

DISS. B 980

OXITOCIN SZINTÉZISEK
SZILÁRD FÁZISON

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

PALLAI VILMOS PÉTER

okl. vegyész

Készült:

A Szegedi József Attila Tudományegyetem

Szerves Kémiai Intézetében

1973



T A R T A L O M J E G Y Z É K

BEVEZETÉS	1. oldal
AZ OXITOCIN - TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS -. . .	5. oldal
A SZILÁRD FÁZISU PEPTIDSZINTÉZIS MODSZEREI	8. oldal
A./ A szilárd hordozó, a funkciós csoport kiépítése	10. oldal
B./ Az első aminosav kapcsolása a polimer- hez	12. oldal
C./ Védcsoportok és eltávolításuk . . .	14. oldal
1./ Az α -aminocsoport védelme . . .	14. oldal
2./ Oldalláncvédelem	16. oldal
D./ Kapcsolási módszerek	18. oldal
1./ Diciklohexil-karbodiimidés kapcsolo- lás	18. oldal
2./ Aktivészterés kapcsolás	20. oldal
3./ Egyéb kapcsolási módszerek . . .	21. oldal
E./ A nemteljes kapcsolat problémája, blokk- kerék, analitikai módszerek	22. oldal
1./ Blokkkerék	23. oldal
2./ Analitikai kontroll-módszerek . .	25. oldal
F./ A kész peptid eltávolítása a polimer- ről	27. oldal
1./ Hasítás acidolízissel	27. oldal
2./ Hasítás bázikus körülmények között	28. oldal
G./ A termék tisztítása és azonosítása .	29. oldal
1./ Preparatív frakcionálási eljárás- sok	29. oldal
2./ Azonosítási eljárások	31. oldal

OCITOCIN SZINTÉZISEK SZILÁRD FÁZISON . .	33. oldal
1./ Szintézis o-nitro-fenil-szulfenil- -aminosavakkal	36. oldal
2./ Szintézis t-butiloxikarbonil-aminosa- vakkal, az aszparagin és glutamin sav- -amidcsoportjainak utólagos kiépité- sével	38. oldal
3./ Szintézis BOC-aminosavakkal, az asz- paragin és glutamin aktivésztereivel, blokkor alkalmazásával	41. oldal
4./ Szintézis amid védőcsoport és penta- fluorfenilészter alkalmazásával; a nitrilképződés vizsgálata	45. oldal
5./ Szintézis benzilmerkapto tiol-védő- csoport alkalmazásával, a diszulfid- hid szilárd fázison történő kialaki- tásával	52. oldal
KISÉRLETI RÉSZ	59. oldal
ÖSSZEFOGLALÁS	77. oldal
IRODALOM	79. oldal

B E V E Z E T É S

A modern peptidkémia, amelynek kezdetét DU VIGNEAUD /19 / első oxitocin szintézisétől /1953/ számíthatjuk, az azóta eltelt 20 év alatt hatalmas lendülettel fejlődött. A peptidkémia módszereinek jelentős fejlődése olyan nagyszabású szintetikus munkák megvalósítását tette lehetővé, mint az 188-as tagzáru emberi növekedési hormon, az 127-es tagzáru ribonukleáz-A stb. előállítása.

A szintetikus peptidkémia jelentős eredményei azonban nem tulajdoníthatóak kizárólag az első sikeres peptidhormon szintézis nyomán megindult módszertani fejlődésnek. Jelentős és ma már meghatározó az az üsztűzés, amelyet a peptidok és proteinek fontos biológiai szerepének felismerése nyújt. A szerkezet-bizonyítás szintézis útján, a szerkezet-biológiai aktivitás összefüggés megállapítása, megváltoztatott hatású származékok előállítása a szekvencia változtatásával és a természetes forrásból nehezen hozzáférhető peptidhormonok előállítása gyógyászati célokra, mind a szintetikus peptidkémia kiszélesedett alkalmazási területéhez tartozik.

A szintetikus igények ilyen mértékű megnövekedése kívánatosá tette a szintézis menetének egyszerű-

sítését. Ezt a célt látszik elérni a MERRIFIELD / 56 / által 1962-ben javasolt új szintézismód, a szilárd fázisú peptidszintézis. Az új módszer lényege: a C-terminális aminosavat egy oldhatatlan polimerrel észteresíti, majd a szokásos szintézislépések /védőcsoport eltávolítás, kapcsolás/ monoton ismétlésével létrehozza a kívánt szekvenciát. A szintézis során a növekvő peptidlánc végig az oldhatatlan hordozóhoz van kötve, ezért az egyes műveletek után a felesleges reagensok és melléktermékek egyszerű szűréssel eltávolíthatóak. A "klasszikus" peptidszintézissel ellentétben a szilárd fázisú peptidszintézisnél nincs szükség - és lehetőség sincs - az intermedier szekvenciák izolálására és hosszadalmas tisztítási eljárásokra. Az azonos műveletek monoton ismétlődése ugyanakkor lehetőséget nyújt az automatizálásra.

Egy kristályos tetrapeptid, majd a biológiailag aktív bradikinin előállításával elsőként MERRIFIELD / 57, 58 / bizonyította az általa javasolt szintézismód gyakorlati hasznosíthatóságát. Azóta számos biológiailag aktív peptidet állítottak elő e módszerrel, közöttük négy, száznál nagyobb tag-számú /emberi növekedési hormon, ribonukleáz, citokrom C, ribonukleáz T₁/.

A szilárd fázisu peptidszintézis vitathatatlan eredményei ellenére fő hibáját, a hibás összetételű, téves szekvenciák keletkezését, nem sikerült kiküszöbölni. Ezért a módszer alkalmazhatósága, ill. alkalmazhatóságának korlátai máig is viták tárgya.

Az oxitocin nonapeptidet választva modelvegületként, meg kívánatom győződni a szilárd fázisu peptidszintézis módszerének alkalmazhatóságáról.

Az oxitocin szilárd fázison végzett szintéziseinél a megoldandó feladatokat - a szintézismód által felvetett problémákon túlmenően - a nonapeptid szekvenciájából következő problémák jelentették.

Szintéziseim során különböző α -amino védőcsoportokat és a 4 trifunkciós aminosavnál különböző oldallánc védőcsoportok és kapcsolási módszerek alkalmazhatóságát vizsgáltam meg.

A szilárd fázisu peptidszintézis által felvetett kérdések közül foglalkoztam a C-terminális aminosav-polimer észterkialakítási eljárásokkal, a kapcsolási lépések és a védőcsoport eltávolítás teljességét kontrolláló módszerekkel, valamint a nemreagált aminosav-csoportok "blokkolási" módszereivel.

A szilárd fázisu peptidszintézis egy "mikroheterogén" vegyületkeveréket szolgáltat, amely alapos tisztításra szorul. Az általam szintetizált nyers nonapep-

tídek esetében is számos elválasztási eljárás alkalmazása és kipróbálása volt szükséges.

Mivel a szilárd fázisú peptidszintézis rövid múltra tekint vissza, és sok gyakorlati kérdésben egymásnak ellentmondó vélemény lát napvilágot, ezért sok esetben szükségesnek tartottam modellekísérletek során ellenőrizni a javasolt eljárásokat, mielőtt alkalmaztam volna azokat peptidek szintézisénekél.

Kitűzött célom volt a klasszikus és a szilárd fázisú peptidszintézis összehasonlítása a gazdaságosság szempontjából, különös tekintettel az oxitocin előállítására.

A Z O X I T O C I N

- TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS -

Az oxitocin neuroszekrécións eredetű hipofizishormon az uterus simaizomzatára hat, serkenti annak kontrakcióját, fontos szerepet játszik a szülésben. Hatása van ezenkívül a laktáló emlőmirigyre, amelyben fokozza a tejelválasztást és egyidejűleg izomkontrakciót vált ki.

Az első sikeres oxitocin izolálást KAMM / 36/ végezte, akinek módszerét továbbfejlesztve DU VIGNEAUD / 93 / nyert elsőként analitikai tisztaságu oxitocint.

A peptidhormon aminosavösszetételét szintén DU VIGNEAUD / 94 / határozta meg a sósavas hidrolizissel nyert aminosavkeverék komponenseit keményítő oszlopon elválasztva és ninhidrin reakcióval megállapítva, hogy mely aminosavak milyen mennyiségben fordulnak elő.

Az oxitocin szerkezetére TUPPY / 92 / és DU VIGNEAUD / 19 / tett javaslatot - egymástól függetlenül.

A szerkezet végérvényes igazolását DU VIGNEAUD / 95/ totálszintézise jelentette. A szintézis stratégiáját

a 2 + /3 + 4/ képlettel jellemezhetjük. Eszerint először a di-, tri-, és tetrapeptideket építették fel külön-külön, ezután a C-terminális tetrapeptidamidot acilezték a középső tripeptiddel, és végül az N-terminális dipeptid és a heptapeptidamid között hajtottak végre fragmenskondenzációt. Az aminosavakkal történő acilezést a megfelelő /izovalerian-savval képzett/ vegyes anhidridekkel, ill. savkloridokkal, a fragmenskondenzációt pedig tetraetilpirofoszfit-tal végezték.

DU VIGNEAUD /95 / nagyjelentőségű szintézise nemcsak az oxitocin szerkezetének, hanem nagyobb molekulahelyű, biológiailag aktív peptidok előállíthatóságának is bizonyítékul szolgált.

Az oxitocin későbbi szintézisei jól tükrözik a peptidkémia fejlődését. BOISSONNAS /17 / sikerrel alkalmazta szintézisének az azidos fragmenskondenzációt, amely racemizációmentes kapcsolást biztosított és az S-benzil csoportok mellől acidolízissel szelektíven eltávolítható karbobenzoxi védőcsoportot az α -amino csoportok védelmére.

Jelentős előrehaladást jelentett BODÁNSZKY és DU VIGNEAUD /11 / p-nitrofenilészterekkel végzett szintézise, amelynél lépésenkénti /"stepwise"/ stratégiát alkalmaztak, kiküszöbölve a racemizáció veszélyét.

Az oxitocin és vazopresszin csalmen kétszáz analógiát állították elő a kémiai szerkezet - biológiai aktivitás összefüggésének tisztázására. Vizsgálták a szekvencia, a funkciós csoportok, az oldalláncok és az intramolekuláris gyűrű jellege szerepét a receptorhoz való kötődésben, ill. a kontrakció kiváltásában. Kimutatták /35/, hogy az intramolekuláris gyűrű által stabilizált konformációnak van a leglényegesebb szerepe.

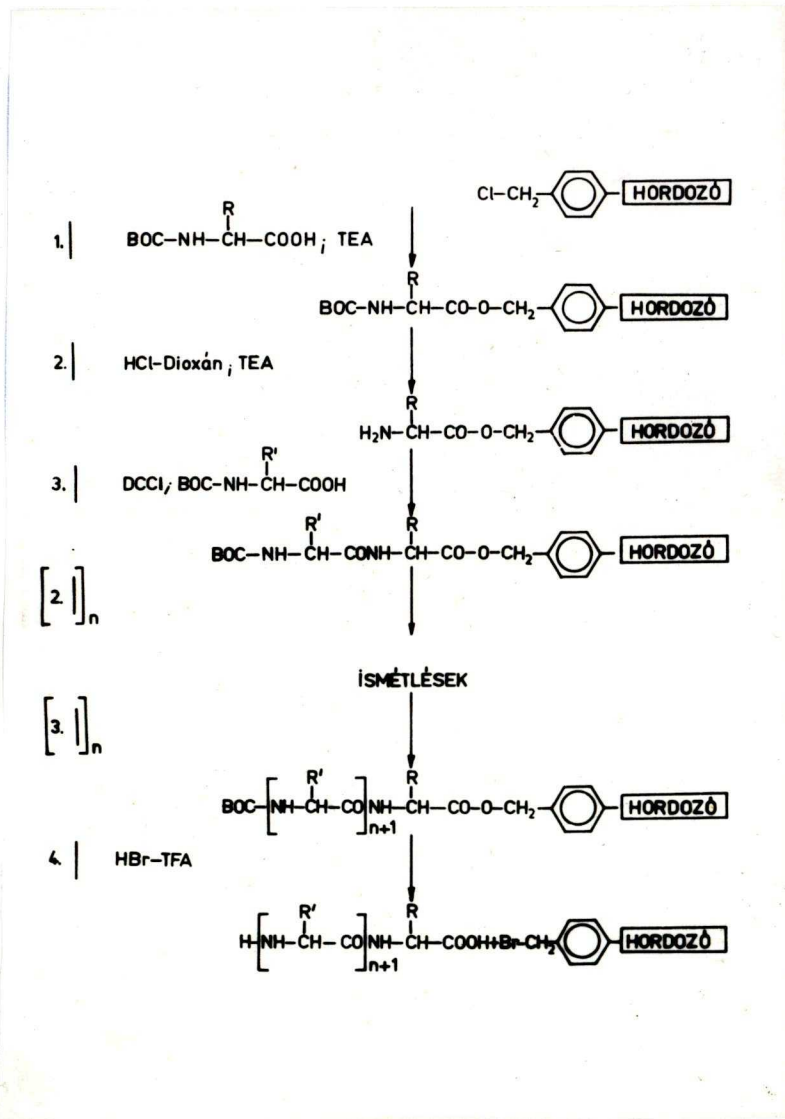
A SZILÁRD FÁZISU PEPTIDSZINTÉZIS

MODSZERE

A szilárd fázisú peptidszintézis bevezetése óta eltelt tíz év eredményei kétségtelenül bizonyítékai a módszer használhatóságának, de rámutattak ugyanakkor alkalmazhatóságának korlátaira is. Az új módszer nem jelenti a peptidszintézis problémáinak végleges megoldását, vagy akár a klasszikus szintézismód felszámolását. Ellenkezőleg: a Merrifield-módszer új, speciális problémákat vetett fel, amellett, hogy a klasszikus szintézismód "klasszikus" problémáit örökölte.

A módszer fő vonzereje a szintézismenet lényeges egyszerűsödése, mindenestre meglepő gyorsasággal általánossá tette a peptidszintézis e módját. Ezt tanúsítja az e témával foglalkozó közlemények nagy száma és az egyre szaporodó összefoglaló munkák / 49, 59, 87. / megjelenése.

A szilárd fázison végzett peptidszintézis első lépése a C-terminális N-védett aminosav karboxil csoportja és az oldhatatlan polimer funkciós csoportja közötti - többnyire benzilészter - kötés kialakítása. A szintézismenet az 1. ábrán látható.



1. ábra

Az aminos védőcsoport eltávolítása után újabb aminosav kapcsolása lehetséges. A kapcsolási reakciók és a védőcsoport eltávolítás megfelelő számú ismétléssel felépíthető a kívánt peptidszekvencia a szilárd fázison. A szintézis utolsó lépése az elkészült peptidlánc hasítása a hordozóról. Legtöbbször a peptid-polimer észterkötés hasításával egyidejűleg eltávolítják az oldallánc védőcsoportokat is. A nyers termék tisztítása ezután a "klasszikus" módszerekkel történik.

Az alábbiakban ismertetem az egyes szintézislépéseket.

A./ A szilárd hordozó, a funkciós csoport kiépítése

A szilárd fázisu peptidszintézis céljaira alkalmas polimerrel szemben támasztott követelmények:

a./ tökéletes oldhatatlanság minden használatos oldószerben,

b./ kémiai és fizikai stabilitás,

c./ olyan szerkezet és forma, amely lehetővé teszi a reakciópartnerek gyors diffúzióját a reakció helyéhez és a melléktermékek, felesleges reagensek, valamint oldószerek gyors eltávolítását,

d./ alkalmasság az észteresítéshez szükséges funkciós csoport kiépítésére.

A MERRIFIELD / 57 / által először használt és azóta széleskörűen elterjedt sztírol-2 % divinilbenzol térhálós kopolimer kielégíti ezeket az igénypontokat. Ujabban sikerrel alkalmazzák az 1 %-os kereszt-kötésű kopolimert is, amely - bár kisebb mechanikai stabilitású - jobb duzzadásképesége és oldószer-átjárhatósága miatt előnyösen használható nagyobb tag-számu peptidok szintézisének.

A szintézis sikere szempontjából lényeges a hordozót jól duzzasztó, az aminosavszármazékokat jól oldó szolvens használata. Kiterjedt vizsgálatok alapján a diklormetánt és a dimetilformamidot találták a legalkalmasabb oldószereknek.

Az észterezésre alkalmas funkciós csoportok közül a legáltalánosabban a klórmetil csoportot használják, amelynek kialakítása a hordozón klórdimetil-éter és Sn/IV/ klorid vagy más Friedel-Crafts katalizátor alkalmazásával történik / 26/. Speciális esetekben célszerűbb a hidroximetilolt származék használata, amely könnyen nyerhető a klórmetil polimerből / 12/. A sztírol-divinilbenzol kopolimer sok módosított származékát /pl. brómmetil, jódmetil, benzhidril, haloacetil, hidroxitercier-alkil, dialkilbenzilsulfonium stb./ állították elő az aminosav-polimer kovalens kötés enyhébb körülmények közötti kialakítása és hasítása érdekében.

Számos más típusu polimer alkalmazhatóságát is vizsgálták a szilárd fázisú peptidszintézis céljaira. SEMJAKIN / 81 / lineáris polisztirolt, INUKAI / 32 / fenol-formaldehid kopolimert, MERRIFIELD / 59 / Sephadex G-25 VLASOV és BILIBIN / 96 / pedig Sephadex LH-20 származékot használt hordozóként. Szilárd, ét nem járható hordozóra vékony rétegben rávitt polimert alkalmaztak az ún. graft-polimereknél TREAGGAR / 91 / és POTTS / 73 /; RAYER / 3 / alkilált szilikagél származéka oszloptechnika használatát tette lehetővé a szokásos Merrifield-féle rászóedény helyett.

Bár a sokasodó új típusu hordozók némelyike előnyös tulajdonságokkal rendelkezik, egyik sem múlja felül a sztírol-divinilbenzol kopolimert, amely továbbra is a leggyakrabban alkalmazott hordozó.

B./ Az első aminosav kapcsolása a polimerhez

A C-terminális aminosav N-védett származéka és a klórmetilézett sztírol-divinilbenzol kopolimer közötti észterkötés kialakítása trietilamin jelenlétében 24-50 óras etanolban vagy más szolvensben való refluxáltatással történik / 59, 87 /.

Egyes aminosavak ill. aminosavszármazékok érzékenysége, valamint néhány mellékreakció /észterképződés,

átésztereződés, a trietilamin kvaternerizálódása/ elkerülésére számos módosítást alkalmaztak ezen az eljáráson: WIELAND /99 / tetrahidrofurént használva szolvensként, LOFFET /49 / trietilammonium-hidroxidot alkalmazva trietilamin helyett, MARGLIN /52 / szobanón, trietilamin jelenlétében dimetilformamidban végezve az észteresítést kiszűbölte ki a mellékreakciók veszélyét.

Igen enyhe körülmények között végezhető az észteresítés a hidroximetilált /85 / és a bróm- ill. jódmetilezett /90 / sztirol-divinilbenzol kopolimerek esetében, valamint DONMAN és MARKLEY /18 / módszerével, akik az aminosavak dimetilszulfonium-polimer sóiból hő hatására bekövetkező átrendeződéssel nyerték a benzilésztereket.

Hátránya az általánosan alkalmazott benzilésztereknek, hogy nem teljesen stabilak a szokásos védőcsoport eltávolítás körülményei között / 27/. Az előző fejezetben említett új típusú polimerek egyike-másika rezisztensebb kötéstípus kialakítását teszi lehetővé.

Megemlítjük, hogy a trifunkciós aminosavak oldal-lánc funkciós csoportjai is lehetőséget nyújtanak a polimerrel való kapcsolat kialakítására, ami sok esetben követendő stratégia.

C./ Védőcsoportok és eltávolításuk

1./ Az α -aminocsoport védelme

A szilárd fázisu peptidszintézisnél alkalmazott védőcsoportnak maximálisan szelektívnek, azaz

a./ kvantitativ eltávolíthatónak kell lennie,

b./ a polimer-peptid kötés és

c./ az oldallánc védőcsoportok legkisebb károsodása nélkül.

Az elsőként alkalmazott aminos védőcsoportok a klasszikus szintézisnél jól bevált karbobenzoxi védőcsoport, illetve ennek nitrált és brómozott származékai voltak / 56, 57 /. E védőcsoportok eltávolításuk drasztikus körülményei miatt nem nyertek általános felhasználást.

A t-butiloxikarbonil /BOC/ csoport MERRIFIELD / 58, 60 / vizsgálatai szerint megfelel a fenti követelményeknek - ma is ez a védőcsoport a legáltalánosabban használatos a szilárd fázison végzett szintézisnél. Kvantitatív hasítása 1 M sósav/jégeccettel 20-40 perc alatt / 88/ 4 N sósav/dioxánnal 30 perc alatt / 61 /, trifluorecetsavval 15-120 perc alatt / 45, 87 / és 50 %-os trifluorecetsav/diklórometánnal 10-30 perc alatt / 27 / végezhető.

A leggyorsabb és legteljesebb védőcsoport eltávolítást a trifloreccetsav/diklórmetán 1:1 arányu elegyével lehet elérni / 38/; nagyobb peptidok szintézisének azonban jelentős peptidvesztést okozó hatását észlelték / 37/, ezért GUTTE és MERRIFIELD /28/ 20 %-os trifluoreccetsav/diklórmetán használatát javasolják, amellyel teljes BOC-eltávolítás érhető el, de nem okoz peptidvesztést.

A glutaminnál a védőcsoport eltávolítása piroglutamin képződését okozza, amelyre a glutamint követő kapcsolat gyenge hozamából következtek / 39 / . BAYBERMAN / 7 / kísérletei szerint elsősorban a hasítás után alkalmazott jégeetes mosás kedvez a piroglutamin képződésének.

A triptofán savérzékeny indolgyűrűjének védelmére tiolvegyszerek adtak a hasító reagensekhez /55 /.

A még kinéletesebb védőcsoport eltávolítása érdekében és hogy kiterjessék az alkalmazható oldallánc védőcsoportok körét, a BOC-csoportnál savlabilisabb védőcsoportok alkalmazásával próbálkoztak. A t-amiloxikarbonil /AOC/ /32 / és a p-metoxibenziloxikarbonil /97 / csoport savérzékenysége a BOC-éval azonos nagyságrendűnek bizonyult, lényegesen savérzékenyebbnek találták viszont o-nitrofenil-

szulfenil csoportot / 41 /, a 3,5-dimetoxi-benzil-oxikarbonil csoportot / 100 / és különösen utóbbi dimetil-származékát / 8 /, valamint a difenil-izopropiloxikarbonil védőcsoportot / 83 /.

Sajnos a fokozott savlabilitás a legtöbb védőcsoportnál az aminosavszármazékok nehézkes preparálásával és nem kellő stabilitásával jár együtt, ezért továbbra is a BOC-védőcsoport használata van tulsulyban.

2./ Oldalláncvédelem

Mint az α -aminocsoport védsénél láttuk, a szilárd fázisu peptidszintézisnél a szelektivitás követelménye olyan védőcsoportok alkalmazását teszi szükségessé, amelyek eltávolítása legkevésbé sem károsítja az oldalláncok védőcsoportjait.

Az oldatfázisu szintéziseknél jól bevált t-butil - benzil típusu védőcsoportkombinációról hamarosan kiderült, hogy alkalmazása a szilárd fázison végzett szintéziseknél nem biztosít teljes szelektivitást.

A nonalizin szintézisénél / 105/ pl. csupán 35 %-ban keletkezett a kívánt nonapeptid, míg a 10-17 aminosavból álló polilizin 43 %-ban, bizonyítva a tekintélyes mértékű oldalláncnövekedést

ill. azt hogy a karbobenzoxi-védőcsoport nem teljesen stabil az α -amino BOC lecsodás körülményei között.

Az egyik lehetőség a szelektivitás növelésére: "enyhébb" BOC-védőcsoport eltávolítási eljárások alkalmazása. A már említett trifluoecetsav/diklórmetán 20 %-os elegyén kívül kiméletes eltávolítást tesz lehetővé a LOFFET / 47 / által használt merkaptocénszulfonsav ecetsavas oldata is, amellyel 30 perc alatt szobahőn teljesen eltávolítható volt a BOC-csoport a karbobenzoxi-csoport károsodása nélkül.

A másik lehetőség az ismerttetett nagy savérzékenységi csoportokkal történő α -aminó védelem, amelynek hátrányairól már említést tettem.

A szelektivitás növelésének harmadik lehetőségére, nevezetesen a BOC-hasítás körülményei között nem károsodó, fokozottan savrezisztens oldallánc védőcsoportok alkalmazására is találunk példát: NODA / 65 / p- és m-klórcarbobenzoxi, OHNO / 66 / p-nitrokarbobenzoxi, SAKAKIBARA / 76 / diizopropil-metoxikarbonil-csoporttal védte az oldallánc funkciós csoportokat; valamennyi eltávolítható a szintézis végén cseppfolyós hidrogén-fluoriddal a polimer benzilészterkötésének hasításakor.

A fokozottan savérzékeny, ill. savrezisztens

védőcsoportok kifejlesztése ellenére az irodalmi példák azt mutatják, hogy a szintetikus munkák zöménél továbbra is az α -t-butiloxikarbonil - oldal-lánc-karbobenzoxi, -benzil csoportkombinációt részesítik előnyben.

E./ Kapcsolási módszerek

Az oldatfázisú reakciónál használatos, szinte valamennyi kapcsolási módszer alkalmazását vizsgálták a szilárd fázisú szintéziseknél / 59 /, de csupán két módszer terjedt el: a diciklohexil-karbodiimides és az aktivészteres. /1969 végéig az eddigi összes szintézis 72 %-ánál alkalmaztak diciklohexil-karbodiimides, 21 %-ánál aktivészteres és csupán 7 %-ánál egyéb kapcsolási módszert./

A kapcsolási reakcióval szemben támasztott követelmények:

- a./ legyen kvantitatív és gyors
- b./ ne okozzon mellékreakciókat és
- c./ recemizációt.

1. Diciklohexil-karbodiimides kapcsolás

SHREHAN és HESS / 80 / diciklohexil-karbodiimides módszerét MERRIFIELD / 54 / használta először szilárd fázisú peptidszintéziseknél. Megállapította, hogy a legtöbb aminosav esetében a kapcsolás 30 perc vagy kevesebb idő alatt lejátszódik, tekintettel azonban a "nehéz" kapcsolásokra, 2 órás reakcióidőt javasolt.

A kapcsolás teljességének további biztosítékeként 3-4 mólos aminosav- és diciklohexil-karbodiimid-felesleget alkalmazott, bár sok esetben az 1,2-1,5-szeres felesleg is elegendő. A nagy dielektromos állandója és ugyanakkor a polimert jól duzzasztó oldószerek közül a diklórmétán és a dimetilformamid bizonyult a legalkalmasabb reakcióközegnek; utóbbi azonban kedvez az N-acilkarbamid képződésével járó mellékreakciónak, s ezért Merrifield a diklórmétánt részesíti előnyben "standard" kapcsolási műveleténél.

Gyakran ilyen feltételek alkalmazása mellett sem értek el teljes kapcsolást, ezért próbálkoztak a hosszabb /5, 15 sőt 24 óras/ reakcióidő, az aminosav - diciklohexil-karbodiimid még nagyobb feleslege /ez növeli a mellékreakciók valószínűségét/ alkalmazásával, az utóbbi időben pedig gyakorlattá vált a kapcsolási reakció megismétlése.

Racemizációmentes, a szokványosnál tisztább termék keletkezésével kecsegtet az ESKO és KARLSSON / 22 /, ill. ELIOT / 20 / által bevezetett un. adszorpciós kapcsolás alkalmazása: a BOC-aminosav karboxilja és a szabad aminocsoport között sókötést hoznak létre diklórmétánban inkubálva a reakciópartnereket, és csak a BOC-aminosav feleslegének eltávo-

litása után végzik el a diciklohexil-karbodiimides kapcsolást.

A diciklohexil-karbodiimides kapcsolás - mint az várható a nagy reaktivitás alapján - nem mellékreakciómentes. A peptidkötés acilezését és az acilező aminosav utólagos beépülését a peptidláncba csupán igen nagy diciklohexil-karbodiimid-aminosavfelesleg alkalmazása esetében észlelték / 63 /. Az aszparagin és a glutamin savamid csoportjának dehidratálódását / 74 / amid védőcsoport vagy aktivészteres kapcsolás alkalmazásával lehet elkerülni - általában az utóbbit alkalmazzák. Az acilező komponens dezaktiválódását eredményező N-acilkarbamid képződése csak bizonyos oldószerekben jelentős.

A diciklohexil-karbodiimides kapcsolás és általában a szilárd fázisú peptidszintézis körülményei nem okoznak számottevő racemizációt / 59 /.

2./ Aktivészteres kapcsolás

A leggyakrabban használatos p-nitrofenilészteres kapcsolás első alkalmazását éppen a diciklohexil-karbodiimides kapcsolás egyik gyengesége váltotta ki: nevezetesen az aszparagin és a glutamin savamid-csoportjának dehidratálódása / 14 /.

E speciális eseten túlmenően az aktivészteres kapcsolás még a további előnyökkel bír a diciklohexil-

karbodiimidés kapcsolással szemben:

- a./ az aktivészterek stabil, többnyire kristályos vegyületek,
- b./ lehetővé teszik a reakció spektrofotometriás követését,
- c./ a felesleg regenerálható.

Az összes előnyt túlkompenzáló hátrány: lassu reakció, amely gyakran még igen nagy feleslegok alkalmazásánál sem vezet teljes reakcióhoz / 39 /.

Az említett vonzó előnyök egyéb aktivészterek kutatására ösztönözték. Vizsgálták többek között a pentafluorfenil-, pentaklórfenil-, o-nitrofenil-, N-hidroxi-szukcinimid- stb. -észterek alkalmazását / 13 /.

A különböző aktivészterek kapcsolási készségének összehasonlítását PENKE és KOVÁCS / 72 / végezték el kinetikai méréseik alapján.

Próbálkoztak különböző akcelerátorok alkalmazásával /1,2,4-triazol, imidazol stb./ az aktivészterek reakciójának gyorsítására - a közölt eredmények ellentmondásosak.

3./Egyéb kapcsolási módszerek

Számos egyéb kapcsolási módszer került kipróbálásra : a karbonildiimidazoles / 50 /, az N-karboxi-anhidrideket felhasználó / 31 /, a vegyes anhidrides

módszer / 44 / stb. - a diciklohexil-karbodiimidés kapcsolás hatékonyságát azonban egyik sem érte el.

Figyelemre méltó előnyökkel rendelkezik viszont a szimmetrikus anhidrideket alkalmazó peptidképzési módszer / 97 . 101 /: a reakció során melléktermékként maga az N-védett aminosav keletkezik, amely újra felhasználható. A módszert peptidokkal való acilezésre is sikerrel alkalmazták.

E./ A nenteljes kapcsolás problémája.

blokkerek, analitikai módszerek

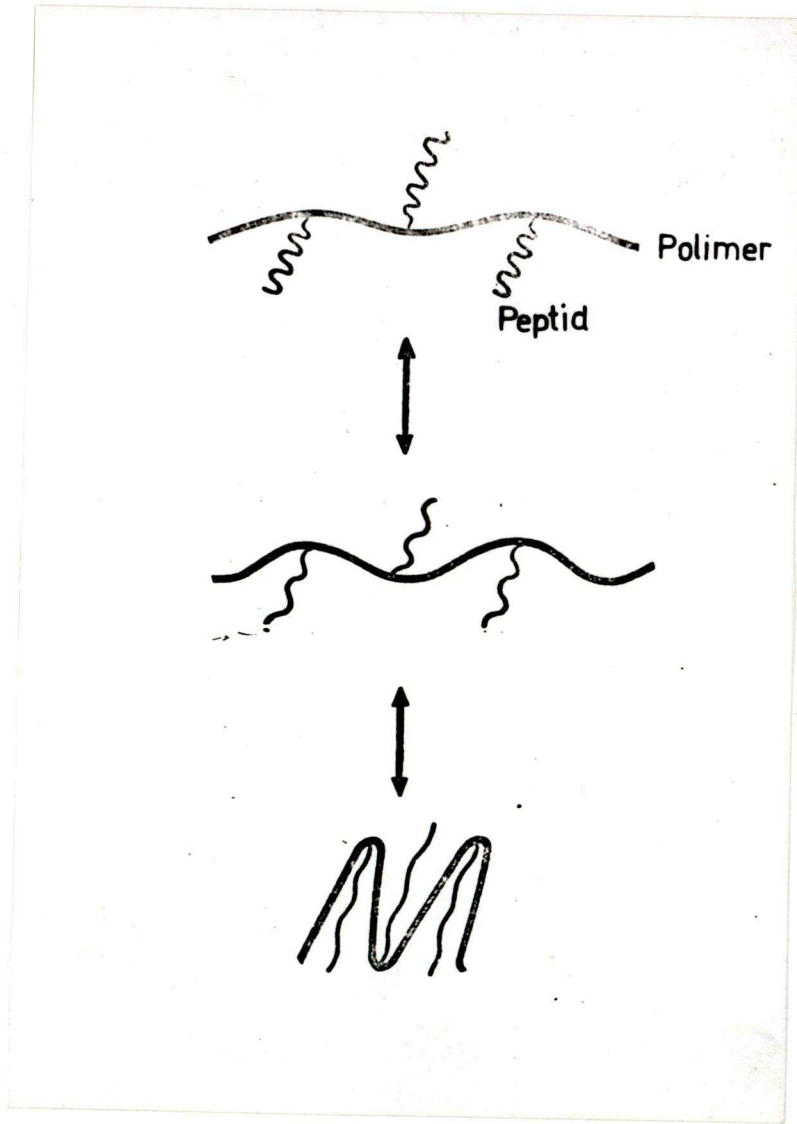
A szilárd fázisu peptidszintézis legnagyobb problémája a nenteljes kapcsolás, illetve annak következményei. Egy nonapeptid szintézisének pl. 95 %-os lépésenkénti átlagos kitermelést feltételezve, 66,3 % kívánt termék keletkezik, egy 190-es tagszámú protein esetében pedig még 99 %-os lépésenkénti kitermeléssel számolva is csupán 15 % végterméket nyerünk. A kapcsolásban részt nem vett peptidrészek az ún. törzsszekvenciák, amelyeknek elreagáltlan szabad aminocsoportjai a szintézis későbbi lépései során reakcióba léphetnek és téves szekvenciák keletkezését eredményezhetik.

A kapcsolás hatékonyságát befolyásoló tényezők:

az aminosavak oldalláncainak térigénye, a peptidlánc hossza és szekvenciája, a közegként alkalmazott oldószer polaritása és a polimer keresztkötésszáma. A különböző befolyásoló tényezők szerepét SHEPPARD / 32 / szemléletes képpel érzékelteti /2. ábra/: a peptid - polimer egy graft polimerként fogható fel, amely az apoláros polisztirol láncból és a lényegesen polárosabb peptidláncból tevődik össze. Ezek viselkedése a különböző polaritású oldószerekben ellentétes: poláros oldószerben a polisztirol lánc "összegyűrődik" hozzáférhetetlenné téve a peptidláncot, míg apoláros oldószerben a polimer duzzadt, de a peptid kollapszál. A szekvencia és az oldószer meghatározzák a konformációt, azaz az N-terminális aminosav hozzáférhetőségét; a peptidlánc hosszának, a polimer keresztkötésszámának és az acilező aminosav oldallánc térkitöltésének szerepe is egyértelmű e kép alapján.

1./ Blokkerek

A törzsszekvenciák elreagálatlan aminosoportjainak további reakcióit megakadályozandó, a szabad aminosoportokat acilezéssel "blokkolni" kell. Az acilező ágensnek, az un. blokkernak a legkevésbé megközelíthető helyekre kell eljutnia, ezért szterikus gátlástól mentesnek kell lennie; ugyanakkor igen re-



2. ábra

akcióképesnek kell lennie, de sem a peptidkötést, sem más funkciós csoportot nem szabad acileznie, továbbá rezisztensnek kell lennie a szintézis során.

MERRIFIELD / 57 / nagyfeleslegű ecetsavanhidriddel - trietilamin jelenlétében, dimetilformamidban - való acetilezést, STAAB / 86 / pedig acetilimidazoles blokkolást alkalmazott.

Az acilezett "törzspeptidek" ioncserés elválasztását teszi lehetővé az o-nitroftálsavanhidriddel / 102/ és a 3-szulfopropionsavval / 103/ történő acilezés esetén a szabad karboxil, ill. szulfo csoport.

2./ Analitikai kontroll-módszerek

A szintézismenet követéséhez kvantitatív és lehetőleg gyors módszerre van szükség, amellyel mind a védőcsoport eltávolítása után, mind a kapcsolás után szabadon maradó aminos csoportok mennyiségét meg lehet határozni.

A minden kapcsolás után alkalmazott aminosav analizissel az újonnan beépült aminosav mennyiségének viszonylag pontos meghatározása lehetséges. Hátránya a módszernek, hogy legalább 24 órát vesz igénybe, és hogy apolimeren történő hidrolízis számos mellékreakció forrása. Az utóbbi hátrány kiküszöbölésére

PLINKÉ és munkatársai / 71 / meghatározták az egyes aminosavak és származékaik károsodásának mértékét és ezt korrekciós faktorokkal vették figyelembe.

Titrimetriás aminosoport meghatározást alkalmazott MERRIFIELD / 57 / és DOHMAN / 18 / a kőszűbősítéskor keletkező trietilemin-hidroklorid mennyiségét mérve.

A leggyorsabb szemikvantitatív aminosoport meghatározási módszer KAISERÉ / 37 /, aki a polimer kis mintáját ninhidrinnel reagáltatta /5 perc, 100 °C/ és az oldat, valamint a polimer szineződéséből következtetett a kapcsolat mértékére.

ESKO / 21 / a szabadon maradó amin Schiff-bázisát képezte, amelyet benzilammal reagáltatva a keletkező termék koncentrációját extincióméréssel határozta meg.

Mindazok a védő- vagy aktiváló csoportok, amelyek kromofor csoportot tartalmaznak, ill. amelyek a reakció során /védőcsoport hasítás, vagy kapcsolat/ kromofor csoportot kildenek oldatba, lehetővé teszik a reakció követését kolorimetriás méréssel.

Felhasználásra kerültek olyan hatékony módszerek is a peptidszintézis kvantitatív követésére, mint az Edman-lebontás kombinálása tömegspektrometriás méréssel /10 / és a szcintillációs technikával /24 /

továbbá a jelzett védőcsoportok vagy blokkerek alkalmazása / 44 /.

F./ A kész peptid eltávolítás a
polimertől

1./ Hasítás acidolízissal

Az oldatfázisú szintéziselnél bevált karbo-
benzoni, ill. benzilészter eltávolító ágens, a jég-
ecetes hidrogénbromidot használták először a kész
peptid-polimer benzilészter kötésének hasítására
/ 4 /. A szerin és a teonin acetilézésének veszélye
miatt később trifluorecetsavat alkalmaztak ecetsav
helyett / 29 /.

A hidrogénbromid-trifluorecetsavas acidolízis
is mellékreakciókat okoz, amelyeknek kiküszöbölésére
számos módosítást vezettek be. A cisztein és a meti-
onin szulfonium származékának keletkezését metil-
szulfid vagy metionin adalékok alkalmazásával lehet
visszaszorítani. / 53 /.

Anizolt vagy rezoleinolt használnak gyökfogó-
ként / 41 /. trifluorecetsavas oldatukat pedig a
bróm előzetes eltávolítására a hidrogénbromidból -
a tirozin bromozásának elkerülésére / 2 /. A tript-
ofán károsodásának megelőzésére redukálószereket
alkalmaznak / 9 /.

A hidrogénbronides acidolízis kísérőjelensége egyes aszparaginsav- és glutaminsavésztereket tartalmazó szekvenciáknál a transzpeptidáció / 68 /, valamint a lehasított peptidok degradációja is.

SHAKAKIBARA / 77 / egyszerű és gyors hidrogénfluoridos benzilészter hasító módszerét LENARD és ROBINSON / 46 / adaptálták a peptid-polimer benzilészterének hasítására. A reakció 0 °C-on 30 perc alatt cseppfolyós hidrogénfluoridban teljesen lejátszódik. A módszer előnye, hogy egyidejűleg az oldallánc védőcsoportokat is eltávolítja, és hogy lényegesen kisebb a mellékreakciók veszélye. Gyűjtőfogó alkalmazása itt is szükséges.

2./ Hasítás bázikus körülmények között.

Ammonolízissel a peptid amidját nyerjük / 15 /. A reakció jó kitermeléssel játszódik le előzőleg 0 °C-on ammoniával telített metanol, etanol vagy alkoholdimetilformamid elegyben, szobahőn, 1-3 nap alatt.

Az alkoholos közegű ammonolízis valószínűleg a megfelelő alkilészter képződésén keresztül megy végbe. Bizonyíték erre, hogy azoknál a szekvenciáknál, ahol a C-terminális aminosav nagy térkitöltésű oldallánccal rendelkezik, csak a megfelelő peptidészter keletkezik.

Vizmentes hidrazinnal vagy hidrazinhidráttal
a további kapcsolásra alkalmas peptidhidrazidokat
nyerjük / 41 , 67 /. A hidrazinolízis károsítja a
triflouracetil-, ftalil-, formil-védőcsoportokat,
valamint az aszparagin és glutamin savamid csoport-
ját.

Az ammonolízisnél észlelt átésztereződés fel-
vetette a báziskatalizálta alkoholízis lehetőségét,
/ 5 /. A reakció a megfelelő alkoholban trietilamin,
N-metil-piperidin vagy diizopropilamin jelenlétében
50-90 %-os kitermeléssel játszódik le.

Az észterképzés elszappanosítása részint a race-
mizáció, részint az aszparagin és a glutamin észtere-
inél fellépő - már említett - transzpeptidáció veszé-
lye miatt nem terjedt el.

G./ A termék tisztítása és azonosítása

1./ Preparatív frakcionálási eljárások

A szilárd fázisú peptidszintézissel még a leg-
egyszerűbb esetekben sem nyerünk homogén, kémiailag
egységes terméket. A szilárd fázisról eltávolított
nyerstermék a kívánt végtermék tulsulya esetén is
rendkívül nehezen tisztítható. Ennek magyarázatát a
szennyezések természetében kell keresnünk: egy "mik-

roheterogén" peptidkeveréket nyerünk, amelyben a szennyezések egymástól és a kívánt terméktől alig különböznek, s ezek a különbségek folytonos átmenetet képeznek.

A szilárd fázison végzett gyors szintézist ezért legtöbbször soklépéses, fáradtságos frakcionálási eljárás követi. A hatékony elválasztási módszerek egész arzenálját vonultatták fel, hogy nagy tisztasági fokú - ha nem is kómiailag egységes - peptideket nyerjenek.

E módszereket az alkalmazási gyakoriság sorrendjében ismertetom.

Az ioncserés kromatográfia a leggyakrabban használt frakcionálási eljárás: a Dowex 1x2, a Dowex 50, a karboximetil-cellulóz, az Amberlite IRC-50, a DEAE-cellulóz és a különböző Sephadex ioncserélők alkalmazása elterjedt. A szabad savas csoportot tartalmazó blokkerek a törzsszekvenciák eltávolítását teszik lehetővé ioncserés kromatográfiával /102 /.

A géliszűrést sikerrel alkalmazzák a nem túl nagy tagszámú peptidok tisztítására. MANNING /51 / az oxitocin és analógiai esetében ismételt Sephadex-G-15-géliszűréssel izolálta a tiszta peptidet.

A hidroxipropilált Sephadex-típus a Sephadex

IH-2o egyaránt alkalmas nemvizes közegben végzett frakcionálásra és vizes közegű megoszlásos kromatográfiára.

Az ellenáramu megoszlás nem csupán hatékony frakcionálási módszer, hanem alkalmas a termék tisztasági fokának megállapítására is.

Kisebb tagszámu peptidek védett származékainak tisztítására nélkülözhetetlen a szerves oldószerekből történő átkristályosítás. Hatnál nagyobb tagszámu szabad peptidek átkristályosítására is találunk példát, szerves oldószerekből vagy vizes oldatokból.

Felhasználást nyertek, mint preparatív elválasztási módszerek a szilikagél adszorpciós kromatográfia, a magasfeszültségű elektroforézis, az izoelektromos fókuszálás, az affinitáskromatográfia stb.

2./ Azonosítási eljárások

Az aminosav analízis önmagában nem elegendő annak eldöntésére, hogy a termék tiszta e: egyrészt melléktermék jelenléte esetén is kaphatunk helyes analízis-eredményt másrészt a meghatározás érzékenysége nem elég nagy ahhoz, hogy 5 %-nál kisebb mennyiségű téves szekvenciát ki lehessen mutatni.

A homogenitás ellenőrzésére használják még az ellenáramu megoszlást, az ioncserés és megoszlásos kroma-

tográfát, a géliszűrést, a magasfeszültségű elektroforézist stb.

A szintetikus peptid biológiai aktivitásának értéke nem minden esetben túlrözi a termék homogenitásának mértékét, mivel a kisebb tagszámú vagy a téves szekvenciájú származékok is biológiai aktivitással rendelkezhetnek.

Kevésbé elterjedt, de igen hatásos eszköze az analízisnek a tömegspektrográfia és a gázkromatográfia, valamint a kettő kombinálása /97/.

O X I T O C I N S Z I N T É Z I S E K
S Z I L Á R D F Á Z I S O N

Csaknem egyidőben jelentek meg az oxitocin szilárd fázison végzett szintéziseiről tudósító publikációk /1968-69/. E szintézisek jól tükrözik a szilárd fázisu peptidszintézis addigi eredményeit, valamint fő törekvéseit: a polimer megválasztása, a védőcsoportkombinációk, a kapcsolási módszerek, a mellékreakciók elhárítása és más, "szilárd fázisu" probléma vizsgálata terén.

Ami a hordozó megválasztását illeti, MERRIFIELD / 59 / az ammonolizist megkönnyítendő a sztírol-2% divinilbenzol kopolimer nitrált származékát, INUKAI / 32 / az első aminosav bevitelét és a végső hasítás kinéletességét biztosító fenolpolimert, BEYERMANN / 6 / pedig hidroximetilált sztírol-2% divinilbenzol kopolimert használt oxitocin szintézisének. A többi esetben a jól bevált sztírol-2% divinilbenzol klórmetilazett származékát használták.

α -amino védőcsoportként szinte minden szerző a t-butiloxikarbonil-csoportot alkalmazta, csupán IVES / 34 / végezte szintézisét o-nitro-fenil-szulfenil-aminosavakkal, INUKAI / 32 / pedig

t-amiloxi-karbonil α -védést használt.

A cisztein szulfhidrilcsoportja védésénél még egyöntetűbb a kép: INUKAI / 32 / etilmarkapto csoportjától eltekintve valamennyi szintézisnél a nátriumos redukcióval eltávolítható S-benzil védelmet alkalmazták.

Az aszparagin és glutamin esetében a sav-amid-csoportot nem védték, míg a tirozint védelem nélkül és benziléter formában védetten is kapcsolták. Az N-terminális cisztein aminocsoportjánál általában az S-benzillel együtt eltávolítható karbobenzoxi-csoportot alkalmazták.

Az aszparagin és glutamin kivételével a kapcsolásokat diciklohexil-karbodiimiddal végezték, 3-4,5-szeres felesleg és általában 2 órás reakcióidő alkalmazásával. Az aszparagin és glutamin beépítése bizonyult az oxitocin szintézisek legnagyobb problémájának: a diciklohexil-karbodiimides kapcsolás nitril-képződéssel, ill. a savamid dehidratálásával járó mellékreakciója miatt / 74, 69 / a lényegesen lassabb p-nitrofenilészteres kapcsolást választották, amely gyakran még nagy feleslegek alkalmazásánál sem eredményezett teljes kapcsolást. BEYERMANN / 6 / az 1,2,4-triazol-katalizált aktivészteres kapcsolással szintetizált védett oxitocint.

A védett peptid hasítását ammonolizissal /metanol-ammoniával vagy metanol-dimetilformamid-ammoniával/, a benzil-csoport és az N-terminális amino-védőcsoport eltávolítását nátriumos redukcióval, az oxidatív gyűrűzárást káliumferricianiddal vagy levegőátvezetéssel pH 6-7-en végezték, csupán INUKAI / 32 / eljárása jelentett lényeges eltérést a szintézis utolsó lépéseinek "standard" műveleteitől: az általa alkalmazott etilmerkaptó tiolvédelen ugyanis lehetővé tette a diszulfidhid polimeren való kialakítását.

Szilárd fázison végzett oxitocsin szintéziseimmél alkalmaztam az ismerttetett szintézisek eredményeit, ugyanakkor az azóta eltelt évek újabb eredményeit is; kitértem olyan problémák vizsgálatára, amelyeket az idézett szerzők nem tárgyaltak részletesen, vagy amelyek újabban vetődtek fel. Kitűzött célom volt az oxitocin szintézisek gazdaságosságának vizsgálata is.

Cys - Tyr - Ile - Gln - Asn - Cys - Pro - Leu - Gly NH₂



Az oxitocin

3. ábra

1./ Szintézis o-nitro-fenil-szulfenil-amino-savakkal

Az első szintézist o-nitro-fenil-szulfenil-aminosavakkal / NPS-aminosavakkal / kísérleten meg elvégezni. E védőcsoportot több kisebb tagszámú peptid szilárd fázisú szintézisének alkalmazták / 41 , 64 / - elsősorban a fokozott savlabilitásból származó előnyök miatt. IVES / 34 / is NPS-aminosavak felhasználásával szintetizált jó aktivitású oxitocint, bár meglehetősen rossz kitermeléssel.

Előnyösnek látszott az NPS-aminosavak könnyű előállíthatósága és olcsósága is, ezért IVES / 34 / módszerét választottam az oxitocin előállítására. Elkészítettem a megfelelő NPS-aminosavakat, ill. diciklohexil-ammonium-sóikat; az NPS-aszparagin és glutamin aktivésztereinek előállítása igen nehézkes volt és teljesen tiszta formában nem tudtam izolálni a p-nitrofenilészter származékokat.

Az első három kapcsolat jó kitermeléssel / ~ 95 % / játszódott le, a nem teljesen egységes olajos aszparagin és glutamin p-nitrofenil származékaival azonban igen rossz hozamu kapcsolást lehetett elérni, a nagy felesleg és a hosszú reakcióidő alkalmazása ellenére. A beépült glutamin mennyisége már csak 25 %-a volt a C-terminális glicinének, ezért a

Szintézist nem volt érdemes tovább folytatni /a képződő téves szekvenciák elválasztása reménytelen feladat lett volna/.

Az NPS-csoport savlabilitása valóban enyhe eltávolítási körülmények alkalmazását tette lehetővé /5 % trifluoecetsav-diklórmetán, ill. 0,5 N sósav-cetsav-diklórmetán/, ugyanakkor a védőcsoport eltávolítás közben mellékreakciókkal kellett számolni /41 /.

Nehézkesse teszi az NPS-aminosavakkal való szintézist, hogy instabilitásuk miatt csak diciklohexilammonium-sóik formájában tárolhatók, amelyekből közvetlenül a kapcsolás előtt fel kell szabadítani azokat. Az irodalomban megadott felszabadítás jelentős anyagvesztéssel jár, ami kérdésessé teszi az NPS-védőcsoport használatának gazdaságosságát.

A szintézis során szerzett tapasztalataim:

a./ az NPS-védőcsoport felhasználásával jó ki-termeléssel csupán a C-terminális tetrapeptid szintetizálható,

b./ az NPS-aminosavakat célszerű közvetlenül a kapcsolás előtt előállítani, mert a diciklohexilammonium-sókból történő felszabadítás jelentős anyag-és idővesztéssel jár,

c./ az aszparagin és glutamin esetében nem ér-

denes NPS-védőcsoportot alkalmazni, mert az aktiv-
észterek nem, vagy csak körülményes eljárásokkal
nyerhetők tiszta formában.

A szintézis során a kapcsolás, ill. a védő-
csoport eltávolítás mértékét Dorman-titrálással és
aminosavanalízissel határoztam meg.

2./ Szintézis t-butiloxikarbonil-aminosavak-
kal, az aszparagin és glutamin sav-amid-
csoportjainak utólagos kiépítésével

Az oxitocin szintézisek legkényesebb problé-
mája az aszparagin és a glutamin beépítése a mole-
kulába. A dicitklohexil-karbodiimid-kondenzáció e
két aminosav esetében a nitrilképződés / 74 , 69 /
vossélya miatt nem alkalmazható. Általában aktiv-
észtoros kapcsolással kerülnek meg ezt a problémát.
Az irodalomban leírt másik lehetőség /23 , 62 / az
amid-csoportoknak az ω -észter származékokból tör-
tendő utólagos kialakítása, amelyet INUKAI / 32 / is
alkalmazott oxitocin szintézisének. E módszer elő-
nye, hogy az aszparagin és glutamin esetében is le-
hetővé teszi a hatékony dicitklohexil-karbodiimides
kapcsolás alkalmazását. Ezért megkíséreltem az ori-
tocint e módszerrel szintetizálni, bár számolnom
kellett az izoaszparaginil és izoglutaminil peptidek

képződésével is / 42 , 30 /. Várható volt azonban, hogy a transzpeptidáció a kedvezőtlen szterikus hatás következtében háttérbe szorul.

A szilárd fázisú szintéziseknél leggyakrabban használatos t-butiloxikarbonil /BOC-/- α -amino védelést alkalmaztam, az N-terminális cisztein kivételével, amelynek karbobenzoxi származékával végeztem el a kapcsolást. /A BOC-aminosavak stabil kristályos vegyületek, amelyeket SCHWABEL / 79 / módszerével jó kitermeléssel lehet preparálni./ A tirozin és cisztein benzilétereinek, az aszparagin- és glutaminsav ω -észtereinek BOC-védett származékait állítottam elő. Nem következett be az első szintézisnél tapasztalt peptidlánc-"letörés" az aszparagin- és glutaminsav származékok kapcsolása után.

A kész peptid hasítását a hordozóról ammonolízissel végeztem, amelynek során az aszparagin- és glutaminsav ω -észterei ammonolízisének is le kellett játszódni. A hasított nyers termék oldékonysági és kromatográfiás viselkedése alapján arra lehetett következtetni, hogy az csak részben ment végbe, ezért az ammonolízist megismételtam oldatfázisban. A nyert védett nonapeptid aminosavanalízise megfelelő /Gly 1,0, Leu 0,98, Pro 0,92, Asp 0,97, Glu 0,97, Cys /Bzl/ 1,84, Ileu 0,91, Tyr 0,75, NH₃ 2,70/ volt, vékonyrétegekroma-

tográfias, elektroforetikus vizsgálatokkal viszont az igen hasonló kémiai karakterű, de biológiailag inaktív izoaszparaginil és izoglutaminil szekvenciák túlsúlya volt kimutatható.

Igy - bár a jó termelések miatt rendkívül vonzó acilaszparagin-és glutamin-aktivészterek helyett diciklohexil-karbodiimides kapcsolást alkalmazni az aszparaginsav és glutaminsav ω -észterével - a bázisos miliűben lejátszódó transzpeptidáció miatt nem ajánlható a savamid csoportok utólagos kialakítása, mivel a keletkező izomerek rendkívül nehezen választatók szét.

A kapcsolat teljességének ellenőrzésére kipróbáltam a Kaiser-féle /37 / ninhidrin-tesztet. A mindössze 10 percet igénybevevő félkvantitatív teszt 0,5 mM/g kapacitás esetén 0 - 24 % szabad aminosav koncentráció határokon belül öt koncentrációtartomány között tesz különbséget a gyanta és a felüluszó színe alapján. Az aminosav-analízis és a Dorman-titrálás eredményeivel való összehasonlítás alapján megállapíthattam, hogy a módszer a kapcsolat mértékének gyors, közelítő meghatározására alkalmas.

3./ Szintézis BOC-aminosavakkal, az aszparagin és glutamin aktivésztereivel, blokker alkalmazásával.

A 3. szintézisnél az aszparagin és glutamin beépítésének újabb módját alkalmaztam; az aktivészteres kapcsolást. Modellkísérletek során kipróbáltam mind a hagyományos p-nitrofenilészteres, mind pedig az oldatfázisú szintéziseknél sikerrel alkalmazott újabb aktivészteres kapcsolásokat. A p-nitrofenilészterekkel hatszoros felesleg, 12 órás reakcióidő alkalmazásával sem tudtam teljes kapcsolást elérni. A reakció megismétlése után is csupán 80-85 %-os aszparagin és 70-75 %-os glutamin beépülést tapasztaltam. Hasonló eredményt kaptam KISFALUDY /43/ oldatfázisú szintéziseknél bevált diciklohexil-karbodiimid-pentafluorfenol komplexszel végzett kapcsolásánál. A komplex és a BOC-aminosav háromszoros feleslegét alkalmaztam, de a reakcióidőt 96 óráig növelve is, csak 70-75 %-os kitermeléssel ment a reakció. Ezzel szemben, ha a BOC-aszparagint, a diciklohexil-karbodiimidet és a pentafluorfenolt 1:1:3 molarányban alkalmaztam /a komplex előzetes elkészítése nélkül/, gyakorlatilag 100 %-ig végbenemt a reakció, viszont a kapcsolást ebben az esetben nitrilképződés kísérte.

Ezen előzetes modellkísérletek alapján a p-nitrofenilészteres kapcsolást választottam az aszparagin és glutamin kapcsolására. Az utóbbi származékok nenteljes kapcsolása ugyan törzsszekvenciák keletkezését eredményezi, amelyek elválasztása viszont megoldhatónak látszott a 3-nitroftálsavanhidrid blokker /99/ alkalmazása esetén ioncserés kromatográfiával.

A szintézist BOC-aminosavak, a Tyr és Cys-nél benzil oldalláncvédelem és /az aszparagin és glutamin kivételével/ diciklohexil-karbodiimides kapcsolás alkalmazásával végeztem el.

Azoknál a kapcsolási reakciónál, amelyeknél 5 %-nál több amino-csoport maradt elreagálatlan /glutamin, aszparagin, isoleucin, tirozin-benziléter/, a kapcsolat megismétlése után 3-nitroftálsavanhidrides blokkolást alkalmaztam.

A kapcsolási reakciók teljességét az említett Kaiser-féle teszteléssel, a Dorman-titrálással és aminosavanalízissel határoztam meg. Utóbbi módszer hátránya, hogy lassu és néhány aminosavra /Tyr, Cys/ a hidrolízis okozta bomlás /amelyet csak fokoz a polimer jelenléte/ következtében nem ad pontos értéket, viszont más aminosavak /Gly, Pro, Leu, Ilcu/ mennyiségének igen pontos meghatározását teszi lehetővé.

Problémát jelentett oxitocin szintéziseim során az oldallánc-védett aminosavak analizissel történő meghatározása is. A Tyr és Cys benziléter származékai ugyanis csak részben debenzileződnek a hidrolízis során és a változatlan Tyr/Bzl/ és Cys/Bzl/ a bázisos aminosavakkal oluálhatók. Az érzékeny aminosavak bomlása megakadályozható volt a szokásos sósv-dioxán, sósv-ecetsav helyett 3N merkaptotén-szulfonsav /ecetsavban/ alkalmazásával hidrolizisközegként /70 /.

Az oxitocin érintett aminosavszármazékainál meghatároztam a polimer által okozott spontán bomlásból, valamint a nem bomló oldallánc-védőcsoport miatti veszteséget és ezt korrekciós faktorokkal vettem figyelembe. Így lehetővé vált a szilárd fázison végzett oxitocin szintézis kapcsolásainak kvantitatív követése.

A BOC-Asn és BOC-Gln p-nitrofenilészterei, mint az a modellkísérletek alapján várható volt, ötszörös felesleget alkalmazva és megismételve a reakciót is csak 75-80 %-ban kapcsolt. A kész, védett nonapeptidet ammonolízissel hasítottam le a hordozóról. A korábbi szintéziseknél tapasztalt részleges hasítás miatt a 0 °C-on ammóniával telített metanol helyett, a metanol-dimetilformamid 1:1 ammóniás oldatát használtam, amellyel gyorsabb és teljesebb ammonolízist értem el. Feltételestem,

hogy a dimetilformamid reakciót elősegítő hatása elsősorban a polimert jól duzzasztó tulajdonságára vezethető vissza.

Az ammonolízissel nyert nyers, védett peptidamidot dimetilformamidból éterrel, illetve metanollal történő kicsapással tisztítottam.

A 3-nitroftálsavanhidrid blokkkeréként való alkalmazása lehetővé tette a termék ioncsérés kromatográfiával való további tisztítását. A Z-di-S-benzil oxitocin rendkívül rossz vízoldékonysága miatt az ioncserét dimetilformamidos közegben kellett végrehajtani. Erre a célra az Amberlyst-A26 makropórusos anioncserező gyanta látszott alkalmasnak. Sajnos az ioncsere az alkalmazott körülmények között olyan lassú volt, hogy nem tudtam elérni a blokkolt törzsszekvenciák teljes eltávolítását. Feltételezhető, hogy vízben vagy metanolban jobban oldódó peptid származékok esetében ezt a módszert sikerrel lehet alkalmazni.

A termék további tisztítása /kifűzés, kicsapás/ után a védőcsoportokat nátrium-folyékony ammóniás redukcióval távolítottam el.

A szabaddá vált thiol-csoportok között a diszulfid-híd oxidatív kialakítását pH=7-nél levegőbevezetéssel végeztem. Az oldat oxitocin aktivitása

70-80 egység/ml volt, ami alacsonyabb a klasszikus szintézissel nyerhetőnél. A jó aminosévanalízisi és kromatográfiásan egységes termék csökkent aktivitása a biológiailag hatástalan törzsszekvenciák jelenlétére utal. E szintézis tapasztalatai szerint ezzel az előállítási módszerrel kb. 100 egység/ml aktivitású oxitocin nyerhető jó kitermeléssel - tisztítási eljárások alkalmazása nélkül.

4./ Szintézis amid védőcsoport és pentafluorfenilészter alkalmazásával; a nitrilképződés vizsgálata.

Az aszparagin és glutamin diciklohexil-karbodiimidok kapcsolásainál fellépő, a 3. szintézis modellisérletei során a pentafluorfenilészter-diciklohexil-karbodiimidok kapcsolásoknál általában is tapasztalt nitrilképződést eddig csupán az oldatfázisú szintéziseknél vizsgálták. Felmerült a kérdés, vajon milyen mértékben játszódik le ez a mellékreakció a szilárd fázisú peptidszintézis körülményei között és hogy a peptidláncba már beépített aszparagin és glutamin savamid csoportja károsodik-e a szintézis későbbi diciklohexil-karbodiimidok kapcsolásainál.

Az oldatfázisú szintéziseknél a diciklohexil-karbodiimidok, illetve a tetractilpirofoszfites kap-

esolásoknál észlelték először az aszparagin és glutamin áhidratálódását / 74, 25, 78 /. Megállapították, hogy a reakció oldószerfüggő és hogy az aszparaginnál kedvezményezettebb. Néhány közepes tagsámu peptidnél kimutatták a dehidratált származék jelenlétét / 74, 25, 78 /, az acil aszparagin és glutamin aktivésztereinek előállításánál pedig a melléktermékként keletkező ω -nitril származékokat el is különítették / 16, 75/. A kész aktivésztereket diciklohexil-karbodiimiddel kezelve nem észlelték a nitrilképződést / 16 /, ami azt látszott bizonyítani, hogy a reakció a karboxilcsoport részvételével játszódik le. Utóbbi feltevést igazolták PAUL / 40 / és KASHALIKAR / 69 / reakciómechanizmust tisztázó, O^{18} -származékokkal végzett kísérletei. Eszerint a gyűrűs közti termék, az aminoizoszubcinimid keletkezésére két lehetőség van: a karboxilaktivált származékból diciklohexil-karbodiimid anion eliminációjával a savamid oxigén részvételével alakulhat ki a gyűrű, vagy a karboxilát anionnak a karboxamid karboniljával való intermolekuláris kölcsönhatása révén - s ez esetben a kondenzáló ágens a savamid oxigénjénél "aktivál". Az eredmény mindkét esetben az aminoizoszubcinimid származék, amely bázikus hatásra felnyílik és a meg-

felelő ω -nitril karbonsavat szolgáltatja. Az említett kísérletek / 40 , 69 / a gyűrűzáródás karboxilaktivált származékon keresztül történő lejátszódásának tulsúlyát igazolták. A reakciómechanizmus tisztázásával egyuttal bizonyítást nyert, hogy a peptidláncba már beépült aszparagin és glutamin dehidratálódása nem játszódhat le - legalábbis a diciklohexil-karbodiimides kapcsolásoknál.

A szilárd fázisu peptidszintézisnél érvényesnek tekintették az oldatfázisu szintézisek fenti kapcsolatait, ezért az aszparagin és glutamin p-nitrofenilészter származékaival végezték a kapcsolásokat.

A nitrilképződés oldatfázisu kísérleti eredményei azonban nem terjeszthetők ki a szilárd fázison végzett szintézisekre - célszerűnek tartottam ezért - elsősorban az aszparaginnál - a dehidratáció jelenségének vizsgálatát a szilárd fázison végzett diciklohexil-karbodiimides kapcsolásoknál. Ráadásul a nitrilképződés általánosan alkalmazott elkerülési módja, a p-nitrofenilészteres kapcsolat rossz hozama miatt nem vált be a szilárd fázison, ezért, ha a diciklohexil-karbodiimides kapcsolat csupán néhány %-os dehidratációval jár, alkalmazása preferált, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy lehetőség van az

-nitril \longrightarrow savanid utólagos hidrolizisre / 10^6 /.

Modellvegyületként a BOC-Asn-PheOMe dipeptid-származékot választottam, amelyet mind a klasszikus, mind a szilárd fázisu módszerrel szintetizáltam. Hogy az összehasonlítást elvégezhessem /a dehidratált és nem-dehidratált származék között/, azonos reakciókörülményeket alkalmaztam és előállítottam a BOC- β -CN-Ala-Phe-OMe származékot is.

A dehidratált termék kimutatását és arányának meghatározását az infravörös spektrumból véltem megoldhatónak. Míg a BOC- β -CN-Ala spektruma 2290 cm^{-1} -nél jól kiértékelhető csucs található, addig a BOC- β -CN-Ala-PheOMe spektrumán csupán gyenge elnyelés észlelhető ebben a nitril-tartományban.

A szilárd fázison háromszoros feleslegű BOC-Asn és DCC alkalmazásával szintetizált dipeptid spektruma nem mutatott ki β -CN-Ala beépülést. Az első kapcsolással mindössze 30 %-os és a megismételt kapcsolással is csupán 68 %-os beépülést sikerült elérni. Ugyanakkor a BOC- β -Ala-val végzett első kapcsolat 76 % hozammal ment végbe. /A kapcsolat mértékét aminosav analízissel határoztam meg./

Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a nitrilképződés valóban lejátszódik, de a de-

hidratált termék kapcsolási reakciója nem preferált - a változatlan BOC-Asn-éhoz képest mindenesetre elenyésző. A kész, a polimerről eltávolított termék és a kapcsolási reakció anyalugjából izolált anyag infravörös spektrumának felvételével ez a feltevés kísérleti bizonyítást nyert: míg a dipeptid-származéknál nem jelent meg elnyelési sáv az említett tartományban, addig a melléktermék spektrumában a 2290 cm^{-1} -nél jelentkező sáv tekintélyes mennyiségű BOC- β -CN-Ala jelenlétére utalt. A dehidratált dipeptid-származék már említett gyenge abszorpciója a nitriltartományban sajnos nem tette lehetővé a BOC- β -CN-Ala-beépülés kvantitatív meghatározását.

A nitrilképződéssel kapcsolatos fenti modellkísérletek alapján nem lehet végérvényes választ adni arra a kérdésre, hogy érdemes-e a karbodiimides kapcsolást alkalmazni az Asn- és Gln-származékok esetében. Ehhez egyrészt ki kell dolgozni a dehidratált termékek kvantitatív meghatározására alkalmas módszert, másrészt felül kell vizsgálni a peptidok nitril-származékainak savamid-származékokká történő hidrolízisnek lehetőségét. Az erre irányuló kísérletek folyamatban vannak.

Végül felvetődött a karbodiimides kapcsolásra szintén lehetőséget nyújtó savamid-védett Asn- és



Gln-származékok alkalmazásának lehetősége is. Az ω -amidcsoportot korábban az ω -karboxilok védőcsoportjaként használták, de néhány mellékreakció /ciklizáció, transzpeptidáció és a nitrilképződés/ arra a felismerésre vezetett, hogy az amidcsoport reakciókészsége miatt maga is védelemre szorul.

A 4. oxitocin szintéziséből az AKABORI / 1 / által alkalmazott xantil védőcsoportot használtam az Asn és Gln amidcsoportjainak védelmére. A xantil-származékok könnyen előállíthatók jégecet/xantihidrol alkalmazásával 48 óra alatt, szobahőn - hasításuk pedig jégecetes hidrogénbromiddal végezhető. Az előzetes kísérletek szerint a xantil védőcsoport a BOC-Asn-ről kismértékben, a BOC-Gln-ről egyáltalán nem hasad a BOC-eltávolítás körülményei között.

A szintézist Cys-nél S-benzil-, a Tyr-nál pedig O-BOC-védett származékokkal végeztem és az N-terminális BOC-Cys/BeI/ kapcsolásától eltekintve minden esetben DCC-kondenzációt alkalmaztam.

A BOC-Asn és BOC-Gln xantil származékai ismételt kapcsolat után sem adtak kvantitatív reakciót, amit az amid védőcsoport nagy térkitöltésének tulajdonítottam. /Az így elért kapcsolási hozam jobb, mint ami a p-nitrofenilészterekkel elérhető volt./

Ismételt kapcsolást kellett alkalmazni a BOC-Ileu, illetve a BOC-Tyr/BOC/ reakciójánál is. A kétszeres kapcsolás után még változatlanul maradt szabad aminoszoportokat ecetsavanhidriddel acetileztem dimetilformamidban, ekvivalens trietilamint alkalmazva.

Mivel a Tyr hidroxilcsoportja a szokásos BOC-védőcsoport eltávolítás után szabadon maradt, az N-terminális /Z, S-Bzl-védett/ Cys pentafluorfenilészterével végeztem a kapcsolást - jó eredménnyel. A pentafluorfenilészteres kapcsolás a 3. szintézis modellkísérletei során alkalmazott aktívészteres kapcsolásokkal összehasonlítva is a legjobb eredményt szolgáltatotta. Ezért lehetséges, hogy Asn és Glu esetében is a pentafluorfenilészteres kapcsolás a legcélravezetőbb. Ennek eldöntésében az aktívészterek preparálásánál fellépő nitrilképződés mértéke a mérvadó.

Az elkészült Z-diBzl-védett nonapeptidet dimetilformamid-metanol elegyben ammóniával hasítottam le. A nyert nonapeptidamid-származékot dimetilformamid-éter, ill. dimetilformamid-víz eleggyel, kicsapással tisztítottam. A nyerstermék további tisztítását sephadex LH-20 oszlopon dimetilformamid-metanol eleggyel történő gradiens elucióval végeztem.

Kromatográfiásan egységes, éles olvadáspontu, jó elemi analizisű, megfelelő aminosav analizisű anyagot nyertem.

5./ Szintézis benzilmerkaptó tiol-védőcsoport alkalmazásával, a diszulfidhid szilárd fázison történő kialakításával.

Az 5. szintézisnél célul tűztem ki olyan tiol-védőcsoport alkalmazását, amely lehetővé teszi a diszulfidhid polimeren történő kialakítását. A cisz-tintartalmu peptidok szintézisének általában használt benzil védőcsoport egyedüli eltávolítási módja, a nátrium/ammóniás redukció gyakran a peptidkötés hasadását eredményezi és az oldatfázisban végrehajtott gyűrűzárásnál elkerülhetetlen az internolekuláris diszulfidképződés. Bár az oldatfázisú szintéziseknél számos, a benzil-csoportnál enyhébb körülmények közt használható tiol-védőcsoport nyert alkalmazást, a szilárd fázisú szintéziseknél lényeges stabilitás és a hordozón való eltávolíthatóság követelményeit csupán az INUKAI / 33 / által javasolt alkilmerkaptó típusú védőcsoport látszott kielégíteni.

A diszulfidhid gyantán történő kialakítása, amellet, hogy az intramolekuláris reakció lehetőségét kiküszöböli, egyuttal a nyers termék tisztításának egyszerűsödését is biztosítani látszott.

INUKAI /33 / S-etilmerkaptó-ciszteín alkalmazásával végrehajtott szintézise után WEBER és HATTER / 98 / több alkil-/metil, etil, propil, i-propil, t-butil, benzil/-merkaptó ciszteín származékot szintetizált, hogy megállapítsa ezen származékok stabilitását a peptidszintézis körülményei között. Megállapították, hogy valamennyi általuk szintetizált alkil-merkaptó származék stabil a Merrifield-szintézis körülményei között is, hogy az alkil-sorban a + induktív effektus növekedésével csökken a diszulfidcserére való hajlam, vagyis nő a stabilitás.

WÜNSCH /104 / a terc.-butil-merkaptó csoportot használja tiolvédőcsoportként, amelynél a jelentős mértékű + induktív effektuson kívül a terc.-butil csoport nagy térkitöltése is csökkenti mind a diszulfid oxidációjának veszélyét, mind a diszproporcionálódás valószínűségét.

A védőcsoport megválasztásán azonban figyelemmel kell lenni arra, hogy a stabilitás ne legyen olyan mértékű, amely már túl nehéz eltávolíthatóságot eredményez - s ez a szempont különösen figyelembe veendő a szilárd fázison végzett szintéziseknél. Ezen megfontolások alapján a viszonylag nagy térkitöltésű, de a terc.-butiléhoz képest csökkent + induktív ef-

fektusu benzil-merkaptó csoportot választottam tiol védőcsoportként.

Szintézisénel első lépésben dibenzildiszulfidot állítottam elő, amelyet perbenzoéssavval oxidálva a szulfoxidot /benziltiolszulfinsav-benzilészter/ nyertem. A bomlékony szulfinsavészter cisztein feleslegével benzil-merkaptó-cisztein keletkezése közben reagál. A tiolvédett cisztein BOC-származékát, ill. DCMA-sóját az INUKAI /32 / által leírt módon /45 °C, TEA, BOC-azid, víz-dioxán/ állítottam elő.

A benzil-merkaptó védőcsoport stabilitásáról előkísérletek során győződtem meg, a szilárd fázisú szintézis körülményeit alkalmazva. Vizsgáltam a védőcsoport hasíthatóságát is: míg tiofenollal és merkaptóctanollal 12 óra alatt 45 °C-on sem volt teljes a védőcsoporteltávolítás, addig vízmentes tioglikolsavval 45 °C-on 12 óra alatt kvantitatív hasítás volt elérhető.

A BOC-benzilmerkaptó-ciszteín, az aszparagin és glutamin p-nitrofenilészterei, N,O-bis-BOC-tirozin alkalmazásával szintetizáltam a BOC-dibenzilmerkaptó-oxitocin-polimert. A dicitklohexil-karbodiimides kapcsolásoknál háromszoros feleslegben alkalmaztam a BOC-aminosavakat és a DCC-t; az aminosav analízis és a Dorman-titrálás eredményei 90-95

%-os kapcsolást mutattak ki valamennyi DCC-kondenzációnál, ezért nem volt szükség a kapcsolások megismétlésére. Az aszparagin és glutamin aktivésztereinek ötszörös feleslegével végezve a kapcsolásokat sem sikerült teljes reakciót elérni, ezért ugyanilyen felesleget alkalmazva megismételtem a reakciókat. A tirozinnál az ezuttal is alkalmazott O-BOC-védelem az N-terminális cisztein aktivészterével történő kapcsolását tette szükségessé; a 4. szintézisnél jól bevált pentafluorfenilészteres kapcsolást használtam a BOC-benzilmerkapto-cisztein beépítésére - ezuttal is jó eredménnyel. A korábban ismertetett módon ecetsavanhidriddel acetyltem az elreagálatlan aminos csoportokat.

A szintetizált BOC-dibenzilmerkapto-védett nonapeptid-polimer kisebb hányadából ammoxidálissal előállítottam a védett peptidamidot, hogy a védőcsoporteltávolítást és a gyűrűzárást oldatfázisban is tanulmányozhassam. Ezen vizsgálatok szükségességét indokolja, hogy a BOC-benzilmerkapto-ciszteinre kidolgozott védőcsoport hasítási eljárás nem feltétlenül érvényes a peptidláncba beépített származékokra /még kevésbé a hordozón végzendő védőcsoport hasításra/, és hogy a szilárd fázison nem követhető a hasítás folyamata.

A védett nonapeptiddel végzett kísérletek a várakozásnak megfelelően azt bizonyították, hogy a benzilmerkapto csoport hasítása drasztikusabb eljárást igényel a peptidláncba beépített származékok esetén: a merkaptoetanol és a tiofenol nagy foleslege 45-50 °C-on alig kimutatható mértékben távolította el a védőcsoportot, a vízmentes tioglikolsav pedig csupán 16 óra alatt adott teljes reakciót.

Jogos a feltételezés, hogy a hordozón a védőcsoporteltávolítás még nehezebben valósítható meg. A védett nonapeptid-polimert ezért 24 órán át 40 ekvivalens tioglikolsavval reagáltattam 45 °C-on, kevertetés közben. A diszulfidhid oxidatív kialakítását pH 6,5-ön, dinetilformamid-víz elegyben, széndioxid-mentes levegő átbuborékolatásával végeztem. A kész N-védett peptid hasítását a hordozóról ezután a szokásos módon végzett ammonolízissel hajtottam végre.

A nyert nyersternéket szilikagél oszlopon frakcionáltam n-butanol-ecetsav-víz 8:1:1 oldószer-elegyet alkalmazva elválószerként. Négy frakciót kaptam, amelyek mindegyike tartalmazott tirozint.

Kromatográfiás azonosítással igazoltam, hogy az első frakció BOC-dibenzilmerkapto-védett oxitocin, a védőcsoporteltávolítás tehát nem volt tel-

jes, legalább 20 %-ban változatlanul maradt a benzilmerkaptó csoport. Ezért ezt a frakciót ismételtén tioglikolsavval kezeltem, majd igen hig vizes oldatban pH 6,5-ön levegő átbuborékolatásával oxidáltam. A liofilizált nyersternéket Sephadex G-15 oszlopon, majd karboximetil-cellulóz oszlopon tisztítottam. Kromatográfiásan egységes anyagot kaptam, amelyet az ammóniumacetáttól újabb Sephadex G-15 oszlopon történő elválasztással /0,1 mól ecetsav/ tisztítottam meg.

A 3. és 4. frakciók aminosav analízise, kromatográfiás viselkedése azt mutatta, hogy főleg szennyezéseket /acetoilezett törzsszekvenciákat/ tartalmaznak, ezért nem foglalkoztam további tisztításukkal.

A 2. frakció jórészt BOC-okitocin volt: a trifluorecetsavval történő BOC-eltávolítás után nyert anyag a gyári standard készítménnyel vékonyrétegekromatográfiásan azonosnak bizonyult. A nyersternéket első lépésben Sephadex G-15 oszlopon tisztítottam MANNING /51/ módszerével. Sajnos a szennyezésektől az anyag nem tisztult meg, így megítélésen szerint Manning módszere elsősorban az okitocin és a különböző nagyobb mólsúlyú oligonerek elválasztására alkalmas.

A neutrális szennyezések, a blokkolt kisebb tagszámú törzesszekvenciák elválasztását IRC-50 /H⁺ ciklus/ oszlopon kísérleten meg elvégezni hig, növekvő koncentrációja ecetsavoldattal történő eluálással. A tisztításnak ez a módja - elsősorban oldékonysági problémák miatt - nem vált be.

Az 5. oxitocin szintézisről összefoglalóan megállapítható, hogy nem oldható meg tökéletesen a benzilmerkaptó védőcsoport szilárd fázison történő hasítása, következésképp a disszulfidhid kialakítása sem. Bár e módszerrel nyerhető tiszta oxitocin, de a hosszadalmas tisztítási eljárások miatt ez a szintézis nem ajánlható. A Sephadex G-15 és a karboximetil-cellulóz oszlopkromatográfia viszont jól alkalmazható az oxitocin tisztítására.

K I S É R L E T I R É S Z

A kísérleti részben ismertetem az oxitocin szilárd fázisu szintéziseivel kapcsolatos kísérleti munkát, különös tekintettel azokra a preparátumokra, amelyek az irodalomban nem szerepelnek.

A szilárd fázisu szintéziseket az un. Merri-field-edényekben /59 / végeztem, az oldószereket a speciális előírásoknak megfelelően tisztítottam.

/87 /.

A termékek aminosavösszetételét HD 1200-E típusu automatikus aminosavanalizátorral, a forgatóképeséget Zeiss-polariméterrel, az olvadáspontot Koffler-blokkon határoztam meg. Az elemi analizisek mikroanalizissel készültek.

A Kiesegel-G adszobansen végzett vékonyréteg kromatográfiánál a ninhidrin 0,2 %-os acetonos oldatát, klór-tolidin reagenst és jódgőzöket használtam a kromatogramok előhívására. A vékonyréteg kromatográfiánál használt futtatószerrek:

- | | |
|----------------------------|--------------|
| 1./ etilacetát-piridin-víz | /60:20:6:11/ |
| 2./ kloroform-aceton | /9:1/ |
| 3./ kloroform-metanol | /9:1/ |
| 4./ n-butanol-ecetsav-víz | /4:1:1/ |

5./ n-butanol-ecetsav-viz	/8:1:1/
6./ benzol-ecetsav	/7:1/
7./ kloroform-metanol-ecetsav	/85:10:5/
8./ aceton-ecetsav	/95:2/

A peptidok tisztaságának ellenőrzésére és az azonosításra - a vékonyréteg kromatográfia mellett - közép feszültségű elektroforízist is alkalmaztam.

A termékek oszlopkromatográfiás frakcionálásánál az eluátum abszorpcióját $\lambda = 280$ nm-nél/ UVICORD /LKB/ UV-fotométerrel mértem.

Az IR-spektrumok UNICAM SP 200 spektrofotométerrel készültek.

1. NPS-Gln-Asn-Cys/Be1/-Pro-Leu-Gly-P

/1. szintézis/

NPS-glicint a Merrifield által leírt módon észtereszítjük a 2 % divinilbenzol tartalma polisztirol klórmetilezett származékával. A polimerhez kötött glicin mennyiségét aminosav analízissel határozzuk meg: 0,70-0,80 mM glicin/g polimer.

Az /1./ védett hexapeptid előállításánál a következő szintézisciklust alkalmazzuk:

Mossuk a polimert /7 g, ~ 5 mM/ diklórmetánal, rázzuk 5 percig 5 % trifluorecetsav-diklórmetánal, majd 15 percig 0,5 N jégecetes sósav - di-

klórmetánnal. Háromszor 5 perces mosás következik diklórmetánnal, majd 10 perces ekvilibrálás a megfelelő NPS-aminosav /15 mM: 3x-os felesleg/ diklórmetános oldatával. 15 ml 1 mólos diklórmetános DCC-oldat hozzáadása után két óráig rázatjuk rázógépen. /Az Asn és Gln p-nitrofenilésztereinek 6x-os feleslegét DMF-ban oldva reagáltatjuk/. A melléktermékeket és a feles reakciópartnereket 3-szoros diklórmetánnal, 3-szoros dimetilformamiddal és végül 3-szoros diklórmetánnal végzett mosással távolítjuk el. A kapcsolások mértékét Dorman-titrálással és aminosévanalizissal határozzuk meg.

Aminosav analízis: Gly 1,0, Pro 0,95, Leu 0,92
Cys/Bzl/ 0,85, Asn 0,58,
Gln 0,25.

2. Z-Cys/Bzl/-Tyr/Bzl/-Ileu-Glu/OMe/-
-Asp/OMe/-Cys/Bzl/-Pro-Leu-Gly-P
/2. szintézis/

A szintézist az /1./-nél leírt ciklus szerint végezzük. A BOC-Gly-P glicintartalma 0,55 mM glicin/g polimer /8 g. ~ 4,5 mM/.

Eltérés az /1./-nél ismertetett ciklustól:
a BOC-védőcsoportokat 30 perces 25 %-os trifluor-
ecetsav-diklórmetános kezeléssel távolítjuk el.
A kapcsolásokat rendre a következő aminosavszárma-
zékokkal hajtjuk végre: BOC-Leu, BOC-Pro, BOC-
-Cys/Bzl/, BOC-Asp/OMe/, BOC-Glu/OMe/, BOC-Ileu,
BOC-Tyr/Bzl/, Z-Cys/Bzl/. A BOC-Ileu-val és a BOC-
-Tyr/Bzl/-rel a kapcsolást megismételjük.

A Dorman-titrálás és az aminosavanalízis a-
lapján az egyes aminosavak beépülési aránya:
Gly 1,0, Leu 0,97-0,98, Pro 0,95-0,96, Cys 0,95,
Asp 0,90-0,91, Glu 0,85-0,87, Ileu 0,75-0,80,
Tyr 0,75-0,78, Cys 0,65-0,70.

3. Z-Cys/Bzl/-Tyr/Bzl/-Glu-Asn-Cys/Bzl/-
-Pro-Leu-Gly-NH₂

A /2./ védett peptid-polimert exsiccátor-
ban szárítjuk, majd 50 ml dimetilformamidben duz-
asztjuk és 50 ml 0°C-on ammóniával telített meta-
nolt adunk hozzá. A szuszpenzióhoz 2 óráig át, 0 °C-
on ammóniát vezetünk, majd éjszakán át állni hagy-
juk. A polimert szűrjük, dimetilformamiddal több-
szőr mossuk, majd az ammonolízist megismételjük.
Az egyesített dimetilformamid-metanol szűrleteket
bepároljuk, a nyert olajat dimetilformamidben old-

juk és a védett nonapeptidet éterrel kicsapjuk. A kromatográfiásan nem egységes /3,2 g, 55 %-a kiindulási glicinre vonatkoztatva/ nyerszerumét 15 ml dimetilformamidban oldjuk és 500 ml metanollal kicsapva tisztítjuk. E tisztítási művelet megismétlése után 2,0 g /33 %/, 215-220 °C olvadáspontu anyagot nyerünk, amelynek aminosav analízise: Gly 1,0, Leu 0,98, Pro 0,92, Cys 1,84, Asp 0,97, Glu 0,97, Ileu 0,82, Tyr 0,75.

Elemi analízis: $C_{65}H_{88}O_{15}N_{12}S_2$ /1341,51/

	C	H	N
számított	58,30	6,70	12,53
talált	57,72	6,53	12,70

$[\alpha]_D^{22} = -43,5 /c = 1, MF/$

4. Z-Cys/Bzl-Tyr/Bzl/-Ileu-Gln-Asn-Cys/Bzl/-
-Pro-Leu-Gly-P /3. szintézis/

A szintézist lényegében a /2./-nél leírtak szerint végessük, a következő eltérésekkel: a BOC-Asn és a BOC-Glu kapcsolását p-nitrofenilészter-származékokat - 12 óra alatt - 6 x-os feleslegben alkalmazva végessük és a reakciót mindkét esetben megismétljük. A Dornan-titrálás és az aminosavana-

lízis eredménye: Gly 1,0, Leu 0,95-0,96, Pro 0,95-0,96, Cys 0,92-0,94, Asp 0,80-0,85, Glu 0,75-0,80, Ileu 0,70-0,75, Tyr 0,65-0,70, Cys 0,65-0,70.

A BOC-Asn, a BOC-Gln, a BOC-Ileu és a BOC-Tyr/BeI/ kapcsolása után az elreagálatlan aminosoportokat 3-nitroftálsavanhidriddel acilezzük, a következő módon: a Dorman-titrálás után a polimert dimetilformamiddal mossuk, majd 20 ml piridinben oldott ekvivalens mennyiségű /5 mM/ 3-nitroftálsavanhidriddel reagáltatjuk. A blokkoló ágens feleslegét trietilamin-dimetilformamidos oldatával végzett mosással távolítjuk el.

5. Cys-Tyr-Ileu-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

A /4./ védett nonapeptid-polimert a /3/-nál ismertetett módon ammonolízisnek vetjük alá. A nyert védett peptidamidot kicsapással tisztítjuk: 3,9 g /75 %/, kromatográfiásan csaknem egységes teracéket nyerünk, amelyet 100 ml dimetilformamidban oldunk és 50 ml acetátciklusu, dimetilformamidban duzzasztott Amerlyst-A 26 makropórusos anionese-relővel keverünk 1 napig. Szűrés után a szűrletet bepároljuk - éteres kicsapás, majd alkohol kifűzés után

kromatográfiásan csalmem egységes, 6les olvadáspontu /229-230 °C/ terméket nyertünk.

Elemi analízis: $C_{65}H_{88}O_{15}N_{12}S_2$ /1341,51/

	C	H	N
számított	58,30	6,70	12,53
talált	57,84	7,00	12,40

$$[\alpha]_D^{22} = -51,5 /c = 0,6, DMF/$$

Kitermelés 1,0 g /18 %/

Aminosav analízis: Gly 1,00, Leu 0,96, Pro 0,95

Cys 1,75, Asp 0,92, Glu 0,87

Ileu 0,92, Tyr 0,65

A védett nonapeptid 0,5 g-ját nátrium-csoep-folyós ammóniával kezeljük a védőcsoportok eltávolítása céljából, majd a szabad nonapeptidet pH 7-nél 2 órási levegőbevezetéssel oxidáljuk. Az oldat oxitocin aktivitása 70,8 egység/ml.

6. A kapcsolások mértékének meghatározása

a./ Dorman-titrálással

A peptidkapcsolás után mossuk a polinert 3-szor diklórmétánnal, 3-szor diklórmétán-alkohollal, 3-szor alkohollal, 3-szor dimetilformamiddal, majd ismét 3-szor diklórmétánnal. Ezután a Dorman-eljárást alkalmazzuk, azzal az eltéréssel, hogy piri-

din-hidroklorid helyett piridin-hidrobromid 0,3 mó-
los diklórmetános oldatával ekvilibrálunk /25 ml,
10 perc/. A reagens feleslegét 4-szer 30 ml diklór-
metánnal /5 perc/ 3-szor alkohollal /5 perc/ és 3-
szor dimetilformamiddal történő mosással távolítjuk
el.

A szabad aminos csoportokkal ekvivalens hidro-
bromidot 25 ml 10 %-os trietilamin-diklórmetánnal
/10 perc/ és 4-szer 30 ml dimetilformamiddal /5 perc/
végzett reakció, ill. mosás egyesített szűrleteiből
kénsavas savanyítás után potenciometrikus titrálás-
sal határozzuk meg.

b./ Aminosav analizissel

A peptidkapcsolás után a 10-20 mg oldószermed-
ves polimermintát veszünk a Merrifield-edényből. A
mintát üvegszűrőn alaposan mossuk a melléktermékek
és feles reagensok eltávolítására, szárítjuk majd
bombacsőbe /Pyrex, 80x12 mm/ tesszük és 1 ml 1 N
merkaptoctánszulfonsav 50 %-os ecetsavas oldatát ad-
juk hozzá. Az oldatot -70°C -ra hűtjük és a bomba-
csövet vákuumban /0,05 Hgmm/ leforrasztjuk. 22 órás
10 $^{\circ}\text{C}$ -on végzett hidrolízis után a csövet felnyit-
juk, a polimert szűrővel elkülönítjük, mossuk 1 ml
nátriumcitrát pufferral /pH 5,28/ és a 2 ml-nyi
szűrlet 0,2 ml-éből végezzük az analizist.

7. BOC- β -CN-Ala

5 mM /1,16 g/ BOC-Asn-t 10 ml piridinben oldunk és szobahőn, keverés közben 6,25 mM /1,28 g/ DCC piridines /8 ml/ oldatát csepegtetjük hozzá 30 perc alatt. 3 órányi további keverés után a kivált diciklohexilkarbamidot szűrjük és a szűrletet bepároljuk. A nyert olajat 12 ml 5 %-os nátriumhidrogénkarbonátban oldjuk, az oldatot szűrjük és pH 3-ra állítjuk be 4 N sósavval. A felszabaduló olajat 45 ml éterrel extraháljuk, az éteres extraktumot mosuk 3-szor vízzel és magnéziumsulfáton szárítjuk. Az éteres oldatot részlegesen elpároljuk, kevés petroléter hozzáadása után a kristályos BOC- β -CN-Ala kiválik. Az átkristályosítást megismételve 0,83 g /78 %/ kromatográfiásan egységes $R_F^6 = 0,6$, $R_F^4 = 0,82$ / anyagot nyerünk. Op: 90 - 92 °C

Elemi analízis: $C_9H_{14}O_4N_2$ /214,23/

	C	H
számított	50.46	50.22
talált	6,58	6,59

8. BOC-Asn-PheOMe

a./ szilárd fázison

3,5 g /2,275 mM/ BOC-Phe-P_r61 a BOC-eltávolí-

tást, majd a BOC-Asn és DCC 3-szoros feleslegével a kapcsolást az /1/, ill /2/-nél leírtak szerint végessük. A kapcsolást - aminosav analízis elvégzése után - megismételjük. A dipeptid metilészterét trietilamin /50 ekvivalens/-metanoles alkoholizissal hasítjuk a hordozóról. Szűrés után a szűrletet bepároljuk, az olajat etilacetátban vesszük fel és citromsavoldattal majd nátriumhidrogénkarbonát oldattal mossuk, szárítjuk. Átkristályosítás etilacetát-petroléterből.

Op.: 197-199 °C, kromatográfiásan egységes: $R_F^2 = 0,25$

Aminosav analízis /BOC-Asn-Phe-P/

1. kapcsolás után Phe 1,0 Asp 0,3

2. kapcsolás után Phe 1,0 Asp 0,68

b./ oldatfázisban

0,52 g /2,24 mM/ BOC-Asn -t oldunk 5 ml etilacetátban, majd a -15 °C-ra lehűtött oldathoz keverés közben 0,23 ml /2,24 mM/ N-metil-morfolint és 0,22 ml /2,24 mM/ klórszénsav-etilésztert csepegtetünk. 3 perc után a vegyes anhidridhez adagoljuk a PheOMe etilacetátos oldatát /előzetes felszabadítás után/ 3 óráig -5 °C-on és 1 óráig szobahőn kevertetjük, majd egy éjen át jégszekrényben állni hagyjuk. A termék feldolgozását a /8.a/-nál leírtak szerint végessük.

Op.: 199-201 °C, kromatográfiásan egységes $R_F^2 = 0,25$

9. BOC- β -CN-Ala-PheOMe

/9/ előállítását a /8.a/ szerint - BOC-Asn helyett BOC- β -CN-Ala-nal - végezzük.

Op.: 117-119 °C, kromatográfiásan egységes: $R_f^2=0,60$

Aminosav analízis /BOC- β -CN-Ala-Phe-P/

Phe 1,0, Asp 0,76

10. Z-Cys/Bzl/-Tyr-Ileu-Gln-Asn-Cys/Bzl/-

-Pro-Leu-Gly-P /4. szintézis/

5,5 g /5 ml/ BOC-Gly-P-t Merrifield-edényben diklórmetánban duzzasztunk, majd a BOC-leszedés után az /1/ és /2/-nél ismertetett ciklusok ismétlésével rendre a következő aminosavszármazékokkal végezzük a kapcsolást: BOC-Leu, BOC-Pro, BOC-Cys/Bzl/, BOC-Asn/Xa/, BOC-Gln/Xa/, BOC-Ileu, BOC-Tyr/BOC/, Z-Cys/Bzl/-OPFP.

A BOC-Asn és BOC-Gln xantil származékainál, valamint a BOC-Tyr/BOC/ és a BOC-Ileu esetében a kapcsolást megismételjük. A kétszeres kapcsolás után szabadon maradó aminosoportokat ecetsavanhidriddel acetilezzük dimetilformamidban, ekvivalens trietilamin jelenlétében.

A Z-Cys/Bzl/-OPFP 5-szűrös feleslegével dimetilformamidban végezzük a kapcsolást. A védett peptid-polimert exsiccátorban szárítjuk.

11. Z-Cys/Bzl/-Tyr-Ileu-Glu-Asn-Cys/Bzl/-
-Pro-Leu-GlyNH₂

/10/ védett peptid-polimert metanol-dimetilformamid elegyben duzsasztjuk, majd a védett peptidamidot a /3/-nál ismertetett módon ammonolízissel oldatba vesszük. A dimetilformamid-víz, ill. dimetilformamid-éter elegyekből történő kicsapással elhuzódó olvadáspontu /190-210 °C/, szennyezett terméket nyerünk. A 2,6 g / 40 %/ nyersterméket 30 ml dimetilformamid-etanol /1:1/ elegyben oldjuk és Sephadex LH-20 oszlopon /2,5 x 65 cm/ kromatografáljuk, a dimetilformamid-koncentreciót lineárisan növelve, 120 4 ml-es frakciót szedünk; az anyagot a 31.-45. frakciók tartalmazzák, amelyek bepárlása után a nyert olaj éter alatt kristályosodik /750 mg, ~ 11 %/.

Op.: 222-223 °C

Aminosav analízis: Gly 1,0, Leu 0,93, Pro 0,92,
Cys 1,82, Asp 0,78, Gln 0,67,
Ileu 0,82, Tyr 0,72

Elemi analízis: C₆₉H₉₄N₁₂O₁₄S₂ /1379,72/

	C	H
Számított	60,07	6,87
Talált	59,50	6,98

12. BOC-benzilmerkaptó-cisztein

A benziltioszulfinsav-benzilésztert az irodalomban ismertetett módon / 34 / szintetizáljuk. A kiindulási dibenzildiszulfid és a különböző mértékben oxidált származékok keverékét nyerjük, amelyből a kivánt monoxid kinyerése átkristályosítással - annak bomlékonysága miatt - csak jelentős kitermelés-veszteség árán valósítható meg. Ezért a perbenzoésavval végzett oxidációval nyert szulfinsavésztert ~ 60 %-ban tartalmazó kristálymassza 15,8 g-ját /60 mm/ további tisztítás nélkül reagáltatjuk 12,1 g /100 mm/ cisztein 100 ml 1 N sósavas oldatával. A szulfinsavésztert 300 ml alkoholban oldjuk és 1 óra alatt, intenzív keverés közben adagoljuk a cisztein oldatához. További 12 óra keverés után a kiváló olajat /főleg dibenzildiszulfid és dioxid/ az alkohol bepárlása után éterrel extraháljuk, majd az oldat pH-ját piridinnel 6-6,5-re állítjuk be. A kiváló benzilmerkaptó-ciszteint hűtés után szűrjük, vízzel, kevés alkohollal és peroxidmentes éterrel mossuk, majd híg sósavoldatban oldva és piridinnel kicsapva tisztítjuk. 45 mm /10,9 g/ 189-190 °C olvadáspontu fehér kristályos benzilmerkaptó-ciszteint nyerünk, amelynek BOC-származékát dioxán-víz elegyben, trietilamin jelen-

létében állítjuk elő 45 °C-on.

A szokásos feldolgozás után a nyert olajat éterben vesszük fel és DCHA-sóját képezzük, amelyből az acetonos átkristályosítást követően citromsavoldattal felszabadítjuk a BOC-benzilmerkaptó-ciszteint.

Kitermelés 8,35 g /24,3 mm/, O.p.: 72-73 °C.

Elemi analízis: $C_{15}H_{12}O_4N_2S_2$ /343,5/

	C	H
Számított	52,45	6,16
Talált	52,35	6,42

13. BOC-Cys/SBzl/-Tyr-Ileu-Gln-Asn-Cys/SBzl/-
-Pro-Leu-Gly-P /5.szintézis/

8 g / 7,2 mm/ BOC-Gly-P-ből a /2/-nél leírtak szerint szintetizáljuk a Cys/SBzl/-Pro-Leu-Gly-P-t. A BOC-Asn és BOC Gln kapcsolását p-nitrofenilészterekkel végezzük. Mindkét esetben 5-szörös feleslegget alkalmazunk és megismételjük a kapcsolást.

A BOC-Tyr/BOC/ DCC-s kapcsolása után az N-terminális Cys beépítésére a BOC-Cys/SBzl/ pentafluorfenilészterének 5-szörös feleslegét alkalmazzuk. Valamennyi DCC-s kondenzációnál 3-szoros felesleggel végezzük a reakciókat.

As elreagálatlan aminosoportokat ecetsavanhidriddel aciloztuk /10/ szerint. 13,3 BOC di-benzilmerkapto-védett peptid - polimert nyertünk.

14. BOC-Cys/SBzl/-Tyr-Ileu-Gln-Asn-Cys/SBzl/-
-Pro-Leu-Gly-NH₂

4.75 g /13/ at a /3/-nál leírt módon ammonolízisnek vetjük alá. 1,5 g /~ 46 %/ kissé szennyezett peptidot nyertünk, amelyet etanolos kifűzéssel és dimetilformanidból /éterrel/ történő kicsapással tisztítunk. 1 g /~ 30 %/ kromatográfiásan egységes 170-174 °C olvadáspontu anyagot nyertünk.

Aminosav analízis: Gly 1,00, Leu 0,92, Pro 0,97,
Cys 1,95, Asp 0,82, Gln 0,74,
Ileu 0,81, Tyr 0,58

Elemi analízis: C₆₂H₈₈N₁₂O₁₄S₄ /1348,71/
C H
Számított 55,21 6,20
Talált 54,07 6,39

15. BOC-Cys-Tyr-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

8,65 g /13/-at 60 ml dioxán-ectanol /1:1/-ben szuszpendálunk, 40 ekvivalens vízmentes tioglikolsavat adunk hozzá, majd 24 órahosszú 45 °C-on kever-

tetjük. Szűrés, majd többször megismételt metanolos és dimetilformamidos mosás után 50 ml dimetilformamid - víz /1:1/-ben szuszpendáljuk a peptid-polimert, és pH 6,5-ön levegő átbuborékolatásával végezzük a diszulfidhid oxidatív kialakítását.

Ammonolizissal 2,8 g /~50 %/ BOC-védett, nyers oxitocin amidot nyerünk, amelyet szilikagél oszlopon /3,0 x 80 /n-butanol - jégecet - víz 8:1:1 oldószerelegyet alkalmazva eluálószerként, tisztítunk. Kromatográfiás azonosítás alapján 4 frakcióba egyesítjük az eluátumokat; a frakciók mennyisége rendre: 0,29 g, 0,67 g, 0,27 g, ill. 0,13 g /összesen 1,4 g, 25 %/.

Az első frakciót /0,29 g/ ismételten tioglikolsavval /20 ekvivalens/ kezeljük /a BOC-csoport eltávolítása után/, majd hig vizes oldatban megismételjük az oxidációt is pH 6,5-ön végzett levegő-átbuborékolatással. A vizes oldatot liofilizáljuk, a nyert anyagot 10 ml 50 %-os ecetsavoldatban oldjuk és Sephadex G-15 oszlopon /1,5 x 100/ 50 %-os ecetsavoldattal eluálva, majd karboximetil-cellulóz oszlopon /1,8 x 80/ ammoniumacetát gradiens elucióval /0,02 M \rightarrow 0,5 M/ frakcionáljuk. A 280 nm-nél jelentős elnyelést mutató frakciókat egyesítjük, majd liofilizáljuk. A sómentesítést u-

jabb Sephadex G-15 oszlopon végzett gélszűrőssel
végezzük /0,1 móli ecetsav oldattal/.

Aminosav analízis: Gly 1,00, Asp 0,88, Glu 0,95
Pro 1,05, Ileu 0,75, Leu 1,02
Tyr 0,80

Elemi analízis: $C_{43}H_{66}N_{12}S_2 \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$:

	C	H	N
Számított	49,80	6,69	15,49
Talált	49,23	6,32	15,60

A 2. frakciót /0,67 g/ a trifluorecetsavval
végzett, szokásos BOC-eltávolítás után Sephadex
G-15 oszlopon /2 x 120/ 50 %-os ecetsavval eluálva
frakcionáljuk. A liofilizálás után nyert 0,5 g
nyers oxitocint 100 ml 0,2 N ecetsav oldatban old-
juk és Amberlite IRC-50 /H⁺ ciklus/ oszlopra
/2,5 x 60 / visszük fel. Az eluálást növekvő kon-
centrációjú /0,2 N - 3 N/ ecetsav oldattal végez-
sük. Mintegy 0,2 g neutrális - az oszlopon meg sem
kötődő - peptidkeveréket, és 80 mg erősen szennye-
zett oxitocint /1 N → 2,5 N/ nyerünk.

Aminosav analízis: Gly 1,00, Asp 0,90, Glu 0,85,
Pro 0,95, Leu 0,98, Ileu 0,80,
Tyr 0,72

Elemi analisis: $C_{43}H_{66}N_{12}S_2 \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$

	C	H
Számított	49,80	6,69
Talált	22,22	5,47

Szervetlen: 55 %

ÖSSZEFOGLALÁS

Az oxitocin nonapeptidet választva modellvegyületként, a sokat vitatott szilárd fázisú peptidszintézis módszerének alkalmazhatóságával foglalkoztam.

Az öt szintézis során különböző védőcsoportkombinációkat és kapcsolási módszereket alkalmaztam, vizsgáltam a diszulfidhid szilárd fázison történő kialakításának lehetőségét, valamint az aszparagin és glutamin dehidratációval járó mellékreakcióját a karbodiimides kapcsolásoknál.

A szilárd fázisú peptidszintézis módszere által felvetett kérdések közül elsősorban a C-terminális aminosav-polimer észterkialakítási eljárásokkal, a kapcsolási reakciók és a védőcsoport eltávolítás teljességét kontrolláló módszerekkel, a nem-reagált aminos csoportok blokkolási módszereivel foglalkoztam.

Az egyes kapcsolási reakciók mérésének meghatározására - a szokásos kvalitatív tesztek alkalmazása mellett - szükségessé vált egy kvantitatív eljárás kidolgozása, amely a polimerhez kötött peptid pontos aminosavösszetételének meghatározását tette lehetővé aminosav analízissel.

A nyers oxitocin-származékok tisztítására számos preparatív frakcionálási eljárás alkalmazását vizsgáltam.

A szilárd fázison végzett szintézisek tapasztalatai alapján megállapíthattam, hogy a szintézismódszert a tiznél kisebb tagszámú "egyszerű" szekvenciájú peptidek előállítására sikerrel lehet alkalmazni, ha a nyerstermékek tisztítása megfelelően hatékony frakcionálási eljárással megoldható.

Az oxitocin szintézisem esetében a klasszikus és a szilárd fázisu módszer a gazdaságosság szempontjából egyenértékűnek tekinthető - a gyors és egyszerű szintézis lehetősége azonban a szilárd fázisu módszert részesíti előnyben.

A pontosabb összehasonlításhoz az előállított termékek aktivitásának ismerete szükséges. Az aktivitásmérés folyamatban van.

I R O D A L O M

- / 1 / S. AKABORI et al.: Bull. Chem. Soc. Japan
34, 739 / 1961 /.
- / 2 / C.B. ANFINSEN : Pure Appl. Chem. 17, 461
/ 1968 /.
- / 3 / E. BAYER, H. ECKSTEIN et al.: J. Am. Chem.
Soc. 92, 1735 / 1970 /.
- / 4 / D. BEN ISHAI, A. BERGER: J. Org. Chem. 17,
1564 / 1952 /.
- / 5 / H.C. BEYERMAN et al.: Chem. Commun. 1668
/ 1968 /.
- / 6 / H.C. BEYERMAN et al.: Rec. Trav. Chim. Pays-
Bas 87, 257 / 1968 /.
- / 7 / H.C. BEYERMAN, T.S. LIE, VAN VEDHINZEN: In
"Peptides 1971", North-
Holland, Amsterdam.
- / 8 / C. BIRR, F. FLOR, P. FLECKENSTEIN, T. WILAND:
In "Peptides 1971", North-
Holland, Amsterdam.
- / 9 / I. BLAKE, C.H. LI: J. Am. Chem. Soc. 90, 5882
/ 1968 /.
- / 10 / B. BLOMBACK, M. BLOMBACK et al.: Biochim.
Biophys. Acta 115, 371
/ 1966 /.
- / 11 / M. BODÁNSZKY, V. DU VIGNEAUD: J. Am. Chem.
Soc. 81, 2504 / 1959 /.
- / 12 / M. BODÁNSZKY, I.T. SHEERMAN: Chem. Ind. /Lon-
don/, 1597 / 1966 /.

- / 13 / M. BODÁNSZKY, R.J. BATH: Chem. Comm. 1259
/ 1969 /.
- / 14 / M. BODÁNSZKY, M.A. ONDETTI: "Peptide Synthesis" Wiley, New York
/ 1966 /.
- / 15 / M. BODÁNSZKY, J.T. SHEERAN: Chem. Ind. /London/, 1423 / 1964 /.
- / 16 / M. BODÁNSZKY, DU VIGNEAUD: J. Am. Chem. Soc. 81, 5688 / 1959 /.
- / 17 / R.A. BOISSONAS, St. GUTTMANN et al.: Helv. Chim. Acta 38, 1491 / 1955 /.
- / 18 / L.C. DORMAN, L.D. MARKLEY: Tett. Lett. 1787
/ 1970 /.
- / 19 / V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER, I.M. SWAN,
C.V. ROBERTS, P.G. KATSOYANNIS, S. GORDON:
J. Am. Chem. Soc. 25, 4879
/ 1953 /.
- / 20 / D.F. ELLIOTT, P. MORITZ, R. WADE: In "Peptides 1971" North - Holland, Amsterdam.
- / 21 / K. ESKO, S. KARLSSON, J. PORATH: Acta Chem. Scand 22, 3342 / 1968 /.
- / 22 / K. ESKO, S. KARLSSON: Acta Chem. Scand. 24, 1415 / 1970 /.
- / 23 / J.S. FRUTON, M. BERGMAN: J. Biol. Chem. 127, 627 / 1939 /.
- / 24 / W. GEISING, S. HÖRNLE: Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 352, 5
/ 1971 /.

- / 25 / D.T. GISCH et al.: J. Am. Chem. Soc. 78,
5954 / 1956 /.
- / 26 / H. GROSS, E. HÖFT: Angew. Chem. Intern.Ed.
6, 335.
- / 27 / B. GUTTE, R.B. MERRIFIELD: J. Am. Chem.
Soc. 91, 501 / 1969 /.
- / 28 / B. GUTTE, R.B. MERRIFIELD: J. Biol. Chem.
246, 1922 / 1971 /.
- / 29 / S. GUTIMAN, R.A. BOISSONNAS: Helv. Chim.
Acta 42, 1257 / 1959 /.
- / 30 / R.W. HANSON, H.N. RYDON: J. Chem. Soc. 836
/ 1964 /.
- / 31 / R.T. INGWALL et al.: Biopolymers 6, 331
/ 1968 /.
- / 32 / N. INUKAI, K. NAKANO, M. MARUKAMI: Bull.
Chem. Soc. Japan 41,
182 / 1968 /.
- / 33 / N. INUKAI: Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2913
/ 1967 /.
- / 34 / D.A. IVES: Can. J. Chem. 46, 2318 / 1968 /.
- / 35 / K. JOST, J. RUDINGER: Coll. Czech. Chem.
Comm. 32, 1229 / 1967 /.
- / 36 / O. KAMM et al.: I. Am. Chem. Soc. 50, 573
/ 1928 /.
- / 37 / E. KAISER et al.: Anal. Biochem. 34, 595
/ 1970 /.
- / 38 / S. KARLSSON, G. LINDBERG, J. PORATH,
U. RAGNARSSON: Acta. Chem. Scand. 24, 1010
/ 1970 /.

- / 39 / S. KARLSSON, G. LINDBERGER, U. RAGNARSSON:
Acta Chem. Scand. 24, 337
/ 1970 /.
- / 40 / D.V. KASHELKAR, C. RESSLER: J. Am. Chem.
Soc. 86, 2467 / 1964 /.
- / 41 / W. KESSLER, B. ISELIN: Helv. Chim. Acta 49,
1330 / 1966 /.
- / 42 / J. KOVÁCS, K. MEDZIHRADECKI, V. BRUCKNER:
Acta Chim. Acad. Sci.
Hung. 6, 183 / 1955 /.
- / 43 / J. KOVÁCS, L. KISFALUDY: J. Org. Chem. 35,
3563 / 1970 /.
- / 44 / C.L. KRUIDIECK, C.M. BAUGH: Biochemistry 8,
1568 / 1969 /.
- / 45 / P. KUSCH: Kolloid Z. and Z. Polymere 208,
138 / 1966 /.
- / 46 / J. LENARD: J. Org. Chem. 32, 250 / 1967 /.
- / 47 / A. LOFFET, J. CLOSE, C. DREMIER: In "Pepti-
des 1969", pp 92-94. North-
Holland, Amsterdam.
- / 48 / A. LOFFET, D. DREMIER: Experientia 27, 1003
/ 1971 /.
- / 49 / G. LOSSE, K. NEUBERT: Z. Chem. 10, 48 / 1970 /.
- / 50 / G. LOSSE, H. KLEUGEL: Tetrahedron 27, 1423.
- / 51 / M. MANNING et al.: J. Chromatogr. 38, 396
/ 1968 /.
- / 52 / A. MARGLIN: Tet. Lett. 3145 / 1971 /.
- / 53 / A. MARGLIN, R.B. MERRIFIELD: J. Am. Chem.
Soc. 88, 5051 / 1966 /.

- / 54 / G.R. MARSHALL, R.B. MERRIFIELD: Biochemistry
4, 2394 / 1965 /.
- / 55 / G.R. MARSHALL: Advan. Exp. Med. Biol. 2, 48
/ 1968 /.
- / 56 / R.B. MERRIFIELD: Fed. Proc. 21, 412 / 1962 /.
- / 57 / R.B. MERRIFIELD: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149
/ 1963 /.
- / 58 / R.B. MERRIFIELD: J. Am. Chem. Soc. 86, 304
/ 1964 /.
- / 59 / R.B. MERRIFIELD: Advances in Enzymology 32,
221 / 1969 /.
- / 60 / R.B. MERRIFIELD: Biochemistry 3, 1385 / 1964 /.
- / 61 / R.B. MERRIFIELD: In "Hypotensive Peptides",
pp. 1-13. Springer,
New York.
- / 62 / H.K. MILLER, H. WAELSCH: Arch. Biochem. Bio-
phys. 35, 176 / 1952 /.
- / 63 / A.R. MITCHELL, R.W. ROESKE: J. Org. Chem. 35,
1171 / 1970 /.
- / 64 / V.A. NAJJAR, R.B. MERRIFIELD: Biochemistry 5,
3765 / 1966 /.
- / 65 / K. NODA, S. TERADA, N. IZUMIYA: Bull. Chem.
Soc. Japan 43, 1883 / 1970 /.
- / 66 / M. OHNO, K. KUROMIZU, H. OGAWA, N. IZUMIYA:
J. Am. Chem. Soc. 93 5251
/ 1971 /.
- / 67 / M. OHNO, C.B. ANFINSEN: J. Am. Chem. Soc. 89,
5994 / 1967 /.
- / 68 / M.A. ONDETTI et al.: Biochemistry 7, 4069
/ 1968 /.

- / 69 / R. PAUL, A.S. KENDE: J. Am. Soc. 86, 741,
4162 / 1964 /.
- / 70 / P. PALLAI, K. KOVÁCS, B. PENKE: Acta Chem.
et Phys. Szeged, in
Press.
- / 71 / B. PENKE, K. KOVÁCS, R. FERENCZI: Monat-
shefte, in Press.
- / 72 / B. PENKE, K. KOVÁCS, "Peptides 1972", North-
Holland, in press.
- / 73 / J.T. POTTS, G.W. TREGGAR: Proc. Nat. Acad.
Sci. 68, 63 / 1971 /.
- / 74 / C. NESSLER: J. Am. Chem. Soc. 78, 5956
/ 1956 /.
- / 75 / C. NESSLER, H. RATIKIN: J. Org. Chem. 26,
3356 / 1961 /.
- / 76 / S. SAKAKIBARA et al.: Bull. Chem. Soc. Japan
43, 3322 / 1970 /.
- / 77 / S. SAKAKIBARA, Y. SHIMONISKI: Bull. Chem.
Soc. Japan 38, 1412
/ 1965 /.
- / 78 / R. SCHWYZER et al.: Helv. Chim. Acta 41 1273
/ 1958 /.
- / 79 / E. SCHNABEL: Liebigs Ann, Chem. 702, 188
/ 1967 /.
- / 80 / I.C. SHEEHAN, G.P. HESS: J. Am. Chem. Soc.
77, 1067 / 1955 /.
- / 81 / M.M. SHEFAYAKIN, Y.A. ORCHINNIKOV, A.A. KI-
RYUSCHKIN, and I.V. KOZHLONIKOVA: Tet. Lett.
2323 / 1965 /.

- / 82 / R.C. SHEPPARD: In "Peptides 1971", North -
Holland, Amsterdam.
- / 83 / P. SIERRER, B. ISELIN: *Helv. Chim. Acta* 51,
614 /1968 /.
- / 84 / L.D. SMALL, J.H. BATLEY, CAVALLITO: *J. Am.*
Chem. Soc. 71, 3565
/ 1949 /.
- / 85 / H.A. STAAB, K. WENDEL: *Chem. Ber.* 26, 3374
/ 1963 /.
- / 86 / H.A. STAAB: *Angew. Chem. Internat. Ed.* 1,
351.
- / 87 / I.M. STEWART, I.D. JOUNG: *Solid Phase Pep-*
tide Synthesis, Freeman
and Co., San Francisco,
1969.
- / 88 / I.M. STEWART, D.W. WOOLLEY: *Nature* 206, 619
/ 1965 /.
- / 89 / H. TAKASHIMA, V. DU VIGNEAUD, R.B. MERRI-
FIELD: *J. Am. Chem. Soc.* 90,
1323 / 1968 /.
- / 90 / M.A. TILAK: *Tet. Lett.* 6232 / 1968 /.
- / 91 / G.W. TREGGAR, K. CATT, H.D. NIALL: *Proc.*
Royal Australian Chem.
Inst. 345 / 1967 /.
- / 92 / H. TUPPY: *Biochim biophys. Acta /Aust./* 11,
449 / 1953 /.
- / 93 / V. DU VIGNEAUD, A.H. LINEMORE: *J. Biol.*
Chem. 180, 365 / 1949 /.
- / 94 / V. DU VIGNEAUD, I.G. PIERCE: *J. Biol. Chem.*
199, 929 / 1952 /.

- / 95 / V. DU VIGNEAUD et al.: J. Am. Chem. Soc.
26, 3115 / 1954 /.
- / 96 / G.P. VLASOV, A. YU. BILIBIN: Isv. Akad.
Nauk. SSR, Ser. Khim.
1400.
- / 97 / F. WEYGAND, U. RAGNARSSON: Z. Naturforsch
21b, 1141 / 1966 /.
- / 97a / F. WEYGAND, R. OBERMEIER: Z. Naturforsch
23b, 1390 / 1968 /.
- / 98 / V. WEBER, P. HARTTER: Hoppe-Seyler's Z.
Physiol Chem. 351,
1384 / 1970 /.
- / 99 / T. WIELAND, C. BIRR, F. FLOR: Liebigs Ann,
Chem. 727, 130 / 1969 /.
- / 100 / T. WIELAND, C. BIRR: Chimia 21, 581
/ 1967 /.
- / 101 / T. WIELAND et al.: Angew. Chem. 83, 333.
Intl. Ed. 10, 336.
- / 102 / T. WIELAND, C. BIRR, H. WISSENBACH: Angew
Chem. 81, 782 / 1969 /.
- / 103 / T. WISSMANN, R. GEIGER: Angew. Chem. 82,
937 / 1970 /.
- / 104 / E. WÜNSCH, R SPANGENBERG: "Peptides 1969"
p. 30. North-Holland Co.
/ 1971 /.
- / 105 / A. YARON, S.F. SCHLOSSMANN: Israel J. Chem.
4, 69 / 1966 /.
- / 106 / M. ZACRAL, J. HUDINGER: Coll. Czech. Chem.
Comm. 24, 1993 / 1959 /.

Ezuton mondok köszönetet Dr. Kovács Kálmán professzor Urnak, hogy lehetővé tette számomra doktori értekezésem elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Penke Botond egyetemi adjunktus Urnak a témavezetésért és a sokoldalú segítségért, amellyel munkámat támogatta.

Köszönet illeti a Szerves Kémiai Intézet és a peptidkémiai kutatócsoport azon tagjait, akik segítettek munkám során, elsősorban közvetlen munkatársaimat Ferenczi Richárd vegyésztchnikus és Fülöp József laboránst.

Köszönettel tartozom Dr. Baláspiri Lajos egyetemi adjunktus Urnak hasznos tanácsaiért és segítségéért.

