

**NEM FEHÉRJEEREDETŰ AMINOSAVAKAT
TARTALMAZÓ NEUROPEPTID ANALÓGOK SZINTÉZISE
ÉS VIZSGÁLATA**

Egyetemi doktori értekezés

Basel Adi
okleveles gyógyszerész



S z e g e d

1996

TARTALOMJEGYZÉK

| | oldal |
|---|-----------|
| I. Bevezetés | 3 |
| II. Előzmények, célkitűzések, módszerek | 5 |
| 1. <i>Előzmények</i> | 5 |
| 2. <i>Célkitűzések</i> | 20 |
| 3. <i>Módszerek</i> | 23 |
| III. Kutatási eredmények | 26 |
| 1. <i>Nem fehérjeeredetű aminosavak</i> | 26 |
| 2. <i>Kiatorfin és analógjai</i> | 27 |
| 3. <i>Morfin tolerancia és dependencia gátló peptidek és analógjaik</i> | 30 |
| 4. <i>Galanin szegmensek és analógjaik</i> | 35 |
| 5. <i>Csalán extrahálási vizsgálatok</i> | 39 |
| IV. Kísérleti leírások | 41 |
| V. Összefoglalás | 54 |
| Köszönetnyilvánítás | 56 |
| Irodalom | 57 |

I. B E V E Z E T É S

1993-ban szereztem okleveles gyógyszerészi diplomát a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Gyógyszerészeti Karán. Egyetemi doktori értekezésem a diplomamunkám folytatásaként készítettem az Egyetem Orvosi Karának Orvosi Vegytani Intézetében.

A szerves kémián belül a modern peptidkémia mintegy negyvenéves múltat tekint vissza amikor du Vigneaud és munkatársai megvalósították a neurohipofízis ismert peptidhormonjainak, az oxitocinnak és a vazopresszinnek első sikeres szintézisét, amelyért a kiváló amerikai kutatót Nobel-díjjal is jutalmazták 1955-ben.

A peptidkémian belül az elmúlt évtizedekben a neuropeptidek egyre nagyobb jelentőségre tettek szert. A hetvenes évek elején kiderült, hogy egyre több, már korábban is ismert, az élő szervezetben más helyen felfedezett peptidhormon megtalálható a központi idegrendszer bizonyos részeiben, így neuropeptid sajátosságokkal is, vagy főleg neuropeptid sajátosságokkal rendelkeznek. A modern biokémiai, szerves kémiai módszerek, az úgynevezett nagyműszeres izolálási és analitikai technikák az elmúlt két évtizedben különösen jelentős fejlődésen mentek át. Ennek szinte egyenes következménye, hogy új és új neuropeptid jellegű vegyületek kerültek kimutatásra, izolálásra és szerkezetüket is igazolták.

Ezen neuropeptidek közt megtalálhatók a már fehérje nagyságrendbe tartozó óriás molekulák, de találhatók köztük egész kicsi di- vagy tripeptidek is, amelyek számos neuropeptid sajátosságot hordoznak egyazon molekulán belül.

A neuropeptidok egy része, így a MIF-1 is felfogható mint egy nagyobb neuropeptid kisebb származéka vagy esetleg metabolitja. Fontos megemlíteni, hogy különösen a neuropeptideknél a nagyobb neuropeptidok kisebb szegmensei új, érdekes biológiai hatásokat hordozhatnak. Peptid analógokról akkor beszélünk, amikor az eredeti biológiailag aktív peptid eredeti aminosav-szekvenciájában olyan helyettesítéseket végeznek más aminosavak, aminosav származékok, nem fehérjeeredetű aminosavak beépítésével vagy egész drasztikus változtatásokkal, hogy az eredeti peptidmolekula egész szerkezete kevésbé vagy lényegesen megváltozik. Ezzel természetesen a peptidmolekula biológiai sajátosságai is megváltoznak.

A peptidanalógok szintézisének ma már óriási az irodalma. Ezért ebből csak két dolgot emelek ki. Segítségükkel lényeges információkat kaphatunk a peptid kémiai szerkezete és biológiai hatásai közti összefüggésekre. Számos esetben ilyen tervezett analógok specifikus, vagy fokozott biológiai hatásokkal rendelkeznek.

Doktori munkám során kis neuropeptidok, neuropeptid szegmensek és olyan analógjaik szintézisével és kémiai vizsgálatával foglalkoztam, amelyek valamely nem fehérjeeredetű aminosavat tartalmaznak, a kutatócsoport profiljának megfelelően, amelyben dolgoztam. Ezen peptidok elsősorban a kémiai szerkezet és a biológiai hatások összefüggéseire adhatnak információt.

II. ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK, MÓDSZEREK

1. ELŐZMÉNYEK

Mint a bevezetőben is említésre került, az ismert neuropeptidek között számos alacsony aminosavszámú dipeptid és tripeptid is található, amelyek igen fontos biológiai hatást vagy hatásokat hordoznak. Nem véletlen példaként említem meg a dipeptidek közül az analgetikus/fájdalomcsillapító hatással rendelkező kiotorfint, a H-Tyr-Arg-OH alapeptidet [1]. Az elnevezés onnan ered, hogy a dipeptidet a japán Kyotóban fedezték fel és morfin-szerű fájdalomcsillapító hatással rendelkezik [2].

Ugyancsak két aminosavból álló dipeptid az 1980-ban leírt morfin tolerancia dependencia (függőség és hozzászokás) gátló/inhibáló kis peptidek családjának legegyszerűbb tagja az exogén Z-Pro-D-Leu-OH [3]. Ezen dipeptid az oxitocin lineáris, C-terminális tripeptidjének, a MIF-1-nek [4] a származéka. Érdekes, hogy az utóbbi endogén tripeptid ugyancsak rendelkezik morfin tolerancia és dependencia gátló sajátságokkal [5]. Ugyanakkor ezen tripeptid jó példa arra is, hogy még egy kis peptid is számos biológiai sajátságot hordozhat magában egyidejűleg. Elég csupán ezen MIF-1, a H-Pro-Leu-Gly-NH₂ példáját megemlíteni, amely a fenti további fontos neuropeptid sajátsága, hogy csökkenti a Parkinson-hatást továbbá antiamnéziás sajátságokkal rendelkezik. A tripeptidamid fontos hormonhatása, hogy

az MSH, az ismert hipofízis hormon felszabadulásának inhibitora is. Nevét is e hatásáról kapta. A morfin tolerancia, dependencia gátló családba tartozik még az eddig nem említett ugyancsak exogén ciklo(Pro-Leu) [5] is.

Az ismert kis neuropeptidok közül, amelyekkel a kutatócsoportban is dolgoztak, a fenti két dipeptiden és az MIF-1 tripeptiden kívül szeretném megemlíteni a tireotropin felszabadító hormont, a TRH-t [6], a Glp-His-Pro-NH₂-t. E tripeptid kutatócsoporti munkáiból két szabadalom és két közlemény [7,8] jelent meg, ezért is említem ezt példaként. E tripeptid két fő hatással rendelkezik: részben a tireotropin felszabadító hormonhatással, részben számos központi idegrendszeri, neuropeptid hatásokkal.

Doktori munkám során elsősorban a kiotorfin (H-Tyr-Arg-OH), az endogén és exogén morfin tolerancia és dependencia gátló peptidok a Pro-Leu-Gly-NH₂ (MIF-1), és a Z-Pro-D-Leu-OH (MTDIP) nem fehérjeeredetű aminosavakat tartalmazó analógjai, valamint a galanin (Gal) nevű, újabban intenzíven kutatott neuropeptid egy szegmensének szintézisével, tisztításával, fizikai és kémiai jellemzésével foglalkoztam. Gyógyszerészként önállóan foglalkoztam csalán hatóanyagok egy izolálási technikája kidolgozásával, az extraktumok bizonyos jellemzésével. E munka sajnos rajtam kívül álló okokból nem nagy haladást ért el, de alapot ad további kutatásokhoz. A továbbiakban e fejezet keretében az analgetikus dipeptid kiotorfin, a morfin tolerancia és dependencia gátló dipeptid és tripeptid (MTDP és MIF-1), a csirke galanin (Gal) nevű 29 aminosavat tartalmazó neuropeptid, valamint a csalán hatóanyagkutatás legfontosabb irodalmi előzményeiről kívánok elkülönítetten, röviden beszámolni.

Természetes ezen irodalmi összefoglalóban nem törekedhettem a teljességre.

KIOTORFIN

A fájdalomcsillapítás, az egyre hatásosabb fájdalomcsillapító készítmények kutatása az orvostudomány és a gyógyszeripar ma is élő problémája. A klasszikus, készítmények ismert családja az ópiát típusú alkaloidok (morfin, stb...) hozzáférhetősége, relative olcsó előállíthatósága miatt ma is klinikai jelentőségű. Ugyanakkor sajnos világjelenség, és egyre jobban behatol Európába, Európa középső részébe, sőt Magyarországra is a kábítószer fogyasztása és annak folyamatos emelkedése. Az ópiát típusú alkaloidok is kábítószer, amelyeknél más kábítószerhez hasonlóan, egyéb mellékhatások mellett fellépnek különböző központi idegrendszeri problémák, többek közt a tolerancia és a dependencia jelensége, a súlyos hozzászokás és a függőség jelenségeinek kialakulása.

Szakemberek évtizedek óta feltételezték a testidegen (exogén) morfin alkaloidoknak megfelelő humán eredetű, endogén, vagyis természetes fájdalomcsillapító anyagok biológiai létezését. Ezen anyagot még felfedezése előtt várhatóan endogén mivolta és morfinszerű hatása miatt endorfinnak nevezték el. A fájdalomcsillapításban, a peptidkutatásban is óriási áttörést jelentett 1977-ben Hughes és munkatársainak felfedezése, amikor a már ismert szerkezetű endorfinok fragmentumait az endogén Met- és a Leu-enkefalint [9] felfedezték. Feltételezték, hogy az endorfinok mellett az enkefalinok a természetes fájdalomcsillapító peptidek. Részletesen nem kívánok kitérni az endorfinokra és az enkefalinokra, mert nem tartoznak doktori értekezésemhez.

Ugyancsak nem foglalkozhatok a tej kazeinjából izolált morfin-szerű

analgetikumok másik csoportjával, a kazomorfinokkal [10] és a közeli rokon dinorfinokkal [11].

Részletektől eltekintve, sajnos az ópiát típusú endogén peptidekről és hatásosabb, mitöbb reménykeltő analógjaikról is kiderült, hogy alkalmazásuknál fájdalomcsillapítás ugyancsak fellép a tolerancia és a dependencia jelensége.

A kiotorfin elnevezés eredete az, hogy mint morfin hatású vegyületet a japánok Kyoto városában fedezték fel először. Takagi és munkatársai szarvasmarhaagyból izolálták [1,2]. Később több emlős agyában (patkány, egér, nyúl stb...) ugyancsak sikerült kimutatni, sőt ezekből is izolálták. Ezen analgetikus dipeptid magas koncentrációban található az agy szinaptoszóm frakciójában. A "kiotorfint tartalmazó neuronok" jelenléte azt sugalja, hogy a kiotorfin úgy hat, mint neurotranszmitter/neuromodulátor. Talán nincs messze a valóságtól az az állítás, hogy a kiotorfin (ha áttételesen is) a legkisebb endogén analgetikum. Japán szerzők az analgetikus hatások mérésére az általuk kidolgozott "tail-pin" vagy "tail-flick" módszert alkalmazták *icv* vagy *ic* adagolás mellett [12]. Fájdalomcsillapító hatását oly módon fejt ki, hogy indukálja (10^{-6} vagy 10^{-7} M nagyságrendben) a Met-enkefalin felszabadulását az agyból depolarizáló hatással az enkefalinerg neuronokból koncentráció-függő módon. Ezen indukálás elsősorban a striatumban, a gerincvelőben és a medulla oblongata-ban [13-15] jelentős.

Általánosságban elfogadott, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció az idegi terminálokban közeli kapcsolatban van a neurotranszmitter felszabadítással. Ebből egyértelműen az a következtetés vonható le, hogy a kiotorfin dipeptid a Met-enkefalin felszabadításával fejt ki analgetikus hatását. Így valószínűsíthetően a kiotorfin a



fájdalomgátló mechanizmusban fiziológiai szereppel bír mint neurotranszmitter vagy mint neuromodulátor [16,17]. Valószínűsítették azt is, hogy a kiotorfin gátolja a Met-enkefalint lebontó enzimek működését [18]. A kiotorfin viszont gyorsan bomlik egy membránhoz kötött aminopeptidáz hatására [19]. A kiotorfin agybani keletkezéséről is szükséges néhány dolgot előrebojsajtani. Az irodalomban két elmélet található; egyik variáció szerint egy a membránhoz kötött prekursor proteinekből (az endogén CANP involválva van) képződik először az 1982-ben leirt neo-kiotorfin [20], amely egy pentapeptid: H-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg-OH és egy tripszinszerű peptidáz hatására a Lys és a Tyr között kiotorfinná hasad [21]. A másik elmélet szerint, a kiotorfin dipetid az agy több helyén aminosavakból, vagyis Tyr és Arg-ból szintetizálódik [22]. A kiotorfin semmilyen ópiát receptorhoz nem kötődik, hanem egy speciális receptoron az agy plazma membránjában Ca^{2+} - mobilizáló mechanizmuson keresztül fejt ki hatását [23]. A dipeptid növeli a Ca^{2+} belépését a synaptosomákba koncentrációtól függő módon. Ez alátámasztja azt, hogy a kiotorfin indukálhatja a Ca^{2+} belépését a synaptosomákba egy specifikus receptor-mediált módon.

A fentiekből adódóan az analgéziát produkáló kiotorfin mechanizmusa különbözik más ópioid peptidekétől. E dipeptid egy naloxon-reverzibilis és hosszú hatású analgéziát okoz [24], de nem kötődik speciális ópiát receptorokhoz. Nincs arra bizonyíték, hogy az endogén ópioid peptidek, különösen a Met- és a Leu-enkefalin neurotranszmitter szereppel rendelkeznek. Ezért a kiotorfin analgetikus hatása endogén opiooid peptideken keresztül játszódik le. Összefoglalóan a kiotorfin lehetséges hatásai: (1) enkefalin vagy endorfin felszabadító hatás; (2) az

enkefalinokat lebontó (degradáló) enzimekre gyakorolt gátló hatás. Bár az analgetikus hatás nem csupán ezekkel magyarázható, mivel a szakirodalomban található sokkal hatásosabb enkefalin-lebontást gátló inhibitorok (puromycin, bacitracin) még sincs ezeknek analgetikus hatásuk.

Igy a legvalószínűbb, hogy a kiotorfin úgy hat mint egy enkefalin és endorfin felszabadító faktor [25]. A kiotorfint kötő specifikus receptorról még nem sokat tudunk, de e receptor kapcsolatban van a G-proteinnel, lehet egy GTPase. Egy dipeptid, a Leu-Arg egy hatásos, tiszta kiotorfin antagonistája [26]. Ugyancsak részben bizonyított, hogy a kiotorfin gyorsan degradálódik agyi homogenizátumokban a synaptosoma és a nyers mitochondrium frakciókban a bestatin-érzékeny aminopeptidázok hatására [19].

A neo-kiotorfinról annyit említek meg, hogy kiotorfin-szerű hatással rendelkező pentapeptid, amelynek molekulájában a kiotorfin dipeptid megtalálható.

Röviden a kiotorfin és analógjai szintetikus munkáiról és az ezzel kapcsolatos biológiai eredményekről. Az irodalom igen érdekes képet mutat. A kiotorfin fájdalomcsillapító hatása moláris alapon 4,2-szer nagyobb a Met-enkefalinénál, ugyanakkor a kiotorfin az enkefalinok esetleg az endorfinok felszabadításán keresztül fejt ki hatását. Így a kiotorfin jelentősége nagyobb, mint amelyet a kevésbé terjedelmes irodalma mutat.

Az első szerkezetigazoló szintézist követően számos kutatócsoport előállította a kiotorfint kémiai szintézissel és a használt analgetikus tesztekől függetlenül azonos relatív aktivitásokat kaptak. Meg kell említeni, hogy e dipeptidet évek óta sikeresen használják az enzimatis peptidszintéziseknél modellvegyületként [27-29].

Az enzimatis peptidszintézis lehetőséget nyújt az igen tiszta, teljesen aktív dipeptid "large-scale" előállítására is [30].

Yajima és munkatársai elkészítették a kiotorfin retropeptidjét és a D-izomereket [31], amelyek között volt a H-Tyr-D-Arg-OH a mai napig is az egyik legaktívabb analóg. Ennek analgetikus aktivitása a kiotorfinénak 5,6-szorosa. Kubota és munkatársai nyolc enkefalin analógot állítottak elő, amelyek mindegyike tartalmazta a Tyr-Arg, vagy Tyr-D-Arg szekvenciárészt [32]. Utóbbi Met-enkefalin analógja 2,4-szer aktívabbnak bizonyult a morfinnál is.

Elkészítették a dipeptid és mindkét aminosavnál külön-külön a D ciklikus analógokat és azt találták, hogy a D-aminosavakat tartalmazó keto-piperazin analógok aktivitása nagyobb a kiotorfinénál. Van olyan, amely aktivitása a H-Tyr-D-Arg-OH aktivitásának felel meg [33]. Olyan dipeptideket, illetve D izomer enkefalin analógokat is előállítottak, amelyek aldehid C-terminális végződést tartalmaztak, de csökkent aktivitásuk csalódást keltett [34]. Még említést teszek arról, hogy Tyr, Arg és D-Arg tartalmú, esetleg többszörösen is helyettesített neo-kiotorfin analógokról számoltak be a szerzők [35], amelyek közül nem egy 10-szer aktívabbnak bizonyult a neo-kiotorfinnél.

Kutatócsoportunkban korábban intenzíven foglalkoztak kitorfin analógok előállításával és vizsgálatával, amely fontos szerkezet hatás tulajdonságokra mutatott rá és sikerült néhány igen aktív analógot is előállítani [36].

További szintetikus munkák ismertetésétől eltekintek, mert kémiaileg vagy biológiailag különös jelentőségük nincs. Az irodalmi ismertetésem ezek nélkül is megadja a legszükségesebb információkat.

MORFIN TOLERANCIA DEPENDENCIA GÁTLÓ PEPTIDEK

Ezen alfejezet keretében három alapeptid (1) az exogén MSH-felszabadítást gátló peptid (MSH-RIF, MIF-1, vagy PLG: H-Pro-Leu-Gly-NH₂), az exogén Morfin Tolerancia Dependencia Inhibitor Peptid (MTDIP, vagy MTDP: Z-Pro-D-Leu-OH és egy dipeptid ciklikus változata a ciklo(Leu-Gly) irodalmát tekintem át röviden.

Hangsúlyt fektettem a Z-Pro-D-Leu-OH irodalmára, ugyanis doktori munkám során főleg ezzel és ennek analógjaival foglalkoztam.

A MIF-1 tripeptidamid a humán és számos emlős hipotalamuszában található. Először szarvasmarha hipotalamuszából izolálták és szerkezetét bizonyították [37,38]. Már korán bizonyítást nyert, hogy e peptid gátolja az MSH felszabadulását [39] és mai ismeretünk szerint is csak az egyedüli endogén peptid, amely ezen tulajdonsággal rendelkezik. Időközben kiderült, hogy elősegíti a Parkinson-kór kifejlődését [40], hatásos az elektrokonzulzív sokk-indukált amnéziában, anti-amnéziás sajátságokkal is rendelkezik, amelyet szegedi kutatócsoport bizonyított [41]. Végül, de nem utolsó sorban, gátolja a morfin toleranciát és dependenciát [42]. E peptidek blokkolják a tolerancia és a fizikai depen-

dencia kifejlődését egérben anélkül, hogy a morfin analgetikus potenciálját módosítanák.

Szerkezet - hatás összefüggés vizsgálatok azt mutatták, hogy számos peptid képes blokkolni a fizikai dependencia kifejlődését a morfiom esetében [43]. A MIF-1-en kívül (amely, mint említettem egyidejűleg számos más hatással is rendelkezik) a szintetikus Z-Pro-D-Leu-OH dipeptid (amelynél más hatásokat nem irtak le) és a ciklo(Leu-Gly) rendelkezik ilyen hatásokkal. Érdekes módon az előbbi védett dipeptid további három izomerje is képes blokkolni a morfin fizikai függőségét. Egy másik gyűrűs származék, a ciklo(Pro-Phe) is aktívnak bizonyult. Még ma sem ismert túl sok ezen peptidek hatásmechanizmusáról, de az bizonyos, hogy a dopaminerg rendszerek nem játszanak döntő szerepet. Az egyértelmű, hogy a MIF-1, a Z-Pro-D-Leu-OH és a ciklo(Leu-Gly) a leghatásosabb peptidek a morfin fizikai dependenciájának blokkolásában. A MIF-1 és a ciklikus peptid az ópiát tolerancia kifejlődésének gátlásán kívül a dopamin receptorok szuperérzékenységét is gátolják [44].

Mivel e kis peptidek részét alkotják az oxitocinnak, amely nagyon közeli rokonságban van a vazopresszinnel, egyáltalán nem meglepő, hogy az oxitocin és a memória folyamatokban igen aktív vazopresszin analógok (DG-AVP, stb.) szintén hatásosak az ópiát tolerancia kialakulás és a fizikai függőségek gátlásában [45]. Ezek a C-terminális MIF-1 hatásaira vezethetők vissza. A morfinnal szembeni tolerancia kifejlődése a tanulás és a memória folyamatok részének tekinthető [46].

Logikus az is, hogy ha a PLG az ópioid tolerancia és dependencia endogén modulátora, akkor e kis peptidek valószínűsíthetően inhibitorai más ópioidoknak

is (morfin), de ez nem nyert bizonyítást ezidáig. Az viszont többszörösen bizonyított, hogy az oxitocin és a PLG fragmense hasonló módon hatásos az alkohol tolerancia kivédésében is [47]. Részletesen tanulmányozott a MIF-1 konformációja, amely a vizsgálatok szerint egy eléggé flexibilis molekula [48]. Az endogén tripeptidamid eléggé gyorsan degradálódik a vérben, a különböző szövetekben és a vese ürítése révén. A ciklopeptid, a ciklopeptidek megelőző irodalmát külön szükségtelen részleteiben tárgyalni, ugyanis a MIF-1 és a Z-Pro-D-Leu-OH kapcsán számos esetben kerül szóba. Annyit mindenesetre hangsúlyozni kell, hogy szintetikus volta miatt, de más enzimatis okok miatt is e ciklikus peptidok hatásideje/felezési ideje lényegesen meghaladja a MIF-1 peptidét.

A fentiekben hangsúlyoztam, hogy a hipofízis hátsólebeny hormonok (oxitocin, vazopresszin) befolyásolják (gátolják) a kábitó fájdalomcsillapítók iránt kialakuló toleranciát és dependenciát/függőséget. A hetvenes évek végén elsősorban Walter és munkatársai figyelték meg, hogy az oxitocin di- és tripeptid származékai a legaktívabb gátló peptidok (egerekben). A legaktívabbnak ezek közül is a Z-Pro-D-Leu-OH (MTDIP) peptidszármazék bizonyult [3,5].

Ez a dipeptid a leucin D módosulatát tartalmazza és az N-terminális részen karbobenzoxi csoport van. Az enzimekkel szembeni rezisztencia valószínű, hogy ennek köszönhető.

Mint említettem a hipofízis hormonok (oxitocin, vazopresszin) befolyásolják a tanulás memóriatárolási folyamatait is [45, 46], azonban a MTDIP nem hat a passzív elhárító tanulásra [49]. E peptid hatásmechanizmusáról a morfin dependenciában ugyancsak keveset tudunk. Érdekes, hogy bár maga a dipeptid nem

rendelkezik fájdalomcsillapító hatással, magasabb dózisokban fokozza a morfin hatását. A szegedi kutatócsoportban megállapították, hogy az MTDIP közvetlen agyi támadásponttal gátolja a morfin dependencia kialakulását. Nem valószínű azonban, hogy a peptid egyszerűen a morfin receptorral lép kölcsönhatásba [50]. Feltételezik viszont, hogy hatásmechanizmusában az agytörzs neurotranszmissziója szerepet játszik [51].

A további helyi kutatások eredményei alapján valószínűsíthető az is, hogy a Z-Pro-D-Leu-OH hatása a morfin dependenciára közvetlenül a központi idegrendszer (CNS) irányítása alatt van és befolyásolhatja az agyi catecholaminergikus és/vagy serotonergikus neurotranszmisszió változásait [52]. Az MTDIP nem befolyásolja a noradrenalin és a DA eltűnését az agyi rendszerből, ugyanakkor jelentősen védi az MPT-indukált DA tartalom csökkenését a striátumban. Az, hogy ezen mechanizmusok/hatások közül melyek okozzák a Z-Pro-D-Leu-OH hatását a morfin tolerancia és dependencia gátlásában, még továbbra sem tisztázott [50]. Az MTDIP térszerkezetére és lebomlási mechanizmusára vonatkozóan Walter korai halálát követően vizsgálatok tudomásom szerint csak kevés helyen folynak, eléggé mérsékelt ütemben. Az irodalom tanulságai szerint szerkezet - hatás vizsgálatok és új hatásosabb MTDIP analógok kutatása is csak kutatócsoportunkban folyik. Ennek kezdeti eredményeit igazolja, hogy sikerült előállítani az MTDIP két lényegesen aktívabb szerkezeti analógját, nevezetesen a Z-Gln-Leu-OH és a Z-Glp-Leu-OH dipeptid származékokat [53].

GALANINOK

A gyomor-bél rendszer (gasztrointesztinum), a központi és a perifériás idegrendszer különböző helyein is jelentős mennyiségben megtalálható ezen relatíve peptidhormon és neuropeptid családba tartozó lineáris, többnyire 29 vagy 30 aminosavat tartalmazó peptid. A galanin (Gal) család első tagját, a sertés galanint 1983-ban izolálták, megállapították peptidszekvenciáját [54]. Ez egy lineáris, 29 aminosavtartalmú peptidamid. A nyolcvanas évek végétől a galaninok kutatása nagyon felgyorsult nagyszámú és igen fontos biológiai hatásai miatt.

A kilencvenes évek közepéig további 12 faj galanin szekvenciája vált ismertté. Ezek között nagy jelentőségű a humán galanin, amelynek szerkezetét 1991-ben igazolták [55]. Érdekes módon ez az egyetlen galanin, amely 2 endogén formában is létezik (Gal 1-19 és Gal 1-30), mindkettő szabad karboxilcsoportot tartalmaz.

Az eddig ismert galaninok mindegyikének N-terminális első 15 aminosava megegyezik. A 16. aminosavnál vannak azonosságok, viszont lényeges eltérések vannak a C-terminális részek aminosav összetételében. Feltételezhetően ez a biológiai sajátosság különbségekben is megmutatkozik. A galaninok igen nagyszámú (már ismert) biológiai hatásainak felsorolására nem vállalkozhattam, de megemlítem, hogy a hormon hatások és a központi idegrendszeri hatások úgy tűnik, jól elkülöníthetőek.

Kutatócsoportunk már negyedik éve foglalkozik galanin kutatásokkal számos biológus partner segítségével. A kutatás fő iránya a humán és a csirke galanin, amelyek már idáig számos érdekességet vetettek fel. A kutatócsoport alapteóriája,

hogy valószínűleg a galaninnál több úgynevezett aktív-centrum létezik, lehet, hogy több receptora (vagy szubreceptora) létezik a galanin molekulának [56]. E kutatások során számos galanint is előállított a kutatócsoport, igen nagyszámú kisebb-nagyobb szegmensel valamint ezek analógjaival egyetemben. A kutatások összhangban vannak más kutatócsoportok kutatásaival.

Doktori munkám során résztvettem a galanin szintetikus munkáiban is, kisebb galanin szegmensek szintézisével, a nyers termékek folyadékkromatográfiás tisztításával és a fragmensek kémiai jellemzésével foglalkoztam.

A CSALÁN (URTICA DIOICA)

Diploma dolgozatom korábban ezen ismert, évelő, vadontermő növény irodalmának rövid összefoglalásából készítettem [57]. Doktori munkám során együttműködésben foglalkoztam a csalán kémiájával is, így értekezésem irodalmi előzményeit, ha röviden is, de úgy érzem tárgyalni szükségeltetik.

A csalán az egyik legismeretebb gyógynövény a népgyógyászatban. Maga a növény is, de alkotórészei a természetgyógyászat fontos anyagai és azokká válhatnak. Ezért a vadontermő gyógynövény jelentősége egyre növekszik. A teának és főzelékféleként való felhasználása régen ismeretes, és ma is használatos. A növény rendszertani besorolása, előfordulása, morfológiája stb. nincs kapcsolatban dolgozatommal, ezek ismertetésétől eltekintek. Csupán a növény leveleinek kémiai összetételéről ejtek néhány szót [58-60]. A csalán **szervetlen anyagai** főleg ásványi sók, amelyek az élő szervezet számára létfontosságúak; K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, P,

sói a levél vizében ionos formában fordulnak elő. Ezek a növény leveleinek kisebbik hányadát képezik. A szerves anyagok vízdékony vagy részben vízdékony vegyületek.

Karbonsavak és származékaik: a növény főleg magas hangyasav [58], de annak ecetsav [59] és vajsav [60] homológjaiban is gazdag. Azonosíthatók a levélből telítetlen dikarbonsavak mint a fumársav [62], maleinsav [63], valamint található benne citromsav [61], oxálsav [64], lakturonsav [65], glicinsav [66]. A szerves savak mellett sikerült kimutatni, elkülöníteni a foszforsavat is [61,67]. Megtalálható a levélben a fenol és az esculetin (penészgomba és élesztőgomba bénítás) [68] származékok formájában.

A növény mikroorganizmus károsító hatása elsősorban a ferulsav [69], a szinapinsav [70], és a kávéssav [70] tartalomra vezethető vissza [62]. Nem nagy mennyiségben megtalálható az aszkorbinsav (C-vitamin) [71]. A levél csípő és hólyaghúzó hatását a hisztamin és hangyasav tartalomra vezetik vissza [64].

Aminosavak, fehérjék: a begyűjtött csalán fehérjetartalma 20-27% is lehet, a szárított levél kb. 5-10% aminosav tartalommal rendelkezik, nem csupán az összes esszenciális, de minden aminosav megtalálható [65]. Legnagyobb mennyiségben az aszparaginsav és a glutaminsav fordul elő.

Klorofil és hasonló vegyületek: a növény leveleiben a klorofil és a karotinok [72,73] fordulnak elő jelentős mennyiségben. A klorofil egy ártalmatlan színezőanyag, így élelmiszeriparban és gyógyszeriparban is felhasználható.

A cukorszármazékok közül először a galakturonsavat mutatták ki, de számos

más cukorféleséget is tartalmaz a növény levele, ha nem is nagy mennyiségben [74].

A **hisztamin** jelenléte a növényben bizonyos ismert gyógyhatásokat hordoz magában

[75]. A **vitaminokat** mint ugyancsak fontos vegyületeket az említett C-vitamin

mellett a K₁-vitamin, az A-vitamin, a B₂ és a B₅ vitaminok képviselik [75,76].

Szteránváz vegyületekről csupán annyit, hogy az elsőként izolált szitoszterol

mellett újabban más szteroidokat is kimutattak vagy izoláltak [77]. A tárgyalt

vegyületeken kívül még megemlítendő az alkaloidok, flavanoidok [69] és a

viaszok.

2. C É L K I T Ű Z É S E K

Doktori munkám célkitűzéseit a kapott feladatok határozták meg, amelyek magukba foglalták az analgetikus hatású kiotorfin ismételt szintézisét, valamint e dipeptid 13 további (némelyek nem fehérjeeredetű aminosavakat is tartalmaznak) új analógjának szintézisét és kémiai vizsgálatát. További célkitűzésem volt a morfin tolerancia és dependencia gátló endogén MIF-1 (Pro-Leu-Gly-NH₂) és az exogén MTDIP alapeptidek és 5-5 új, nem fehérjeeredetű aminosavat tartalmazó új analóg előállítása és kémiai vizsgálata. További feladatomból az eltérő szintetikus és más kémiai analitikai munkát jelentő csirke galanin 1-16 N-terminális szegmensének szintézise és tisztítása, kémiai jellemzése. Célul tűztem ki további két szegmens tisztításában és kémiai jellemzésében való részvételt. Nem szorosan kapcsolódott a szintetikus peptidkémiai témákhoz, de diplomamunkám mintegy folytatásaként célkitűzésem volt a csalánnal kapcsolatos kémiai munka, amely sajnos objektív okok miatt csak csekély eredménnyel járt.

Részletezve feladatomból volt a kiotorfin allapeptid, valamint 13, elsősorban nem fehérjeeredetű aminosavat és védett analógot tartalmazó, új kiotorfin analóg előállítása a klasszikus oldatfázisú peptidszintézis segítségével.

A felhasznált nem fehérjeeredetű aminosavak előállításával és rezolválásával, védett és aktív származékainak elkészítésével is célkitűzésem, feladatomból foglalkozni.

Hasonló módon elő kellett állítanom ismételt szintézissel a MIF-1 és az MTDIP peptideket, ezen morfin tolerancia és dependencia gátló peptidek néhány nem fehérjeeredetű aminosavat tartalmazó analógját a kitorfin analógokhoz hasonlóan a klasszikus oldatfázisú peptidszintetikus módszerekkel. Az előállítottak közül számos peptidet oszlopkromatográfiásan tisztítani kellett.

Az új analógok mindegyikét a lehetőség szerinti legalkalmasabb és modern analitikai módszerekkel kellett jellemezni.

A kutatócsoportban korábban előállított néhány peptidanalógot, amelyek a szintézis után, vagy hosszabb állás után részben bomlottak, ugyancsak meg kellett tisztítanom a legolcsóbb, de igen hatásos szilikagél oszlopkromatográfia módszerével.

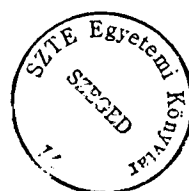
Célkitűzéseim közt szerepelt a szilárd fázisú peptidszintézis módszerének tanulmányozása. Elő kellett állítanom a humán és csirke galanin közös N-terminális 1-16 hexadekapeptidet, részt kellett vállalnom a csirke galanin 17-29 szegmens és az előbbi peptid karbonsavamid származéka tisztításában. Ezek többlépcsős folyadékkromatográfiás tisztítások voltak.

Célkitűzéseimben (a fentiek szerint) bennfoglaltattak a nagyfelbontóképességű folyadékkromatográfiás módszerek alkalmazásai szemipreparatív tisztításokra és analitikai jellemzésekre. Peptidszintetikus munkáim kapcsán feladatomból volt rutinszerűen dolgozni egyszerű peptidanalitikai módszerekkel és megismerni a modern nagyműszeres analitikákat értékelési szinten.

A csalánnal kapcsolatos gyakorlati feladatként tűztem ki a nyers és szárított csalán leveleinek aprítását, az ezt követő vizes, alkoholos és éteres extraktumainak elkészítését laboratóriumi méretekben, ezen extraktumokat vizsgálni modern analitikai

módszerekkel (gázkromatográfia és RP-HPLC). Ugyancsak feladatomból volt résztvenni ezen extraktumokból gyógykészítmények gyakorlati előállításában.

Célkitűzéseim megvalósításáról a III. és IV. a kutatási eredmények és a kísérleti leírások fejezetben számolok be. Őszintén remélem, sikerült célkitűzéseim túlnyomó részét megvalósítani.



3. KISÉRLETI MÓDSZEREK

A kísérleti módszerek további tárgyalására a kutatási eredmények és a kísérleti leírások keretében is sor kerül. E fejezetben a munkámhoz használt módszerek és technikák rövid ismertetésére szorítkozom.

A peptidszintézisek során használtam mind a klasszikus/oldatfázisú, mind az úgynevezett szilárd fázisú peptidszintézisek módszerét. Az oldatfázisú szintézisek különböző módszereit, ezek variációit a kisebb peptidek szintéziseinél a kiotorfin, az MTDIP és a MIF-1 analógok esetében alkalmaztam. A galanin szegmensek és analógja esetében a szilárd fázisú peptidszintézis módszereit alkalmaztam. Ezen peptidkémiai szintetikus módszerek irodalmának nagysága, a kézikönyvek jelentős, a leíró irodalmak nagy száma, továbbá doktori értekezésem korlátai miatt ismertetésüktől eltekintek.

A legszükségesebb irodalmi alátámasztásokat ugyancsak kutatási eredményeim kapcsán ismertetem.

A nyers peptidek tisztítása során használtam az oszlopkromatográfiás tisztítások számos módszerét. Alkalmaztam a megoszlás és adszorpció elvén alapuló, talán legrégebbi és legolcsóbb, kis és főleg védett peptid molekulák tisztítására kiválóan alkalmas szilikagél oszlopkromatográfiás módszert. Alkalomadtán a gélszűrésen alapuló Sephadex oszlopkromatográfia használatára is sor került.

A nagy felbontóképességű (nagy nyomású) folyadékkromatográfia (HPLC) módszerének kidolgozása és alkalmazása mintegy húszéves múltra tekint vissza. Ezen

a korábbi oszlopkromatográfiás módszereken alapuló elválasztási technikát az elmúlt időszakban igen magas szintre fejlesztették. A peptidkémiai manapság a HPLC-n alapuló preparatív és szemipreparatív elválasztások, analitikai ellenőrzések számos kiváló módszere áll a peptidkutatások rendelkezésére [78]. A módszerek, a berendezések, valamint a használt oldószerek minőségi követelményei miatt eléggé költségesek. Ezek ellenére elterjedten használják a biológiailag aktív vegyületek, így a peptidok tisztítására és analitikai jellemzésére is a HPLC technikát és alkalmazási területük folyamatos bővül.

Mivel az Orvosi Vegytani Intézet, ahol doktori munkámat végeztem, a HPLC technikát illetően jól felszerelt, rendszeresen alkalmaztam a szemipreparatív fordított fázisú HPLC technikát (RP-HPLC) elsősorban a galanin szegmensek és analógjaik tisztítására. Részletek a kutatási eredmények során kerülnek ismertetésre.

A szintetikus peptidjeim analitikai vizsgálatai/ellenőrzései során a klasszikus és a modern peptidkémiai analitika számos módszerét egyaránt használtam. A klasszikusnak tekinthető vékonyréteg kromatográfiát kész alufólia vagy üveg szilikagél lapokat alkalmazva rendszeresen használtam. Általánosságban minden peptid ellenőrzését két vagy három alkalmas futtatószerben vizsgáltam. Előhívószerként ninhidrin reagenst és/vagy ninhidrint és klór-TMD-t (N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diamino-difenil metán) előhívó reagenseket együttesen használtam. Peptidjeimnél néhány esetben az olvadáspont meghatározást is használtam. Ennek jelentősége a szabad peptidoknál minimális. Ugyanez mondható el a klasszikus elemi analizisekről is.

Kiseb peptidjeimnél néhány esetben N vagy C,H,N elemi analíziseket kértünk, amelyeket a JATE Szerves Kémiai Intézetében vagy a SZOTE Gyógyszerészeti Vegytani Intézetben végeztek, amelyért külön köszönettel tartozom.

A szintetikus peptidok modern analitikai módszerekkel történő ellenőrzésénél elsősorban az RP-HPLC módszert használtam, elsősorban gradiens változatban, a peptid jellegétől függően különböző hullámhosszoknál mért UV detektálásokkal. Személyesen ritkán mértem (kivéve az IR-spektrometriás méréseket), de főleg kis peptidjeim esetében rendszeresen mértek IR- és bizonyos esetekben NMR-spektrumokat a SZOTE Gyógyszerészeti Vegytani Intézetében.

Az Orvosi Vegytani Intézet analitikai laboratóriumában szintetikus peptidjeim túlnyomó részéről ES-MS, a galanin származékokról kapillár elektroforetikus felvételek és aminosav analízisek is készültek, amelyek értékelésében, vettem részt személy szerint.

III. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

A doktori munkám során elért kutatási eredményeket vegyületcsoportonként külön értékelem, hangsúlyt fektetve a kémiailag új vegyületekre vagy újdonságokat jelentő eredményekre.

1. NEM FEHÉRJEEREDETŰ AMINOSAVAK

Új vegyületeim, analógjaim szintézise során használtam kódolt vagy fehérjeeredetű aminosavakat is, valamint ezek D izomerjeit. Ez utóbbiak ugyancsak nem kódolt aminosavakhoz tartoznak, de ezek alkalmazása gyakorlatilag nem tér el az L aminosavak alkalmazásától, továbbá ezeket a D-pipekolinsavat (D-Pip) és a D-fenilglicint (Pgl) kivéve a kereskedelemről szereztük be, így ezeket nem részletezem. Annyit szükséges viszont megjegyezni, hogy ezek peptidszintézisre alkalmas származékait ismert leíratok alapján magam készítettem. A D-Pgl-t DL-Pgl-ből annak karbobenzoxi (Z) származékát elkészítve az ismert L-tirozin-hidrazinos rezolválási módszerrel [79] készítettem.

A pipekolinsav peptidkémia alkalmazásának a kutatócsoportban jelentős múltja van. Mivel még a DL-pipekolinsavnak is magas az ára reprodukáltam és sikeresen módosítottam a magyar kutatók által leírt L-lizinből kiinduló L-pipekolinsav előállítását [80]. Ez azért lényeges, mert a DL-pipekolinsavból kiinduló fent említett rezolválási módszer általában a D-izomert tisztán adja, de az L-izomerek további tisztításra szorulnak.

Az ismert módszerekkel elkészítettem ez utóbbiak nemcsak Z- de Boc- és Fmoc- védett származékait is.

2. A KIOTORFIN ÉS ANALÓGJAI

Munkám során az alábbi elsősorban védőcsoportokat tartalmazó és nem tartalmazó kiotorfint és kiotorfin analógokat állítottam elő (a mellélt számok a vegyületek azonosító számai a kutatócsoportban).

Z-Tyr/Bu^t/-Arg-OH(KT-31); H-Tyr-Arg-OH(KT-1);
Boc-Tyr/Bzl/-Arg-OH(KT-12);
Z-Tyr-D-Arg-OH (KT-19); H-Tyr-D-Arg-OH (KT-19a);
H-D-Pgl-Arg-OH (KT-3);
Z-Pip-Arg-OH (KT-16); Z-D-Pip-D-Arg-OH (KT-26);
Z-D-Pro-Arg-OH (KT-9);
H-Tyr/Bzl/-Lys-OH (KT-2); H-Ser/Bzl/-Lys-OH (KT-17);
Z-D-Phe-D-Arg-OH (KT-5);
Z-Phe-Arg-OH (KT-7); Boc-Tyr/Br₂/-Arg-OH (KT-28);

A 14 szintetikus kiotorfin származék és analóg közül, amelyet elkészítettem

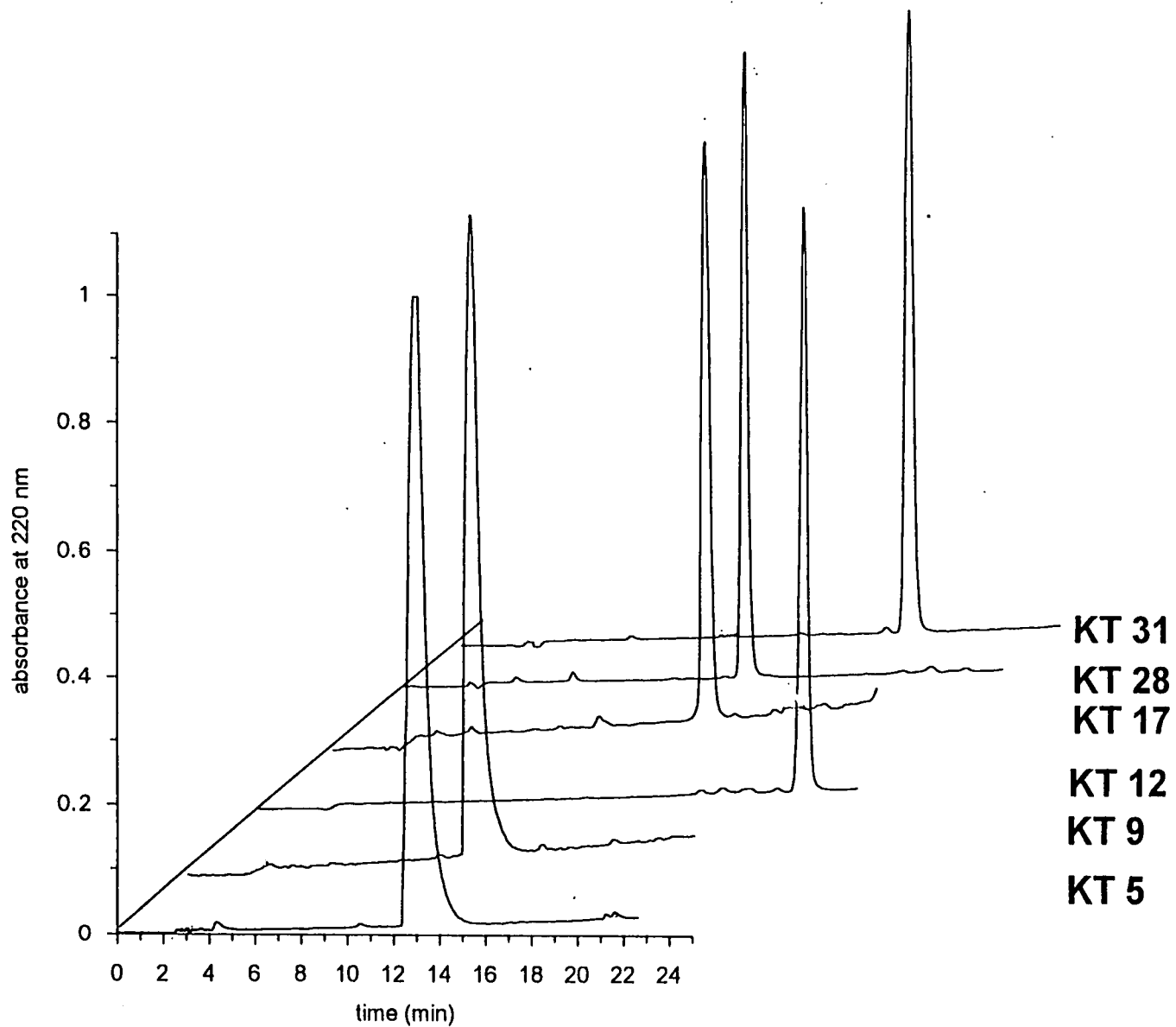
5 ismert az irodalomból, de új megközelítést (szintézis, tisztítás) alkalmaztam.

A további 9 analóg esetében nem csak a megközelítés, hanem maguk a vegyületek is irodalmilag újak. A szintézisek során az N-terminális aminosav difunkcionális Z- vagy Boc- aminocsoport védelmet használtam. Ha az N-terminális aminosav trifunkcionális (Tyr, Ser) Boc/Bzl vagy Bzl/Boc védőcsoport kombinációval dolgoztam. A C-terminális aminosavaknál még trifunkcionális esetben (Lys, Arg) is ideiglenes sóvédelmet [81], N-metil-morfolint (NMM) vagy trietilamint (TEA)

használtam, amely egyszerű és jól bevált a szintéziseim során. A kapcsolást minden esetben az N-terminális aminosav izolált N-hidroxi-sukcinimid (SuOH) aktívésztereinek feleslegével végeztem. A védőcsoportok eltávolítása a szokásos módszerekkel trifluoecetsavval (Boc) vagy Pd/C (10%) katalizátor jelenlétében hidrogénezéssel (hidrogenolízis) történt. Peptidjeim a szintézist követően nem voltak tiszták.

Tisztításukra még a védett származékoknál is csupán néhány esetben bizonyult megfelelőnek a kristályosítás, ezért igen gyakran alkalmaztam védett származékoknál a szilikagél oszlopkromatográfiát különböző oldószerekben (a VRK-nak megfelelően), Leginkább a kloroform-metanol különböző keverékeit használtam. Ez a módszer esetenként szabad kiotorfinok tisztítására is megfelelőnek bizonyult. Azon analógoknál ahol ez a módszert nem bizonyult alkalmasnak és a nyers peptid viz-ecetsav oldékonysága jó volt, sephadex G-10-es oszlopon gélszűréses tisztítást alkalmaztam. A peptidek izolálása a kristályosításon kívül az oszlopkromatográfiás tisztítások (szilikagél) után a vákumbepárlást követő éteres kicsapással vagy gélszűrés után liofilizálással történt.

A kiotorfin peptidek tisztaságellenőrzése, jellemzése minden esetben megtörtént vékonyréteg kromatográfiával és fordított fázisú analitikai HPLC-vel. Néhány esetben elemi analízist, ES-MS ellenőrzést, kvalitatív aminosav analízist is végeztünk, ahol lehetett olvadáspontot is mértünk. Elég rendszerességgel készítettünk IR-spektrum felvételeket néhány esetben NMR-spektrum is készült. A mért fizikai adatokat a kísérleti részben adom meg, a helyes szerkezetet igazoló néhány IR- és NMR-spektrummal nem foglalkoztam részletesen. Mellékletenként csatolom hat analóg RP-HPLC kromatogramját a következő oldalon (1. ábra).



1. ábra: kitorfin analógok RP-HPLC kromatogramjai

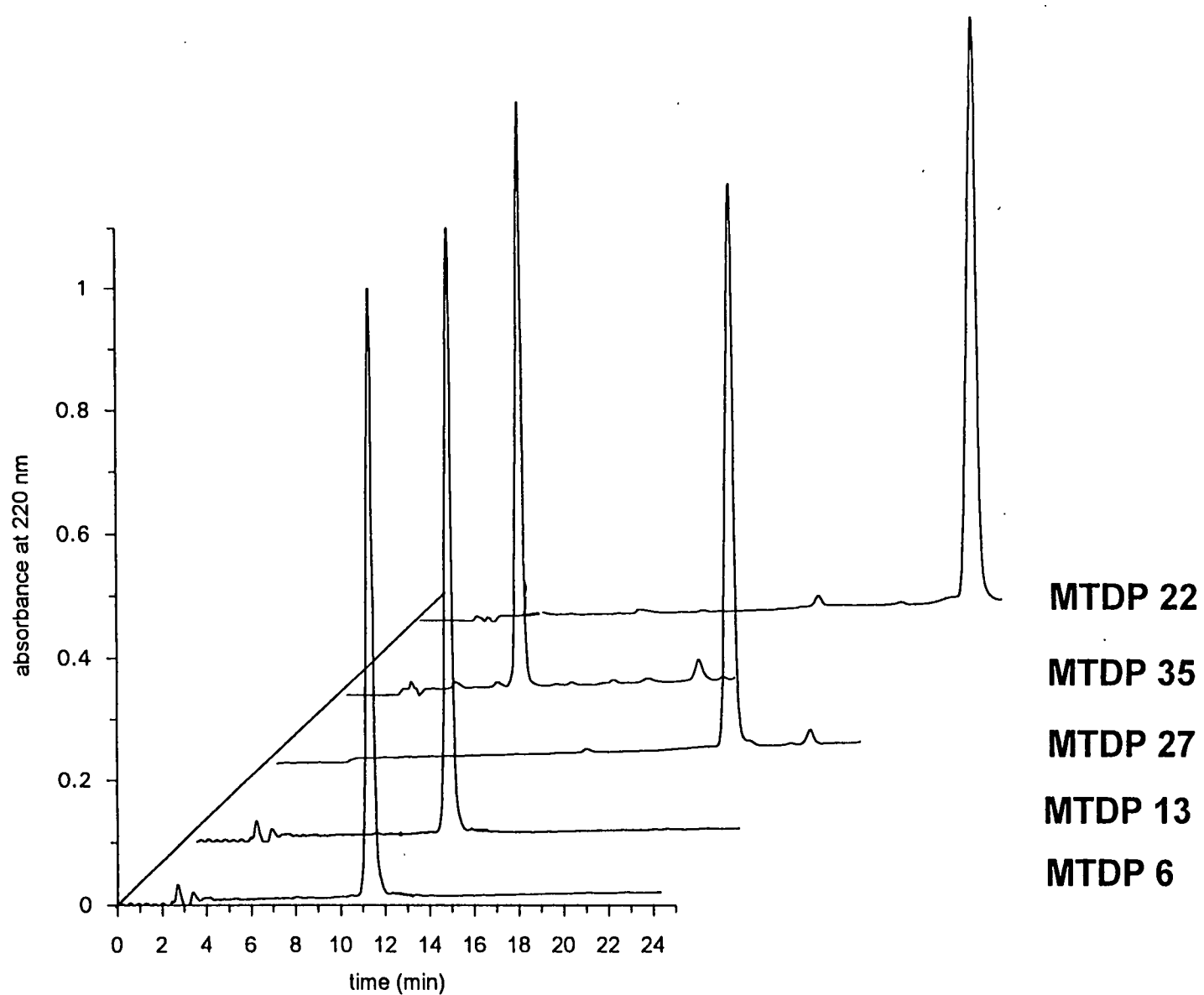
3. A MORFIN TOLERANCIA ÉS DEPENDENCIA GÁTLÓ PEPTIDEK ÉS ANALÓGJAIK.

Az alapeptideken kívül elsősorban D- vagy L-Pip-t tartalmazó analógokat szintetizáltam, amelyek MTDIP esetén az alábbiak.

Z-Pro-Leu-OH (MTDIP-6); Z-D-Pip-D-Pip-OH (MTDIP-13);
Z-Leu-D-Pip-OH (MTDIP-35); Z-Pip-D-Leu-OH (MTDIP-22);
Z-D-Pip-Pro-OH (MTDIP-27); Z-Pro-D-Leu-OH (MTDIP-2);

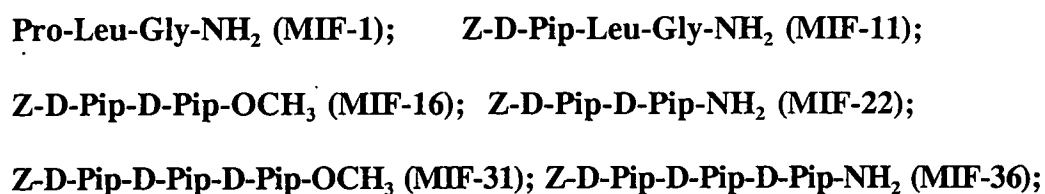
Az MTDIP-2 alapeptiden kívül a másik 5 analóg irodalmilag új vegyület ebben a sorban (az MTDIP és az MTDP jelölés teljesen azonos). A szintézisek során csak difunkcionális, főleg aromás és igen liofil aminosavakkal dolgoztam. Az N-terminális aminosavakat csak Z-védőcsoporttal védtem. Az N-terminális aminosavakat pedig nem védtem a szintézisek során. A kiotorfin analógoknál használt sóvédelem mellett ugyancsak aktívészteres kapcsolási módszert alkalmaztam mivel a módszer ezen dipeptid származékoknál különösen jól bevált. A védőcsoportot, mivel az alapvegyület is hasonló szerkezetű csak próbaként távolítottam el 2 esetben. Az új szintetikus analógokat sikeresen lehetett kristályosítani, ezért további, a már említett szilikagél oszlopkromatográfiát csak két esetben hasonló körülmények közt alkalmaztam. Ezen új analógok tisztaságellenőrzése és jellemzése a kiotorfin analógokéval teljesen hasonló módon történt. A mért fizikai adatok a kísérleti részben, a helyes szerkezetet igazoló néhány IR- és NMR-spektrum nincs külön tárgyalva dolgozatomban.

Az RP-HPLC kromatogramok (egy kivétellel) a következő oldalon találhatóak (2. ábra).

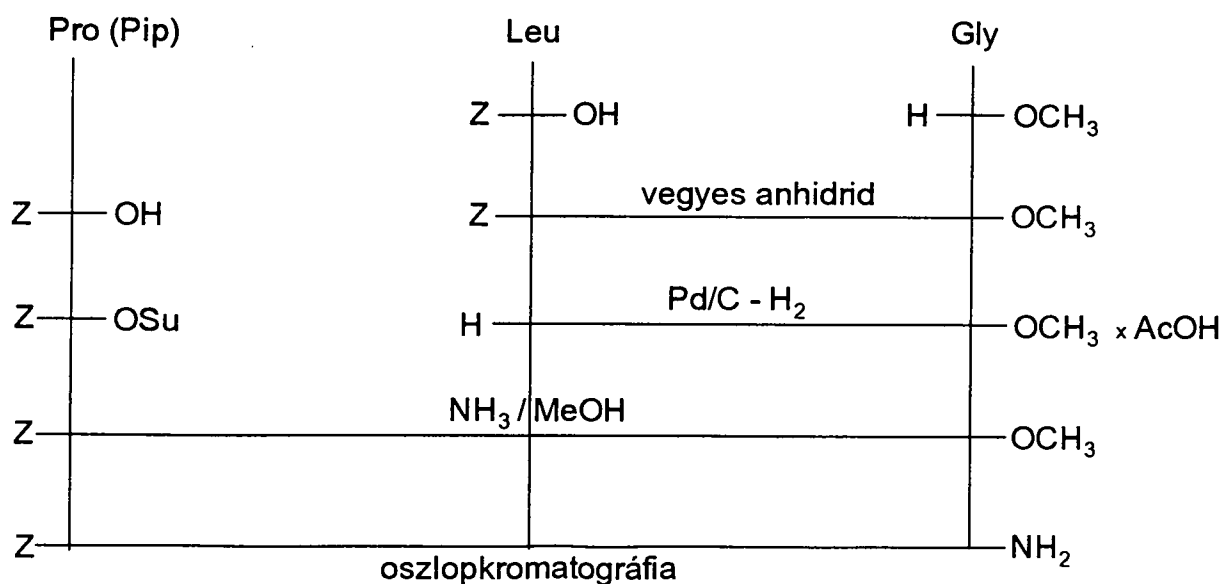


2. ábra: a morfin tolerancia dependencia gátló dipeptid analógok
RP-HPLC kromatogramjai

A tripeptid sorban a MIF-1 alapeptiden kívül egy másik ismert és 5 új analógot szintetizáltam. Ezen analógok is főleg L-pipekolinsavat tartalmaznak, melyek a következők.



Ezen MIF-1 analógok szintézisét oldat fázisban az alábbi ábrán (3.ábra) látható szintézis séma alapján valósítottam meg.



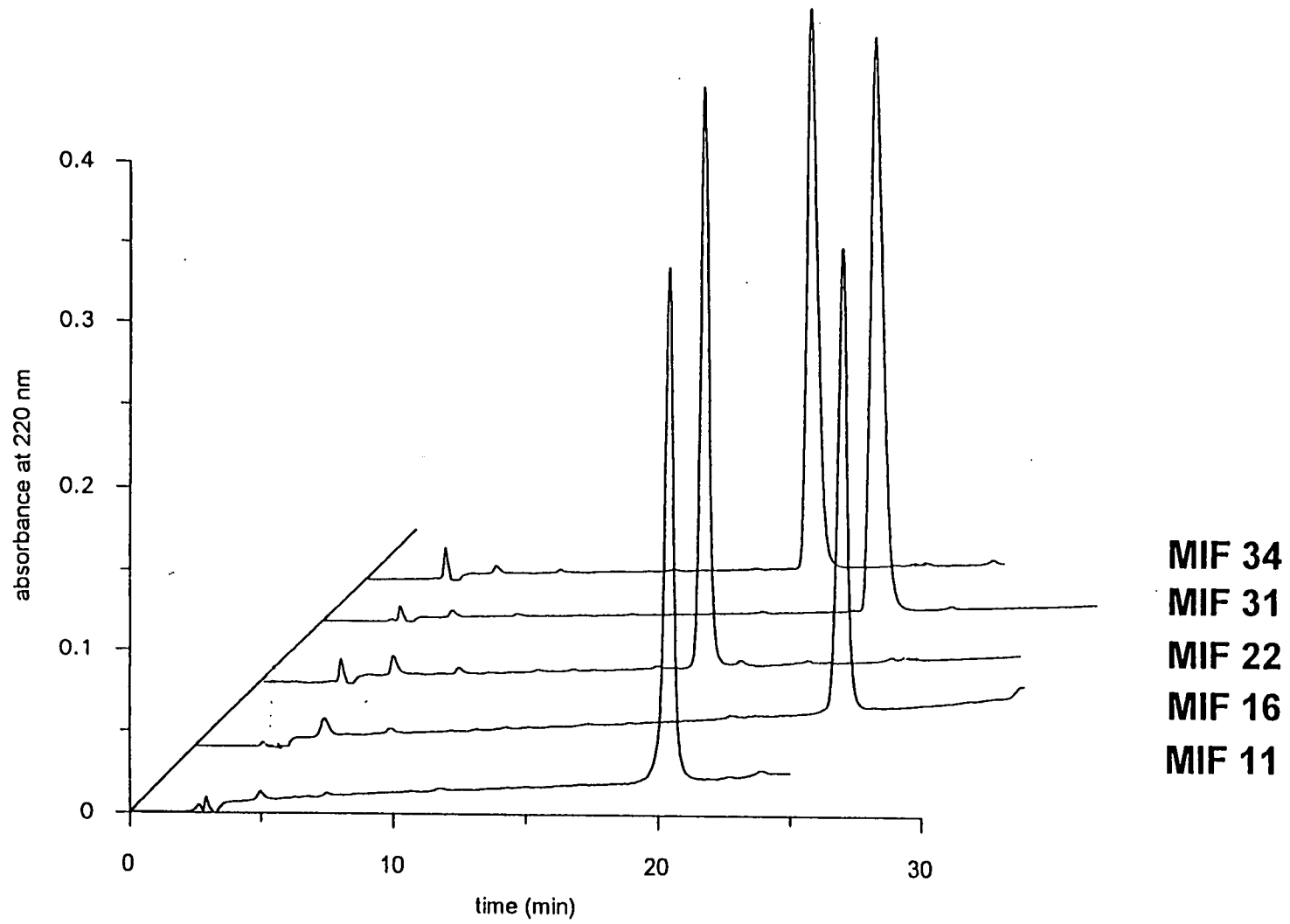
3. ábra: a MIF-1 és analógjainak szintézis sémája



A szintézis során az N-terminális (difunkciós) aminosavak aminocsoportját minden esetben karbobenzoxi (Z) védőcsoporttal míg a C-terminális aminosavak karboxilcsoportját metilészter formában blokkoltam ideiglenesen. A alapidipeptid kapcsolását az úgynevezett vegyesanhidrides módszerrel (klórszénsav-izo-butilészterrel) NMM mint bázis jelenlétében valósítottam meg. A további kapcsolásoknál aktívészteres (SuOH) kapcsolásokat és TEA-t alkalmaztam. A védett dipeptideket általában sikerült kristályosítani és elfogadható tisztaságot elérni. Az MIF-16 analóg esetében többszöri kristályosítást végeztem. A dipeptidekről a Z védőcsoportokat vizes ecetsavban Pd/C katalizátor mellett hidrogénezéssel távolítottam el, majd így acetát só formájában kapcsoltam a tripeptid N-terminális aminosavjaival. A védett tripeptidésztereket már nem sikerült kristályosítással jól megtisztítani. Ezért adott esetekben az előzőekben ismertetett szilikagél kromatográfiával további tisztítást végeztem.

A védett tripeptidek izolálása után azokat hig oldatban alacsonyabb hőmérsékleten ammónia gázzal amidáltam, az amidálás előrehaladtát vékonyréteg kromatográfiával követtem. A védett peptidamidokat izoláltam, kristályosítással és szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítottam.

Az analógok tisztasági ellenőrzése és jellemzése a kiotorfinok és az MTDIP analógokéhoz hasonlóan történt. A peptidek fizikai adatait a kísérleti részben ismertettem, készült néhány IR- vagy NMR-spektrum is ami a helyes szerkezeteket igazolja. Az 5 irodalmi újdonságot jelentő MIF-1 analóg RP-HPLC kromatogrammjai (kromatográfiás tisztaságuk bizonyítékai) együttesen a következő oldalon találhatóak (4.ábra).



3. ábra: a MIF analógok RP-HPLC kromatogramjai

4. GALANIN SZEGMENSEK ÉS ANALÓGJA

Mint a célkitűzések fejezetben ismertettem a csirke és a humán galanin peptidek közül egy szegmens teljes szintézisét másik kettő részbeni tisztítását és jellemzését végeztem. Az alábbi ábrán (5.ábra) a humán és a csirke galanin aminosavszekvenciája található, vastagon kihúzva az általam szintetizált szegmens és amelyek tisztításában segédkeztem láthatók.

G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-V-G-N-H-R-S-F-S-D-K-N-G-L-T-S
G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-V-D-N-H-R-S-F-N-D-K-H-G-F-T-NH₂

5. ábra: a humán és a csirke galanin teljes aminosavszekvenciája és az általam szintetizált vagy tisztított szegmensek.

Mint az ábrán és az elmondottakból kiderült, célkitűzésemnek megfelelően előállítottam egy hexadekapeptidet (csirke, humán Gal 1-16-OH) önnálóan (a kísérleti részben csak ezt írom le részletesebben). Ennek terminális savamid analógja (csirke, humán Gal 1-16-NH₂) és egy tridekapeptidamid (csirke Gal 17-29-NH₂) tisztításánál működtem közre.

A szilárd fázisú szintézist [82] a klasszikus kézi módszerrel végeztem.

A szabad karboxil végű peptidnél 1% Merrifield gyantát használtam. A peptidet a C-terminális oldalról lépésenkénti szintézissel állítottam elő.

A szintéziseknél minden esetben a Boc/Bzl kémiát alkalmaztam, a kapcsolásokat 3 ekvivalens Boc-aminosav felesleggel, DCC/HOBt-vel kétszer végeztem a kapcsolást. A kvalitatív Kaiser tesztet rendszeresen alkalmaztam.

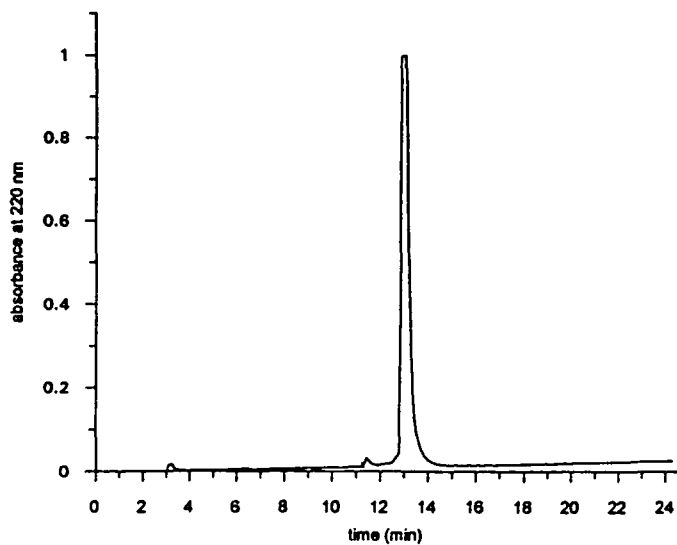
Szintézis közben a Boc védőcsoportokat trifluoecetsav/ diklórmétánnal (TFA/DCM) távolítottam el, folyamatosan a normál protokolt [82] használtam. Szintéziseknél az alábbi Boc-aminosavakat használtam: Boc-Ala, Boc-Asn, Boc-Gly, Boc-leu, Boc-Phe, Boc-Pro, Boc-Trp, Boc-Val, Boc-Asp(OcHx), Boc-His(Tos), Boc-Lys(2-Cl-Z), Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl) és Boc-Tyr(2-Br-Z).

A védett peptid szintézisét követően az utolsó Boc és az oldalfunkciós védőcsoportokat és a nyers peptidet a gyantáról egyidejűleg cseppfolyós HF-1 (anisol, dimetilszulfid szkevegerek használata mellett) 0°C-on kb. 1 óra távolítottuk el. A gyanta mellől a peptid kioldását vizes ecetsavval végeztem. Liofilizálást követően a nyers peptidet analizáltam, kétlépcsős szemipreparatív RP-HPLC gradiens módszerrel tisztítottam. Az oszlop Vydac C 18, 1.6x25 cm méretű (max.50 mg tisztítható egyidejűleg). Lineárisan váltakozó gradiensét használtam (A: 0.1% TFA vizes oldat, B: 80% AcCN+0.1% TFA). A peptidek detektálása UV 220 nm-en. A kromatográfiásan tiszta frakciókat összegyűjtve liofilizáltam a peptideket.

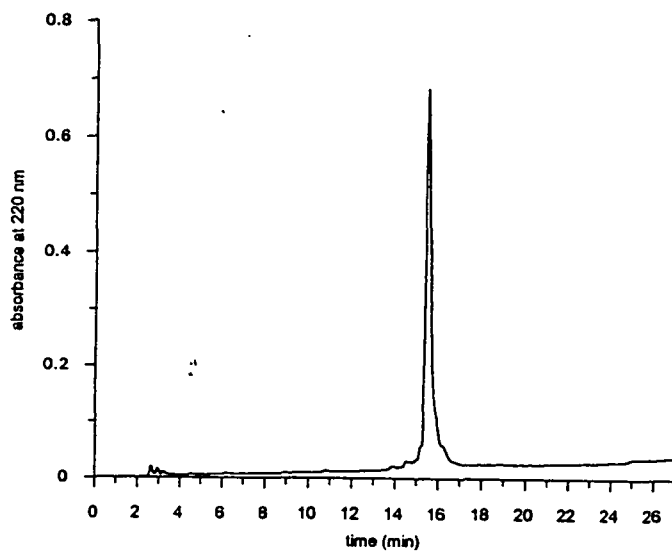
Ezt követte a peptidek azonosítása (FAB-MS vagy ES-MS), tisztaság-ellenőrzése a fenti RP-HPLC analitikai változata alkalmazásával. A további jellemzések aminosav analízissel, kapilláris elektroforetikus mérésekkel történtek.

Eddigi adataink szerint miligrammos mennyiségekben sikerült a három galanin peptidet előállítanom. Ezek ES-MS felvételei és RP-HPLC kromatogramjai a következő két ábrán (6. és 7. ábra) láthatók.

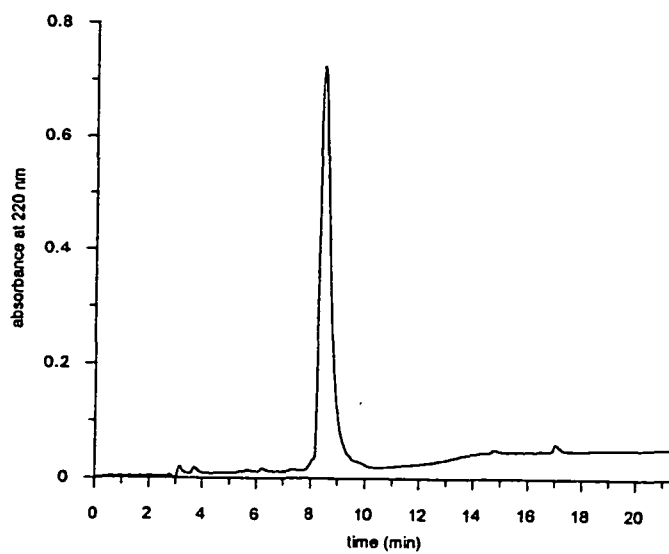
a.



b.

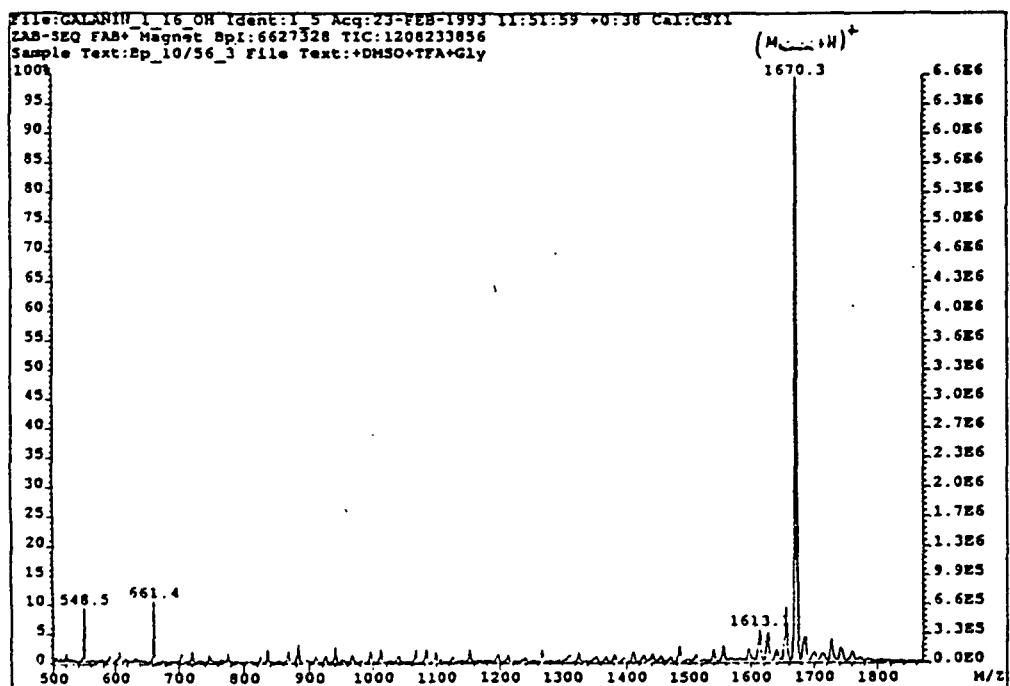


c.



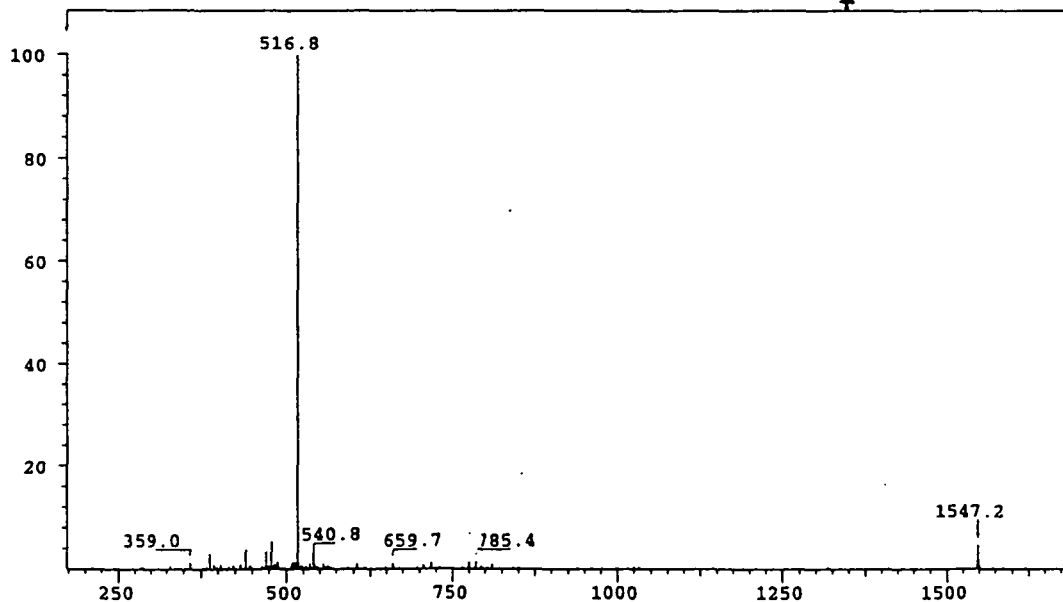
5. ábra: a humán és csirke GALANIN 1-16-OH (a), 1-16-NH₂ (b) és a csirke 17-29-NH₂ (c) RP-HPLC kromatogramjai

a.



SPEC: bp95-03-06 06-MAR-95 DERIVED SPECTRUM #9
 Samp: Start : 16:17:21 353
 Comm: 10/47ny 10/67ny 10/84 11/1 m
 Mode: ESI +Q3MS LMR UP LR Study : ESI-MS
 Oper: Kele+Szabo Inlet :
 Base: 516.8 Inten : 24240570 Masses: 30 > 2500
 Norm: 516.8 RIC : 82973804 #peaks: 2604
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: +/248>262 - /235>243, 284>304 H₂: 4.563 ✓

b.



6. ábra: a humán és csirke GALANIN 1-16-OH (a) és a csirke GALANIN 17-29-NH₂ tömegspektrumai

5. CSALÁN EXTRAHÁLÁSI VIZSGÁLATOK

Az eredeti elgondolásunkhoz mérten eredményeink eléggé szerények, ennek oka elsősorban az, hogy a kutatásokhoz nem sikerült megfelelő anyagi háttartet teremteni. A permetmentes területről szedett csalánágak szár részét vagy elkülönítettük a levelektől vagy nem. Ezt természetes levegőn szárítás követte. Az aprítást zúzás követte, majd előkísérletek után két féle extrakciót végeztünk külön-külön mintákból, úgy mint vizes és alkohol-éteres extrahálást. Az extraktumokat szűrés után besűrítettük melegítés nélkül. Az éteres-alkoholos extraktumot szobahőmérsékleten vákumban bepároltuk és zöldszinű olajos terméket kaptunk. A vizes oldatot szobahőmérsékleten porlasztással szárítottuk be és sötétzöld finom porhoz jutottunk.

Mindkét sűrítmény nagymennyiségű klorofilt tartalmazott. A sűrítményekkel gázkromatográfiás és folyadékkromatográfiás elővizsgálatokat végeztünk, amelyek csupán arra voltak alkalmasak, hogy megállapítsuk az oldószer maradékot (alkohol és víz). A nagy klorofil tartalom a fenti vizsgálatokat ugyancsak zavarja. További korrekt vizsgálatokhoz teljes kiszáritás és klorofilmentesítés szükséges. Az igen terjedelmes csalán irodalomban ilyen nagyműszeres vizsgálatok (leírása) nem szerepel így vizsgálataink elősegítették a körülmények kidolgozását további vizsgálatokhoz.

A vizes frakció szárított anyaga felhasználásával a SZOTE Gyógyszertechnológia Intézetének segítségével néhány próbakészítményt dolgoztunk

ki, amelyek már ilyen formában is forgalmazhatók lehetnének kozmetikumokként, ha a nagybani csalántermeléshez, feldolgozáshoz, engedélyeztetéshez és marketinghez megfelelő partnert vagy anyagi háttérrel sikerülne biztosítani.

Az említett próbakészítmények reklámszerű leírása a disszertációban részletesen nincs megadva.

IV. K I S É R L E T I L E I R Á S O K

A szilárd fázisú szintézist a hagyományos Merrifield edényben laboratóriumi rázógép segítségével végeztem. A hordozón kiépített peptid és a védőcsoportok egyidejű eltávolítása cseppfolyós HF-1 (UCAR)) zárt készülékben történt.

Az olvadáspontokat Boetius-blokkal (VEB Analytik, Drezda) határoztam meg, a mért értékek korrigálatlanok. A vékonyréteg kromatográfiához kész Merck lapokat alkalmaztam (szilikagél 60, 0.25 mm) a következő futtatószerekkel (A) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=9/1$, (B) piridin/ecetsav/víz = 20/5/11 eszencia etilacetáttal különböző koncentrációkra (5,10,20%) higitva. Az előhívókat már korábban tárgyaltam. A HPLC tisztításokat és analitikai vizsgálatokat egy LKB összeállítású készülékkel (2 db. LKB 2250 típusú pumpa, LKB 2250 típusú kontrolláló, LKB 2210 típusú 2 csatornás írószerkezet, KNAUER változtatható UV detektor, automatikus számítógépes program vezérlés) végeztem.

A tisztításokat és az ellenőrzéseket is különböző gradiensekkel A és B gradiensekkel végeztem ahol (A) vizes 0.1% TFA, (B) AcCN-0.1% TFA.

A szilikagél oszlopokhoz Merck szilikagél 60 (0.063-0.04mm) tölteteket, a gélkromatográfiához sephadex G-10 vagy sephadex G-25 töltetet alkalmaztam.

A néhány klasszikus mikroanalitikai vizsgálaton kívül a kvalitatív aminosav analízisekhez ioncserélő lapokat használtam. A kvantitatív aminosav analíziseket automata aminosav analizátorral (Hewlett-Packard Aminoquant) végezték. Az aminosav analízisekhez 6 N HCl-s (24 óra, 110°C) hidrolizátumokat használtam, ahol szükséges volt (Trp) más hidrolizist is alkalmaztam. A peptidek azonosítását esetenként ES-MS-el Finigan tömegspektrométerben végezték.

L-Pipekolinsav (1)

10 g (54.6 mmol) L-lizin. HCl 200 ml-es vizes, élénken kevert oldatához (pH 9.5-re állítva cc. ammoniumhidroxiddal) 18.6 g (64.6 mmol) nitropruszidnátrium (nitrozil-pentacianoferrát (II.) dihidrátot) adtam 60°C-on. A reakció elején elszíneződés figyelhető meg. Folyamatos pH kontroll (pH 9.5) mellett, cseppenként adagoltam 4 N. NaOH-t. A reakció előrehaladását folyamatosan követtem vékonyrétegekromatográfiával. A reakció végén a reakcioelegyet lehűtöttem, a kis mennyiségű vörös-barna csapadéktól megszűrtem, és az oldatot pH 3.5-re állítottam cc. sósavval. A sárga oldatot Kieselgel oszlopon desztillált vízben kromatográfiásan tisztítottam. A frakciókat vékonyrétegekromatográfiával követtem. A kombinált főfrakciókat bepároltam szárazra, a maradékot forró metanolban oldottam és éter-n.hexán hozzáadásával kristályosítottam. Az ismételt kristályosítás ugyancsak metanol-éter-n.hexánból. Termelés: 30%; Op: 263-265°C; $[\alpha]_D = 0$ (c=1, víz).

Karbobenzoxi-L-pipekolinsav (2)

Az (1) vegyületből Z-OSu-val acilezve és a szokásos módon izolálva. Termelés: 82%; kristályosítás: éter-petroléter; Op: 112-113°C; $[\alpha]_D = -57^0$ (c=1, ecetsav).

Butiloxikarbonil-L-pipekolinsav (3)

Az (1) vegyületből Boc-pirokarbonáttal acilezve és a szokásos módon izolálva. Termelés: 68%; kristályosítás etilacetát-petroléter; Op:121-122°C; $[\alpha]_D = 62.2^0$ (c=1, ecetsav).

Fluorenil-metiloxikarbonil-L-pipekolinsav (4)

Az (1) vegyületből Fmoc-OSu-val acilezve és a szokásos módon izolálva. Termelés:

72%; kristályosítás: metanol-petroléter; Op: 153-156⁰C; $[\alpha]_D = -14.88^0$ (c=1, ecetsav).

Karbobenzoxi-D-pipekolinsav (5)

Előállítva Z-DL-pipekolinsavból L-Tyr-N₂H₃-os rezolválással. Termelés: 82%; kristályosítás éter-petroléter; Op:113-114⁰C; $[\alpha]_D = + 55^0$ (c=1, ecetsav).

Butiloxikarbonil-D-pipekolinsav (6)

Előállítva (3) szerint. Termelés: 72%; kristályosítás etilacetát-petroléter; Op: 120-122⁰C; $[\alpha]_D = + 60,5^0$ (c=1, ecetsav).

Fluorenil-metiloxikarbonil-D-Pipekolinsav (7)

Előállítva (4) szerint. Termelés: 56%; kristályosítás metanol-petroléter; Op: 150-153⁰C; $[\alpha]_D = +18.2^0$ (c=1, ecetsav).

Karbobenzoxi-D-fenilglicin (8)

A Z-DL-fenilglicin előállításá DL-fenilglicinből Z-OSu-val acilezéssel (2) szerint. 100 mmol Z-DL-fenilglicin és 100 mmol L-tirozin-hidrazid forrón oldva 500 ml 75% metanolban és az oldat szobahőmérsékleten kevertetve 24 óráig. A kiváló kristályok a Z-D-fenolglicin, amelyet kiszűrve és kristályosítva metanol-éterből adja a tiszta származékot. Termelés: 80-85%, Op:182-184⁰C; $[\alpha]_D = -63^0$ (c=1, metanol).

Boc-Tyr/Bzl/-Arg-OH (9)

440 mg (1 mmol) Boc-Tyr/Bzl/-OSu oldva 10 ml DMF-ben, az oldathoz hozzáadtam 209 mg (1,2 mmol) Arg-OH-t és 3 ekvivalens trietilamint. Kevertetés 5⁰C-on 2 órát és szobahőmérsékleten 1 napot. Savanyítva néhány csepp cc.kénsavat adva az oldathoz, vízzel hígítottam (10 ml) és a reakcióelegyet extraháltam etilacetáttal (3x). Az extraktumot mostam

1 N. NH_4OH oldattal és vízzel, szárítottam (MgSO_4). Az oldószert eltávolítva olajat kaptam, melyet trituráltam n-hexánnal ekkor amorf port kaptam. Ezen amorf port kromatografáltam szilikagél oszlopon (eluens metanol-kloroform). A fő frakciók bepárolva adták a tiszta származékot. Termelés: 60-65%; Op: 154-156 $^\circ\text{C}$; $R_f(\text{A})$ 0.2, (B) 0.4; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -5.1^\circ$ (c=1, metanol).

H-Tyr-Arg-OH (10)

150 mg (9) oldva 10 ml 80% TFA-diklórmétánban és szobahőmérsékleten kevertetve kb. 1 óráig, az oldatot bepároltam és továbbra is folyamatos vékonyréteg ellenőrzés mellett az olajat metanolban Pd/C jelenlétében kezeltem amíg a védőcsoportokat eltávolítottam. A katalizátort kiszűrve az oldatot bepároltam, olajat kaptam, amelyből n-hexános triturálást követően amorf por formájában kaptam meg a dipeptid sóit. Ez utóbbit ioncserélve a szabad dipeptidhez jutottam a főfrakciók liofilizálását követően. Termelés: 70-75%; $R_f(\text{A})$ 0.05, (B) 0.15; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +22^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-Tyr-D-Arg-OH (11)

395 mg (1 mmol) Z-Tyr-OSu oldva 10 ml DMF-ben, az oldathoz hozzáadtam 209 mg (1,2 mmol) D-Arg-OH-t és 3 ekvivalens trietilamint. Kevertetés 5 $^\circ\text{C}$ -on 2 órát és szobahőmérsékleten 2 napot. Feldolgozás és szilikagél oszlopkromatografálás (10) szerint. Az oszlopkromatografálás fő frakciói (tiszta/egységes) bepárolva etilacetát-éterből kristályosíthatók. Termelés 60-65%; Op: 155-159 $^\circ\text{C}$; $R_f(\text{A})$ 0.25, (B) 0.35; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -14.5^\circ$ (c=1, metanol).

H-Tyr-D-Arg-OH (12)

200 mg (11) oldva 40 ml 5% jégecetet tartalmazó metanolban és Pd/C jelenlétében

szobahőmérsékleten hidráltam vékonyrétegekromatográfiás ellenőrzés mellett. A hidrálás befejezése után az oldatot bepároltam és a maradék olajat eldörzsöltem éter-n.hexán alatt, amorf anyagot kaptam. Termelés 80-85%; $R_f(A)$ 0.5, (B) 0.15; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -17^\circ$ (c=1, metanol).

H-D-PGI-Arg-OH (13)

A kapcsolás és feldolgozás 1 mmol Z-D-PGI-OSu és 1,2 mmol Arg-OH-val a (11) szerint. Utánna szilikagél oszlopkromatográfia, majd a kapott és jellemzett amorf Z-D-PGI-Arg-OH 100 mg mennyiségéről a védőcsoportot a (12) szerint hidrogenolizissal távolítottam el és feldolgoztam, amorf anyagot kaptam. Brutto termelés 40-45%; $R_f(A)$ 0.5, (B) 0.1; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +22.2^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-Pip-Arg-OH (14)

343 mg Z-Pip-OSu (1 mmol) oldva 10 ml DMF-ben, hozzáadva 209 mg (1,2 mmol) Arg-OH-t és 3 ekvivalens trietilamint a reakcióelegyet kevertetés mellett 5°C -on és szobahőmérsékleten reagáltattam 48 óráig. A reakcióelegyet feldolgoztam (10) szerint, de oszlopkromatografálás nem volt szükséges. Kristályosítás etanol-éterből. Termelés: 55-60%; Op: $134-139^\circ\text{C}$; $R_f(A)$ 0.2, (B) 0.4; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -32.3^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Arg-OH (15)

343 mg Z-D-Pip-OSu (1 mmol) és 209 mg (1,2 mmol) D-Arg-OH-ból kiindulva a (14)-l azonosan kapcsoltam és dolgoztam fel. Oszlopkromatográfia nem szükséges, kristályosítás ugyancsak etanol-éterből. Termelés: 55-60%; Op: $129-133^\circ\text{C}$; $R_f(A)$ 0.2, (B) 0.4; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +34^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-D-Pro-Arg-OH (16)

662 mg (2 mmol) Z-D-Pro-OSu és 420 mg Arg-OH-ból kiindulva a (14,15) szerint kapcsolva és feldolgozva. Viszont szilikagél oszlopkromatográfiás tisztításnak kellett alávetni a nyers peptidet, amelynek végén amorf anyagot kaptam.

Termelés: 40-45%; $R_f(A)$ 0.05, (B) 0.25; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -59.5^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-Phe-Arg-OH (17)

Előállítás a (14) szerint azonos mmol mennyiségből, a reakció idő 48 óra, feldolgozás is azonos módon történt. Szilikagél oszlopkromatográfia volt szükséges, a tiszta anyag viszont metanol-éter-n.hexánból kristályosítható. Termelés: 45-50%; Op:130-133°C; $R_f(A)$ 0.3, (B) 0.5; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -5^\circ$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-D-Phe-D-Arg-OH (18)

Előállítás, feldolgozás, kristályosítás (17)-tel teljesen analóg módon.

Termelés: 52%; Op:110-115°C; $R_f(A)$ 0.3, (B) 0.5; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +22^\circ$ (c=1, metanol).

Boc-Tyr(Br₂)-Arg-OH (19)

770 mg (1.5 mmol) Boc-Tyr(Br₂)-Su oldva 15 ml DMF-ben. Az oldathoz hozzáadtam 315 mg (1.7 mmol) Arg-OH-t és 3 ekvivalens trietilamint majd 48 óráig kevertettem az oldatot 5°C-on és szobahőmérsékleten. A feldolgozás azonos a (9)-l. Az olajat szilikagél oszlopon az előzőeknek megfelelően tisztítottam. Az egységes frakció ugyancsak olaj, amelyet n.hexán alatt eldörzsöltem és sárga amorf anyaghoz jutottam. Termelés: 20-25%; Op: 121-127°C; $R_f(A)$ 0.38, (B) 0.48; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -21^\circ$ (c=1, metanol).

H-Tyr/Bzl/-Lys-OH (20)

150 mg Boc-Tyr/Bzl/-Lys-OH oldva 20 ml cc. TFA oldatban kevertetés közben, vékonyréteg kromatográfiás ellenőrzés mellett. Amikor a reakció befejeződött az oldatot bepároltam és az olajos maradékot éter-n.hexán alatt eldörzsöltem (higroszkópos). Kiszáritás után amorf anyagot kaptam, amelyet még szilikagél oszlopon tisztítani kellett. Változatlanul amorf anyagot kaptam. Termelés 70%; $R_f(A)$ 0.2, (B) 0.3; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -45.2^0$ (c=1, metanol).

H-Ser/Bzl/-Lys-OH (21)

250 mg Boc-Ser/Bzl/-Lys-OH-ból a (20)-nak megfelelően készítettem, szilikagél oszlopkromatográfia szükséges volt ugyancsak és egységes amorf anyagot kaptam. Termelés: 45-50%; $R_f(A)$ 0.1, (B) 0.25; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -72.1^0$ (c=1, metanol).

Karbobenzoxi-Pro-Leu-OH (22)

1.22 g (4 mmol) Z-Pro-OSu oldva 20 ml DMF-ben, az oldathoz hozzáadtam 575 mg (4,4 mmol, 10% felesleg) Leu-OH-t és 2 ekvivalens trietilamint majd kevertetés közben reagáltattam a komponenseket szobahőmérsékleten 24 óráig. Az reakcióelegyet bepároltam, a maradékot etilacetátban vettem fel, az oldhatatlan maradékot kiszűrtem. Az oldatot mostam hig sósavval, hig lúggal és vízzel. Száritás, bepárlás után az olajos maradékot kristályosítottam $CHCl_3$ -n.hexánból. Termelés: 65%; Op: 134-136°C; $R_f(A)$ 0.42, (B) 0.6; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -63.8^0$ (c=1, metanol). $C_{19}H_{26}O_5N_2$ (362.44), számított C:62.96, H:7.23%, N:7.62%, talált C:62.62%, H:7.18%, N:7.62%.

Karbobenzoxi-Pip-D-Leu-OH (23)

680 mg (2 mmol) Z-Pip-OSu és 280 mg (2.2 mmol) D-Leu-OH oldva 15 ml DMF ben 2 ekvivalens trietilamin jelenlétében (a D-Leu nehezen oldódik be csak a reakció

folyamán) és kevertetés szobahőmérsékleten 24 óráig. A feldolgozás (22)-höz hasonlóan. A maradék kromatográfiásan egységes olaj, amelyet nem sikerült kristályosítani, ezért szilikagél oszlopkromatografálást is végeztem, de ez is egységes termékre utalt és olaj maradt vissza, amelyet ugyancsak nem sikerült kristályosítani. Így az olajat DCHA só formájában izoláltam kristályosan. Termelés 35-40%; Op: 159-160⁰ (DCHA só); HPLC (olaj) a DCHegységes; R_f(A) 0.2, (B) 0.35 (olaj); [α]_D = -5,1⁰ (c=1, metanol) (DCHA só). só).

Karbobenzoxi-Pro-D-Leu-OH (24)

2 mmol Z-Pro-OSu-ból és 2.2 mmol D-Leu-ból kiindulva a szintézis és a feldolgozás (22) szerint. A bepárlás után egységes olaj, amelyet az kloroform-n.hexánból kristályosítottam. Az analitikai adatok az irodalmi adatoknak megfelelőek csupán minimális eltérésekkel. Termelés: 45-50%; Op: 132-134⁰C; R_f(A) 0.15, (B) 0.25; HPLC egységes; [α]_D = -43⁰ (c=1, metanol); az elemi analízis C,H,N adatai is a számítottak megfelelőek.

Karbobenzoxi-Leu-D-Pip-OH (25)

3 mmol Z-Leu-OSu-ból és 3.3 mmol D-Pip-ból kiindulva a szintézis és feldolgozás (22) szerint. A bepárlás után szilikagél oszlopkromatográfia, a kromatográfiásan tiszta olajat ugyancsak nem tudtam kristályosítani, DCHA só formában leválasztottam. Az olajat és a sót is jellemeztem. Termelés: 35-40%; Op: 88-92⁰C (DCHA só); R_f(A) 0.2, (B) 0.3 (olaj); HPLC egységes (olaj); [α]_D = +19.5⁰ (c=1, metanol) (DCHA só).

Karbobenzoxi-D-Pip-Pro-OH (26)

2 mmol Z-D-Pip-OSu-ból és 2.2 mmol Pro-OH-ból kiindulva a szintézis és feldolgozás a (22)-nek megfelelően. A bepárlás után nem egységes olaj, ezért

szilikagél oszlopkromatográfiát alkalmaztam, olajat kaptam, amelyet sikerült aceton-éter-n.hexánból kristályosítani. Termelés: 50-55%; Op: 113-116°C; R_f (A) 0.25, (B) 035; HPLC egységes; $[\alpha]_D = -5^{\circ}$ (c=1, metanol), -22.5° (c=1, ecetsav);

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Pip-OH (27)

2 mmol Z-D-Pip-OSu-ból és 2.2 mmol D-Pip-OH-ból kiindulva a szintézis és a feldolgozás a (22)-nek megfelelően. Bepárlás után egységes olaj, kristályosítás etanol-éter-n.hexánból. Kitűnően kristályosodott. Termelés 75-80%; Op: 102-104°C; R_f (A) 0.35, (B) 0,5; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +38.2^{\circ}$ (c=1, metanol). Az elemi analízis C,H,N adatai a számítottak megfelelő a hibahatáron belül.

Karbobenzoxi-D-Pip-Leu-Gly-NH₂ (28)

1.4 g (4 mmol) Z-Leu-Gly-OEt oldva 100 ml ecetsav-metanol 50%-os keverékében és Pd/C katalizátor jelenlétében átáramoltatásos hidrogénezés 3 óráig amikor a vékonyrétegekromatográfia szerint a hidrogenolízis befejeződött. Vákumbepárlás után az olaj Leu-Gly-OEt. AcOH-t éter alatt megszilárdítottam, mostam éterrel, szűrtem, KOH felett vákumban szárítottam 48 óráig (kromatográfiásan egységes).

A dipeptidészter sót oldottam 20 ml DMF-ben és oldottam 20 ml DMF-ben majd 1,36 g (4 mmol) Z-D-Pip-OSu-t és 0.56 ml (4 mmol) trietilamint adtam a kevert oldathoz szobahőmérsékleten. Keverés 48 óráig. A reakcióelegy vákumbepárlása után az olajos maradékot oldottam etilacetátban (50 ml) azt extraháltam 3x50 ml 5%-os NaHCO₃ oldattal. A vizes fázist mostam többször etilacetáttal és a szerves fázist szárítottam, bepárooltam. A nyers terméket (olaj) szilikagél oszlopon kromatografáltam (metanol-kloroform gradiens).

A tiszta frakciót (olaj) kristályosítás nélkül oldottam hideg metanolban (jeges hűtés) és telítettem ammónia gázzal folyamatosan keverés mellett. 4 óra után az oldatot bepároltam és a kapott olajat sikerült kristályosítani metanol-éterből, fehér kristályos anyagot kaptam. A termelés az mindhárom reakcióra együttesen 25-30%; Op:142-144°C; HPLC egységes; $R_f(A)$ 0.1, (B) 0.2; $[\alpha]_D = +10^0$ (c=1, etanol); a N elemi analízis a számítottal megegyező.

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Pip-OCH₃ (29)

1.7 g (5 mmol) Z-D-Pip-OSu oldva 25 ml DMF-ben. A kevert oldathoz 835 mg (5 mmol) D-Pip-OCH₃.HCl-t és 0.7 ml (15 mmol) trietilamint adtam és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 24 óráig. Az oldatot bepároltam és a maradékot oldottam etilecetátban, ezen oldatot mostam 2N. HCl-l, vízzel, 5% NaHCO₃-l, vízzel (3x), szárítás, bepárlás. Kromatográfiásan egységes olajat kaptam, amelyet sikerült kristályosítani etanol-éterből. Termelés: 68%; Op: 119-123°C; $R_f(A)$ 0.3, (B) 0.55; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +69^0$ (c=1, etanol); a N elemi analízis a számítottal megegyező.

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Pip-NH₂ (30)

500 mg (kb. 1,3 mmol) (29) oldva 10 ml metanolban, amelyet -20°C alatt tartottam, folyamatosan kevertettem és ammónia gázzal telítetten tartottam. Kb. 6 óra reakcióidő után (vékonyrétegekromatográfiás ellenőrzés) az oldatot bepároltam és az egységes olajat kristályosítottam etanol-éterből. Termelés: 85-90%; Op: 168-172°C; $R_f(A)$ 0.1, (B) 0.25; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +62^0$ (c=1, etanol).

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Pip-D-Pip-OCH₃ (31)

770 mg (2 mmol) (29) oldva 20 ml metanol-ecetsav-ban és Pd/C jelenlétében átáramoltatásos hidrogénezés 6 óráig (egységes VRK-an). A katalizátor kiszűrése után az

oldatot bepároltam, a dipeptidészter-acetát (olaj) egységes VRK-an. Az olaj teljes mennyiségét oldottam 10 ml DMF-ben és 0°C-on kevertetés közben 0.22 ml (3 mmol) trietilamint és 340 ml (1 mmol) Z-D-Pip-OSu-t adtam az elegyhez. További 2 óra keverés ezen a hőfokon, 48 óra szobahőmérsékleten. Vákumbepárlás után olajat kaptam, amelyet oldottam etilacetátban (50 ml), mostam 2N. HCl-1, vízzel, 5% NaHCO₃-1, vízzel (3x), az oldatot szárítottam, bepároltam, olaj maradt vissza, amelyet szilikagél oszlopon kromatografálni kellett. A tiszta frakciók bepárolva az olajat sikerült etanol-éterből kristályosítani. Termelés: 52%; Op: 185-190°C; R_f(A) 0.2, (B) 0.2; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +92^\circ$ (c=1, etanol).

Karbobenzoxi-D-Pip-D-Pip-D-Pip-NH₂ (32)

498 mg (1 mmol) (31) oldva 20 ml metanolban, amelyet telítettem ammónia gázzal -20°C alatt kevertetés közben. A hűtést, keverést fenntartva, időnként az ammóniát pótolva 4 óra reakció idő után VRK szerint az amidálás befejeződött. Bepárlás után szilikagél oszlopon kromatografáltam az olajat, majd a főfrakciókat összegyűjtve bepárlás után a kristályosítás sikerült etanol-éterből. Termelés: 60%; Op: 212-217°C; R_f(A) 0.1, (B) 0.1; HPLC egységes; $[\alpha]_D = +80^\circ$ (c=1, etanol).

Csirke GALANIN-(1-16)-OH (G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-V) (33)

4 g Boc-Val-1% Merrifield gyanta (0.4 mmol/g, összesen 1.6 mmol) DCM-be és DMF-ben szuszpendálva 6 óráig (Merrifield edényben rázás). Utánna a Val-gyantán lépésenkénti (ciklusonként) hasonló módon kézi kapcsolással építettem fel a védett hexadekapeptidet. A ismétlődő ciklusok a Boc-Ala-OH kapcsolási ciklushoz hasonlóak így ezt a lépést ismertettem csak részletesen. A ciklusok

többszöri DCM mosásokkal indulnak (5x1 perc), a Boc-Val-gyantáról a védőcsoport eltávolítása 2 lépésben (15, 30 perc) 50% TFA-DCM-l távolítottam el, majd a gyantát többször mosva DCM-l (3x1 perc) a semlegesítés (TFA só) 10% TEA-DCM-l (2x3 perc) történt. Ismételt DCM mosások (3x1 perc) majd 4 ekvivalens (6,4 mmol) Boc-Ala-OH-t 4 ekvivalens HBTA és DCC hozzáadásával kapcsoltam minél töményebb DCM oldatban. Ismételt mosási periódusok után DCM (3x), DCM-MeOH (2x), MeOH (2x) a kvalitatív Kaiser-teszttel ellenőriztem a kapcsolás mértékét (5 perc forralás).

A kapcsolást ugyanazon mennyiségekkel és körülmények közt megismételtem nemcsak a Boc-Ala-OH hanem az összes Boc-aminosav kapcsolása esetében kb. ugyancsak 2 óráig. A második kapcsolás után ismételtam a mosási periódusokat és a kvalitatív Kaiser-teszteket is, amely mind a 15 ciklus második kapcsolása után negatív.

Ugyanezt a tesztet alkalmaztam a Boc védőcsoport második eltávolítása után is. Ezek minden esetben pozitívak voltak. Az utolsó ciklus (Boc-Gly-OH kapcsolása) befejezése után a gyantán lévő védett peptidet mostam többször DCM- és MeOH-l, közönséges szűrőre szűrtem a reakció edényből, mostam még MeOH-l és a peptidgyantát szárítottam exikátorban. A reakció folyamán 420 mg súlynövekedést kaptam.

1.2 g peptidgyantáról a peptidet a vízmentes HF-l (18 ml) 1 óráig kezelve 0°C-on 10 ml anizol, 1 ml DMS és 0.1 g acetiltriptofán adalékanyagok jelenlétében N₂ atmoszférában távolítottuk el. A gyantát és peptidet kiszűrve az éteres mosások után a gyanta mellől a peptidet kioldottam 50% és tömény ecetsavval. Az ACOH-s oldatot vízzel meghiggítottam (maximum 5%-ra) és liofilizáltam. 122 mg nyers peptidet kaptam, amely kb. 70% tisztaságúnak bizonyult HPLC-vel.

A nyers peptidet 2x50 mg mennyiségekben tisztítottam RP-HPLC szemipreparatív oszlopon lineáris gradinst [(A) viz-0.1% TFA és (B) 80% AcCN-0.1% TFA] alkalmazva 90

percig. A tisztább frakciókat (HPLC analízis után) egyesítve liofilizáltam. 32 mg 85%-os tisztaságú peptidet kaptam, amelyet ismételtén a fenti oszlopon és gradienssel tisztítottam, a tiszta frakciókat egyesítettem és liofilizáltam. 12 mg tiszta peptidet kaptam, amelynek ES-MS és analitikai RP-HPLC-je megfelelőnek bizonyult. A peptid aminosav analízise megfelel a szekvenciának a hibahatáron belül.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori értekezésem legfontosabb kutatási eredményeit, a klasszikus irodalom függvényében pontokba szedve az alábbiakban adom meg.

1. A szilárd fázisú peptidszintézisnél használt Boc-aminosavak kivételével a szintéziseimnél használt kódolt aminosavak védett és aktivált származékait a szokásos módszerekkel magam készítettem. Ugyanigy jártam el a nem kódolt/nem fehérjeeredetű aminosavak D izomérjeinél. A nem kódolt pipekolinsav és fenilglicin esetében a DL racemátokat acilezve (Z) formában sikeresen rezolváltam.

Ez utóbbi aminosavaknál használtam az új acilezési módszereket Z, Boc és Fmoc esetében is. Egy korábbi ismert módszer módosításával L lizinből L pipekolinsavat sikerült tisztán előállítani tisztán, elfogadható termeléssel.

2. Oldatfázisú szintézissel előállítottam az analgetikus kitorfin alappeptidet, annak 13 analógját, amelyből 9 új vegyület. Tisztítás után nyert tiszta vegyületek kémiai analitikai vizsgálatát elvégeztem és kémiai jellemzésükre is sor került.

3. A morfin tolerancia és dependencia gátló MTDIP dipeptidet és a MIF-1 tripeptidet mint alapvegyületeket ugyancsak előállítottam és azonosítottam. Szintetizáltam ugyancsak oldat fázisban továbbá 5 új MTDIP dipeptid és 5 új MIF-1 tripeptid analógot. Ezek tisztaságot bizonyító analitikai vizsgálatán kívül, ugyancsak sor került a vegyületek kémiai kémiai jellemzésére.

4. A szilárd fázisú peptidszintézis módszerével állítottam elő a Boc-kémiai alkalmazásával a csirke és az emberi galanin közös N-terminális 1-16 szegmensét. Résztvettem a fenti savamid analógja valamint a csirke galanin C-terminális 17-29-NH₂ nyers peptidek tisztításában.

Mindhárom vegyületet sikeresen tisztítottam az RP-HPLC módszerével. A tisztaságot bizonyító, szerkezetigazoló és a kémiai jellemzést szolgáló kémiai analitikai vizsgálatokra is sor került.

5. A csalán főbb alkatrészeinek izolálására és vizsgálatára irányuló kezdeti vizsgálatokat is végeztem, a nyers izolátumokból néhány kísérleti kozmetikai készítményt is kidolgoztunk. Sajnos a vizsgálatok objektív okok miatt félbe-maradtak.

K Ö S Z Ö N E T N Y I L V Á N I T Á S

Először is szeretném megköszönni a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem vezetésének, hogy külföldi állampolgárságom ellenére lehetőséget kaptam a Gyógyszerésztudományi Kar elvégzése után, a régi rendszer szerint, a doktori munka végzésére és értekezésem megvédésére.

Hálásan köszönöm Dr. Penke Botond egyetemi tanár és Dr. Erős István egyetemi tanár tanszékvezető uraknak, hogy lehetőséget nyújtottak az Orvosi Vegytani Intézetben és a Gyógyszerészeti Technológiai Intézetben doktori munkám végzéséhez és, hogy folyamatos konzultációval, segítséggel lehetővé tették értekezésem elkészítését is.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Baláspiri Lajos egyetemi docens úrnak, témavezetőmnek fáradságos munkájáért, segítőkészségért amelyet egész munkám és az értekezés elkészítése kapcsán nyújtott.

Köszönettel tartozom Dr. Janáky Tamás egyetemi docensnek és az Orvosi Vegytani Intézet analitikusainak a peptid analitikai munkák elvégzéséért, a szintetikus laboratóriumban Kocsisné Horváth Gizella laboratóriumi asszisztensnek, Pirosné Menyhárt Éva és Nógrádi Imre technikusoknak munkám során nyújtott napi segítségükért.

Végezetül köszönöm Dr. Dombi György egyetemi docens úr és a Gyógyszerészeti Vegytani Intézet analitikai laboratóriuma munkatársainak az ugyancsak elvégzett analitikai munkákért.

IRODALOM

1. Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. és Amano, H.: (1979) *Nature* **282**, 410.
2. Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. és Amano, H.: (1979) *Eur. J. Pharmacol.* **55**, 109.
3. Walter, R., Ritzmann, R.F., Bhargava, H.N., Rainhow, T.C., Flexner, L.B. és Krivoy, W.A.: (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4573.
4. Nair, R.M.G., Kastin, A.J. és Shally, A.V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1376.
5. Walter, R., Ritzmann, R.F., Bhargava, H.N. és Flexner, L.B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 518.
6. Guillemin, R., Burgus, R. és Vale, W.: (1971) *Vitam. Horm.* **29**, 139.
7. Somlai, Cs. és Baláspiri, L.: (1994) *Acta Chim. Hung. - Models in Chemistry* **129**, 871.
8. Somlai, Cs. és Baláspiri, L.: (1994) *J. prakt. Chem.* **336**, 525.
9. Hughes, J. és Kosterlitz, H.W.: (1977) *British Med. Bull.* **33** 157.
10. Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. és Lottspeich, F.: (1979) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**, 1211.
11. Montecucchi, P.C., de Castiglione, R., Piani, S., Gozzini, L., és Erspamer, V.: (1981) *Int. J. Peptide Protein Res.* **53**, 275.
12. Nett, M.V. (1968) *Eur. J. Phar, Pharmacol.* **5**, 93.
13. Shiomi, H., Kuraishi, Y., Ueda, H., Harada, Y. Amono, H. és Takagi, H. (1981) *Brain Res.* **221**, 161.
14. Janiacki, P.K. és Lipkowski, A.W. (1983) *Neurosci. Lett.* **43**, 73.

15. Ueda, H., Yoshihara, Y. és Takagi, H. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 897.
16. Beaumont, A. és Hughes, J.: (1979) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 245.
17. Ueda, H., Tasumi, K., Shiomi, H. és Takagi, H.: (1982) *Brain Res.* **231**, 22.
18. Ueda, H., Amano, H., Shiomi, H. és Takagi, H.: (1979) *Eur. J. Pharmacol.* **56**, 265.
19. Ueda, H., Ming, G., Hazato, T., Katayama, T. és Takagi, H.: (1985) *Life Science* **36**, 1865.
20. Fukui, K., Shiomi, H., Takagi, H., Hayashi, K., Kiso, Y. és Kitagawa, K.: (1983) *Neuropharmacology* **22**, 191.
21. Yoshihara, Y., Ueda, H., Imajoh, S., Takagi, H. és Satoh, M.: (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 546.
22. Ueda, H., Yoshihara, Y., Fukushima, N., Shiomi, H., Nakamura, A. és Takagi, H.: (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8165.
23. Rackham, A., Wood, P.L. és Hudgin, L.: *Life Science* **30**, 1337.
24. Takagi, H., Satoh, M., Shiomi, H., Akaike, H., Ueda, H., Kawajiri, S., Yamamoto, M. és Amano, H.: (1979) *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*, Pergamon, New York 201.
25. Snyder, S.H. és Childers, S.R.: (1979) *Ann. Rev. Neurosci.* **2**, 35.
26. Ueda, H., Yoshihara, Y., Misawa, H., Fukushima, N., Katada, T., Ui, M., Takagi, H. és Satoh, M.: (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3732.
27. Flörsheimer, A., Schwarz, A., Steinke, M., Kittelmann, M., Herrmann, G., Kula, M.R. és Wandrey, C.: (1991) *Ann. New York Acad. Sci.* **38**, 633.

28. Clapés, P., Valencia, G., Torres, J.L., Reig, F., Garcia-Anton, J.M. és Mataalvarez J.: (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 157.
29. Wandrey, C. és Kula, M.R.: (1994) *J. Biol. Chem.* **278**, 1497.
30. Ueda, H. és Takagi, H.: (1994) *Japan J. Pharmacol.* **26**, 216.
31. Yajima, H., Ogawa, H., Ueda, H. és Takagi, H.: (1980) *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1935.
32. Kubota, M., Nagase, O., Amano, H., Takagi, H. és Yajima, H.: (1980) *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2580.
33. Sasaki, Y., Akutsu, Y., Suzuki, K., Sakurada, S. és Kisara, K.: (1981) *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3403.
34. Kubota, M., Kojima, H., Nagase, O., Amano, H., Takagi, H. és Yajima, H. (1982) *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 2447.
35. Kitagawa, K., Kawai, N., Kiyawa, S., Akita, T., Kiso, Y., Ueda, H., Ming, G. és Takagi, H.: (1985) *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 377.
36. Balásperi, L., Kovács, K., Gecse, Á., Telegdy, Gy. és Neubert, K.: (1982) *Peptides*, K. Blaha és P. Malon (eds.), Walter de Gruyter Co. Berlin, New York, 487.
37. Nair, R.M.G., Kastin, A.J. és Shally, A.V.: (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1376.
38. Nair, R.M.G., Kastin, A.J. és Shally, A.V.: (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 1420.
39. Kastin, A.J., Shally, A.V. és Viosca, S.: (1971) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**, 1437.

40. Kastin, A.J. és Barbeau, A.: (1972) *Can. Med. Assoc. J.* **107**, 1079.
41. Kovács, L.G., Szabó, Gy., Telegdy, Gy., Balásperi, L., Pálos, É. és Szpornyi, L.: (1989) *Pharmacol. Biochemistry and Behavior* **31**, 833.
42. Van Ree, J.M. és de Wied, D.: (1976) *Life Science* **19**, 1331.
43. Bhargava, H.N., Walter, R. és Ritzmann, R.F.: (1980) *Pharmacol. Biochemistry and Behavior* **12**, 73.
44. Bhargava, N.H.: (1981) *Life Science* **29**, 45.
45. Van Ree, J.M. és de Wied, D.: (1976) *Life Science* **19**, 1331.
46. Clouet, D.H. és Iwatsubo, K.: (1975) *Ann. Rev. Pharmacol.* **15**, 49.
47. Pucilowski, O., Kostowski, W. és Trzaskowska, E.: (1985) *Peptides* **6**, 7.
48. Live, D.H., Wyssbrod, H.R. Fischman, A.J., Agosta, W.C., Bradley, C.H. és Cowburn, D.: (1979) *J.Amer. Chem. Soc.* **101**, 474.
49. Walter, R., Ritzmann, R.F. Bhargava, H.N. és Flexner, R.: (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 518.
50. Szontágh, L., Kovács, G.L., Balásperi, L., Hódi, K., Bohus, P. és Telegdy, Gy.: (1981) *Kísérletes Orvostudomány* **33**, 369.
51. Kovács, L.G., Szontágh, L., Balásperi, L., Hódi, K., Bohus, P. és Telegdy Gy.: (1981) *Neuropharmacology* **20**, 647.
52. Kovács, G.L., Szontágh, L., Balásperi, L. és Telegdy, Gy.: (1984) *Acta Phys. Hung.* **63**, 83.
53. Balásperi, L. és Adi, B.: (1995) Kis neuropeptid analógok szintézise, vizsgálata. MKE Vegyészkonferencia, Debrecen.

54. Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jörnvall, M., McDonald, T.M. és Mutt, V.: (1983)
FEBS Lett. **164**, 124.
55. Bersani, M., Johnsen, A.H., Hjup, P., Dunning, B.E., Andressen, J.J. és
Holst, J.J.: (1991) *FEBS Lett.* **283**, 189.
56. Balásipiri, L.: Sikeres OTKA pályázat, OTKA T 7300.
57. Adi, B.: (1993) Gyógyszerész Szakdolgozat, SZOTE Gyógyszerésztudományi Kar.
58. Augustin, B., Jávorka, S., Giovanni, R. és Rom, P.: (1948) *Magyar Gyógynövények*,
Medicine Budapest.
59. Rápoti, J. és Romváry, V.: (1983) *Gyógyító Növények*, Medicine, Budapest.
60. Pókai, É.: (1987) Gyógyszerész Szakdolgozat, SZOTE Gyógyszerésztudományi Kar.
61. Verza-Petri, G.: (1979) *Drogatlasz*, Medicina, Budapest.
62. Beschia, M., Leonte, A. és Oance, I.: (1984) C.A. referencia 101, 169335c.
63. Ulrich, I., Jahn-Deesbach, W.: (1984) *Angew. Bot.* **58**, 255.
64. Trofimova, E.P.: (1978) *Izv. Akad. Nauk. Tadzh.*, C.A. referencia **89**, 87365.
65. Adamski, R. és Bieganska, I.: (1984) *Herba Pol.* **30**, 17.
66. Grandi, A., Lupatelli, M. és Paola, G.: (1985) C.A. referencia **102**, 94557m.
67. Vezárné Petri G. (1982) *Farmakognosia*, Medicina, Budapest.
68. Penmans, Lay, M. és Brochaert, W.F.: (1984) *FEBS Lett.* **177**, 99.
69. Ulrich, I. és Deesbach, W.: (1984) *Angew. Bot.* **58**, 255., C.A. referencia
102, 146176h.
70. Schicher, H. és Effenberger, S.: (1986) *Dtsch. Apoth. Ztg.* **126**, 79., C.A.
referencia **104**, 156063z.

71. Rosishaya, G.I. Bargaeva, I.D. Butko, L. és Nikolaev, S.M.: (1984) *Farm. Zh.* **3**, 67., C.A. referencia **101**, 78720h.
72. Hughes, R.E., Ellery, P., Harry, T., Inkins, V. és Jones, E.: (1980) *J. Sci. Food. Agric.* **31**, 1279., C.A. referencia **94**, 190425d.
73. Baribar, C., Broncano, F.J., Lazaro-Cassaro, M. és Rebuelta, M.: (1983) *Ann. Bromatol.* **35**, 99., C.A. referencia **101**, 53533m.
74. Oláh, A.: (1987) *A természet patikája*. Kossuth Könykiadó, Budapest.
75. Verzar, G., Nyeredy, Sz. Batulko, P., Mikita, K., Mészáros, S., Gulyás, A., Galambos, B. és Vincze, J.: (1985) *Ger. Off.* **3**, 504, 355. C.A. referencia **101**, 165938v.
76. Andersen, S. és Wold, J.K.: (1978) *Phytochemistry* **17**, 1875.
77. Rácz, G., Rácz-Kotilla, K. Laza, A.: (1984) *Gyógynövényismeret*. Cases, Bukarest.
78. Szókány, Gy. és Janáky, T.: (1996) *A kémiai újabb eredményei. HPLC a peptidkémiaiban*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
79. Vogler, K. és Lanz, P.: (1966) *Helv. Chim. Acta* **49**, 1348.
80. Kisfaludy, L. és Korenczki, F.: (1982) *Synthesis*, 163.
81. Ogawa, H. és Kubota, M.: (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1315.
82. Stewart, J.M., Young, J.D.: (1968) *Solid Phase peptide Synthesis* Freeman Company, Saan Francisco; és Stewart, J.M., Young, J.D.: (1983) *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford.

