

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 812822 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **812822**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.09.1981**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.09.1981**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.03.1982**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoiikeus - Prioritet - Priority

19.09.1980 US 188,804 27.07.1981 US 286,138

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • American Home Products Corporation, 685 Third Avenue, New York, NY 10017, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • McGregor, William Herbert, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Polypeptidivalmisteet.

Polypeptidprodukter.

Polypeptidivalmisteet

Viimeaikainen tutkimus on vahvistanut kateenkorvan merkityksen imettäväisten immuunijärjestelmän toiminnassa. Verta muodostavat varsisolut erilaistuvat kateenkorvassa kypsiksi immunologisesti tehokkaiksi lymfosyyteiksi, joita kutsutaan T-soluiksi, ja jotka kulkeutuvat vereen, imunes-

5 teeseen, pernaan ja imusolmukkeisiin. T-soluilla on immunologisia erityisominaisuuksia ja ne liittyvät soluvälitteisiin immunovasteisiin, kuten kudossiirtovasteisiin, virusinfektioiden vasteisiin, kasvainten vasteisiin jne. Ruumiin vaste antigeeniselle materiaalille, kuten baktee-

10 reille, on luuytimen varsisolujen, jotka eivät kuitenkaan erilaistu kateenkorvassa, aikaansaama. Antigeenin vastainen vasta-ainevaikutus vaatii usein sopivien T-solujen läsnäoloa, joten T-solut ja siten myös kateenkorva, ovat välttämättömiä ruumiin immuunijärjestelmälle, ei ainoastaan solujen immuunivasteiden aikaansaajina, vaan myös neste-

15 vasta-aineiden rakentajina. Kateenkorva indusoi varsisolujen välttämättömän erilaistumisen erittämällä kateenkorvahormoneja epiteelisoluistaan.

Suuri mielenkiinto kateenkorvan valmistamiin aineisiin, jotka saattavat monin tavoin liittyä immuunivasteisiin, on johtanut hyvin tuottoisaan tutkimustyöhön. Tämän

25 tutkimuksen tuloksena kirjallisuudessa on kuvattu lukuisia kateenkorvan erittämiä aineita. Low, et al., The Journal of Biological Chemistry, 254(1979)981-993, kuvaavat kateenkorvakudoksen osittain puhdistetun uutteen, jota kutsutaan tymosiinifraktio 5:ksi, voimakasta immunologista vaikutusta. On osoitettu, että tämä tymosiinifraktio korjaa joita-

30 kin kateenkorvan toiminnan puuttumisesta aiheutuvia häiriöitä monilla eläimillä, samoin kuin ihmisillä, joilla on primäärisiä immunologisia vajavuuksia sekä syöpäpotilailla, joiden immunitetti on heikentynyt.

35 Lisäksi em. artikkelissa kerrotaan, että tymosiinifraktio 5 muodostuu useista polypeptidikomponenteista, joista kaksi on nimetty, tymosiini α_1 ja polypeptidi β_1 .

Näistä kahdesta pääkomponentista tymosiini α_1 :n on osoitettu olevan voimakas immunologisesti vaikuttava kateenkorvan polypeptidi, joka on 10 - 1 000 kertaa niin aktiivinen kuin sen lähteenä oleva tymosiinifraktio 5 tutkittaessa useilla biologisilla malleilla, mm. in vivo hiiren mitoge-
 5 geenikokeella, in vitro imunestekokeella, joka mittaa makrofageja estävän tekijän tuotantoa (MIF), indusoidaessa in vitro Lymf-pintamerkinäaineita oletetuille T-solujen prekursoreille ja in vitro ihmisen E-rosettikokeella, joka
 10 mittaa T-solujen tuotantoa.

Low:n et al. artikkelissa annetaan lisäksi 28 aminohapon, jotka muodostavat tymosiini α_1 :n, järjestys.

Tämä keksintö koskee lyhyitä polypeptidiketjuja, joilla on huomattu olevan samanlaisia ominaisuuksia kuin
 15 eristetyllä pitkäketjuisella polypeptidillä, joka on nimetty tymosiini α_1 :ksi.

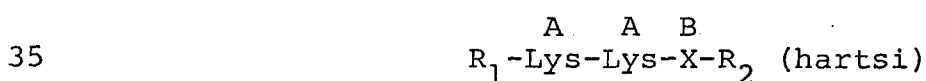
Keksintö sisältää uuden polypeptidiryhmän, jonka rakennekaava on:



jossa R_1 on vety tai p-Glu; X on Glu tai Asp; R_2 on Val, NH_2 tai Val- NH_2 , siitä saatavan täysin suojatun peptidi-hartsivälituotteen, sekä sen muodostamat farmaseuttisesti
 25 hyväksyttävät suolat.

Yllä olevassa kaavassa ja seuraavassa selityksessä sekä patenttivaatimuksissa aminohapon kiraalisuuden ollessa merkitsemättä tai muuten ilmoittamatta aminohapon katsotaan kuuluvan L-sarjaan.

30 Täysin suojattuja peptidi-hartsivälituotteita, jotka myös kuuluvat keksinnön piiriin, voidaan kuvata seuraavalla kaavalla:



jossa R_1 ja R_2 ovat edellä määritellyt ja A ja B ovat

jäljempänä kuvattavia suojausryhmiä. Välituotteet muodostuvat täydellisesti suojatusta polypeptidistä, joka on sidottu bentshydryyliamiinihartsiin, jota käytetään polypeptidien kiinteäfaasisynteesissä.

5 Keksinnön mukaisten yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat myrkyttömiä happosuoloja, jotka valmistetaan tunnetuilla menetelmillä lääkeaineisiin yleensä käytetyistä hapoista, kuten kloorivety-, bromivety-, rikki-, fosfori-, polyfosfori-, maleiini-, etikka-, sitruuna-, bentsoe-, meripihka-, maloni-, askorbiini- ja vastaavista hapoista.

 Keksinnön mukaiset peptidit pystyvät indusoimaan suoraan T-solupopulaatioiden kypsymistä, vaikuttaen täten T-solujen muodostumisen aivan varhaisiin vaiheisiin. Nämä
15 vaikutukset ovat havaittavissa jopa niin alhaisilla pitoisuuksilla kuin 1-100 ng/ml, mikä tekee nämä yhdisteet käyttökelpoisiksi hoidettaessa lukuisia immuunivasteen häiriöitä. Koska yhdisteillä on tiettyjä kateenkorvan aikaansäämiä vaikutuksia, niitä voidaan käyttää monilla kateenkorvan toimintaan ja immunitettiin liittyvillä alueilla.
20 Täten yhdisteet voivat auttaa säilyttämään immuunitoiminnan ja kiihdyttämään erityisiä lynfosyyttitoimintoja lapsilla, joilla on kateenkorvan toiminnan vaje ja niitä voidaan käyttää aikuisilla erilaisissa T-soluhäiriöissä, kuten syövässä ja autoimmuunisairauksissa. Polypeptidit lisäävät tai edistävät solujen immunitetin terapeuttista stimulaatiota ja ovat siksi käyttökelpoisia hoidettaessa in vivo tauteja, joihin liittyy krooninen infektio, kuten sieni- tai mykoplasmainfektio, tuberkuloosi, lepra, akuutit ja krooniset virusinfektiot, jne. Lisäksi yhdisteitä
30 voidaan käyttää immunitetin vajavuustiloissa, kuten DiGeorgen oireistossa sekä hoidettaessa immunitetiltaan heikentyneitä syöpäpotilaita. Yhdisteillä saattaa olla myös arvoa tiettyjen autoimmuunisairauksien, kuten systeemisen
35 punahukan, joidossa.

 Polypeptidien tärkeä ominaisuus on niiden kyky elvyttää in vivo soluja, jotka ominaisuuksiltaan vastaavat

T-soluja. Peptidit ovat hyvin tehokkaita erittäin pieninä pitoisuuksina, 1-100 ng/ml. Yhdisteiden kantoaine voi olla mikä tahansa tunnettu tähän tarkoitukseen sopiva kantoaine, esim. tavallinen fysiologinen suolaliuos, joka on edullisesti laimennettu valkuaisaineella, kuten naudan seerumi-

albumiinilla, jotta estettäisiin näin pienissä pitoisuuksissa tapahtuva häviö adsorboitumalla astioiden seiniin.

Polypeptidit valmistetaan tunnetulla kiinteäfaasimenetelmällä, jota Stewart, et al. kuvaavat (Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman and Co., San Francisco, 1969). Sovellettuna joihinkin keksinnön mukaisiin yhdisteisiin, α -aminosuojattu valiini liitetään bentshydryyliamiinipolystyreenihartsiin, minkä jälkeen α -aminoryhmän suojaus poistetaan trifluorietikkahapolla metyleenikloridissa, pelkällä trifluorietikkahapolla tai suolahapolla dioksaanissa. Suojauksen poisto tehdään lämpötilassa 0°C - huoneen lämpötila. Voidaan käyttää myös muita tavanomaisia vapauttavia reagensseja ja olosuhteita poistamaan tiettyjä α -aminosuojauksia, esimerkiksi Schroder ja Lubke, "The Peptides" 1 (1965) 72-75, Academic Press. Kun α -aminoryhmän suojaus on poistettu, saadut suojatut aminohapot liitetään yksitellen hartsissa olevaan ketjuun, seriatiimiin. Vaihtoehtoisesti pienet peptidifragmentit voidaan valmistaa liuosteitse ja lisätä ne kiinteäfaasireaktoriin noin nelinkertaisesti ylimäärin. Liittäminen tehdään dimetyyliformamidissa, metyleenikloridissa tai niiden seoksessa. Kunkin liittämisreaktion onnistumista kussakin synteessivaiheessa seurataan ninhydriinireaktiolla [E. Kaiser, et al., Analyt. Biochem. 34, (1970) 595]. Jos ilmenee epätäydellistä liittymistä, reaktio toistetaan ennen kuin α -aminoryhmän suojaus poistetaan seuraavan aminohapon tai aminohappoketjun liittämistä varten. Liittävänä reagenssina käytetään di-isopropyylikarbo-di-imidiä.

Kun haluttu aminohappoketju on valmistettu, polypeptidi irrotetaan hartsista käsittelemällä fluorivedyllä ja anisolilla, jolloin saadaan polypeptidi, josta suojaus on täysin poistettu. Polypeptidi puhdistetaan sitten

yhdellä tai useammalla puhdistusmenetelmällä, joita ovat geelisuodatus, korkeapaineinen preparatiivinen nestekromatografia ja partitiokromatografia.

Erityisesimerkkeinä lopullisista täysin suojatuista hartsiin sidotuista keksinnön mukaisista polypeptideistä mainittakoon L-(5-oksoprolyyli)-N^ε-2-klooribentsyylioksi-
 5 karbonyyli-L-lysyli-N^ε-2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-O-bentsyyli-L-glutamyyli-L-valyylibentshydriyliamiini-polystyreeniamidi; L-(5-oksoprolyyli)-N^ε-2-kloori-
 10 bentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-N^ε-2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-O-bentsyyli-L-glutamyylibentshydriyliamiini-polystyreeniamidi; N^α-t-butyylioksikarbonyyli-N^ε-2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-N^ε-2-kloori-
 15 bentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-O-bentsyyli-L-glutamyyli-L-valyylibentshydriyliamiini-polystyreeniamidi; N^α-t-butyylioksikarbonyyli-N^ε-2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-N^ε-2-klooribentsyyli-L-asparagyyli-L-valyylibentshydriyliamiini-polystyreeniamidi; ja N^α-2-t-butyylioksikarbonyyli-N^ε-2-kloori-
 20 ribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyli-O-bentsyyli-L-glutamyyli-L-valyylihydroksimetyylipolystyreeniesteri.

Kiinteäfaasisynteesissä käytettävät suojausryhmät ovat hyvin tunnettuja. α-aminosuojausryhmät, joita käytetään kullekin lopulliseen polypeptidiin sidotulle aminohapolle, ovat (1) asyylityyppejä suojausryhmiä, esimerkiksi formyylit, trifluoriasetyyli, ftalyyli, p-tolueenisulfonyyli (tosyyli), nitrofenyylisulfenyyli, jne.; (2) aromaattisia uretaanityyppejä suojausryhmiä, esimerkiksi bentsyylioksikarbonyyli sekä substituoidut bentsyylioksikarbonyylit, kuten p-klooribentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli, p-bromibentsyylioksikarbonyyli, p-metoksibentsyylioksikarbonyyli; (3) alifaattisia uretaanisuojausryhmiä, kuten tert-butyylioksikarbonyyli, di-isopropyylimetoksikarbonyyli, isopropylioksikarbonyyli, allylioksikarbonyyli, 2,2,3-trikloorietoksikarbonyyli, amylioksikarbonyyli; (4) sykloalkyyliuretaanityyppejä suojausryhmiä, kuten syklopentylioksikarbonyyli, adaman-

tyylioksikarbonyyli, sykloheksyylioksikarbonyyli; (5) tio-
uretaanityyppisiä suojausryhmiä, kuten fenyyliitiokarbonyy-
li; (6) alkyylityyppisiä suojausryhmiä, kuten trifenyyli-
metyyli (trityyli); (7) trialkyyilisilaaniryhmiä, kuten tri-
5 metyyilisilaani. Edullinen α -aminoryhmän suojaus on tert-
butyylioksikarbonyyli.

Asparagiini- ja glutamiinihapon karboksiryhmän suo-
jaukseen voidaan käyttää mitä tahansa esterä tai anhydri-
diä, joka ei irtoa poistettaessa α -aminosuojausryhmiä.

10 Karboksiryhmän suojaukseen käytetään edullisesti bentsyy-
liesterä.

Aminohapon, kuten lysiinin, sivuketjun aminoryhmän
suojaukseen voidaan käyttää tosyyli-, t-amyylioksikarbo-
nyyli-, t-butylioksikarbonyyli-, di-isopropyylioksikarbo-
15 nyyli-, bentsyylioksikarbonyyli-, halobentsyylioksikarbo-
nyyli-, nitrobentsyylioksikarbonyyli- ja vastaavaa ryhmää,
2-klooribentsyylioksikarbonyyliryhmän ollessa edullinen.

Tämän keksinnön mukaiset peptidit voidaan valmistaa
myös klassisilla tavanomaisilla synteessimenetelmillä. Täl-
20 löin keksintö sisältää menetelmät polypeptidien valmista-
miseksi rakentamalla molekyyli kondensoimalla asianomaiset
aminohapot/amidit ja prekursorit, suojattuina ja/tai akti-
voituina, mikäli välttämätöntä, jolloin saadaan haluttu
ketju, poistamalla saadusta ketjusta suojaus ja haluttaes-
25 sa eristämällä tuote farmaseuttisesti hyväksyttävänä suola-
na. Tällaisia menetelmiä on kuvattu kirjallisuudessa [esi-
merkiksi Schroder ja Lubke, The Peptides 1 (1965) Academic
Press]. Tällaisissa menetelmissä viimeinen vaihe on yleensä
suojauksen poisto pääteasemasta.

30 Keksinnön mukainen erityisen edullinen menetelmä si-
sältää asianomaisten aminohappojen, suolattuina ja/tai ak-
tivoituina, mikäli välttämätöntä, kondensoimisen kiinteä-
faasiolosuhteissa hartsiin sidottuina, suojauksen poiston
ja polypeptidin irrotuksen hartsista, ja haluttaessa poly-
35 peptidin eristämisen farmaseuttisesti hyväksyttävänä suo-
lana.

Valittaessa erityistä sivuketjun suojausryhmää käytettäväksi keksinnön mukaisessa peptidisynteesissä, tulisi noudattaa seuraavia sääntöjä: (a) sivuketjun suojausryhmän tulee olla pysyvä sen reagenssin ja niiden olosuhteiden
 5 suhteen, joita käytetään kussakin synteesivaiheessa α -aminyhmi-
 ryhmien suojausten poistoon, (b) suojausryhmän tulee säilyttää suojaavat ominaisuutensa (so. se ei saa hajota liittämisreaktion olosuhteissa) ja (c) sivuketjun suojausryhmä
 tulee voida poistaa, kun haluttu aminohappoketju on syntetisoitu, sellaisissa olosuhteissa, ettei peptidiketju muutu.

Seuraavat esimerkit kuvaavat L-(5-oksoprolyyli)-L-lysyyli-L-lysyyli-L- α -glutamyyli-L-valinamididiasetaatin;
 L-(5-oksoprolyyli)-L-lysyyli-L-lysyyli-L- α -glutamyyli-L-
 15 valinamiditriasetaatin; L-lysyyli-L-lysyyli-L-aspartyyli-L-valinamididiasetaatin ja L-lysyyli-L-lysyyli-L- α -glutamyyli-L-valindiasetaatin valmistusta.

Esimerkki 1

L-(5-oksopropyyli)-N ϵ -2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyyli-N ϵ -2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyyli-O-bentsyyli-L-glutamyyli-L-valyylibentshydriamiini-
 20 polystyreeniamidi

Kiinteäfaasipeptidisyntetisoijassa neutraloidaan
 6 g bentshydriamiinihydrokloridihartsia (Bachem) kahdesti 30 %:isella trietyyliamiinilla metyleenikloridissa
 25 viisi minuuttia kullakin kerralla ja pestään sitten metyleenikloridilla (MeCl₂) kerran ja dimetyyliformamidilla (DMF) kahdesti ja käsitellään p-Boc-L-valiinilla (3 g),
 hydroksibentsotriatsolilla (2 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (2 ml) DMF:ssa yön yli. Kun hartsi on pesty perättäin DMF:lla (kerran), MeCl₂:lla (kahdesti), MeOH:lla (kerran) ja MeCl₂:lla (3 kertaa) hartsi antaa heikosti positiivisen reaktion ninhydriinillä ja se pestään 30 %:isella trietyyliamiinilla DMF:ssa (kerran) ja DMF:lla (kahdesti).
 30 Hartsiä käsitellään uudelleen t-Boc-L-valiinilla (3 g),
 35 hydroksibentsotriatsolilla (2 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (2 ml) yön yli.

Kun hartsi on pesty edellä kuvatulla tavalla [DMF (kerran), MeCl_2 (kahdesti), MeOH (kerran) ja MeCl_2 (kahdesti)]⁷, se antaa juuri erottuvan positiivisen reaktion ninhydriinillä ja sen suojaus poistetaan käsittelemällä 30 minuuttia 50 %:isella trifluorietikkahapolla MeCl_2 :ssa, minkä jälkeen se pestään peräkkäin MeCl_2 :lla (kerran), 30 %:isella trietyyliamiinilla DMF:ssa (kahdesti) ja DMF:lla (kahdesti). Valyylihartsia käsitellään t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinihapolla (6,7 g), hydroksibentsotriatsolilla (3 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (3 ml) yli yön.

Perättäisten mainitunlaisten pesujen jälkeen (DMF, MeCl_2 , MeOH ja MeCl_2) hartsi antaa lievästi positiivisen ninhydriinireaktion ja sitä pestään edelleen 30 %:isella trietyyliamiinilla DMF:ssa (kerran) ja DMF:lla (kahdesti) ja käsitellään uudelleen t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinihapolla (3,3 g), hydroksibentsotriatsolilla (1,5 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (3 ml) yli yön. Tavanomaisten pesujen jälkeen hartsi antaa juuri erottuvan reaktion ninhydriinillä ja siitä poistetaan suojaus trifluorietikkahapolla käsittelemällä 30 minuuttia, se neutraloidaan ja pestään edellisen suojauksen poiston yhteydessä kuvatulla menetelmällä. Dipeptidyylihartsi käsitellään t-Boc- ϵ -2-Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (5 g), hydroksibentsotriatsolilla (2 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (2 ml) yön yli.

Peptidyylihartsista, joka on ninhydriini-negatiivinen, poistetaan suojaus trifluorietikkahapolla, neutraloidaan ja pestään, kuten edellisissä suojauksen poistoissa ja käsitellään t-Boc- ϵ -2-Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (5 mg), hydroksibentsotriatsolilla (2 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (2 ml) viikonlopun yli. Tavanomaisten pesujen jälkeen peptidyylihartsi on vielä ninhydriini-positiivinen ja se käsitellään uudelleen t-Boc- ϵ -2-Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (5 g), hydroksibentsotriatsolilla (2 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (2 ml) DMF:ssa yön yli. Tavanomaisten pesujen jälkeen peptidyylihartsi on vieläkin heikosti ninhydriini-positiivinen ja sitä käsitellään vielä

t-Boc-2-Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodi-imidillä (4 ml) DMF:ssa yön yli. Tavanomaisen pesun jälkeen peptidyyliharts on juuri ja juuri ninhydriini-positiivinen, ja sen suojaus poistetaan trifluorietikkahapolla, se neutraloidaan ja pestään edellä mainitulla tavalla ja käsitellään pyro-L-glutamiinihapolla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodi-imidillä (4 ml) yön yli DMF:ssa. Peptidyyliharts on tavanomaisten pesujen jälkeen vielä heikosti ninhydriini-positiivinen ja käsitellään vielä uudelleen pyro-L-glutamiinihapolla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodi-imidillä (4 ml) DMF:ssa yön yli. Toinen uudelleen käsittely samoilla reagensseilla on välttämätön, jotta saataisiin peptidyyliharts, joka on juuri ja juuri ninhydriini-positiivinen. Pestynä etyyllieetterillä ja kuivattuna hartsin paino on 8 g.

Esimerkki 2

L-(5-oksoprolyyli)-L-lysyili-L-lysyili-L- α -glutamyyli-L-valinamididiasetaatti

8 g edellisen esimerkin mukaista peptidyylihartsia vapautetaan ja siitä poistetaan suojaus HF:lla anisolin (8 ml) läsnäollessa yksi tunti 0°C:ssa, HF poistetaan alipaineessa ja jäännös pestään kolmesti dietyllieetterillä, kuivataan typpivirrassa ja trituroidaan 0,2N HOAc:lla (150 ml) viisi minuuttia ja suodatetaan. Suodos kylmäkuivataan, jolloin saadaan 222 mg epäpuhdasta p-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-NH₂·2HOAc:a.

150 mg epäpuhdasta peptidiä puhdistetaan kromatografisesti Sephadex G 10 -geelillä käyttäen liuottimena 0,2N etikkahappoa ja keräten 1 ml:n fraktioita virtausnopeudella 15 ml/h. Kerätyt fraktiot 53-63 yhdistetään TLC-silikaalevyjen perusteella (Merck), eluenttina butanoli-etikkahappovesiseos, tunnistamiseen käytettiin ninhydriinin ja peptidi-klooriruiskutukseen perustuvaa järjestelmää (R_f 0,06) ja kylmäkuivataan, jolloin saadaan 67 mg otsikon mukaisesta yhdistetystä.

Tuotteen aminohappoanalyysin tulos oli seuraava:
 Glu 2,2; Lys 2,1; Val 1,0; NH_3 1,1.

Esimerkki 3

L-(5-oksopropyyli)-N ϵ -2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyyli-N ϵ -2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyyli-O-bentsyyli-L-glutamyylibentshydriamiini-polystyreeni-amidi

Kiinteäfaasi-peptidi-syntetisointilaitteessa neutraloidaan 7 g bentshydriamiinihydrokloridihartsia (Bachem) kahdesti viisi minuuttia kerrallaan 30 %:isella trietyyliamiinilla metyleenikloridissa ja pestään sitten metyleenikloridilla (kerran) ja DMF:lla (kahdesti), minkä jälkeen se käsitellään t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinihapolla (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) DMF:ssa yön yli. Hartsi on pesujen, DMF:lla (kerran), MeCl_2 :lla (kahdesti), MeOH:lla (kerran) ja MeCl_2 :lla (kahdesti), heikosti ninhydriini-positiivinen ja se käsitellään uudelleen t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinihapolla (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) DMF:ssa yön yli. Hartsi on perättäisten pesujen jälkeen (samat kuin edellä) heikosti ninhydriini-positiivinen ja se käsitellään uudelleen t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinihapolla (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) yön yli. Edellä mainittujen pesujen jälkeen hartsi antaa juuri erottuvan positiivisen tuloksen ninhydriinillä ja siitä poistetaan suojaus 50 %:isella trifluorietikka-
 hapolla MeCl_2 :ssa (sisältää 0,5 % DTE:a) 30 minuuttia, minkä jälkeen seuraa pesu kerran MeCl_2 :lla, 30 %:isella trietyyliamiinilla DMF:ssa (kahdesti) ja DMF:lla (kahdesti). Glutamyylihartsia käsitellään t-Boc- ϵ -Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) DMF:ssa yön yli. Kun hartsi on pesty perättäin DMF:lla, MeCl_2 :lla, MeOH:lla ja MeCl_2 :lla, kuten edellä, se on juuri ja juuri ninhydriini-positiivinen ja siitä poistetaan suojaus trifluorietikka-
 hapolla, kuten edellä. Kun hartsi on pesty ja neutraloitu

edellä kuvatulla tavalla, se käsitellään t-Boc- -Cl-karbontsoksi-L-lysiinillä (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml). Tavanomaisen pesun jälkeen hartsi on juuri ja juuri ninhydriini-positiivinen, ja siitä poistetaan suojaus trifluorietikkahapolla, pestään, neutraloidaan trietyyliamiinilla ja pestään, kuten aiemmin on kuvattu tämän vaiheen yhteydessä, sitten se käsitellään pyro-L-glutamiinihapolla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) yön yli. Pesun jälkeen hartsi on vielä heikosti ninhydriiniposiitiivinen ja se käsitellään uudelleen pyroglutamiinihapolla (6,5 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) tavanomaisesti. Tavanomaisen tässä vaiheessa käytettävän pesun jälkeen saadaan heikosti positiivinen tulos ninhydriinillä peptidyylihartsille, ja se pestään kerran eetterillä ja kuivataan alipaineessa vapautusreaktiota varten.

Esimerkki 4

L-(5-oksopropyli)-L-lysyili-L-lysyili-L- α -glutamiinidiasetaatti

Esimerkin 3 mukaisesta suojatusta peptidyylihartsista poistetaan suojaus ja se vapautetaan HF:lla anisolin (8 ml) läsnäollessa yksi tunti lämpötilassa 0°C ja HF poistetaan haihduttamalla alipaineessa yön yli. Jäännös pestään kolmesti etyylietterillä, kuivataan typpivirrassa ja trituroidaan 0,2N etikkahapolla (150 ml) viisi minuuttia ja suodatetaan. Suodos kylmäkuivataan, jolloin saadaan 1,65 g epäpuhdasta p-Glu-Lys-Lys-Glu-NH₂·2HOAc.

150 mg epäpuhdasta peptidiasetaattia puhdistetaan Sephadex G-10:lla liuottimena 0,2N HOAc ja kerätään 1 ml:n fraktioita virtausnopeudella 15 ml/h. Fraktiot 59-63 yhdistettiin TLC-silikallevyjen (Merck) perusteella, eluenttina oli nBuOH, HOAc, H₂O 4:1:5 ja tunnistamiseen käytettiin ninhydriiniä ja peptidiklooriruiskutusta (R_f 0,0) ja tuote kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 63 mg otsikon mukais- ta yhdistettä.

Aminohappoanalyysin tulos oli seuraava: Lys 0,97;
Glu 1,0.

Esimerkki 5

N^{α} -t-butyylioksidikarbonyyli- N^{ϵ} -2-klooribentsyylioksidikarbonyyli-L-lysyli- N^{ϵ} -2-klooribentsyylioksidikarbonyyli-L-lysyli-O-bentsyyli-L-glutamyyli-L-valyylibentshydriyliamiini-polystyreeniamidi

Kiinteäfaasipeptidisyntetisointilaitteessa neutraloidaan 6 g bentshydriyliamiinihartsia (Bachem) kahdesti 20 %:isella trietyyliamiinilla $MeCl_2$:ssa viisi minuuttia kerrallaan ja pestään kerran $MeCl_2$:lla ja kahdesti DMF:lla, minkä jälkeen seuraa käsittely t-Boc-L-valiinilla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) DMF:ssa 15 tuntia. Kun hartsi on pesty DMF:lla (kerran), $MeCl_2$:lla (kahdesti), MeOH:lla (kerran) ja $MeCl_2$:lla (kolmesti), se on vielä heikosti ninhydriini-positiivinen ja se käsitellään uudelleen t-Boc-L-valiinilla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) 15 tuntia. Pesu toistetaan ja hartsin huomataan olevan vieläkin heikosti ninhydriini-positiivisen. Se käsitellään vielä toisen kerran uudelleen t-Boc-L-valiinilla (6 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) 15 tuntia. Edellä kuvatun kaltaisen pesun jälkeen hartsi on ninhydriini-negatiivinen ja siitä poistetaan suojaus trifluorietikkahapolla 30 minuuttia, minkä jälkeen se pestään kerran $MeCl_2$:lla, kahdesti 30 %:isella trietyyliamiinilla DMF:ssa ja kahdesti DMF:lla. Se käsitellään t-Boc- γ -bentsyyli-L-glutamiinipolla (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) 15 tuntia. Mainitunlaisen pesun jälkeen hartsi on ninhydriini-negatiivinen ja siitä poistetaan suojaus trifluorietikkahapolla edellä kuvatulla tavalla. Kun hartsi on pesty trietyyliamiinilla DMF:ssa ja DMF:lla edellä kuvatulla tavalla, se käsitellään t-Boc- ϵ -Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (10 g), hydroksibentsotriatsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml) 15 tuntia. Tavanomaisen pesun jälkeen peptidyyliharts on

ninhydriini-negatiivinen ja siitä poistetaan suojaus tri-
fluorietikkahapolla edellä kuvatulla tavalla, pestään ku-
ten tavallisesti tässä vaiheessa ja käsitellään t-Boc- -
Cl-karbobentsoksi-L-lysiinillä (4 g), hydroksibentsotri-
5 atsolilla (4 g) ja di-isopropyylikarbodiimidillä (4 ml)
tavanomaisella menetelmällä. Tavanomaisen pesun jälkeen
peptidihartsin on ninhydriini-negatiivinen ja se pestään
dietyylieetterillä ja kuivataan alipaineessa.

Esimerkki 6

10 L-lysyili-L-lysyili-L-glutamyyli-L-valinamiditri-
asettaatti

Esimerkin 6 mukaisesta suojatusta hartsista poiste-
taan suojaus ja se vapautetaan HF:lla anisolin (8 ml) läs-
näollessa yksi tunti 0°C:ssa ja ylimääräinen HF poistetaan
15 alipaineessa. Jäännös pestään kolme kertaa etyylieetteril-
lä, kuivataan typpivirrassa, trituroidaan 0,2N etikkaha-
polla (150 ml) 10 minuuttia, suodatetaan ja suodos kylmä-
kuivataan, jolloin saadaan 719 mg epäpuhdasta H-Lys-Lys-
Glu-Val-NH₂·3HOAc. 105 mg raakapeptidiä puhdistetaan kro-
20 matografisesti Sephadex G-10 -geelillä käyttäen 0,2N etik-
kahappoa liuottimena ja keräten 1 ml:n fraktioita virtaus-
nopeudella 15 ml/h. Fraktiot 52-57 yhdistettiin TLC-sili-
kageelilevyjen (Merck) perusteella, jolloin eluenttina käy-
tettiin butanoli-etikkahappo-vesi -yhdistelmää ja tunnis-
25 tamiseen ninhydriiniä (R_F ,0) ja tuote kylmäkuivattiin, jol-
loin saatiin 54 mg otsikon mukaista yhdistettä.

Tuotteen aminohappoanalyysin tulos oli seuraava:
Glu 1,0; Lys 1,97; Val 0,98.

Esimerkki 7

30 L-lysyili-L-lysyili-L-asparagyyli-L-valinamididi-
asettaatti

Esimerkin 1 mukaisesti valmistetaan välituote N^α-t-
butyylioksikarbonyyli-L-lysyili-N^ε-2-klooribentsyylioksi-
karbonyyli-L-lysyili-O-bentsyyli-L-asparagyyli-L-valyyli-
35 bentshydriyliamiinipolystyreeniamidi. Esimerkin 2 mukai-
sesti ja TLC-silikalevyjen perusteella [butanoli-vesi-etik-
kahappo eluenttina, ninhydriinitunnistus (R_F 0,05)]

raakapeptidi puhdistetaan kromatografisesti Sephadex G-10 -pylväässä ja kerätyt fraktiot kylmäkuivataan, jolloin saadaan 115 mg otsikon mukaista yhdistettä.

Tuotteen aminohappoanalyysin tulos oli seuraava:

5 Val 1,0; Lys 2,1; Asp 1,1; NH_3 1,0.

Esimerkki 8

L-lysyili-L-lysyili-L-glutamyyli-L-valiinidiasetaatti

Esimerkin 1 mukaisesti ja käyttäen kloorimetyloitua hartsia valmistetaan välituote N^α -t-butylioksikarbonyyli-
 10 N^ϵ -2-klooribentsyylioksikarbonyyli-L-lysyili- N^ϵ -2-kloori-
 bentsyylioksikarbonyyli-L-lysyili-O-bentsyyli-L-glutamyy-
 li-L-valyylihydroksimetyyli-polystyreeniesteri. Esimerkin
 2 mukaisesti ja TLC-silikalevyjen perusteella γ -butanoli-
 vesi-etikkahappo eluenttina ja ninhydriinitunnistus
 15 (R_f 0,03) γ raakapeptidi puhdistetaan kromatografisesti
 Sephadex G-10 -geelillä ja saadut fraktiot kylmäkuivataan,
 jolloin saadaan 70 mg otsikon mukaista yhdistettä.

Tuotteen aminohappoanalyysin tulos oli seuraava:

Lys 2,0; Glu 1,0; Val 1,0.

20 Esimerkki 9

Esimerkkien mukaisten yhdisteiden aktiivisuus määritetään seuraavasti:

T lymfosyyttejä eristetään CBA/J tai NZB-uroshii-
 rien pernasta. Soluhomogenaatit valmistetaan Hankin tasa-
 25 painotettuun suolaliuokseen (HBSS). Kun isommat partikke-
 lit on poistettu ja solut on toistamiseen pesty HBSS:ssa,
 ne suspendoidaan MEM-väliaineeseen (minimum essential
 medium) ja johdetaan lasivillalla täytetyn kolonnin läpi
 makrofagien poistamiseksi. Soluja inkuboidaan nailonvilla-
 30 kolonnissa 37°C :ssa, ilmassa, joka sisältää 5 % CO_2 ,
 45 minuuttia. Kiikki tarttumattomat T lymfosyytit eluo-
 daan sitten kolonnista, ne lasketaan ja niiden pitoisuus
 säädetään 20×10^6 solua/ml:ksi. 50 μl soluliuosta inku-
 boidaan (37°C , 95 % ilmaa, 5 % CO_2) yhdessä yhdisteen kans-
 35 sa 48 tuntia, minkä jälkeen lisätään 0,0082 μl 3H-tymi-
 diiniä ja inkuboidaan vielä 16 tuntia. Viljelmän kokonais-
 tilavuus on 200 μl . Solut kerätään sitten automaattisella

näytteiden sarjakerääjällä (Mash II), lasikuituiset suodatinlevyt laitetaan ksyleenipohjaiseen skintillaationesteseen (10 ml) ja solut lasketaan yhden minuutin neste-tuikelaskurilla. Tulokset annetaan yksikköinä lukumäärä/min $\pm$ virhe (CPM $\pm$ SE). Levamisolia käytetään standardina. Vertailuviljelmien ja yhdistettä sisältävien viljelmien antamia lukumääriä verrataan ja määritetään, onko yhdiste aktiivinen kokeessa käytettynä annoksena. Tulokset ovat taulukossa 1.

Taulukko 1

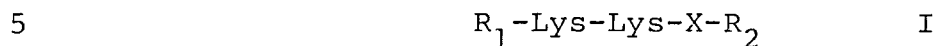
5	Yhdiste	Pitoisuus (ng/viljelmä)	N*	³ H-tymidiinisaalis	
				lukum./min + virhe	p
	Vertailunäyte	-	7	49,519 ± 4048	
	Levamisole	5	8	70,353 ± 1561	<0.05
10	p-Glu-Lys-Lys- Glu-Val-NH ₂	0	10	9,876 ± 951	
		1.5	5	23,736 ± 3417	<0.01
		6.0	5	31,236 ± 2004	<0.01
		25.0	5	26,026 ± 3537	<0.01
		100.0	5	27,830 ± 1749	<0.01
15	H-Lys-Lys-Glu- Val-NH ₂	0	7	49,519 ± 4048	
		1.5	3	72,713 ± 3633	<0.01
		6.0	4	77,979 ± 3760	<0.05
		25.0	3	62,712 ± 6004	N.S.
		100.0	4	51,021 ± 5527	N.S.
25	p-Glu-Lys-Lys Glu-NH ₂	0	7	49,519 ± 4048	
		1.5	3	73,407 ± 3333	<0.05
		6.0	3	78,727 ± 7102	<0.05
		25.0	4	73,932 ± 6944	<0.05
		100.0	3	67,489 ± 5190	N.S.
30	H-Lys-Lys-Glu Val-OH	0	10	2,789 ± 148	
		2.5	5	3,931 ± 140	<0.05
		10	5	3,745 ± 172	<0.05
		25	5	4,397 ± 346	<0.05
		100	4	4,235 ± 284	<0.05
35					

^xN = eläinten lukumäärä

Tulokset osoittavat, että keksinnön mukaisilla peptideillä on huomattava kyky stimuloida T-solujen lisääntymistä hyvin pieninä pitoisuuksina käytettynä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä polypeptidin, jonka kaava on



jossa R_1 on vety tai p-Glu, X on Glu tai Asp ja R_2 on Val, NH_2 tai Val- NH_2 tai sen muodostaman farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan, valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, 10 että tällaisen polypeptidin suojatusta välituotteesta poistetaan suojaus ja haluttaessa tuote eristetään farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että suojattu välituote on peptidi- 15 hartsivälituote ja kaavan I mukaisesta polypeptidistä poistetaan suojaus ja peptidi vapautetaan hartsista ja haluttaessa eristetään farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan I mukaisen polypeptidin tai sen muodostaman farmaseuttisesti 20 hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi valmistetaan kondensoimalla lähtöaineena olevia aminohappoja/amideja, suojattuina ja/tai aktivoituina, mikäli välttämätöntä, jolloin saadaan haluttu ketju, josta poistetaan suojaus ja tuote eristetään halut- 25 taessa farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaa- van I mukaisen polypeptidin tai sen muodostaman farmaseut- tisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n - n e t t u siitä, että polypeptidi valmistetaan kondensoi- 30 malla lähtöaineena olevia aminohappoja/amideja, suojattui- na ja/tai aktivoituina, mikäli välttämätöntä, kiinteäfaa- siolosuhteissa tukihartsiin sidottuina, jolloin saadaan peptidihartsivälituote, josta kaavan I mukainen polypepti- di vapautetaan, polypeptidin suojaus poistetaan ja kaavan I 35 mukainen polypeptidi eristetään haluttaessa farmaseutti- sesti hyväksyttävänä suolana.

5. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on p-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-NH₂ tai sen muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

5 6. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on p-Gly-Lys-Lys-Glu-NH₂ tai sen muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

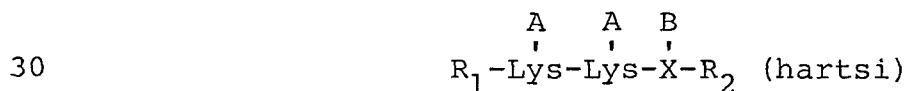
7. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on H-Lys-Glu-Val-NH₂ tai sen muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

8. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on H-Lys-Lys-Glu-NH₂ tai sen muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

9. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on H-Lys-Lys-Asp-Val-NH₂ tai sen muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

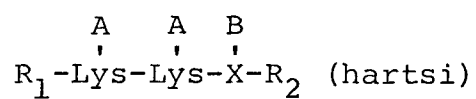
10. Jonkin edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettava polypeptidi on H-Lys-Lys-Glu-Val tai muodostama farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

25 11. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peptidihartsivälituote on yhdiste, jonka kaava on



jossa R₁ on vety tai p-Glu, X on Glu tai Asp ja R₂ on Val, NH₂ tai Val-NH₂; A on aminoryhmän suojaus ja B on karboksyyli-ryhmän suojaus.

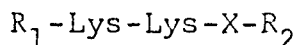
35 12. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peptidihartsivälituote on yhdiste, jonka kaava on



jossa R_1 on vety tai p-Glu; X on Glu tai Asp; R_2 on Val,
 5 NH_2 tai Val- NH_2 ; A on 2-klooribentsyylioksidikarbonyyli ja
 B on bentsyyli.

Patentkrav:

- 5 1. Förfarande för framställning av en polypeptid med formeln



10 vari R_1 är väte eller p-Glu; X är Glu eller Asp; och R_2 är Val, NH_2 eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att skyddet i en skyddad mellanprodukt för en dylik polypeptid avlägsnas och, ifall önskvärt, isoleras produkten som ett farmaceutiskt godtagbart salt.

15 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den skyddade mellanprodukten är en peptidhartsmellanprodukt och att skyddet i polypeptiden med formeln I avlägsnas och spjälks från hartset och, ifall önskvärt, isoleras som ett farmaceutiskt godtagbart salt.

20 3. Förfarande för framställning av en polypeptid med formeln I eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav, enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden framställs genom kondenserande av de som utgångsmaterial föreliggande aminosyrorna/amiderna, vilka skyddats och/eller aktiverats ifall behövt, för 25 erhållande av den önskade sekvensen, varefter skyddet avlägsnas och, ifall önskvärt, produkten isoleras som ett farmaceutiskt godtagbart salt.

30 4. Förfarande för framställning av en polypeptid med formeln I, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav, enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden framställs genom kondenserande av de som utgångsmaterial föreliggande aminosyrorna/amiderna, vilka 35 skyddats och /eller aktiverats ifall behövt, under fastfasförhållanden på ett hartsunderlag för erhållande av

en peptidharts mellanprodukt, varefter polypeptiden med formeln I spjälks från hartset och skyddet avlägsnas och, ifall önskvärt, polypeptiden med formeln I isoleras som ett farmaceutiskt godtagbart salt.

5 5. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är p-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-NH₂, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

10 6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är p-Glu-Lys-Lys-Glu-NH₂, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

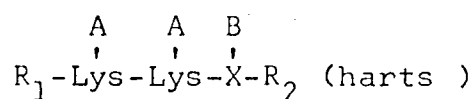
15 7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är H-Lys-Lys-Glu-Val-NH₂, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

20 8. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är H-Lys-Lys-Glu-NH₂, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

9. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är H-Lys-Lys-Asp-Val-NH₂, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

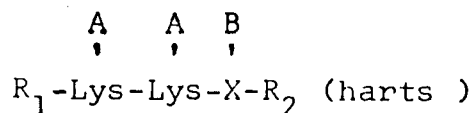
25 10. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att den framställda polypeptiden är H-Lys-Lys-Glu-Val, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

30 11. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att peptidharts mellanprodukten är en förening med formeln



vari R_1 är väte eller p-Glu; X är Glu eller Asp; och R_2 är Val, NH_2 eller Val- NH_2 ; A är en aminoskyddsgrupp; och B är en karboxiskyddsgrupp.

12. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att peptidharts mellanprodukten är en förening med formeln



10 vari R_1 är väte eller p-Glu; X är Glu; eller Asp; R_2 är Val, NH_2 eller Val- NH_2 ; A är 2-klorbensyloxikarbonyl och B är bensyl.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US -P-4079127 (A61K^{37/00})

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Pharmaceutical Bulletin vol. 27, no 12, 1979,
s. 3171-3175

Margit Savan
Allekirjoitus