# MELANOCIT-STIMULÁLÓ HORMON FRAGMENSEK ÉS ANALÓGOK SZINTÉZISE

Egyetemi doktori értekezés

B A L O G H K Á R O L Y

Készült
a József Attila Tudományegyetem Szerves Kémiai Intézetében

1 9 7 1
S z e g e d

JATE KÖZ[illegible]I KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged

Diss. B 674

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS . . . . . 1

ELMÉLETI RÉSZ

Melanocit-stimuláló hormonok. MSH . . . . . 4

A peptidszintézis általános módszerei . . . 8

A peptidképzés közben fellépő racemizálódás 18

A melanocit-stimuláló hormonok szintézisére irányuló kísérletek . . . . . 30

A szerkezet és a biológiai hatás összefüggésének vizsgálata a polipeptidhormonok körében, különös tekintettel a melanocit-stimuláló hormonokra . . . . . 33

A fragmensek és analógok szintézise . . . . 41

KISÉRLETI RÉSZ . . . . . .44

ÖSSZEFOGLALÁS .. . . . . 58

IRODALOM . . . . . 59

# B E V E Z E T É S

Az ötvenes évek elejétől kezdve az izolálástechnika, valamint a szerkezetvizsgáló módszerek fejlődésével egyre több, jelentős biológiai hatással rendelkező természetes eredetű anyagról állapították meg, hogy peptid szerkezetű. A szekvenciák felderitése után - a legtöbb esetben - szintézisükre is sor került. E szintézisfeladatok megvalósitása a peptidkémia ugrásszerű fejlődéséhez vezetett. A fejlődést a publikációk hatalmas mértékű felduzzadásából is le lehet mérni. 1949-ben Fruton / 1./ összefoglalója még képes volt az egész addigi peptidkémiát felölelni, mig az utána következő művek pl. Goodman és Kenner munkája / 2 / már csak 6-7 esztendős periódust próbált átfogni. Greenstein és Winitz / 3 / 1961-ben megjelent munkája főleg alapvető műveletekkel és a kis molekulasulyu intermedierekkel foglalkozik, mig Schröder és Lübke kétkötetes összefoglalója / 4 / a módszertani kérdéseken kivül részletesen tárgyalja a polipeptidhormonok izolálását, szerkezetvizsgálatát, biológiai aktivitását és fragmenseik szintézisét is. Sajnos a mai napig sincs olyan mü, amely minden szintetikusan előállitott peptidet és peptidszármazékot ismertetne.

A peptid szerkezetü vegyületcsoportot azonban nem csupán az idetartozó vegyületek nagy száma teszi jelentőssé, hanem sokkal inkább az, hogy a biológiailag aktiv peptidek, pl. a peptid-hormonok szintézise tudományos és gyakorlati, gyógyszeripari szempontból is rendkivül fontos feladat. Emberi hormonok kellő mennyiségben szintetikus uton állithatók elő, s igen jelentős az is, hogy az igy nyert készitmények biztosan mentesek az izolálással nyert preparátumokban rendszerint előforduló fehérje-szennyeződésektől, amelyek terápiás felhasználás esetén mellékreakciókat válthatnak ki.

A szintézisek sikere legkönnyebben a feltünő biológiai aktivitásu polipeptidek hatásosságán mérhetők le. Ilyen szembetünő biológiai aktivitásuak a hipofizishormonok.

A hipofizis vagy agyalapi mirigy a szervezetnek talán legfontosabb, de minden bizonnyal legsokoldalubb hormontermelő szerve. E hormonok a vérpályába kerülve jutnak el rendeltetési helyükre, s ott jellegzetes biológiai reakciókat inditanak el. A hormontermelő szerv defektusa, egy-egy hormon hiánya különböző betegségek formájában nyilvánul meg, e betegségek az illető hormon adagolásával gyógyithatók.

A hipofiziseből eddig tiz különböző hormont izoláltak tiszta állapotban, melyek legtöbbje egyszerü peptidnek bizonyult. Ilyenek a hipofizis közti lebenyéből izolált melanocit stimuláló hormonok / MSH / is. E hormonok biológiai szerepe magasabbrendü állatoknál és emberben még nem teljesen ismert. Bizonyosan szerepet játszik a pigmentáció kialakitásában és feltehetően részt vesz a látási adaptációban is.

Az MSH fragmensek és analógok szintézisére irányuló kutatás célkitüzéseit az alábbiakban lehet összefoglalni:

a./ A biológiai hatás értelmezésének jobb megismerése elsősorban humán vizsgálatok utján.

b./ A gyógyászatban is alkalmazható fragmensek, illetve analógok szintézise.

c./ Kémiai szerkezet-biológiai hatás összefüggésének vizsgálata a fragmensek és analógok farmakológiai értékelésével.

A dolgozat a szintézis szempontjából teljesen befejezett munkát ismertet. A biológiai aktivitás vizsgálata, amely a farmakológus és kutató orvos közreműködését is igényli, természetesen csak a szintézis sikeres befejezése után indulhatott meg. E vizsgálatokat jelenleg a SZOTE Szemészeti Klinikáján végzik.

# E L M É L E T I  R É S Z

## Melanocit-stimuláló hormonok. MSH

P.E.Smith és E.M.Allen még 1916-ban hívták fel a figyelmet arra, hogy hidegvérű gerinctelenekről a hipofízis kiirtása a bőr színének megváltozásával jár, s később, hogy fejlett békák hipofízisének középső lebenyét hipofízis-irtott vagy intakt ebihalakba átültetve, azok melanocitáinak kiterjedése figyelhető meg. Olyan állatoknál, melyeknél a hipofízis középső lebenye morfológiailag is megkülönböztethető, az MSH ebben termelődik/innen egy régebbi elnevezés: intermedin/ másoknál /az embernél is/ az elülső lebenyből izolálható az MSH aktivitás.

A különféle melanocit-stimuláló hormonokat a kortikotropinokkal egyidőben az ötvenes években izolálták. Sertéshipofízisből T.H.Lee és A.B.Lerner / 5 / 1955-56-ban egy erősen bázikus /izoelektromos pontja pH 11/ melanotropin /$\alpha$-MSH/ izolálását közölte. Más kísérletben két MSH hatású anyagot különített el. Az egyik az előbb említett $\alpha$-MSH, a másik gyengén savanyu karakterű /izoelektromos pontja pH 5,8; $\beta$-MSH/ volt.

A két anyag aktivitása nagyjában megegyezett: 1-2 x $10^7$ E/mg. Korábban az $\alpha$-MSH létezését kétségbe vonták, mivel általában csak a megfelelő $\beta$-MSH volt izolálható, de később, 1958-ban I.I. Geschwind / 6 / marhából, 1960-ban C.H.Li és J.S. Dixon ló hipofizisből is elkülönitette / 7 /. A $\alpha$-MSH-t emberi hipofizisből J.I. Harris / 8 / izolálta. A hormonok izolálását gyakran követte szerkezetfelderitésük is. A szekvenciák meghatározása azzal a módszerrel történt, amelyet Sanger használt az inzulin szerkezetfelderitésénél: a terminális aminosavak meghatározása után savas, enzimes hidrolizis következett, majd a hasitási termékek lépésenkénti lebontása, szerkezetük tisztázása. A teljes szekvenciát a töredékekből az átfedések alapján irták fel. A melanocit-stimuláló hormonok szerkezetét 1956-57-ben Geschwind és Harris ismertette. A szekvenciák meghatározására példaként a sertés $\beta$-MSH szerkezetfelderitését az 1.ábra, mig a melanocit-stimuláló hormonok szerkezetét a 2. ábra mutatja be.

| Hasító enzim | A fragmensek szerkezete |
|---|---|
| Chymotripsin | H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-OH |
| Tripsin | H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-OH |
| Chymotripsin | H-Lys-Met-Glu-His-Phe-OH |
| Tripsin | H-Met-Glu-His-Phe-Arg-OH |
| Chymotripsin | H-Arg-Trp-OH |
| Tripsin | H-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH |
| Chymotripsin | H-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH |
| Teljes szekvencia | H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH<br>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 |

1. az. ábra

| | |
|---|---|
| α-MSH | $CH_3CO$-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ |
| ß-MSH (marha, birka) | Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro--Lys-Asp |
| ß-MSH (sertés) | Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro--Lys-Asp |
| ß-MSH (ló) | Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Arg--Lys-Asp |
| ß-MSH (majom) | Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Asp |
| ß-MSH (emberi) | Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg--Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp |

2. az. ábra

Az $\alpha$- és a $\beta$-MSH között lényeges különbség van a peptidlánc hosszában. Az $\alpha$-MSH tulajdonképpen az ACTH 1-13 szekvenciája N-acetil tridekapeptidamid formában. Különböző fajok esetén is a struktura azonos. / 9,10 /

A $\beta$-MSH 18 aminosavat tartalmaz, kivéve az emberi hormon esetét, melyben 22 aminosavat találunk. Különböző fajoknál különböző az $\alpha$-MSH strukturája. A $\beta$-MSH-knál csak egy heptapeptid fragmens azonos az előbbi $\alpha$-MSH-val és ezen keresztül a kortikotropinokkal.

Nyilvánvalóan a szerkezeti rokonság következménye, hogy a kortikotropinok is rendelkeznek MSH aktivitással, s a hatás erősségében mutatkozó eltéréseket pedig a szekvencia különbségekre ill. az ACTH nagyobb molekulasulyára kell visszavezetnünk.

Az MSH pontos biológiai szerepét még nem ismerik, kivéve a kétéltüeket és néhány halfajtát, annak ellenére, hogy minden fajban megtalálható. Az bizonyos, hogy a pigmentáció kialakulásában szerepet játszik. A sejtek pigmentációjának növekedése enzimatikus befolyás alatt van, a tirozináz ellenőrzi a melaninszemcsék szintézisét tirozinból. A szervezet egy magasabb szintjén már festékreguláló

faktorok befolyásolják a melaninszemcsék mozgását és eloszlását a melanocitákban, így bőrszinváltozást eredményezve. Az MSH az a faktor, amely ellenőrzi a melaninszemcsék diszperziójét a citoplazmában, azaz kontrolálja a melanociták sötétségét. Az ellenkező folyamatot azaz a melaninszemcsék aggregálódását, ezáltal a bőr világosságát a melatonin befolyásolja. Melatonint izolálták a majom, marha és ember toboz-mirigyéből, de a perifériás idegekben is jelen van. A pigment regulációnak az alacsonyabbrendű állatoknál van nagy jelentősége a bőr szinváltozásával a környezethez való alkalmazkodást szabályozzák. Az MSH emlősökben és emberben hozzájárul a látási adaptációhoz is. Humán vizsgálatok szerint MSH adagolásával le lehet rövidíteni a sötétséghez való alkalmazkodás folyamatát, növeli a fény iránti érzékenységet, gyorsitja a retinabibor regenerálódását.

Az MSH értékmérése általában a pigmentációra gyakorolt befolyásán alapuló K.Shizume féle módszerrel történik: a béka bőrén a hormon hatására bekövetkező szinváltozást fotoelektromos reflektométerrel mérik.

A szekvenciák meghatározása után kösvetlenül, már 1955-56-ban elkezdődött a melanotropin fragmensek szintézise. E fragmensek szintéziének

ismertetése előtt röviden összefoglalom a korszerű peptidképzés általános szempontjait, valamint e molekulák szintézisével kapcsolatos speciális nehézségeket.

## A peptidszintézis általános módszerei

Mint ismeretes, a peptidek egymáshoz savamid kötéssel /peptidkötéssel/ kapcsolódó aminosavakból felépitett vegyületek. A peptidkötés kialakitása általában három egymást követő lépést tesz szükségessé: az acilező aminosav aminocsoportját - az autoacilezés elkerülése végett - védeni kell, karboxilcsoportját aktiválni kell a kapcsoláshoz, a végül a védőcsoportot el kell távolitani, hogy a következő aminosavval ismét acilezni lehessen. Természetesen, ha az aminosav komponensek $\alpha$-amino és $\alpha$-karboxil-csoportjukon kivül még más funkciós csoportot /pl. második amino- vagy karboxil- csoportot, szulfhidril-csoportot vagy hidroxil-csoportot/ is tartalmaznak, akkor ezek védéséről is gondoskodni kell.

A peptidképzés tehát meglehetősen sok szintézislépést foglal magában, s e reakciósorozat egyik lépésénél sem szabad az aminosavaknak, vagy a növekvő peptidláncnak károsodnia, illetve megváltoznia /beleértve az aminosavak optikai tisztaságát is/

továbbá célszerű, ha mindegyik lépés jó termeléssel és főleg szennyeződésekhez vezető mellékreakciók nélkül valósítható meg. E feltételeknek, különösen nagyobb aminosavtagszámu peptidek esetén azonban igen nehéz megfelelni.

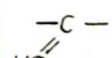
A peptidszintézisnél használt védőcsoportok rendszerezésekor különbséget szoktak tenni az $\alpha$-aminocsoport, az oldalláncok és a karboxilcsoport védése között. A védőcsoportokkal szemben a legfőbb követelmény a szelektivitás, amelynek megoldása viszonylag könnyü feladat különböző funkciós csoportok esetén. Azonos jellegü funkciós csoportok védelmére egyidőben többféle védőcsoport is szükséges, mivel a láncfelépítés előtt pl. a terminális aminocsoportot ugy kell szabaddá tenni, hogy a peptid többi aminocsoportja /pl. a lizin $\varepsilon$-aminocsoportja/ védve maradjanak. Ugyanigy védve kell maradjon a glutaminsav és aszparaginsav $\gamma$-karboxilcsoportja akkor, ha pl. a terminális karboxilcsoport aktiválására kerül sor. A nagy molekulasulyu polipeptidek szintézisét igazán nehézzé nem maga a peptidkötések kiépitése teszi, hanem a megfelelő védőcsoportkombinációk kiválasztása, s a védett peptid sikeres szintézisét követő védőcsoporteltávolitás kiméletes módjának kidolgozása.

A leggyakrabban használt védőcsoportokat és lehasitásuk módját a 3. ábra mutatja be.

Részletesen csak a szintézis során általam használt védőcsoportokat ismertetem, illetve a legujabban felfedezett, de még általánosan nem használt védőcsoportokra is kitérek. Látható lesz, mennyire értékesek még a ma már klasszikusnak nevezhető, régi védési módszerek, s az ujakkal milyen harmonikusan illeszthetők össze.

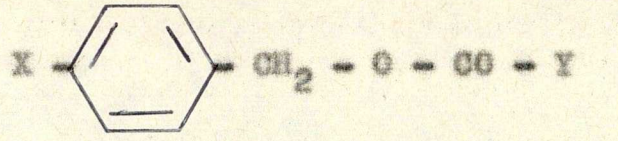
Az aminocsoportok védésére leggyakrabban az uretán jellegü csoportokat használják, ezek közül is a karbobenzoxi és terc.-butil-oxi-karbonil-csoportnak van kiemelkedő jelentősége.

M.Bergmann és L.Zervas 1932-ben fedezte fel a karbobenzoxi védőcsoportot / 11 / amely azóta is a legelterjedtebb védőcsoportok közé tartozik. A reagenssel vizes oldatban acilezzük az aminosavakat nátrium-hidroxid, -karbonát vagy -bikarbonát jelenlétében 0 C°-on vagy szobahőn. A leucin és izoleucin kivételével a karbobenzoxi-aminosavak /röv. Z-aminosavak/ kristályosak. Igen nagy előnye, hogy minden aktiv származéka a racemizálódás veszélye nélkül felhasználható peptidképzésre. A védőcsoport talán egyetlen hátránya, hogy kissé lugérzékeny. Ujabban a védőcsoport több módositott származékát állitották elő / 12,13 /.

| Védett csoport | Védőcsoport | | | |
|---|---|---|---|---|
| | neve | képlete | rövidítése | lehasítás módja |
| $-NH_2$ (amino végcsoport, Lys) | karbobenzoxi- | $C_6H_5CH_2OCO-$ | Z- | $H_2$\|kat, HBr\|jégecet Na\|$NH_3$ |
| | ftalil- | $C_6H_5(CO)_2=$ | Pht= | $NH_2NH_2$ |
| | tozil | $CH_3C_6H_4SO_2-$ | Tos- | Na\|$NH_3$ |
| | terc.butil-oxikarbonil | $(CH_3)_3COCO-$ | BOC- | $H^+$, trifluorecetsav |
| -COOH (karboxil-végcsoport, Glu, Asp) | metil-, etil-észter | $-OCH_3$, $-OC_2H_5$ | -OMe, -OEt | $OH^-$ |
| | benzil-észter | $-OCH_2C_6H_5$ | -OBz | $OH^-$ $H_2$\|kat |
| | terc.butil-észter | $-OC(CH_3)_3$ | $-OBu^t$ | $H^+$, trifluorecetsav |
| $-CH_2OH$ =CHOH (Ser, Thr) | benzil-éter | $-CH_2C_6H_5$ | -Bz | $H_2$\|kat |
|  (Tyr) | terc.butil-éter | $-C(CH_3)_3$ | $-Bu^t$ | $H^+$, trifluorecetsav |
| $-CH_2SH$ (Cys) | Benzil- | $-CH_2C_6H_5$ | -Bz | Na\|$NH_3$ |
| $-NH-\underset{\underset{NH}{\|}}{C}-NH_2$ (Arg) | Nitro- | $-NO_2$ | $-NO_2$ | $H_2$\|kat |
|  (His) | Benzil- | $-CH_2C_6H_5$ | -Bz | $H_2$\|kat Na\|$NH_3$ |

**3.sz.ábra**

A dolgozatban használt rövidítések a IUPAC Comission on Biochemical Nomenclature / J. Biol.Chem. 241, 527 1966 / javaslatainak felelnek meg.



X = $-OCH_3$, , $-NO_2$

Y = Cl, $N_3$

A szubsztituált karbobenzoxi-aminosavak és -peptidek általában jobban kristályosodnak, mint az alapvegyület megfelelő származékai, azonban közös hátrányuk, hogy a hasításuk során képződő melléktermékek nehezebben távolíthatók el, mint az alapvegyület esetében keletkező toluol vagy benzilhalogenid.

A terc.butiloxikarbonil csoportot először Mc Kay és Albertson / 14 / valamint Anderson és Mc Gregor / 15 / használta a peptidkémiában. A terc.butilalkohol és foszgén reakciójával nyert klórhangyasav-terc.butilészter már 10 $C^0$-on bomlik, / 16 / ezért inkább a megfelelő sav-azid, vagy aktiv észter használatos / 17,18 / acilezésre. Legujabban foszgén helyett karbonil-klorid-fluoridot használva sikerült előállitani a terc.butiloxikarbonilfluoridot, amely a kloriddal szemben stabilis, és közvetlenül is felhasználható a védőcsoport bevitelére / 19 / .

A terc.butiloxikarbonilaziddal vizes dioxános vagy tetrahidrofurános oldatban acilezik az aminosavakat, magnéziumoxid jelenlétében.

A reakcióidő 40-50°-on 1-2 nap. E.Schnabel vizsgálatai szerint azonban mindegyik aminosav acilezésére található olyan optimális pH érték, amelynél a reakcióidő 0,5-20 órára csökken. Az acilezést célszerű automata titrátorban végezni, mert 0,2-0,4 pH eltérés már nagyságrenddel növelheti a reakcióidőt / 20 /.

A terc.butilkarbonil-csoport savra érzékeny, így az eltávolítása is acidolízissel történik, így pl. trifluorecetsavval néhány perc alatt teljesen eltávolítható. A melléktermék széndioxid és izobutilén.

Egy ujabb uretán-védőcsoport az adamantiloxikarbonil-csoport, amely az 1-hidroxi-adamantánból vezethető le / 21 /. Az alkoholból foszgénnel előállítható sav-klorid stabilis és kristályos, akárcsak a vele elkészitett védett aminosavak. Hasonlóképpen stabilis a terc.amiloxikarbonil-klorid, amely emiatt a peptidszintézisben ugyancsak alkalmazásra talál. / 22,23 /

Az egyes tercier alkoholokból levezetett uretán-védőcsoportok az acidolízissel szemben nagyon eltérő stabilitásuak, s ez még köztük is lehetővé teszi a kellő szelekciót a lehasitás során. Sieber és Iselin / 24 / egész sor olyan származékot készi-

tett, melyben a terc.butil-csoport egy vagy több metilcsoportját fenil-, tolil- vagy bifenil-csoporttal cserélték ki.

A BOC-csoport igen előnyösen használható Z-csoporttal kombinálva /harmadik funkciós csoport védése esetén/, vagy ha karboxil-védésre benzilészter áll rendelkezésre, mivel a BOC-csoport katalitikus hidrogénezésnek és folyékony ammóniában oldott nátriumnak ellenáll.

Az aminocsoportok szelektiv védelménél jóval kisebb problémát jelent a karboxilcsoprtok megvédése, mivel viszonylag ritkán, a dikarbonsavakkal való acilezésekor merül fel védőcsoportjuk szelektiv eltávolitásának kérdése. Szinte kivétel nélkül ma is azokat az észtereket használják, amelyeket 15-20 évvel ezelőtt bevezettek, az alkil-észterek - benzilészterek - terc.butil-észter hármas kombinációja, s az eltávolitásuk különbözőségében rejlő variációs lehetőség /szappanositás-- hidrogénezés - acidolisis/ csaknem minden esetben kielégitő.

Az alkil-észterek hasitására használt lugos szappanositás ismert hátrányai /pl. racemizálódás veszélye/ miatt a benzil-észterek, szubsztituált benzil-észterek és terc.-butil-észterek sokkal előnyösebbek. Ujabban ismerünk olyan alkilésztert,

melynek hidrolizisához nem kell alkálifém-hidroxid, a dimetil-amino-etilészterek már hidrogén-karbonáttal is gyorsan hasadnak / 25 /.

Feltétlenül említést érdemel még a karboxilcsoportnak só alakban történő védése, amely történhet szervetlen bázisokkal, vagy szerves bázisokkal való sóképzés utján. Első esetben általában vizes oldatot használunk, de ezt nem tudjuk bármely kapcsolási módnál alkalmazni. Szerves bázisokkal pl. trietilaminnal, N-metil-morfolinnal képzett sók dimetilformamidban jól oldódnak, igy ez a legáltalánosabban használt oldószer. A képzett sókat nem szükséges elkülöniteni, a felszabaditás savanyitással történik. Vegyes savanhidrides kapcsolásoknál, azidos módszernél és az aktiv észterek köréből az N-hidroxi-szukcinimides kapcsolásnál használható kielégitően.

Az aminosavak oldallánc-védelmét csak az arginin és hisztidin példáján említem. Itt az elmult néhány esztendő nem hozott lényeges változást. Az arginint a hagyományos peptidszintézisben ma is legtöbbször guanidincsoportján nitrált formában alkalmazzák, de a védőcsoport eltávolitására a katalitikus hidrogénezésen kivül az elektrolitikus /26/ és cink-ecetsavas /27/ redukciót is kidolgozták.

Sakakibara hidrogén-fluoridos hasitási módszere / 28, 29 / is alkalmas e védőcsoport eltávolitására. Ismét van példa a guanidin toziles védelmére / 30 /, s ugyancsak jól használható a protonálásos védelem is, amely még szilárd fázison is le van irva / 31 /. Elkészitették a guanidincsoporton BOC-gyököt tartalmazó védett arginint is, ennek felhasználásáról még nem sok adattal rendelkezünk. / 32,33 /.

Szokás a hisztidin imidazolcsoportját is védeni, s mivel a klasszikus benzilvédelem csak erőteljes hidrogénezéssel, vagy nátrium/ammónia redukcióval távolitható el, néhány ujabb szubsztituenst is megkiséreltek e célra felhasználni. Igy bevezetésre került a dinitro-fenil /34/ /lehasitás merkapto-etanollal/, 2,2,2, trifluor-1-acil-amino-etil /35/ /lehasitás katalitikus hidrogénezéssel, ha Ac=Z, és trifluorecetsavval ha Ac=BOC/, továbbá piperidino-karbonil-imidazol származékok /36/ /lehasitás vizes alkálifém-hidroxiddal vagy hidrazinnal/ de ezek peptidszintézisben való felhasználásáról még nem sokat tudunk.

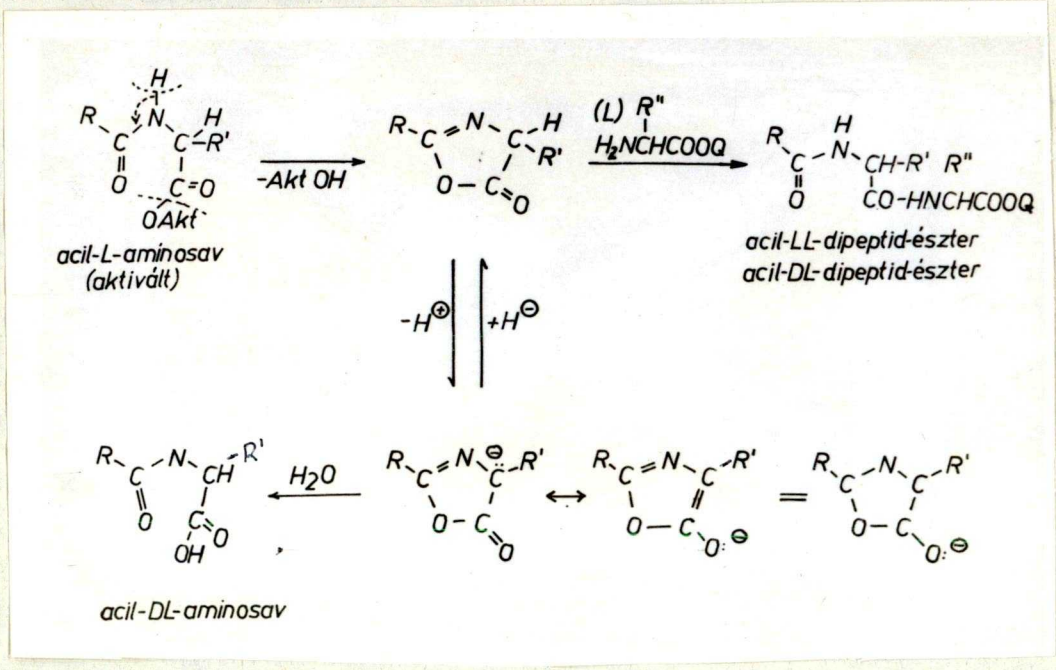
A védőcsoportokhoz hasonlóan a peptidkötés kiépitése sem problémamentes. Az idealis módszernek a következő igényeket kell kielégitenie: viszonylag

gyorsan lejátszódó kvantitativ acilezést kell elérni, hogy a kiindulási anyagok eltávolitását célzó, igen idő- és munkaigényes tisztitási eljárások elkerülhetők vagy legalábbis egyszerüsithetők legyenek, ugyanakkor az acilezést nem kisérheti mellékreakció, ill. racemizáció. A gyors kvantitativ kapcsoláshoz erőteljes aktiválás, vagy az acilező komponens nagy feleslege szükséges, s ilyenkor egyrészt maga a felesleg jelent eltávolitandó szennyeződést, másrészt nyilik egész sor nemkivánatos mellékreakcióra, mint amilyen a peptidkötés acileződése és főként a racemizáció. Mielőtt a leggyakrabban használt kapcsolási módszereket ismertetném, röviden összefoglalom a racemizációval kapcsolatos ismereteket.

A peptidképzés közben fellépő racemizálódás

A peptidkapcsolásnál esetenként fellépő, kisebb-nagyobb mértékü konfigurációváltozás kérdését számos kutató vizsgálta, amiről a bőséges szakirodalmi közlemények is tanuskodnak. / 37,38 / E beható vizsgálatok eredményei azt a nézetet valószinüsitették, hogy a peptdkapcsolás során racemizáció akkor következik be, ha a karboxilcsoport aktiválása oxazol-5-on származék képződését is kiválthatja. Ez a származék ugyanis - különösen

bázikus közegben, vagy általában protonfelvételre képes oldószerben könnyen deprotonálódik. Ennek az asszimetriacentrumot érintő reverzibilis reakciónak a hajtóereje a pszeudo-aromás jellegű mezomer-ion képződésének a lehetősége:



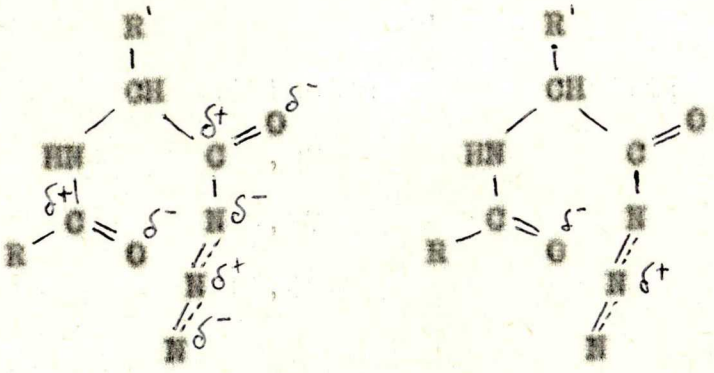

Az előbbiekből következik, hogy elmarad a racemizáció, ha nincs lehetőség az azlakton kialakulására. Így ha az acilező aminosav ftalil- ill. tozilcsoporttal van védve és acil-prolin esetében, strukturális okokból a racemizációs folyamat intermedierje, az oxazolonszármazék nem tud képződni. Természetesen nincs racemizációs veszély - mert asszimetriás C atom sincs - ha a C-terminális aminosav glicin. Elmarad vagy legalábbis nagy mérték-

ben visszaszorul a racemizáció akkor, ha az aciléz-
ést karbobenzoxi-aminosav aktivált származékával
végezzük. Determann és munkatársai / 39 / vizsgála-
tai szerint ennek oka, hogy a karbobenzoxi karbonil
csoportjának elektronaffinitása a szomszédos oxigén
miatt kisebb mint más acil csoportoké, s így csak
az utóbbiakból keletkezhetik az oxazolonszármazék,
mely a racemizáció igazolt intermedierje.

Néha olyankor is megfigyelhető racemizáció,
amikor az oxazolon kialakulása szerkezetileg gátolt,
feltehetően ilyenkor az asszimetriás centrum direkt
protonleadobásáról van szó. Elősegiti ezt a hőmér-
séklet, a poláros oldószerek, és a bázisok felesle-
gének alkalmazása, ezek mind olyan faktorok, amely-
eket a kapcsolás során célszerü elkerülni. Szerin-,
treonin- és ciszteinszármazékoknál racemizációhoz
vezet a védett vagy védetlen funkciós csoport $\beta$ -
eliminációja, ezek kihasadását ugyancsak protonle-
dobás előzi meg. A racemizáció a lehasadó csoport
ujra addiciójakor következik be.

A kapcsolási módszerek közül a peptidkémia
legrégibb, de nélkülözhetetlen acilezési módja az
azidos. / 40 / Jelentősége akkor nőtt meg igazán,
amikor bebizonyosodott, hogy az egyetlen kapcsolá-
si mód, amelynél eddig még nem észleltek racemizá-

dót, ha a közeg nem tul bázisos. Minden szintézis, amely a fragmenskondenzáció elvén épül fel, szükségszerüen azidos módszert használ a peptidek összekapcsolására. E kapcsolás racemizációmentessége többé-kevésbé ma is rejtély, s Young hipotézisét /41/ - mely szerint az acil-aminosavazidok stabil planáris konformációban vannak, nincs lehetőség az azlakton kialakulására, mert az azidcsoport középső, erősen pozitivan polározott nitrogénje megakadályozza az acilcsoport negativ polaritásu oxigénjét az $\alpha$-karboxil csoporttal való azlakton képzésben - mindenki csak átveszi, senki nem erősiti vagy cáfolja meg.



Hátránya is van az azidos kapcsolásnak, az hogy esetenként mellékreakciók kisérik a kapcsolást és a képződött mellékterméket nehéz eltávolitani. Egyik gyakori mellékreakció / 42 / az azid lassu átrendeződése izocianáttá, s ez reagál az amino-

komponenssel. Ilyen esetben a kivánt peptidkötés helyett karbamid származék keletkezik:

$$R\text{-}CO\text{-}N_3 \xrightarrow{-N_2} R\text{-}N{=}C{=}O \xrightarrow{H_2N\text{-}Q} R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH\text{-}Q$$

Mivel ez a mellékreakció elsősorban az azid hosszasabb ideig tartó feldolgozása során következik be, gyakran használják az intermedier azid izolálása nélküli kapcsolást / 43,44 /.

Gyakran használatosak más acilezési módszerek is, racemizáció-veszélyességük ellenére, természetesen elsősorban uretántipusu csoporttal védett aminosavakkal és nem peptidekkel való kapcsoláskor. Minden ilyen esetben nagy gondot fordítanak az optimális reakciókörülmények meghatározására, mivel kismértékü racemizáció ilyenkor is előfordulhat.

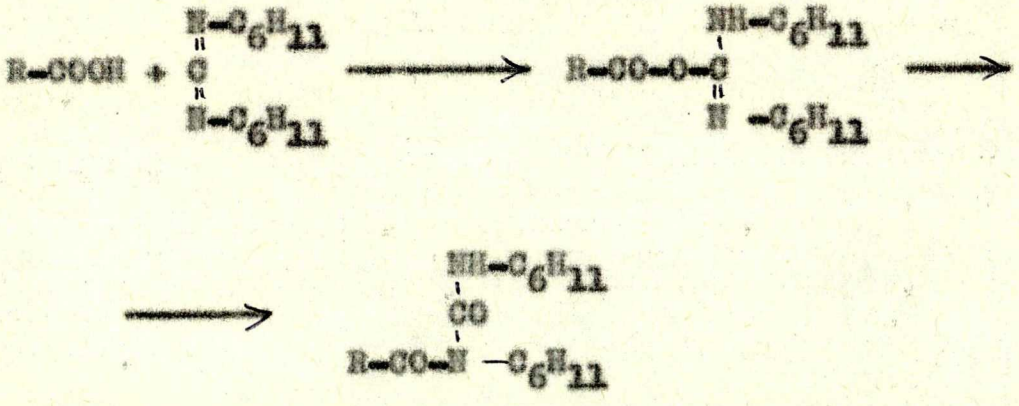
Ebből a szempontból biztatónak látszik a vegyes anhidrides módszer, amelynél előbb a védett acilező aminosavból klórhangyasav-etilészterrel vagy -izobutilészterrel bázis jelenlétében vegyes savanhidrid készithető, mely készségesen reagál aminosav ill. peptidészterekkel vagy sókkal/45,46/. A módszer előnye, hogy gyors, az anhidridet nem kell izolálni és a reakció melléktermékei /a megfelelő alkohol és széndioxid / a végtermék izolálását nem zavarják. Anderson legujabb vizsgálatai szerint/47/

a racemizáció is elkerülhető. A szerzők szerint gyakorlatilag racemizáció mentesen képződik a vegyes savanhidrid, ha klórhangyasav-izobutilésztert N-metil-morfolin jelenlétében 2-3 percig -20 $C^{0}$-on reagáltatjuk a karboxil-komponenssel, melyet előzőleg etilacetátban vagy tetrahidrofuránban oldunk fel.

Az aktiv észteres eljárásnál a védett aminosav karboxil-csoportját észterező komponens elektronszivó jellege teszi az acilező észter karbonil-csoportjának szénatomját kellőképpen elektrofillé. Legtöbbször arilésztereket, elsősorban p.-nitro vagy 2,3,5 triklórfenilésztert, pentaklórfenilészter ill. hidroxi-szukcinimid és ftálimidésztereket alkalmaznak / 48,49 /.

Valamennyi elkészitheto a megfelelő hidroxivegyület és védett aminosav - vagy peptid - kondenzációjával diciklohexil-karbodiimid /DCC/ jelenlétében. Fenilészterek szintézisére a kénessav és foszforossav észterekkel végzett átészterezési reakciót is használhatjuk. A módszer előnye, hogy az aminolizis gyors reakció, amely jó hozammal jár. Hátránya, hogy védett peptidészterek esetén mind az észter elkészitésénél, mind az aminolizisnél fellépheto racemizálódás.

A peptidkötés kialakitására alkalmas a karbodiimides kapcsolás / 50 / is, amely csak látszólag közvetlen dehidratálás, a valóságban a karbodiimid /leggyakrabban a diciklohexilkarbodiimid/ az acilaminosavval előbb aktiv észtert képez, s ez reagál az aminokomponenssel. A módszer egyike a gyakorlatilag legegyszerübben kivitelezhetőknek, az acilező sav-komponenst és az acilezendő aminokomponenst DCC-vel együtt feloldják valamilyen indifferens oldószerben, majd 4-24 óra reakcióidő után a kivált diciklohexilkarbamid melléktermékot kiszürik, a keletkezett peptidet isolálják. A módszer két"gyenge pontja" a mérsékelt racemizáció veszély és az acil-karbamid képződés, utóbbit általában az átmeneti termékként feltételezett O-acil-izokarbamid-származék átrendeződésével magyarázzák:



Az előzőekben ismertetett kapcsolási módszerekhez képest forradalmi változást jelentett 1963-ban egy merőben uj szintézismód, amely Merrifield nevéhez fűződik / 51 /. E módszernél a karboxil-terminális aminosavat egy polistirol alapu műgyantára kötötte, s különben ismert módszerekkel hosszabitotta a láncot a gyantához kapcsolódó C terminális aminosavon. Az oldhatatlan, növekvő peptidláncról igy minden felesleges kiindulási anyag, melléktermék eltávolitható a gyanta bőséges mosásával.

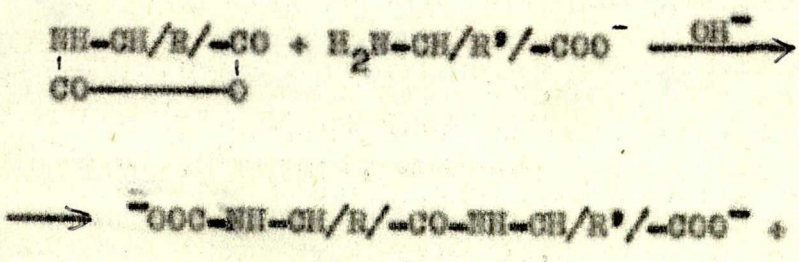
Végül a teljes szekvencia felépitése után el kell távolitani valamennyi védőcsoportot, beleértve a karboxil-terminális aminosav és a polimer közti kötés hasitását is. Az oldhatatlan polimeren végzett reakciósorozat neve "szilárd fázisu peptidszintézis" / solid phase peptide synthesis/.

A szilárd fázisu peptidszintézis ma már nyolc esztendős multra tekint vissza, s minden hozzáfüzött reményt egyelőre még nem váltott be. A módszer bejelentésekor ugyanis ugy gondolták, hogy egy csapásra megoldhatóvá tesz olyan szintéziseket, melyek a klasszikus módszerekkel a lassan reagáló nagy molekulákkal már megvalósithatatlannak látszottak. Valóban, a polimeren végzett szintézis jelentős mértékben járult hozzá nagy molekulasulyu

peptidek sikeres felépitéséhez, azonban a hagyományos szintézismódok számos problémája itt is jelentkezik /hiszen az alkalmazott védőcsoportok és kapcsolási módszerek semmiben nem különböznek a klasszikus szintézisnél használtaktól/, s ehhez még az uj metodika speciális nehézségei is hozzáadódnak. Ilyen hátrányt jelent maga a polimer reakció, igen nehezen lehet biztositani, hogy a polimer valamennyi $Cl-CH_2$ csoportja reakcióba lépjen, s hogy valamennyi peptidlánc egyenletesen növekedjék tovább, Amennyiben pedig ezt nem sikerül elérni, a végső lehasitáskor különböző hosszuságu peptidek keverékéhez jutunk.

Említést érdemel még a " szilárd fázisu " peptidszintézisnek az a módszertani variánsa, amelyet Semjahin és munkatársai 1965-ben alkalmaztak elősör / 52 /. Ez a variáció a térhálóból adódó szférikus akadályok leküszöbét célozza, amelyet oldható polimerek alkalmazásával sikerült is elérni. Az oldatban befejezett kapcsolás után a polimert / amely nem tartalmaz keresztkötéseket / vizre öntik, kiválik, s mellőle minden melléktermék, kiindulási anyag kimosható. Hátránya, hogy nagyobb peptidláncnál már oldhatatlan a polimer, s a vizből nem csapódik ki mindig kvantitative.

Az amerikai Merck kutatócsoportja 1966-ban /Denkewalter és munkatársai/ forradalminak látszó uj, izolálás nélküli peptidszintézisről számoltak be. / 53 / Egy régóta ismert vegyületet az un. Leuchs-anhidridet /2,5-oxazolidin-dion/ használnak acilezésre, ez az anyag mintegy saját védőcsoportjával van egyidőben aktiválva, és az aminosavak sóival egyértelműen reagál a következő egyenlet szerint:

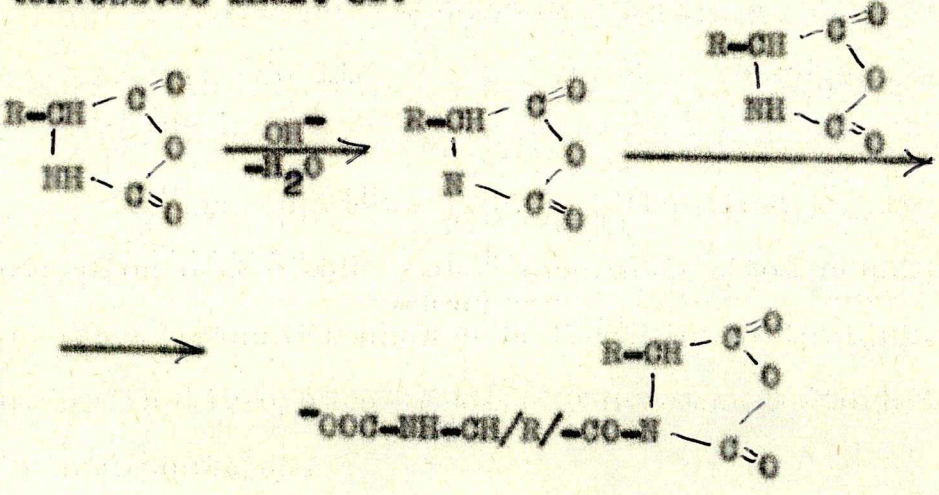


Az acilezést alacsony hőmérsékleten, anhidridenként eltérő pH-ju lugos oldatban végzik erős keverés közben, a átmenetileg karbaminsav származék keletkezik, amelyről a $CO_2$ csak az oldat megsavanyitásakor hasad le. Ujabb lugositással a kapott peptid a további acilezésre készen áll. Végül a szintézis befejezése után a peptidet már csak a sókeveréktől kell elkülöniteni.

A nagytagszámu polipeptidek szintézisének

egyik legnagyobb akadálya, hogy a vegyületek védett állapotban messzemenően oldhatatlanok, s igy a további reakciójuk, továbbépitésük nehézségekbe ütközik. Mindezeket a nehézségeket megszüntethette volna a Leuchs-anhidrides peptidszintézis, amely vizes oldatban, védetlen peptiddel teszi lehetővé a szintézist. Sajnos a további közlemények / 54 /, s a saját vizsgálataink szerint ugy látszik, hogy a módszer mégsem váltotta be a hozzá füzött reményeket. A rossz kitermelések mellet nagymértékü szennyezettség tapasztalható, s ez igen nagy nehézségeket okoz már egy tripeptid izolálásánál is. Tapasztalataink szerint, közbenső tisztitás nélkül a módszer teljesitőképessége már 3-4 aminosav-tagszámnál kimerül.

A mellékreakciók fő oka az anhidridek autoacileződése, amit a lugos közegben bekövetkező protonvesztés indit el:



Megfigyelhető volt, hogy az acilezendő aminosav sem képes teljesen elreagálni, még a leucin-anhidrid feleslegével sem, ami úgy magyarázható, hogy az aminosav a már kialakult peptidkarbaminát-tal lép reakcióba aminosav-karbaminát és peptid keletkezése közben. A karbaminátok labilitását ki lehet esetleg küszöbölni a megfelelő tioszármazékok alkalmazásával, /2,5-tiazolidin-dionok/ ezek viszont acilezéskor jelentős mértékű racemizációt szenvedhetnek /55/. Így egyelőre a nagy tagszámu peptidek szintéziséről homogén rendszerben, izolálás nélkül, le kellett mondani, a módszer gyorsasága és egyszerűsége azonban olyan előnyök, amelyek kedvéért érdemes szisztematikus vizsgálatokat végezni.

Az előzőekben elmondottakból is kiderült, hogy elvileg két lehetőség van a peptidszintézisre: egyrészt a peptidláncok lépésenkénti növelése a soronkövetkező aminosav hozzákapcsolásával, a lépésenkénti szintézis /stepwise method, stufenweise synthese/, másrészt a szekvencia egyes részleteinek megfelelő kisebb-nagyobb, előre elkészitett peptid-fragmensek összekapcsolása az un. fragmens-kondenzáció. A racemizációs nehézségek miatt az első módszert feltétlenül előnyben kell részesiteni, hátránya azonban, hogy mindig egy

viszonylag nagy molsulyu peptidet kell továbbhurcolni, annak véd6csoportját a további kapcsolashoz lehasitani, ami az értékes komponensre vonatkozóan komoly veszteséget is jelent. A két szintéziselv összehasonlitására szolgál a következő példa: ha egy tetrapeptidet mindkét módon felépitünk, s bármelyik peptidkötése 80% termeléssel alakitható ki, fragmenskondenzáció esetén a végtermék 64%, lépésenkénti szintézisnél csupán 51% termeléssel keletkezik.

A lépésenkénti módszer ezek szerint akkor lehet versenyképes a fragmens-kondenzációval, ha az egyes lépések termelése megközeliti a kvantitativ termelést, hiszen akkor a két módszer között eltérül a termelésbeli különbség.

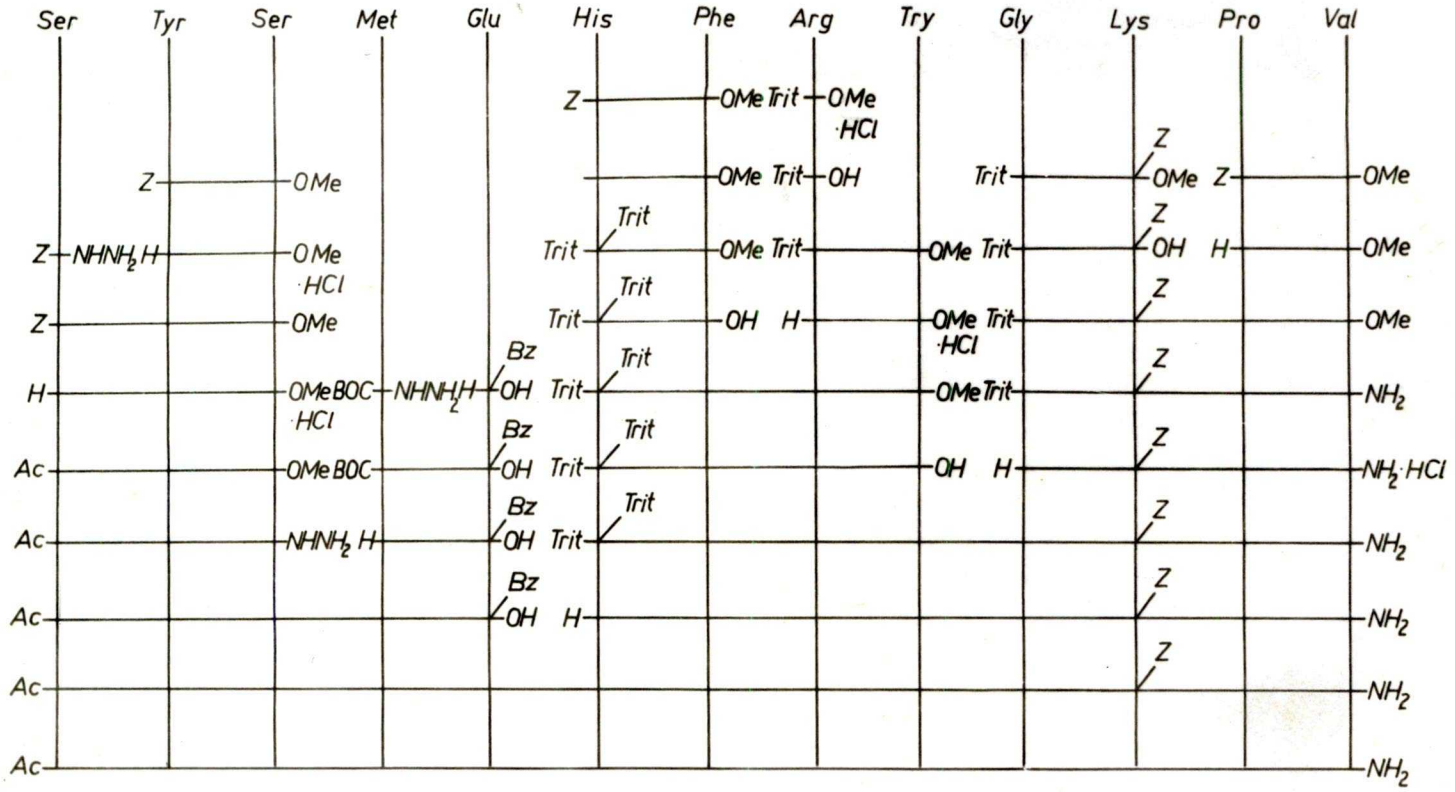
## A melanocit-stimuláló hormonok szintézisére irányuló kisérletek

Az $\alpha$-MSH sikeres előállitásáról 1959-ben Guttmann és Boissonnas számolt be először /56/. A szintézis során DCC-s ill. azidos kapcsolást használtak, az aminocsoport védelme karbobenziloxi és tritil-csoportokkal történt, a karboxilcsoport védésére metilészter használtak, melyet hidraziddá alakitva azidos kapcsolással vagy hidrolizis után

DCC-vel történő kapcsolással vittek tovább. A glutaminsav $\gamma$-karboxiljának védésére benzilésztert használtak. Az 1-5-nek megfelelő pentapeptidet és a 6-13-nak megfelelő oktapeptidet DCC segítségével kapcsolták N-acetil-tridekapeptid-amiddá. A szintézis vázlata a 4.sz ábrán látható.

1963-ban Schwyzer dolgozott ki ujabb szintézist / 57 /, melynek során védőcsoportként terc.-butiloxikarbonil csoportot és terc.-butilésztert használt. E szintézis alkalmas volt arra is, hogy az N-terminális acetilcsoportot más acilcsoportokra cseréljék, s igy vizsgálják a cserének a biológiai hatásra gyakorolt befolyását. Legujabban Yajima és munkatársai számoltak be $\alpha$-MSH szintézisről. / 58 /.

A $\beta$-MSH szintézisek során a szarvasmarha $\beta$-MSH-nak megfelelő hormont 1959-ben Schwyzer és munkatársai állitották elő / 59 /. Az aszparaginsav $\beta$-karboxil-csoportját metilcsoporttal, a lizin $\varepsilon$ - amino-csoportját tozil-csoporttal védték. A védőcsoportok eltávolitása után egy heterogén nyerstermékot kaptak, amelynek tisztitása ellenáramu megoszlással nem sikerült. Egy későbbi szintézis során védőcsoportként terc.-butil-észtert ill. terc.-butiloxikarbonil csoportot használva, amelyeket trifluorecetsavval távolitottak el, egységes termékhez

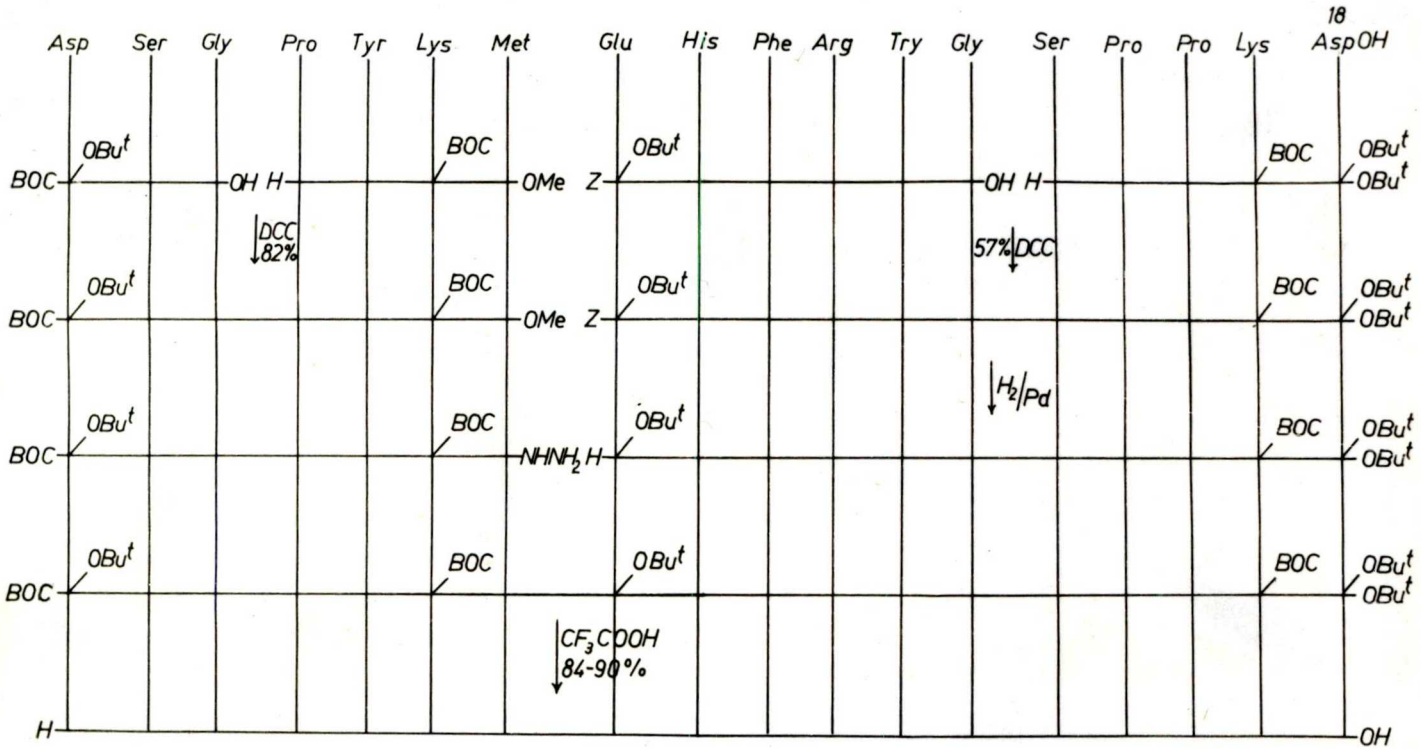

Ser
Tyr
Ser
Met
Glu
His
Phe
Arg
Try
Gly
Lys
Pro
Val
Z
NHNH2 H
OMe
OMe ·HCl
OMe BOC
OMe BOC ·HCl
NHNH2 H
Bz
OH
Trit
OMe Trit
OMe ·HCl
OH
H
NH2
NH2 ·HCl
Ac

jutottak / 60 /. A szintézist az 5.sz.ábra mutatja be. E szintézist csak évek mulva követték ujabbak - most már a szerkezet és hatás összefüggésének vizsgálatát célul kitüzve - a majom / 61 /, majd az emberi / 62// $\beta$ -melanocit stimuláló hormonok felépitése. E szintézisek során általában ugyanazokat a védőcsoport-kombinációkat és kapcsolási módszereket használták, mint a rokon szerkezetü adrenokortikotrop hormonoknál.

<u>A szerkezet és a biológiai hatás összefüggésének vizsgálata a polipeptidhormonok körében, különös tekintettel a melanocit-stimuláló hormonokra.</u>

A korszerü biokémia egyik legérdekesebb feladata, hogy uj betekintést biztositson az enzimek, hormonok és biológiailag aktiv proteinek hatásmechanizmusába. Viszonylag keveset tudunk ezeknek a fontos anyagoknak a kémiai szerkezete és biológiai hatékonysága közötti összefüggésről, hogy a hatásért melyik molekularészlet a felelős, melyek a biológiai reakció intermedier lépései.

A fehérjék pl. az enzimek biológiai hatásában a primer strukturán kivül a magasabbrendü szervezettség is /másod, harmad esetleg negyedrendü szerkezet/ lényeges szerepet játszik, sokszor döntő


Asp
Ser
Gly
Pro
Tyr
Lys
Met
Glu
His
Phe
Arg
Try
Gly
Ser
Pro
Pro
Lys
18
Asp OH
BOC
OBu$^t$
OH H
DCC
82%
OMe
Z
NHNH$_2$ H
57% DCC
H$_2$/Pd
CF$_3$COOH
84-90%
H
OH

5.sz.ábra

fontosságuak a hatás kialakitásában. Igen valószinü, hogy a polipeptidhormonok sem tekinthetők egyszerüen adott sorrendü aminosavakból felépülő peptidláncnak, hanem az oldalláncok térkitöltése, poláros és apoláros külcsönhatásaik ezt a láncot meghatározott konformációba kényszeritik. Ennek ellenére, az eddig ilyen szempontból vizsgált polipeptidhormonoknál magasabbrendü szerkezetet kimutatni egyértelmüen nem sikerült, s igy egyenlőre a biológiai aktivitás magyarázatát magában a szekvenciában kell keresnünk.

Az enzimek hatásmechanizmusának vizsgálatánál általában abból indulnak ki, hogy a viszonylag nagy enzimmolekula lényegesen kisebb szubsztráttal reagál, s igy nyilvánvaló, hogy a közvetlen reakcióban nem vehet részt az egész enzim, csak annak kitüntetett kis része, az un. aktiv centrum. A helyzetet persze bonyolultabbá teszi, hogy az enzimreakció több részletfolyamatból áll, melyeket esetleg különböző aktiv centrumok biztositanak, s nehezíti ezek lokalizálását, hogy az aktiv centrum esetleg egy hosszu peptidlánc szekvenciálisan távoli, de térben közel kerülő szakaszán helyezkedik el.

A polipeptidhormonoknál más a helyzet, kis-

sebb aminosavtagszámuk következtében sokszor minden egyes oldalláncnak jut szerep a hatás kifejtésében. A nagy különbség azonban az, hogy e hormonoknál nem ismerjük a"szubsztrátot", tehát olyan reakció részleteire vagyunk kíváncsiak, ahol csak az egyik reakciópartner, és egy minden bizonnyal soklépéses rekció végterméke ismeretes. Ezért egyelőre a kutatómunka célja arra irányul, hogy megtudjuk, a hormonnak melyik része vesz részt a reakcióban, s milyen részletek szükségtelenek a biológiai hatás kiváltása szempontjából.

A polipeptidek aktiv centrumának felkutatásánál, a lényeges aminosavak meghatározásánál, a molekula szerkezetének, összetételének rendszeres, vagy valamilyen következtetésen alapuló megváltoztatása a legtöbb eredménnyel járó, gyakran használt eljárás. Legkézenfekvőbb az egyes aminosavak cseréje, ahol aszerint, hogy az oldallánc funkciós csoportjának hatására, térkitöltésére vagy polaritásának fontosságára vagyunk kíváncsiak, cserélhetjük pl. a hidroxil tartalmu aminosavat hidroxil nélkülire /szerin ⟶ alanin/, poláros aminosavat kevésbé polárosra /glutaminsav ⟶ glutamin/, nagy oldalláncut oldalláncnélkülire /valin ⟶ glicin/, vagy közel izoszterikus aminosavakat egymás közt /metionin ⟶ norvalin/, stb.

Másfajta, s szintén csak szintézissel /kivételesen enzimatikus parciális hidrolízissel/ hozzáférhető átalakitás a peptidlánc megrövidítése /fragmensek szintézise/, valamint a lánchosszabitás, vagyis ujabb aminosavak, peptidrészletek beépitése a molekulába. Az utóbbi módszer a láncrövidítéshez képest lényegesen kisebb fontosságu. Ciklusos polipeptideknél, gyürüszükitést és tágitást is lehet szintézissel megvalósitani annak eldöntésére, hogy a gyürü jellege ill. tagszáma játszik-e szerepet az aktivitás létrejöttében. A peptidvíz szabályosan ismétlődő -CH-CO-NH- csoportjának megváltoztatását jelenti a dikarbonsavak $\alpha$ kötéseinek $\beta$ ill. $\gamma$ kötésre való módositása.

Szintézissel megvalósitható átalakitás az egyes aminosavak konfigurációjának megváltoztatása is, amely módositásra a hormonpolipeptidek között számos példát találunk.

A szerkezet módositására, az analógok szintézisére először a kisebb molekulasulyu polipeptidhormonoknál, az oxitocinnál és vazopressinnél került sor.

A melanocit-stimuláló hormonok szintézise igen nagy lépéssel vitte előre e vegyületek biológiai hatásának értelmezését / 63 /. Egész sor fragmenst

állitottak elő az -MSH szekvenciájából, melyek biológiai vizsgálatánál kiderült, hogy a hatásért felelős részlet egy középső szekvencia, a 6-9 helyzetű His-Phe-Arg-Trp tetrapeptid / 64 /, s ezt a részletet bármelyik terminálisan hosszabbitva az aktivitás növekedése észlelhető. Igy a Glu-His-Phe--Arg-Trp-Gly kb. tizszer / 65 /, a metionint is tartalmazó heptapeptid pedig kb. husszor aktivabb a tetrapeptidnél, s kb. ilyen aktiv az N-terminális dekapeptid vagy a C-terminálisról származó oktapeptid is. / 66 / Az a tizenegy aminosavból álló peptid, melynél az -MSH már csak az Ac-Ser-Tyr szekvenciával hosszabb, ismét két nagyságrenddel aktivabb, a teljes tridekapeptid pedig - de acetilcsoport nélkül - már csak két nagyságrenddel marad el a nativ hormon aktivitásától / 67,68 /. A teljes hormon és legkisebb aktiv fragmense aktivitása közt tehát tizmilliószoros eltérés van. E vizsgálatsorozat szintézissel nyert polipeptidjeit, illetve azok MSH aktivitását foglalja össze a 6.sz. ábra.

A lánchosszuság variálásán, s igy az aktiv centrum leszükitésén kivül van egy másik, ugyancsak szintézist igénylő módszer, amivel a hormon és bioreceptora közti reakció jellegére lehet következtetni, ez az aktiv centrum aminosavjai konfigurációjának szisztematikus változtatása. Az eredmények igen

| Szerkezet | MSH E/g |
|---|---|
| Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ | $2 \cdot 10^{10} - 2 \cdot 10^{12}$ |
| Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ | $2 \cdot 10^{9}$ |
| Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ | $2 \cdot 10^{8}$ |
| His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ | $8 \cdot 10^{6}$ |
| Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly | $1{,}4 \cdot 10^{6}$ |
| Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly | $2 \cdot 10^{5}$ |
| His-Phe-Arg-Trp-Gly | $3 \cdot 10^{4}$ |
| His-Phe-Arg-Trp | $3 \cdot 10^{4}$ |
| Ser-Tyr-Ser-Met-Gln-His-Phe-Arg | 0 |
| Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ | 0 |

érdekesek: a His-Phe-Arg-Trp-Gly szekvenciánál a konfigurációváltoztatások jelentősen befolyásolták a biológiai hatást, a fenilalanin és triptofán D-konfigurációja fokozta, a két bázikus aminosav D-konfigurációja pedig nemcsak csökkentette, hanem egyenesen anti-MSH-hatásuvá tette a peptidet. A hisztidin és arginin L-konfigurációja annyira fontos, hogy D-konfigurációban beépitve a másik két aminosav D-konfigurációjának most emlitett serkentő hatását is ellensulyozzák / 69 /. Egy csupa D-konfigurációju aminosavból álló, de forditott szekvenciáju pentapeptid /retro-enantio-vegyület/ teljesen inaktiv volt / 70 /. Az elmondottakat a 7. sz. ábra foglalja össze.

| Peptid | Aktivitás |
|---|---|
| His-Phe-Arg-Trp-Gly | |
| L — L — L — L — Gly | $3 \cdot 10^4$ MSH E/g |
| L — D — L — L — Gly | $1 \cdot 10^6$ MSH E/g |
| L — L — L — D — Gly | $1 \cdot 10^5$ MSH E/g |
| D — D — D — D — Gly | anti MSH-hatás |
| D — L — L — L — Gly | anti MSH-hatás |
| L — L — D — L — Gly | anti MSH-hatás |
| D-Trp-D-Arg-D-Phe-D-His-D-Glu | inaktiv |

7.sz.ábra

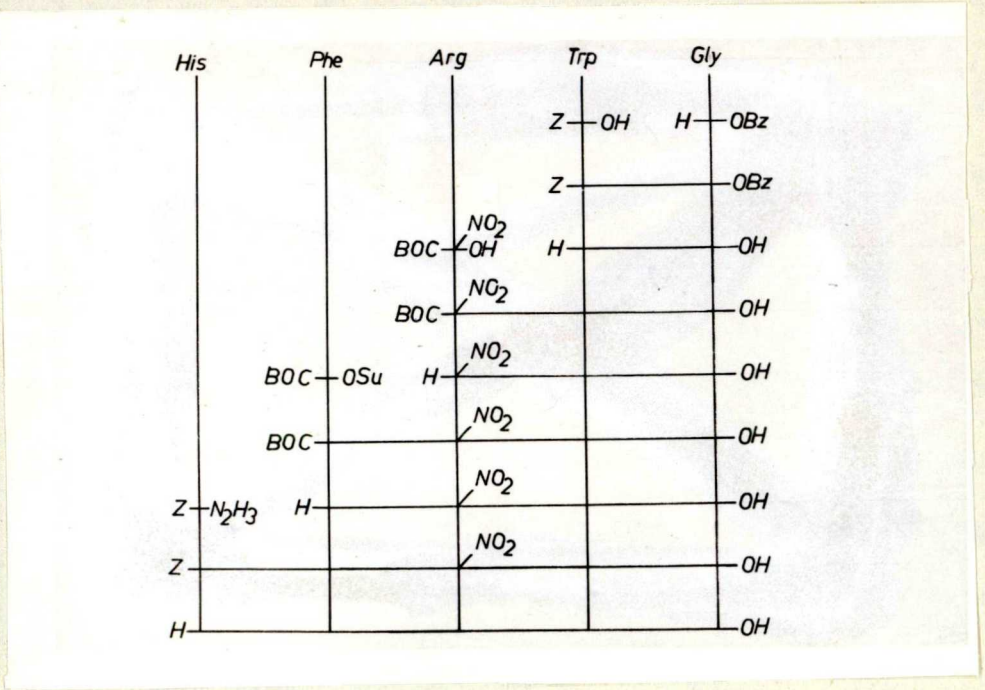
Arra, hogy egy-egy peptidhormon valamennyi szekvencia-variánsát szintetikusan előállitsuk és aktivitását megvizsgáljuk, nyilván gondolni sem lehet, hiszen egyáltalán nem biztos, hogy ez az elképzelhetetlenül nagy munka a várt eredményhez vezetne. Mivel azonban mai tudásunk szerint a szerkezet-aktivitás relációk megismeréséhez más módszerrel nem rendelkezünk, ezért az analógok és fragmensek tanulmányozásához kell folyamodnunk. Ezek a kisérletek természetesen csak olyan anyagokkal végezhetők el, melyek szerkezete, kémiai tulajdonságai messzemenően ismertek.

A fragmensek és analógok szintézise.

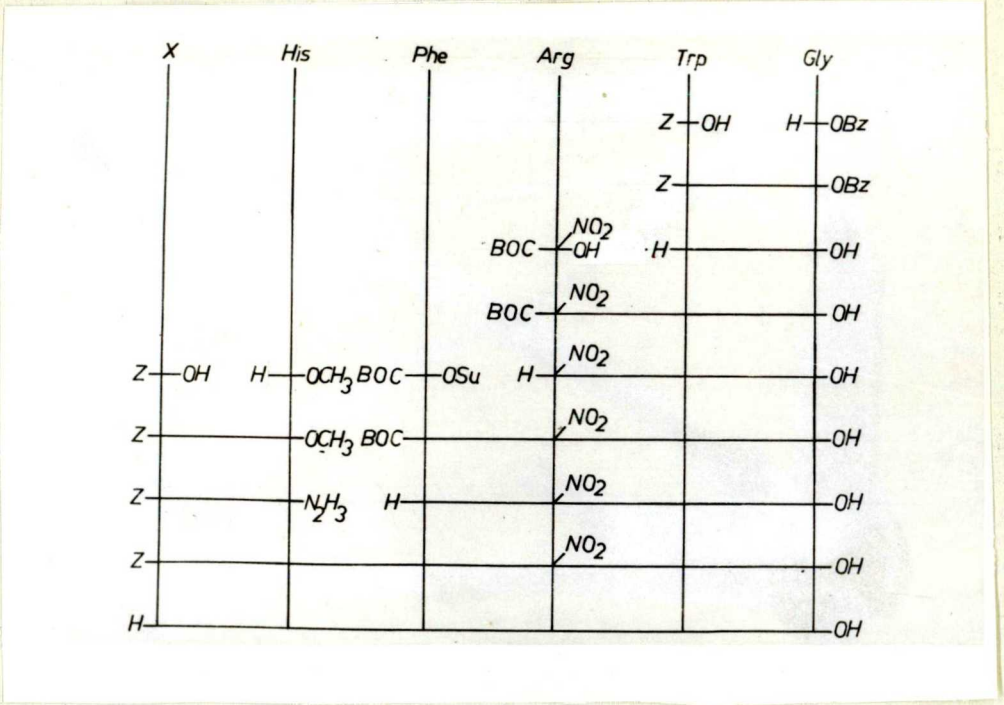
A következő peptideket kivántam szintetizálni: a His-Phe-Arg-Trp-Gly penta, ill. a Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, γ-Abu-His-Phe-Arg-Trp-Gly és a D-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly hexapeptideket.

A pentapeptid szintézise "stepwise" módszerrel történt, mig a hexapeptidekhez egy di- és egy tetrapeptid kondenzációjával jutottam el, mint az a 8. és a 9. sz.ábrákon látható.

Megkiséreltem előzőleg a hexapeptid szintézisénél a glicin karboxil-csoportját etilészter formában védeni, azonban a védett hexapeptid el-




8.sz.ábra




X=Glu, D-Glu ill. γ-Abu

9.sz.ábra

szappanositása csak igen nehezen és alacsony termeléssel volt megvalósitható. Ezért a továbbiakban benzilészteres védelmet alkalmaztam, ill. a Z-Trp-Gly-OBz dipeptid hidrogenolizise után a karboxilcsoport védése só formában történt. A sóképzés N-metil-morfolinnal történt, dimetilformamidos oldatban. A tripeptidhez vegyes anhidrides, mig a tetrapeptidhez aktiv észteres kapcsolással jutottam. A kapott tetrapeptid egyszeri átkristályositással analitikai tisztaságu volt, s a termelés is megfelelőnek bizonyult. A tetrapeptidnek ilyen módon való előállitására az irodalomban nem találtam utalást. A tetrapeptidhez azidos módszerrel kapcsoltam a Z-His-$N_2H_3$-t, s a hidrogénezés után kapott pentapeptid fizikai állandói megegyeztek az irodalmi adatokkal.

A hexapeptidek szintéziséhez elkészitettem a Z- Abu-His-$N_2H_3$-t, a Z-Glu(OBu$^t$)-His-$N_2H_3$-t illetve a Z-D-Glu(OBu$^t$)-His-$N_2H_3$-t, amely dipeptideket azidos módszerrel kapcsoltam a tetrapeptiddel. Trifluorecetsavas kezelés után, ecetsavas közegben hidrogénezve kaptam a kivánt hexapeptideket, amelyek kromatográfiásan és analitikailag is tisztának bizonyultak.

# K I S É R L E T I  R É S Z

## Általános megjegyzések

A kisérleti részben mindazokat a vegyületeket ismertetem, amelyeket a disszertációban tárgyalt szintetikus munka során eredményesn készitettem el, nem szerepelnek tehát az olyan kisérletek, amelyek valamilyen okból eredménytelenek, vagy a továbbiakban nem bizonyultak használhatónak.

Néhány rendszeresen alkalmazott módszer ismertetésére az egyes előiratokban külön nem tértem ki. Igy pl. a reakcióelegyek betöményitése, az oldószerek desztillálása rendszerint rotációs bepárlással, vizsugár- vagy motorvákumban történt, ugy, hogy a fürdő hőmérséklete a 40°-ot nem haladta meg.

A katalitikus hidrogénezés zárt kacsában, vagy átbuborékoltatós rendszerben történt, a hidrogénezés befejeződését az átáramló gáz $CO_2$ tartalmának vizsgálatával állapitottuk meg. Katalizátornak 10% palládiumot tartalmazó aktiv szenet, vagy frissen redukált palládiumot használtam a receptenként megadott mennyiségben.

Az oligopeptidek aminosavösszetételének meghatározásához a teljes hidrolizniseket evakuált cső-

ben, 6 N sósavval, 105°-on, 24 órán át végeztük.

A megadott $R_f$ értékek minden esetben Kieselgel-G /Merck/ adszorbenst alkalmazó rétegkromatográfiás futtatásokra vonatkoznak. Az alkalmazott oldószer-rendszereket sorszámmal láttam el, melyeket az $R_f$ kitevőjébe irtam. Az oldószer rendszerek összetétele a következő volt:

1. n-butanol-ecetsav-viz 4:1:1
2. n-butanol-piridin-ecetsav-viz 30:20:6:24
3. butanol-2-10%-os,ammónia 85:15
4. kloroform-metanol 9:1
5. kloroform-metanol 7:3
6. kloroform-metanol 1:1
7. aceton-dimetilformamid 1:1

A kromatogramok előhivása 0,2%-os alkoholos ninhidrinnel, vagy a klór-tolidin reagenssel történt. /készitése a kisérleti rész végén/

Z-Trp-Gly-OBz

3,4 g /10 mmol/ karbobenzoxi-triptofánt feloldunk 20 ml abs. etilacetátban és lehütjük 0°-ra, majd hozzáadjuk 2,0 g /10 mmol/ glicin-benzilészterhidroklorid és 1,4 ml trietilamin lehütött etilacetátos szuszpenzióját. 2,1 g /10 mmol/ diciklohexilkarbodiimidet adva hozzá, egy órán át kevertetjük

0°-on, majd egy éjszakán át állni hagyjuk jégszekrényben. Szűrés után az etilacetátos fázist mossuk 0,1 N sósavval, vízzel, 5%-os nátriumkarbonáttal, ismét vízzel. A mosások után az oldatot megszárítjuk, $Na_2SO_4$-on, majd bepároljuk és éterrel eldörzsöljük. A kapott fehér anyag 3,7 g /72%/

Op.: 114-116° $/\alpha/_D^{20} = -5,2°$ /c 1, MeOH/

$R_f^{65}$ : 0,85

$C_{28}H_{27}O_5N_3$ M=485,3

| Analízis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 69,30 | 69,51 |
| H | 5,55 | 5,72 |
| N | 8,68 | 8,60 |

<u>H-Trp-Gly-OH</u>

4,9 g védett dipeptidésztert 60 ml metanolban hidrogénezünk csontszenes palládium jelenlétében . A hidrogenolizis végén az oldatot szűrjük, és bepároljuk. A bepárlás után a szabad dipeptidet éterrel csapjuk ki. 2,3 g /87%/ anyagot kaptam.

Op.: 172-174°

$R_f^6$ : 0,47

BOC-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

10 ml dimetilformamidban feloldunk 1,6 g /5 mmol/ terc.butiloxikarbonil- -nitro-arginint, hozzáadunk 0,5 ml /5 mmol/ N-metil-morfolint, majd lehűtjük só-jéggel. A hűtött oldathoz állandó keverés mellett 0,65 ml klórszénsavizobutilésztert csepegtetünk és 10 percig tovább kevertetjük. Ezután hozzáadjuk 1,3 g triptofil-glicin 10 ml dimetilformamidos oldatát, amelyhez 0,5 ml N-metil-morfolint is adunk, és -15°-ra hűtöttük. Az egyesített oldatokat kevertetjük egy órán keresztül hűtés mellett, majd hűtés nélkül. Bepárlás után a maradékot jéghideg 0,1N HCl-al dörzsöljük, s a ragacsosan kiváló anyagot etilacetáttal kirázzuk. Bepárolva 1,8 g védett tripeptidet kaptam. Átkristályosítása metanol-éterből történt.

Op.: 166-168° $/\alpha/_D^{20} = -12,2°$/c 1,MeOH/

$R_f^6$ : 0,67 $R_f^1$ : 0,49

$C_{24}H_{34}O_8N_8$ M = 562,1

| Analisis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 50,67 | 50,52 |
| H | 6,60 | 6,76 |
| N | 19,91 | 20,02 |

H-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH·TFA

1,4 g védett tripeptidet /első kisérlet/ 8 ml 90%-os trifluorecetsavban oldunk $N_2$ atmoszférában, s az oldatot 15 perc állás után bepároljuk. Éter hozzáadására az anyag kristályosan kiválik, amely rétegkromatográfiásan egységes.

Op.: 178-180° $R_f^1$ : 0,38 $R_f^6$ : 0,20

BOC-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

/Aktivészteres kapcsolás/

2,8 g /5 mmol/ H-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH·TFA-t 15 ml dimetilformamidban oldunk és 1,1 ml /10 mmol/ N-metil-morfolint adunk hozzá. Az oldathoz 2,0 g aktivésztert, BOC-Phe-OSu-t adunk, és az elegyet állni hagyjuk szobahőmérsékleten 24 órán keresztül. Bepárlás után a maradékot 0,1 N HCl-al hidegen eldörzsöljük, s etilacetátban vesszük fel. Vizes mosás után szárítjuk, bepároljuk. Éterrel való kezelés után 2,8 g /80%/ védett tetrapeptidet nyerünk.

Op.: 155-157° $R_f^1$ : 0,62 $R_f^6$ : 0,25

$[\alpha]_D^{20} = -20,2°$ /c, 1 DMF/

$C_{35}H_{43}O_9N_9$ M = 709,8

| Analizis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 55,84 | 55,92 |
| H | 6,24 | 6,12 |

BOC-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

/Vegyes anhidrides kapcsolás/

1,3 g terc. butiloxikarbonil-fenilalanint /5 mmol/ feloldunk 10 ml dimetilformamidban, hozzáadunk 0,5 ml N-metil-morfolint és lehütjük só-jéggel. Állandó keverés mellett az oldathoz csepegtetünk 0,65 ml klórszénsavizobutilésztert és 10 percig tovább kevertetjük. Ezután hozzáadjuk 2,8 g /5 mmol/ H-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH·TFA 20 ml dimetilformamidos oldatát, melyhez 1,0 ml N-metil-morfolint is adtunk. Egy órán át hütés mellett kevertetjük az oldatot, majd szobahőmérsékleten szintén egy órát. Bepárlás után 0,1 N HCl-al hidegen kisavanyitjuk, s etilacetátban vesszük fel. Vizes mosás, szárítás után bepároljuk, s éterrel csapjuk ki. 2,1 g /60%/ tetrapeptidet nyerünk. A termék analitikai adatai az aktivészteres uton készitett tetrapeptidével megegyeznek. / Első kisérlet./

Szeged

H-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH·TFA

1,5 g /2 mmol/ védett tetrapeptidet /előző kisérlet/ 10 ml 90%-os trifluorecetsavban oldunk $N_2$ atmoszférában. Az oldatot 15 perc állás után bepároljuk, s éter hozzáadására kristályosan kiválik a szabad tetrapeptid, amely kromatográfiásan egységes.

Op.: 187-189° $R_f^1$ : 0,25 $R_f^6$ : 0,10

Z-His-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

0,76 g karbobenzoxi-hisztidinhidrazidot 6 ml 1 N sósavban feloldunk, majd só-jég hütés közben 0,15 g nátriumnitritet 1 ml vizben feloldva hozzácsepegtetünk. 3 perc után 2,4 ml 50%-os $K_2CO_3$ oldatot adunk hozzá, s a kicsapódó azidot hideg etilacetáttal kivonjuk, majd az oldatot savmentesre mossuk. A száritott etilacetátos oldatot az alábbi amin oldathoz öntjük:1,7 g H-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH·TFA-t feloldunk 15 ml dimetilformamidban és 0,5 ml N-metil-morfolint adunk hozzá. Az egyesitett oldatokat kevertetjük, majd két napig jégszekrényben állni hagyjuk. Ezután a dimetilformamidot ledesztilláljuk és a maradékot 0,1 N sósavval eldörzsöljük. 1,3 g anyagot kaptam, melyet dimetilformamid-vizből kris-

tályositottam át.

Op.: 212-215° $R_f^3$ : 0,6

$/\alpha/_D^{20}$ = -26,2° / c 1, DMF /

$C_{42}H_{48}O_{10}N_{12}$ 1,5 H O M = 880,1

| Analizis: | Számitott: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 55,62 | 55,51 |
| H | 5,70 | 5,58 |
| N | 18,50 | 18,60 |

H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

0,6 g védett pentapeptidet feloldottam 40 ml 90%-os ecetsavban, s 0,4 g frissen redukált palládium jelenlétében hidrogéneztem 8 órán át. A katalizátor kiszürése után bepároltam, s a maradék éterből kristályosodott. 0,4 g /78%/ szabad pentapeptidet kaptam.

Op.: 194-198° $R_f^3$ : 0,42

$/\alpha/_D^{20}$ = -11,2° /c 1, 1 N HCl/

$C_{34}H_{46}O_8N_{11}.2CH_3COOH$ M = 856,2

| Analizis: | Számitott: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 54,24 | 54,05 |
| H | 6,42 | 6,20 |
| N | 19,35 | 19,40 |

Z-Glu/OBu$^t$/-His-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

2,4 g /5 mmol/ Z-Glu/OBu$^t$/-His-$NHNH_2$-t feloldunk 15 ml 1 N sósavban, majd só-jég hütés mellett 0,4 g nátriumnitritet 3 ml vizben feloldva csepegtetünk hozzá. 3 perc után 5 ml 50%-os $K_2CO_3$ oldatot adunk hozzá, s a kicsapódó azidot hideg etilacetáttal kivonjuk, majd savmentesre mossuk. A szárított etilacetátos oldatot 3,5 g H-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH 25 ml dimetilformamidos oldatához öntjük, amelyhez 1,0 ml N-metil-morfolint is adtunk. 16 órán át jégszekrényben állni hagyjuk. Bepárlás után a maradékot 0,1 N sósavval eldörzsöljük, s 95%-os metanol-éterből kristályositjuk. 3,2 g /68%/ hexapeptid származékot kaptam.

Op.: 204-206°  $R_f^7$ : 0,5

$/\alpha/_D^{20}$ = -21,2 /c 1, DMF/

$C_{51}H_{63}O_{13}N_{13}\cdot H_2O$  M = 1084,18

| Analizis: | Számitott: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 56,50 | 56,42 |
| H | 6,04 | 5,92 |
| N | 16,80 | 16,88 |

H-Glu/OBu$^t$/-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·$CH_3COOH$

2 g /1,9 mmol/ védett hexapeptidet feloldunk 50 ml 90%-os ecetsavban és 1 g frissen redukált palládium jelenlétében hidrogénezzük 10 órán keresztül. A katalizátor kiszürése után az oldatot bepároljuk, a maradékot metanol-éterből kristályositjuk.

Op.: 210-212°  $R_f^3$ : 0,7

H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

0,2 g H-Glu/OBu$^t$/-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH-t feloldunk 3 ml trifluorecetsavban és 5 perc után bepároljuk. A maradékot 2 ml vizben oldjuk és egy kis oszlopra /Amberlite IR-4B, acetát ciklusban/ öntjük fel. Az eluátumot bepároljuk, s a maradékot vizes etanolból kristályositjuk. 0,12 g hexapeptidet kaptam.

Op.: 228-231°  $R_f^3$ : 0,25  $R_f^1$ : 0,15

$/\alpha/_D^{20} = -14,5^0$ /c 1, 1 N ecetsav/

$C_{39}H_{50}N_{12}O_9 \cdot H_2O$  M = 848,9

| Analizis: | Számitott: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 55,18 | 55,36 |
| H | 6,17 | 5,82 |
| N | 19,82 | 19,50 |

Z-Abu-His-$OCH_3$

2,37 g karbobenzoxi- aminovajsavat /Z-Abu/ feloldunk 25 ml etilacetátban és a $0^0$-ra lehütött oldathoz 1,75 g hisztidin-metilésztert, majd kevertetés közben 2,1 g DCC-t adunk. 1 órát kevertetünk ezen a hőfokon, majd 15 óráig jégszekrényben állni hagyjuk. A diciklohexilkarbamid kiszürése után az oldatot híg savval, majd vízzel mossuk, $Na_2SO_4$-on szárítjuk és bepároljuk. 2,8 g /72%/ anyagot kaptam, amelyet metanol-éterből kristályosítottam át.

Op.: 124-126$^0$ $R_f$ : 0,32

$/\alpha/_D^{20}$ = -10,2$^0$ /c 1, metanol/

$C_{19}H_{23}O_5N_4$ M= 387,2

| Analizis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 58,62 | 58,75 |
| H | 5,87 | 5,60 |
| N | 14,42 | 14,60 |

Z-Abu-His-$N_2H_3$

$0^0$-ra lehütött 1,95 g Z-Abu-His-$OCH_3$ 15 ml etanolos oldatához 8 ml hidrazinhidrátot adunk, s 60 órán keresztül ezen a hőmérsékleten tartjuk. Ezután kis térfogatra pároljuk, s metanol-éterből kristályosítjuk.

1,8 g Z-Abu-His-$N_2H_3$-t /94%/ kaptam.

Op.: 183-185°  $R_f$ : 0,74

/ $\alpha/_D^{20}$ = -24,2° / c 1, metanol /

$C_{18}H_{22}O_4N_6$  M = 416,2

| Analizis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 51,92 | 52,10 |
| H | 5,28 | 5,40 |
| N | 20,19 | 19,95 |

Z-Abu-His-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

4,16 g Z-Abu-His-$N_2H_3$-t feloldunk 10 ml 1 N sósavban, 0°-ra hűtjük, 0,69 g $NaNO_2$-t adunk hozzá. 3 perc eltelte után 4,8 ml 50%-os $K_2CO_3$ oldatot adunk a reakcióelegyhez, a kivált azidot jéghideg etilacetátban vesszük fel. Mossuk, $MgSO_4$-on szárítjuk az azidot, a 7,2 g H-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH*TFA 30 ml dimetilformamidos oldatához öntjük, amelyhez 2 ml N-metilmorfolint is tettünk. Egy órát kevertetjük 0°-on, majd éjjel jégszekrényben állni hagyjuk. Bepároljuk, a maradékot 95%-os metanol-éterből kristályosítjuk. 5,8 g /62%/ védett hexapeptidet kaptam.

Op.: 192-195°  $R_f^3$ : 0,65

$/\alpha/_D^{20}$ = -18,5° /c 1, dimetilformamid/

$C_{46}H_{59}O_{11}N_{12}$ M = 955,4

| Analízis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 57,78 | 57,89 |
| H | 6,17 | 6,30 |
| N | 17,52 | 17,60 |

Z-Abu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

2 g Z-Abu-His-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH-t 50 ml 90%-os ecetsavban feloldunk, a 8 órán keresztül hidrogéneztük, 1 g frissen redukált palládium katalizátor jelenlétében. A katalizátor kiszűrése után az oldatot bepároljuk, a metanol-éterből kristályosítunk. 1,4 g szabad hexapeptidet kaptam.

Op.: 208-211° $R_f^1$ : 0,15

$/\alpha/_D^{20}$ = -16,5 /c 1, dimetilformamid/

$C_{38}H_{53}O_7N_{11}$ M = 774,2

| Analízis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 58,91 | 59,05 |
| H | 6,84 | 6,95 |
| N | 16,91 | 17,10 |

Z-D-Glu/OBu$^t$/-His-Phe-Arg/$NO_2$/-Trp-Gly-OH

1,2 g Z-D-Glu/OBu$^t$/-His-$NHNH_2$-t 3 ml 1 n sósavban feloldunk, 0°-ra hűtjük, a 0,12 g $NaNO_2$ 2 ml vizes oldatát adjuk hozzá. 3 perc után 1,6 ml 50%-os $K_2CO_3$-t adunk a reakcióelegyhez, a kivált azidot etilacetátban vesszük fel. Hidegen mossuk, szárítjuk, a az etilacetátos oldatot 1,8 g H-Phe-Arg$NO_2$/-Trp-Gly-OH TFA 15 ml dimetilformamidos oldatához adjuk, amelyhez 0,5 ml N-metilmorfolint is tettünk. Éjjel állni hagyjuk jégszekrényben, bepároljuk, a maradékot 95%-os metanol-éterből kristályosítjuk.

Op.: 201-205° $R_f^7$: 0,48

$[\alpha]_D^{20}$ = -18,5° /c, 1 DMF/

$C_{51}H_{63}N_{13}O_{12}$ $H_2O$ M = 1084,18

| Analízis: | Számított: | Talált: |
|---|---|---|
| C | 56,50 | 56,60 |
| H | 6,04 | 6,20 |
| N | 16,8 | 16,90 |

# Összefoglalás

A hipofizis közti lebenyéből izolált melanocit-stimuláló hormonok biológiai szerepe magasabbrendű állatoknál és embernél még nem teljesen ismert. Bizonyosan szerepet játszik a pigmentáció kialakításában, a feltehetően részt vesz a látási adaptációban is. A biológiai hatás értelmezésének jobb megismerése céljából állítottam elő a következő melanocit-stimuláló hormon fragmenseket és analógokat. Elkészült a His-Phe-Arg-Trp-Gly penta illetve a Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, Abu-His-Phe-Arg-Trp-Gly és a D-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly hexapeptid. Az utóbbi két hexapeptid uj oligopeptid, amelyeket sem hazai, sem külföldi kutatócsoportok még nem szintetizáltak. Ilyen tagszámu oligopeptid előállitása sok nehézséggel jár. Minden egyes aminosavrész védése, kapcsolása, a védőcsoportok eltávolitása mintegy harminc lépéses folyamat. A kapcsolási módszerek ugy lettek megválasztva, hogy racemizáció ne következzék be. A szintézisut különös nehézsége, hogy érzékeny aminosavak beépitése volt szükséges. Az előállitott vegyületek biológiai vizsgálata a SZOTE Szemészeti Klinikáján folyik.

# I R O D A L O M

1. Fruton, J.S.: Advances in Protein Chemistry 5, 1 /1949/

2. Goodman, M.-Kenner, G.W.: Advances in Protein Chemistry 12, 465 /1957/

3. Greenstein, J.P.-Winitz, M.: Chemistry of the Amino Acids. J. Wiley and Sons 1961

4. Schröder, E.-Lübke, K.: The Peptides, I-II. Academic Press, 1965-66.

5. Lerner, A.B. and Lee, T.H.: J. Biol. Chem. 221, 943 /1956/

6. Goschwind, I.I.: Columbia University Conference on Comparative Endocrinology, 421. Wiley New York /1958/

7. Dixon, J.S.-Li, C.H.: J. Am. Chem. Soc. 82, 4568 /1960/

8. Harris, J.I.: Nature 184, 167 /1959/

9. Lerner, A.B. and Lee T.H.: J. Am. Chem. Soc. 77, 1066 /1955/

10. Li, C.H.: Surv. Biol. Progr. 4, 93 /1962/

11. Bergmann, M. and Zervas, L.: Ber 65, 1192 /1932/

12. Anderson, G.W.-Blodinger, J. and Welcher, A.D.: J. Am. Chem. Soc. 74, 5309 /1952/

13. Hofmann, K.-Jöhl, A.: J. Am. Chem. Soc. 79, 1636 /1957/

14. Mc Kay, F.C. and Albertson, N.F.: J. Am. Chem. Soc. 79, 4686 /1957/

15. Anderson, G.W. and Mc Gregor, A.C.: J. Am. Chem. Soc. 79, 6180 /1957/

16. Schwyzer, R. and Sieber, P.: Nature 199, 172/1963/

17. Schwyzer, R. and Kappeler, H.: Helv. Chim. Acta 42, 2622 /1959/

18. Schwyzer, R. and Zatekó, K.: Helv. Chim. Acta 41, 491 /1958/

19. Schnabel, E., Herzog, H. and Klauke, E.: Liebigs Ann. Chem. 716, 175 /1968/

20. Schnabel, E.: Liebigs Ann. Chem. 702, 188 /1967/

21. Haas, W.L. and Gerson, K.: J. Am. Chem. Soc. 88, 1988 /1966/

22. Sakakibara, S., Shin, M., Fujino, M. and Inukai, N.: Bull. Chem. Soc. Japán 38, 1522 /1965/

23. Sakakibara, S., Honda, I. and Takada, K.: Bull. Chem. Soc. Japan 42, 809 /1969/

24. Sieber, P. and Iselin, B.: Helv. Chim. Acta 51, 622 /1968/

25. Greben, A.E., Martynov, V.F.: Zn. Obsca. Chim. 38, 664 /1968/

26. Scopes, K.B.-Young, G.T.: J. Chem. Soc. 1965, 782

27. Fless, J.-Guttmann, S.: Biochim. biophys. Acta 147, 386 /1967/

28. Sakakibara, S.-Shin, H.: J. Am. Chem. Soc. 84, 4921 /1962/

29. Sakakibara, S., Fujino, M. and Imukai, H.: Bull. Chem. Soc. Japan 38, 1522 /1965/

30. Masur, H.H., Plume, G.: Experientia 24, 661 / 1968 /

31. Loffet, A.: Experientia 23, 406 /1967/

32. Bruchner, V., Medsihradszky, K.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 44 /1965/

33. Schnabel, E.: Liebig's Ann. Chem. 702, 188 /1967/

34. Shaltiel, S.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 178 /1967/

35. Weygand, F., Fielta, P.: Chem. Ber. 100, 3841 /1941/

36. Jäger, G., Siedel, W.: Chem. Ber. 101, 3537 /1968/

37. Schröder, E., Lübke, K.: Fortschritte der Chemie Org. Naturstoffen 26, 48 /1968/

38. Law, H.D.: Annual Reports 63, 528 /1966/

39. Determann, H., Heuer, J.: Liebig's Ann. Chem. 694, 190 /1966/

40. Nedzihradszky K., Bajusz S.: Kémiai Közl. 29, 379 /1968/

41. Antonovics, I., Heard, A.: J. Am. Chem. Soc. 85, 3660 / 1963/

42. Savrda, J., Veyrat, D.H.: Tetrahedron Letters 60, 6253 /1968/

43. Honzl, J., Budinger, J.: Coll. Czech. Chem. Comm. 26, 2333 /1961/

44. Hope, D.B., Murti, V.: J. Biol. Chem. 237, 1563 /1967/

45. Anderson, G.W.: J. Am. Chem. Soc. 89, 5012 /1967/

46. Anderson, G.W., Mc Gregor, A.C.: J. Am. Chem. Soc. 79, 6180 /1957/

47. Williams, M.W., Young, G.T.: J. Chem. Soc. 1963, 881

48. Fruton, J. S.: Advances in Protein Chemistry 5, 1 /1949/

49. Fujino, M., Hatanaka, C.: Chem. Pharm. Bull. /Tokyo/ 16, 929 /1968/

50. Gross, H., Bilk, L.: Tetrahedron 24, 6935 /1968/

51. Merrifield, R.B.: Advances in Enzymology 32, 221 /1969/

52. Semjahin, M.M., Kolosov, N.M.: Chemie der Antibiotika /1961/

53. Denkewalter, R.G., Hirschmann, R.: J.Am. Chem. Soc. 88, 3163 /1966/

54. Hirschmann, R., Strachan, R.G.: J. Org. Chem. 32, 3415 /1967/

55. Dewey, R.S., Schwam, H.: J. Am. Chem. Soc. 90, 3254 /1968/

56. Guttmann, S., Boissonnas, R.: Helv. Chim. Acta 41, 1852 /1958/

57. Schwyzer, R., Sieber, P.: Helv. Chim. Acta 46, 870 /1963/

58. Yajima, H., Minami, H.: J. Am. Chem. Soc. 90, 527 /1968/

59. Schwyzer, R., Iselin, B.: Helv. Chim. Acta 46, 1975 /1962/

60. Schwyzer, R., Kappeler, H.: Helv. Chim. Acta 42, 1702 /1959/

61. Yajima, H., Kawasaki, K.: Chem. Pharm. Bull. Tokyo 16, 1342 /1968/

62. Yajima, H., Okada, Y.: J. Am. Chem. Soc. 90, 527 /1968/

63. Yajima, H.: Gunma Symposia on Endocrinology 5. 73 /1968/

64. Vogler, K., Lanz, F.: Helv. Chim. Acta 49, 390 /1966/

65. Li, C.H.: J. Org. Chem. 28, 178 /1963/

66. Li, C.H.: J. Am. Chem. Soc. 82, 5760 / 1960 /

67. Hofmann, K.: J. Am. Chem. Soc. 83, 2289 /1961/

68. Guttmann, S., Boissonnas, R.A.: Experientia 17, 265 /1961/

69. Chung, D., Li, C.H.: Biochim. biophys. Acta 136, 570 /1967/

70. Hofmann, K., Yajima, H.: Recent Progress in Hormone Research 18, 41 /1962/

Ezuton mondok köszönetet Dr Kovács Ödönön professzor urnak, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom elkészitését a vezetése alatt álló intézetben, a munkámat tanácsaival segitette.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk minden tagjának az értékes eszmecseréért, hasznos technikai és elméleti tanácsaikért.