljárás végén a Boc csoportot eltávolítjuk és a gyantát metilén-kloridban ecetsav-anhidriddel acetilezzük.

A Sta⁸-Des-Met⁹-litorin szintézise:

A peptid bármely két aminosavja, ahol a peptid csak peptidkötéseket tartalmaz, helyettesíthető sztatinnal, AHPPA-val vagy ACHPA-val. Így például a Sta⁸-Des-Met⁹-litorin analóg módon szintetizálható először sztatint kötve a gyantához, majd folytatva a Boc-His(benzil-oxi-karbonil) hozzáadásával. A sztatint vagy Boc-sztatint az alábbi eljárások szerint állíthatjuk elő: Rich és munkatársai, *J. Org. Chem.*, 43: 3624 (1978); Rich és munkatársai, *J. Med. Chem.*, 23: 27 (1980). Az AHPPA és az ACHPA szintéziséhez módszert ad meg: Hui és munkatársai, *J. Med. Chem.*, 30: 1287 (1987), Schuda és munkatársai, *J. Org. Chem.*, 53: 873 (1988) és Rich és munkatársai, *J. Org. Chem.*, 53: 869 (1988).

A p-Glu-Glu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-NH₂ összetételű BIM-26 120 peptid szilárdfázisú szintézise az alábbi eljárás szerint történik. Elsőként α-terc-butoxi-karbonil-sztatint [előállítva Rich és munkatársai szerint; *J. Org. Chem.*, 43: 3624, (1978)] kötünk a metil-benzhidril-amin-polisztirol gyantához. Acetilezés után a p-Glu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-(benzil-oxi-karbonil)-Sta-metil-benzhidril-amin-gyanta köztitermékét állítjuk elő. A szintézis a következőképpen történik:

(1) Az α-terc-butoxi-karbonil-sztatint hozzákötése a metil-benzhidril-amin-gyantához: 1,0 g (0,73 mmól) kloridion formában lévő metil-benzhidril-amin-polisztirol gyantát (Vega Biochemicals, Inc.) teszünk a Vega 250C Coupler peptidszintetizátor reakcióedényébe. A szintetizátort az alábbi lépésekre programozzuk be:

(a) metilén-klorid, (b) 10%-os trietil-amin kloroformban, (c) metilén-klorid, (d) dimetil-formamid.

A semlegesített gyantát 18 órán át kevertetjük az előzőleg 1,46 mmól α-terc-butoxi-karbonil-sztatinnal, 2 mmól diizopropil-karbodiimiddal és 1,46 mmól hidroxibenzotriazol-hidráttal dimetil-formamidban 0 °C hőmérsékleten, egyórás reakcióidővel előállított aktív észterrel. A keletkezett aminosavas gyantát a szintetizátorban mossuk dimetil-formamiddal, majd metilén-kloriddal. A Kaiser-féle ninhidrin teszt (5 perc) szerint ekkor a sztatint gyantához való kapcsolódása 84%-os.

Az acetilezést úgy végezzük, hogy az aminosavas gyantát 15 percen át 5 mmól N-acetilimidazollal kevertetjük metilén-kloridban. A Kaiser-féle ninhidrin teszt szerint (5 perc) a szabad aminosavakokon a származékképzés 94–99%-os. A Boc-sztatinnal gyantát ezután metilén-kloriddal mossuk.

(2) A többi aminosav felkötése:

A peptidszintetizátort a következő reakciólépésekre programozzuk: (a) metilén-klorid, (b) 33%-os trifluor-ecetsav (TFA) metilén-kloridban (mindkettő kétszer 5 és 25 perccel), (c) metilén-klorid, (d) izopropil-alko-

hol, (e) 10% trietil-amin kloroformban és (f) metilén-klorid.

Diizopropil-karbodiimiddal (4 mmól) vagy diizopropil-karbodiimiddal és hidroxibenzotriazol-hidráttal (1,47 vagy 0,73 mmól) az aminosavakat (2,19 mmól) az alábbi sorrendben kapcsoljuk fel, a peptides gyantát a szintetizátorban dimetil-formamiddal, majd metilén-kloriddal mosva és a mosó és deblokkoló (a)–(f) beprogramozott lépéseknek alávetve: Boc-His(benzil-oxi-karbonil) (2 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzotriazol jelenlétében felkötve), Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Ala és Boc-Trp (hidroxibenzotriazol aktív észtereként felkötve, amit 1 ekvivalens mennyiségű hidroxibenzotriazol-hidráttal állítunk elő 0 °C hőmérsékleten egyórás reakcióidővel), Boc-Gln és pGlu (ugyancsak az előzetesen elkészített hidroxibenzotriazol aktív észtereként felkötve, amit 1 ekvivalens hidroxibenzotriazol-hidráttal állítunk elő 0 °C hőmérsékleten, egyórás reakcióidővel). A teljes peptidet hordozó gyantát metanollal mossuk és levegőn szárítjuk.

A fenti 1,60 g (0,73 mmól) peptides gyantát 2,5 ml anizollal, 50 mg ditionitrozzal és 30 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kevertetjük 0 °C hőmérsékleten egy órán át. A hidrogén-fluorid felesleget gyorsan elpárologtatjuk száraz nitrogéngáz áramban, a szabad peptidet lecsapjuk és éterrel mossuk. A nyers peptidet 100 ml 1 M ecetsavban oldjuk és az oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk. A nyers peptidet minimális mennyiségű metanol/víz, 1 : 1 elegyben oldjuk és tízszeres térfogatú etil-acetátban eldörzsöljük.

A triturált peptidet egy 9,4 mm×50 cm méretű okta-decil-szilán-szilikagél oszlopra (Whatman Partisil 10 ODS-2 M9) visszük. A peptidet lineáris gradienselűcíóval eluáljuk az oszlopról. A lineáris grádiens 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó vízben állítjuk elő a 0,1% trifluor-ecetsav/acetonnitril 20 : 80 arányú elegyének 20%-ról 80%-ra való emelésével. A frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával és HPLC analízissel vizsgáljuk és a maximális tisztaságra törekedve gyűjtjük össze. Az oldatnak vízből való fagyasztva szárításával 77 mg terméket nyerünk fehér, pelyhes por alakjában.

A fenti módszerrel állítottuk elő például az alábbi vegyületeket, melyek molekulatömegét gyorsatom bombázásos tömegspektroszkópiával (FAB-MC) határoztuk meg:

	vegyület	FAB-MS
50	p-Glu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-ψ(CH ₂ NH)-Leu-NH ₂	1054
	p-Glu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)-Leu-NH ₂	1015
55	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)-Leu-NH ₂	1055
	D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)-Leu-NH ₂	1105
	D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)-Phe-NH ₂	1140

vegyület	FAB-MS
D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ (CH ₂ NH)-Phe-NH ₂	1090
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ (CH ₂ NH)-Cpa-NH ₂	1124
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ (CH ₂ NH)-D-Phe-NH ₂	1140
p-Glu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-NH ₂	965
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH ₂	956
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH(C ₂ H ₅)	981
p-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Sta-NH ₂	1015
D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His- β -Leu-NH ₂	1005

A peptidek agonista vagy antagonistá hatását az alábbi vizsgálati módszerek szerint vizsgáljuk.

1. vizsgálat – 3T3 peptid által stimulált (³H) timidin felvétel.

Sejtkultúra: A Swiss 3T3 sejtek törzskultúráját Dulbecco-féle módosított Eagles táptalajon (DMEM) növesztjük ki, mely táptalajt még kiegészítjük 10% borjúembrió-szérummal. A tenyésztés 37 °C hőmérsékleten történik 10% széndioxid, 90% levegő összetételű nedves gáztérben. A kísérlethez a sejteket 24 lyukas tittertálcákra oltjuk le, és a táptalaj utolsó cseréje után négy nappal használjuk fel. A sejteket a sejtciklus G1/G0 gázisában használjuk fel, a tápközegüket szérumentes DMEM-re lecserélve 24 órával a timidin-felvétel-teszt előtt.

A DNS szintézis vizsgálata: A sejteket kétszer 1 ml szérumentes DMEM közeggel mossuk, majd 1 ml szérumentes DMEM közegben inkubáljuk, mely 0,5 μ M (metil-³H) timidint (20 Ci/mmól New England Nuclear) 3 nM bombezint és 1, 10, 100 vagy 1000 nM vizsgálendő vegyületet tartalmaz. A sejteket 2x1 ml jéghideg 0,9%-os nátrium-klorid oldattal mossuk, a savoldékony radioaktivitást eltávolítjuk 4 °C hőmérsékleten végzett, 5%-os triklór-ecetsavban történő inkubálással. A kultúrát egyszer 1 ml 95%-os etanollal mossuk, és 30 perccel át inkubáljuk 1 ml 0,1 n nátrium-hidroxid-oldatban. A beoldódott anyagot csövekbe visszük át, melyek 10 ml ScintA (Packard) közeget tartalmaznak. A radioaktivitást likvid-szcintillációs spektrométerrel határozzuk meg.

2. vizsgálat – Kis-sejtes karcinóma (SCLC)-bombezint által stimulált (³H) timidin-felvétel-teszt.

Sejtkultúra – NCI-H69 humán sejt karcinóma sejtvoalat (American Type Culture Associationtól beszerezve) 10% borjúembrió-szérummal kiegészített RPMI 1640 közegben tartjuk fenn 10% széndioxidot, 90% levegőt tartalmazó gáztérben, 37 °C hőmérsékleten. 24 órával a vizsgálatok előtt, a sejteket szérumentes közeggel mossuk és 24 lyukas titterlemezekre oltjuk be.

DNS szintézis – 1 nM bombezint, 0,5 μ M (metil-³H)-timidint (20 Ci/mmól, New England Nuclear) és 1, 10, 100 vagy 1000 nM vizsgálendő anyagot adunk a tenyészetekhez, hogy a végső térfogat 0,5 ml legyen. 28 óras, 37 °C hőmérsékleten történő inkubálás után a

sejteket GF/B üvegszálás szűrőkön gyűjtjük össze, és a DNS-t jéghideg triklór-ecetsavval kicsapjuk. A savoldhatatlan DNS frakcióba beépült (³H) timidint likvid-szcintillációs spektrometriával mérjük meg.

5 3. vizsgálat – Peptid által indukált hasnyálmirigy-gyulladás.

A kísérletekhez 250 g súlyú hím Sprague–Dawley patkányokat használunk. 15 perccel a bombezint injektálása előtt szubkután adjuk be a vizsgálandó vegyületet vagy a 0,9%-os nátrium-klorid oldatot. A bombezint 10 μ g/kg dózisban szubkután injektáljuk és vérmintákat veszünk 1,5, 3 és 6 óra múlva. A plazma amiláz-tartalmát Pantrak amiláz-tesztel határozzuk meg.

15 4. vizsgálat – A (¹²⁵J) gasztrint felszabadító peptid (GRP) bombezintreceptorokhoz kötődésének in vitro gátlása.

Különböző szövetekből (patkányagy, patkányhasnyálmirigy, patkány-agyalapimirigy, SCLC, 3T3 sejtek) membránt preparálunk oly módon, hogy a szövetet 0,1% borjúsérumalbumint és 0,1 mg/ml bacitracin tartalmazó 50 mM TrisHCl-ben homogenizáljuk, kétszer centrifugáljuk (39 000 g, 15 perc, 4 °C), a centrifugátok között friss pufferben szuszpendálva az üledéket. 0,8 ml kivétet 0,5 nM (¹²⁵J)GRP-vel (2000 Ci/mmól; Amersham Corp.) és különböző koncentrációban lévő vizsgálendő anyaggal inkubáljuk 0,5 ml végső térfogatban. 30 perccel 4 °C hőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót gyorsan leállítjuk azáltal, hogy a szuszpenziót gyorsan átszűrjük egy Whatman GF/C szűrőn, amit előzőleg 0,3%-os vizes polietilén-iminben áztattunk, hogy csökkentjük a nem-specifikus megkötődést. A szűrőket és a csöveket háromszor 4 ml jéghideg pufferrel mossuk és a szűrőn maradt radioaktivitást gamma-spektrometriával megmérjük. A specifikus kötődést úgy határozzuk meg, hogy az összes (¹²⁵J) GRP-ből kivonjuk azt, ami 1000 nM bombezint jelenlétében megkötődött.

5. vizsgálat – A gasztrin felszabadulás gátlása

Elaltatott patkányok gyomrán gyomorszáj kanülön keresztül sóoldatot öblítünk át, amit 15 perccel inkubálunk. A vizsgálandó peptidet 0–150 perccel inkubálunk infuzáljuk az állatokba nyaki vénán keresztül.

6. vizsgálat – In vivo antitumor aktivitás

5 db összefüggő 75 cm² felületű szövettenyészetből NCI-H69 kis-sejtes tüdőrák sejtvoalatot transzplantálunk minden egyes állat tüdejének jobb lebenyébe. Az NCI-H69 sejteket sejtaggregátum szuszpenzióként in vitro tenyésztjük. A sejtaggregátumokat nem kísérletük meg fizikai vagy kémiai úton dezaggregálni. A tumor méretét a két átmérő átlagában adjuk meg milliméterben, vagyis:

hosszúság és szélesség

2

55

Számos olyan bombezint vagy GRP analógot megvizsgáltunk egy vagy több fent ismertetett 1–6 tesztel, amely nem-peptidkötést, sztatint, AHPPA-t vagy ACHPA-t tartalmaz. Az 1. és 2. teszt eredményeit az I.

60

táblázatban foglaljuk össze. Az I. táblázatban feltüntetjük a nem-peptid analógok képleteit, az (¹²⁵J) GRP in vitro kötődésének gátlását a 3T3 fibroblast bombezin receptoraihoz és a 3T3 sejt kultúrák bombezin-stimulálta (³H) timidin felvétel gátlását. A 3T3 GRP receptor és a timidin felvétel adatait nM-ben kifejezett IC₅₀ értékekben adjuk meg. A táblázat tartalmazza egy nem-peptidkötést tartalmazó természetes peptidnek, a Neuromedin C-nek az adatait is, mely peptid C-terminálisának hét aminosavja hasonló a bombezin és a GRP megfelelő szakaszának aminosavjaihoz. (Az I. táblázatban a „litorin” egy 9 tagú peptidanalógot vagy származékát, a „Neuromedin C” egy 10 tagú analógot vagy származékát jelöli).

Az I. táblázatban a nem-peptid kötést a ψ(CH₂NH) jelölés mutatja, azaz a ψ(CH₂NH) jelölés mindig előtte áll annak az aminosavnak, melynek aminocsoportja részt vesz a nem-peptid kötésben.

I. táblázat

Kódszám	Szerkezet	3T3 GRP timidin receptor IC ₅₀ (nM)	Timid felvétel IC ₅₀ (nM) felvétel	FAB-MS
BIM-26 092	Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Neuromedin C	242	466	
BIM-26 095	pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Litorin	2623	1209	
BIM-26 100	pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Litorin	23	26	1054
BIM-26 101	p-Glu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Litorin	118	296	1015
BIM-26 105	D-Ala-Asn-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leuψ(CH ₂ CH)Leu-NH ₂ Neuromedin C	107	107	
BIM-26 106	desGly-D-Ala-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Met-NH ₂ Neuromedin C	401	354	
BIM-26 107	D-Phe-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Neuromedin C	199	154	
BIM-26 108	N-Ac-D-Ala-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Neuromedin C	841	>1000	

Kódszám	Szerkezet	3T3 GRP timidin receptor IC ₅₀ (nM)	Timid felvétel IC ₅₀ (nM) felvétel	FAB-MS
BIM-26 113	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Litorin	5,8	9	1055
BIM-26 114	D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Leu-NH ₂ Litorin	23,5	28	1105
BIM-26 120	pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-NH ₂ Litorin	150	165	
BIM-26 122	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH ₂ Litorin	5,9	28,6	
BIM-26 136	D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH ₂ NH)Phe-NH ₂ Litorin	1,4	3,3	1140
BIM-26 182	D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-β-Leu-NH ₂ Litorin	0,88	4,77	

Az I. táblázatból látható, hogy előnyös, ha a nem-peptidkötés a litorin-analógok A⁸ és A⁹ tagjai között található. A két legaktívabb analóg (amit az alacsony GRP receptor IC₅₀ érték jelez) a BIM-26 100 peptid [Phe⁸ψ(CH₂NH)Leu⁹] és a BIM-26 101 [Leu⁸ψ(CH₂NH)Leu⁹].

Ezen túlmenően, mint az I. táblázat eredményei bizonyítják, a BIM-26 113 (D-Phe¹,Leu⁸ψ(CH₂NH)Leu⁹) peptid aktívnak bizonyult a 3T3 GRP receptor kötődés és a timidin felvétel tesztekben.

A legfigyelemreméltóbb, hogy a BIM-26 136 peptid (D-Nal¹,Leu⁸ψ(CH₂NH)Phe⁹) a leghatékonyabb analóg, amelyik az amino és karboxil végén is aromás csoportot tartalmaz és ezáltal hidrofób kapcsolatokra képes. Végül, ha a litorin A⁸ és A⁹ aminosavját sztatinnal vagy β-leucinnal helyettesítjük, a nyert BIM-26 120 és a BIM-26 182 analógok ugyancsak hatásos antagonisták.

Az I. táblázatban negatív eredményt mutató Neuromedin C analógokra is találunk példát, ilyen például a BIM-26 108. A használható antagonisták kiválasztásához a nem-peptidkötéssel való cserét a fent ismertetett rutin vizsgálatokkal együtt kell elvégezni.

A bombezin és a bombezin analógok gátolják az interleucin-2 (IL-2) hatását [Fink és munkatársai, Klin. Wochenschr., 66. Suppl. 13: 273 (1988)]. Minthogy az IL-2 a T-limfociták szaporodását idézi elő, lehetséges, hogy a litorin antagonisták megakadályozzák a bombezin vagy analógjainak IL-2-re gyakorolt hatását. Az IL-2 által stimulált limfociták képesek in vitro a kis-sejtes tüdőrák sejtjei hatékony lizálására. Miközben a bombezin antagonistáknak közvetlen sejt-sza-

porodásgátló hatásuk van a neoplasztikus szövetekre, kedvezően hathatnak a limfociták szaporodására, melyeknek lítikus hatása van a kis-sejtes tüdőrák sejtekre.

Ezek a megfigyelések serkentettek minket arra, hogy a 6. teszt alapján meghatározzuk a BIM-26 100 hatását az SCLC tumorsejtvonal in vivo növekedésére. Húsz csecsemőmirigy nélküli, 5–6 hetes nőstény meztelen egérbe a nulladik napon beültettünk NCI-H69 humán kis-sejtes tüdőkarinómát (SCLC), egyedenként azonosítjuk őket, majd véletlenszerűen szétosztjuk az alábbi kontroll és vizsgálati csoportokba:

csoport száma	kezelés	állatok száma
1.	sóoldatos vivőanyaggal kezelt kontrollállatok 2 ml; s. k. inf.; kétszer naponta, 28 napon át	10
2.	BIM-26 100 50 µg/inj.; s. k.; kétszer naponta, 28 napon át	5
3.	BIM-26 100 50 µg/inj.; s. k. inf.; kétszer naponta, 28 napon át	5

(s. k. – szubkután; inj. – injekált; inf. – infúzió).

Az NCI-H69 xenograft növekedését és a tumornövekedés BIM-26 100 [pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Pheψ(CH₂NH)Leu-NH₂] bombezin antagonistával történő gátlását az 1. ábrán, a relatív tumorméreteket a II. táblázatban mutatjuk be.

A BIM-26 100 tumorelles hatása nyilvánvaló, tekintettel az NCI-H69 tumorsejtek nagy mennyiségű inokulmára (állatonként 5 db 75 cm² összefüggő felületű sejt kultúra), és a sejtek agglomerált állapotára. A tenyészedényekben az NCI-H69 agglomerátumok makroszkopikusan láthatók és együtt egy metasztatizáló tumortelephez hasonlítanak. Sok ilyen tumortelepet ültettünk be állatonként. A BIM-26 100 dózist önkényesen választottuk ki

a vegyület hozzáférhetősége alapján és nem volt az optimális. Magasabb BIM-26 100 dózisokat is alkalmazhatunk, amire a testsúlygyarapodás utal (III. táblázat). A testsúlynál levonjuk a daganat súlyát. Ez azt mutatja, hogy a BIM-26 100-nak semmi toxikus hatása nincs sem az alkalmazás helyén, sem az egész szervezetre vonatkozólag, és gyógyászati célra felhasználható, mint egy tumorelles hatású növekedésgátló faktor.

A 3. ábra mutatja a D-p-Cl-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH₂NH)Phe-NH₂ bombezin-antagonista hatását a bombezin stimulálta amiláz kiválasztásra patkányoknál. Az eredmények azt mutatják, hogy ez az analóg hatásos antagonist. 5 nM analóg képes megakadályozni az 5 nM bombezin által kiváltott amilázválasztást.

A találmány szerinti peptideket az emlősöknek, főként azonban az embernek adhatjuk be a szokásos módok valamelyikével (szájon át, parenterálisan, bőrön keresztül, nyálkahártyán át) vagy elnyújtott felszabadulást biztosító készítményekben, melyeket biodegradatív biokompatibilis polimerekből készítenek vagy a célhelyre szállító készítményekkel (például a tüdőhöz) micellákat, géleket, liposzómákat alkalmazva.

A találmány szerinti bombezin-antagonisták alkalmazsak valamennyi olyan rák kezelésére, ahol a bombezinnel rokon anyagok autokrin vagy perakrin mitotikus ágensként hatnak, különösen a kis-sejtes tüdőkarinóma esetében. Ugyancsak alkalmazhatók a peptidek a gyomorsavszekréció gátlására, a gasztrointesztinális rendszer mozgási betegségeire, az exokrin hasnyálmirigy adenokarcinómájának kezelésére vagy a tünetek enyhítésére, kachexiás betegek étvágyának helyreállítására.

Embernek a peptidek napi 0,5 µg–5 mg/testsúlykilogramm dózisban adagolhatók. Némely ráknál, például a kis-sejt tüdőkarinómánál a kuratív kezelés előnyös dózisa napi 250 mg személyenként.

II. táblázat

A BIM-26 100 bombezin-antagonista in vivo tumorgátló aktivitása NCI-H69 humán sejtes tüdőrák esetében

kísérleti csoport száma	kezelés	tumorméret ^d 18. nap (mm)		tumorméret 28. nap (mm)	
		kezelt/kontroll%		kezelt/kontroll%	
1.	Vivőanyaggal kezelt kontroll 0,2 ml, sz. k., inf., kétszer naponta, 28 napon át	10,9 ± 1,82		15,9 ± 2,27	
2.	BIM-26 100, 50 µg/inj., sz. k., kétszer naponta, 28 napon át	10,1 ± 1,47	93	17,3 ± 1,96	108
3.	BIM-26 100, 50 µg/inj., sz. k., inf., kétszer naponta	7,6 ± 1,56**	70	13,7 ± 0,67*	86

^d A kontrollcsoportban 10 állatnál, a vizsgálati csoportnál 5 állatnál kapott átlagérték ± SD. A Student-féle SD a kontrolltól * p<0,05; ** p<0,01.

III. táblázat

A tumornövekedés és a BIM-26 100 kezelés hatása a testsúlyra: nincs toxicitás

kísérleti csoport száma	kezelés	testsúly (g) ^a 0. nap	testsúly (g) 18. nap	testsúly (g) 28. nap
1.	Vivőanyaggal kezelt kontroll, 0,2 ml, sz. k., inf., naponta kétszer, 28 napos kezelés	17,3	19,6	19,7
2.	BIM-26 100, 50 µg/inj., sz. k., naponta kétszer, 28 napos kezelés	16,9	19,2	19,1
3.	BIM-26 100, 50 µg/inj., sz. k., inf., naponta kétszer, 28 napos kezelés	17,7	20,4	21,1

^a A testsúlyadatok a kontrollcsoportban 10 állat, a vizsgálati csoportban 5 állat átlagértéke. A tumor súlyát levonjuk a testsúlyból. A tumor súlyát a két leghosszabb átmérő megméréseivel határozzuk meg, az ellipszoid alakú test térfogatából a súlyt mg-ban kifejezve: (hosszúság×szélesség 2/2) mg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás A¹-Gln-Trp-A⁴-A⁵-A⁶-A⁷-A⁸-A⁹-NHR (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe, D-Nal vagy pGlu,

A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A⁶ Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val vagy D-Nle,

A⁷ His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A⁸ Phe, Gly, Ala, Leu, β-Leu, gamma-Leu, Ile, Val, Sta vagy cSta,

A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Phe vagy halogén-Phe, vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogyha A⁴ kémiai kötéstől eltérő, az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy a fenti (I) általános képletnek megfelelő peptidet, mely legalább egy, a peptidkémiaiában ismert védőcsoportot tartalmaz, és/vagy valamely gyantához kapcsolódik, védőcsoport-hasításnak vetünk alá és/vagy lehasítunk a gyantáról, és kívánt esetben egy keletkezett peptidet sójává alakítunk. (Elsőbbsége: 1989. 10. 13.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe, β-D-Nal vagy pGlu,

A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A⁶ Gly vagy D-Ala,

A⁷ His,

A⁸ Phe, Gly, Ala, Leu, Ile vagy Val,

A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Phe vagy halogén-Phe, és az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 14.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe vagy pGlu,

A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A⁶ Gly vagy D-Ala,

A⁷ His,

A⁸ Phe, Gly, Ala, Leu, Ile vagy Val,

A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Phe vagy halogén-Phe, és az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1988. 12. 09.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe, β-D-Nal vagy p-Glu

5 A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A⁶ Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile vagy D-Val,

A⁷ His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A⁸ Phe, Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Sta vagy cSta,

10 A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Phe vagy halogén-Phe, vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogyha A⁴ kémiai kötéstől eltérő, az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

15 R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)

20 5. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe, β-D-Nal vagy pGlu,

25 A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

A⁶ Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile vagy D-Val,

A⁷ His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A⁸ Phe, Gly, Leu, Ile, Val, Sta vagy cSta,

30 A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Phe vagy halogén-Phe, vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogyha A⁴ kémiai kötéstől eltérő, az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

35 R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 07. 07.)

40 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek és sóik előállítására, ahol a képletben

A¹ D-Phe, halogén-D-Phe vagy pGlu,

A⁴ és A⁵ egymástól függetlenül Gly, Ala, Val, Leu, Ile vagy Nle,

45 A⁶ Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ile vagy D-Val,

A⁷ His, 1-metil-His vagy 3-metil-His,

A⁸ Phe, Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Sta vagy cSta,

50 A⁹ Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Phe vagy halogén-Phe, vagy közvetlen kötés, azzal a feltétellel, hogyha A⁴ kémiai kötéstől eltérő, az A⁸ és A⁹ között peptidkötés CO-csoportja CH₂ csoporttá redukált formában van jelen, és

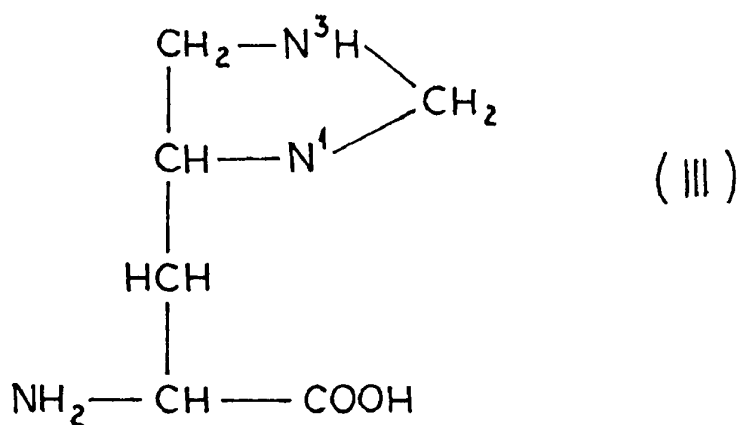
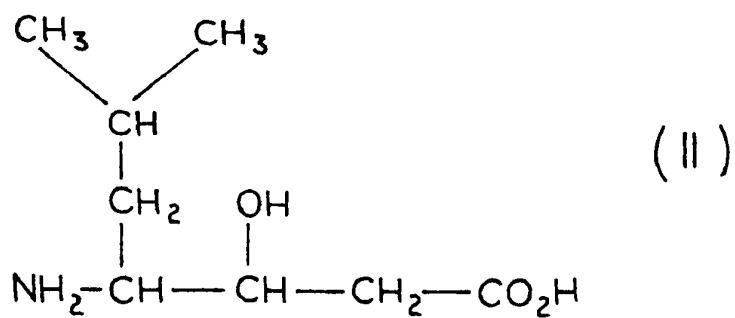
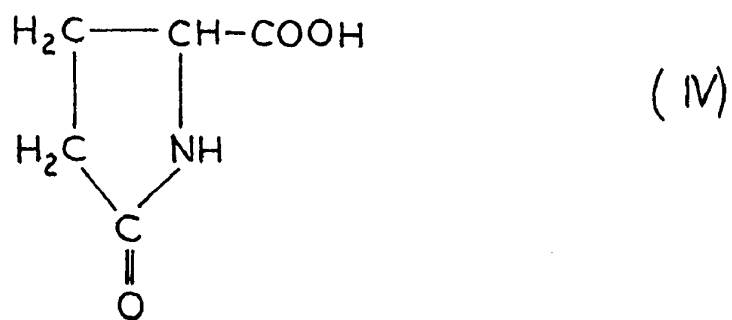
R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

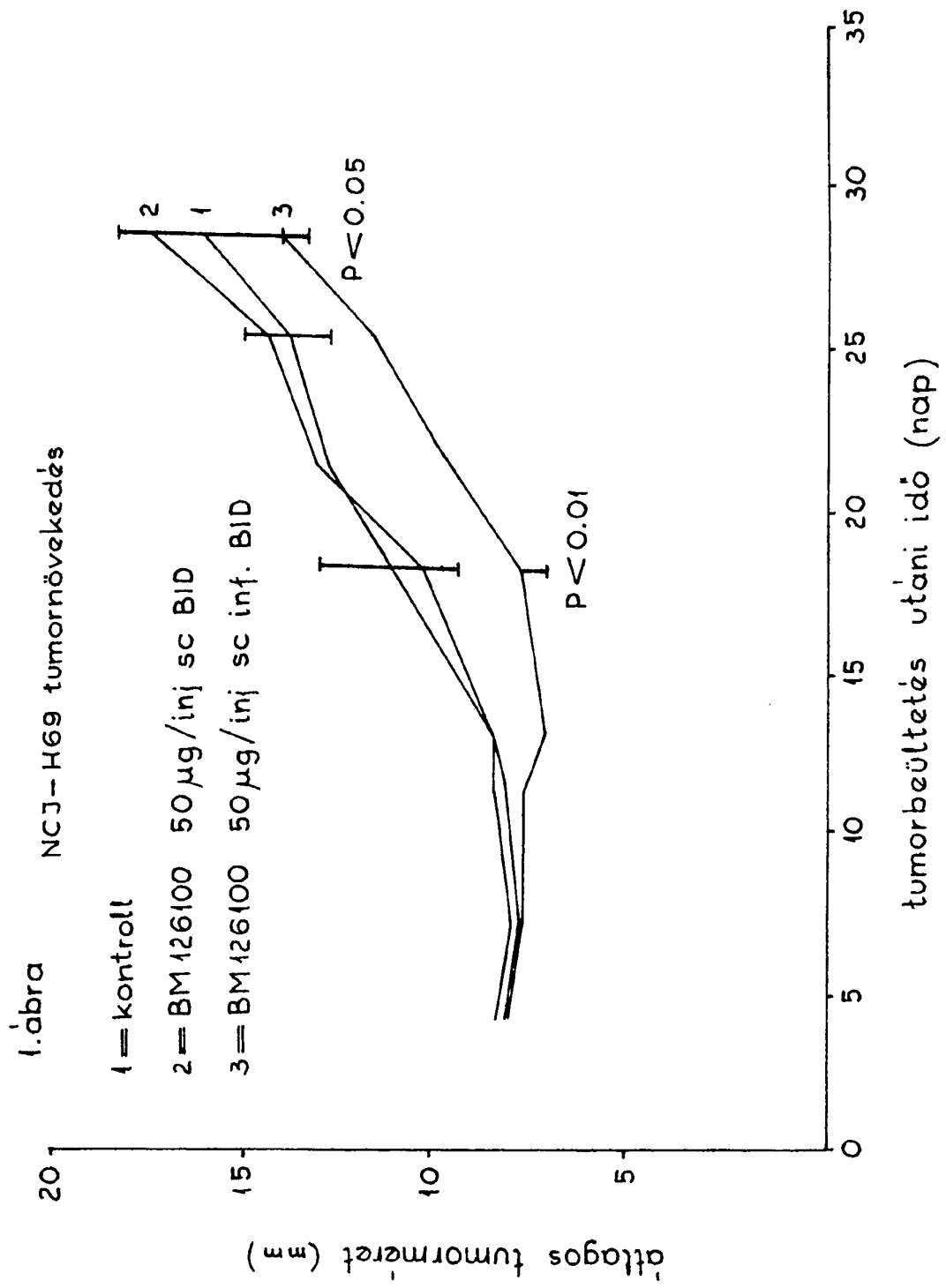
55 *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 08. 21.)

60 7. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol

A¹ pGlu, D-Phe, β-D-Nal, vagy D-Cpa,

- A⁴ jelentése Ala,
 A⁵ jelentése Val,
 A⁶ jelentése Gly vagy D-Ala,
 A⁷ jelentése His,
 A⁸ jelentése Leu, β -Leu, Phe vagy Sta,
 A⁹ kémiai kötés, és
 R jelentése hidrogénatom,
azzal jellemezve, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 10. 13.)
8. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-sztatin-amid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás a D-p-CI-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His- β -Leu-NH₂ előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 10. 13.)
10. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol A¹ pGlu, D-Phe, β -D-Nal, Gln vagy D-Cpa, A⁴ jelentése Ala, A⁵ jelentése Val, A⁶ jelentése Gly vagy D-Ala, A⁷ jelentése His, A⁸ jelentése Leu, Phe vagy cSta, A⁹ Leu vagy Phe, R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport, és az A⁸ és A⁹ közötti CO-csoport redukált, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
11. A 10. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol A¹ jelentése β -D-Nal és A⁸ és A⁹ jelentése egymástól függetlenül Leu vagy Phe, előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
12. A 10. igénypont szerinti eljárás a β -D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ (CH₂-NH)Leu-NH₂ előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 13.)
13. A 10. igénypont szerinti eljárás a β -D-Nal-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ψ (CH₂-NH)Phe-NH₂ előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 13.)
14. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol A¹ pGlu, D-Phe, β -D-Nal vagy D-Cpa, A⁴ jelentése Ala, A⁵ jelentése Val, A⁶ jelentése Gly vagy D-Ala, A⁷ jelentése His, A⁸ jelentése Leu vagy Phe, A⁹ jelentése közvetlen kötés, és R jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
15. A 14. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű peptidek előállítására, ahol A⁸ jelentése Leu, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
16. A 14. igénypont szerinti eljárás a D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-etil-amid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)
17. A 14. igénypont szerinti eljárás a D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂ előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti szerkezetnek megfelelő védett és/vagy gyantához kötött kiindulási peptideket használunk. (Elsőbbsége: 1989. 03. 02.)

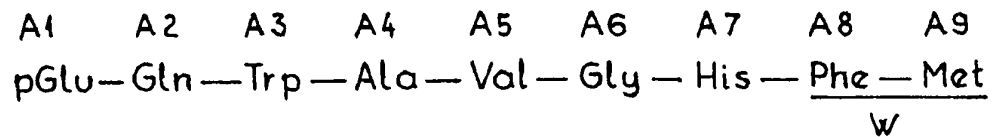




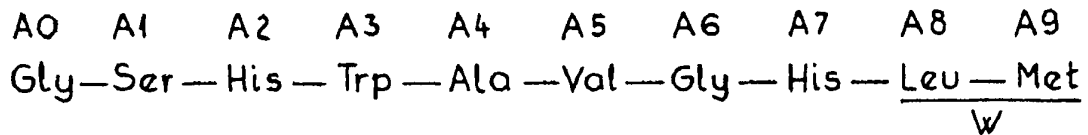
2. ábra

A természetes peptidek aminosav szerkezete

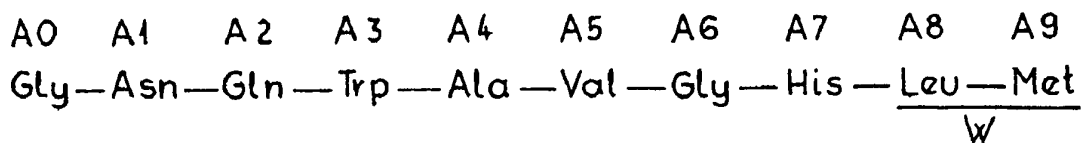
Litorin



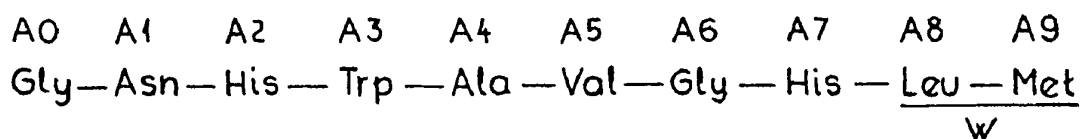
Neuromedin C



Bombezin (last 10 amino acid)



human GRP (last 10 amino acid)



3. ábra

D-Phe⁶BN (6-13) metil-észter bombezin analóg ha-
tása a hasnyálmirigy bombezin által kiváltott amiláz
elválasztására

