



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 67366
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti ja Rekisteri 11.03.1985
Patentti ja Rekisteri

(51) Kv. Ik. / Int. Cl. ³ C 07 C 103/52

SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökan	772156
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	11.07.77
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	11.07.77
(41) Tulkittu julkiseksi — Blivit offentlig	13.01.78
(44) Nähtävöityksen ja kuulutuksen pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.11.84
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	12.07.76
Hollanti-Holland(NL) 7607684	

(71) Akzo N.V., Jussellaan 82, Arnhem, Hollanti-Holland(NL)

(72) Hendrik Marie Greven, Heesch, David de Wied, Bilthoven,
Hollanti-Holland(NL)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä uusien psykofarmakologisesti vaikuttavien peptidien valmistamiseksi - Förfarande för framställning av nya psyko-farmakologiskt verkande peptider

Keksintö koskee menetelmää uusien psykofarmakologisesti vaikuttavien peptidien valmistamiseksi. Näillä peptideillä on arvokkaita psykofarmakologisia ominaisuuksia. Erityisesti ne estävät välillisen ajatusreaktion häviämisen, minkä seurauksena ne ovat erityisen sopivia hoidettaessa tiettyjä mielenterveydellisiä sairauksia, joissa aivot toiminnan stimulointi on toivottavaa, kuten vanhuuden oireita hoidettaessa.

Julkaisusta Eur.J.Pharmacol.2, 14 (1967) tunnetaan, että luonnollisten adrenokortikotrooppisten hormonien (ACTH) tietyt peptidi-fragmentit hidastavat välillisen ajatusreaktion heikkenemistä. Erityisesti peptidi, joka koostuu ACTH:n aminohapposarjasta 4-10, on osoittautunut pienimmäksi peptidiosaseksi, joka on tässä suhteessa vaikuttava.

Mainittujen psykofarmakologisten ominaisuuksien lisäksi on pepti-

dillä, jossa on ACTH:n aminohapposarja 4-10, lievä MSH-vaikutus, kuten tämän tyyppisille ACTH-osasille on tavallista. Vaikkakaan peptidin, jolla on MSH-vaikutusta, pienen annoksen vaikutusta ei vielä täysin tunneta, on siitä huolimatta tutkittu peptidejä, joilla on ainakin sama psykofarmakologinen vaikutus, mutta ei lainkaan tai suuresti vähentynyt MSH-vaikutus.

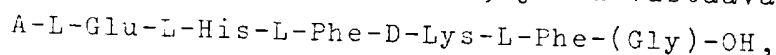
US-patenttijulkaisussa 3 853 836 esitetään, että aminohapposarja 4-10 ACTH ei ole oleellinen psykofarmakologisen vaikutuksen kannalta, ja että tämä vaikutus on katsottava aiheutuvaksi paljon lyhyemmästä peptidistä, nimittäin 4-6 ACTH. Lisäksi käy ilmi, että N-terminaalinen aminohappo L-Met voidaan aktiivisuuden vähentymättä korvata ryhmällä D-Met, L- tai D-Met($\Rightarrow$ O), L- tai D-Met($\Rightarrow$ O₂), desamino-Met, desamino-Met($\Rightarrow$ O) tai desamino-Met($\Rightarrow$ O₂), tai ryhmällä $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{B}}-\text{C}-$, jossa B on haarautunut tai suoraketjuinen alkeeniryhmä,

jossa on 1-6 hiiliatomia.

US-patenttijulkaisussa 3 856 770 esitetään edelleen, että C-terminaalisen peptiditähteen -L-Trp-Gly-OH korvaamisesta alkuperäisessä 4-10 ACTH-peptidissä yhdellä tai useammalla ryhmistä -L-Phe OH, L-Phe-Gly-OH, fenyylialkyyliaminoryhmällä tai (3-indolyyli)alkyyliaminoryhmällä on seurauksena psykofarmakologisen vaikutuksen lisääntyminen.

US-patenttijulkaisussa 3 842 064 on lisäksi esitetty, että saadaan psykofarmakologisen vaikutuksen huomattava lisäys korvaamalla L-arginiini alkuperäisessä 4-10 ACTH-peptidissä tai jossakin modifioiduista peptideistä, joita on kuvattu edellä mainituissa julkaisuissa, D-lysiinillä.

Tässä jälkimmäisessä julkaisussa on kuvattu kaikkein aktiivisimmat peptidit, nimittäin peptidit, jotka vastaavat yleistä kaavaa:

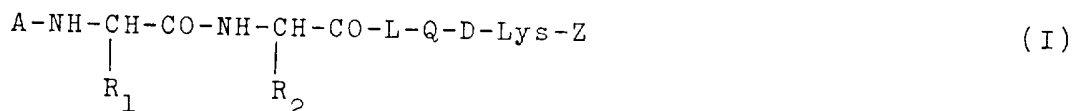


jossa A tarkoittaa samaa kuin edellä. Näiden peptidien aktiivisuuden on todettu olevan n. 1 000 kertaa voimakkaampi kuin alkuperäisen 4-10 ACTH:n.

Yllättäen on nyt havaittu, että aminohapotähteet Glu ja His, joita tähän asti on pidetty oleellisina aktiivisuudelle, voidaan korvata ilman aktiivisuushäviötä alemmilla alifaattisilla aminohapotähteillä, kuten ryhmällä Ala, Leu, Val ja Ile, joita voidaan käyttää hyväksi paljon yksinkertaisemmin ja halvemmin kuin tähteitä Glu ja His peptidisynteesissä.

On myös varmistettu, että aminohappo L-Phe alkuperäisen 4-10 ACTH:n 7-asemassa voitaisiin korvata muilla vasemmalle kiertävillä aminohapoilla, kuten edellä nimetyillä alemmilla alifaattisilla aminohapoilla.

Keksinnön kohteena on täten menetelmä uusien psykofarmakologisesti aktiivisten peptidijohdannaisten valmistamiseksi, joilla on kaava

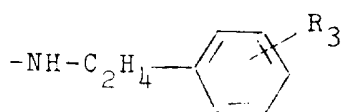


jossa

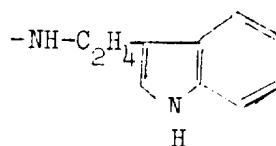
A on H-L-Met- H-L-Met($\Rightarrow$ O), H-L-Met($\Rightarrow$ O₂), desamino-Met, desamino-Met($\Rightarrow$ O), desamino-Met($\Rightarrow$ O₂) tai ryhmä H₂N-B-CO,
B on haaroittunut tai suoraketjuinen 1-6 hiiliatomia sisältävä alkyleeni tai 1-6 hiiliatomia sisältävä alkylideeni,
Q on aminohappotähde -NH-CHR-CO, jossa R merkitsee 1-4 hiiliatomia sisältävää alkyylia, p-hydroksifenyyliä, 3-indolyylimetyyliä tai fenyyliä, R₁ ja R₂ merkitsevät vetyä tai 1-4 hiiliatomia sisältävää alkyylia, ja
Z on N(fenyylietyyli)amino, N(β -indolylietyyli)amino, L-Trp-OH, L-Phe-OH, L-Trp-Gly-OH tai L-Phe-Gly-OH, tai niiden toiminnallisten johdannaisten valmistamiseksi, joita ovat farmaseuttisesti hyväksyttävät happoadditiosuolat, alifaattisesti C₁₋₆-karboksyylihaposta johdetut asyylijohdannaiset, substituoimat-
tomat tai alemmalla alkyyllillä (1-6 C) substituoituneet amidit, 1-8 hiiliatomia sisältävistä alifaattisista alkoholeista johdetut esterit, sekä metallikompleksit, jotka on saatu saattamalla peptidi kosketukseen kobolttin, nikkelin, kuparin, raudan tai edullisesti/sinkin niukkaliukoisien suolan, hydroksidin tai oksidin kanssa.

Z:n määritelmässä N(fenyylietyyli)-amino ja N(β -indolylietyyli)amino poikkeavat samanasukuisista aminohappotähteistä siinä, että niissä ei ole karboksyyli-ryhmää.

N(fenyylietyyli)amino- ja N(β -indolylietyyli)aminoryhmillä ymmärretään ryhmiä



ja vastaavasti



jossa R_3 on vety, halogeeni, hydroksi, alkyyli-ryhmä, jossa on 1-4 hiiliatomia, tai alkoksiryhmä, jossa on 1-4 hiiliatomia.

Yleisen kaavan I mukaisia peptidejä ja peptidijohdannaisia valmistetaan tällaisille yhdisteille tavallisilla tavoilla. Tavallisimmin käytetyt menetelmät näiden peptidien valmistamiseksi voidaan pääkohdittain esittää seuraavasti:

a) kondensoimalla kondensoimisaineen läsnäollessa yhdiste (aminohappo, peptidi), joka sisältää vapaan karboksyyli-ryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on suojattu, yhdisteen kanssa (aminohappo, peptidi tai amiini), joka sisältää vapaan aminoryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät samoin on suojattu,

b) kondensoimalla yhdiste, (aminohappo, peptidi), joka sisältää aktivoitua karboksyyli-ryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on valinnaisesti suojattu, yhdisteen (aminohappo, peptidi, amiini) kanssa, joka sisältää vapaan aminoryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on suojattu; minkä jälkeen suojarahmat, jos niin halutaan, voidaan poistaa.

Menetelmät karboksyyli-ryhmän aktivoimiseksi käsittävät tämän ryhmän muuttamisen happohalogenidiksi, -atsidiksi, -anhydridiksi, -imidiatsolidiksi tai aktivoituksi esteriksi, kuten N-hydroksi-sukkiini-imidiesteriksi tai p-nitrofenyyliesteriksi. Aminoryhmä voidaan aktivoida muuttamalla tämä ryhmä fosfiittiamidiksi tai käyttämällä "fosforatso"-menetelmää.

Tavallisimmat menetelmät edellä mainittuja kondensaatioreaktioita varten ovat: karbodi-imidi -menetelmä, atsidi-menetelmä, sekaanhydridi -menetelmä ja aktivoitu esterimenetelmä, kuten on kuvattu teoksessa "The Peptides", osa I, 1965 (Academic Press), E. Schröder ja K. Lübke. Ns. Merrifieldin "jähmeäfaasi"-menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa J.Am.Chem.Soc. 85, 2149 (1963) voidaan lisäksi käyttää keksinnön mukaisten peptidien tai peptidi-johdannaisten valmistamiseksi.

Reaktiiviset ryhmät, joiden osaanotto kondensaatioreaktioon täytyy estää, suojataan tehokkaasti, ns. suojarahmillä, jotka voidaan helposti jälleen poistaa, esimerkiksi hydrolyysillä tai pelkistämällä. Esimerkiksi karboksyyli-ryhmä voidaan tehokkaasti suojata esteröimällä metanolilla, etanolilla, tertiäärisellä butanolilla, bentsyylialkoholilla tai p-nitrobentsyylialkoholilla, tai muuttamalla amidiksi. Tämä jälkimmäinen suojarahma on kuitenkin hyvin vaikea poistaa, niin että on suositeltavaa, että tätä ryhmää käytetään vain C-terminaalisen aminohapon karboksyyli-ryhmän suojaamiseen lopullisessa peptidissä.

Tässä tapauksessa peptidisynteesi johtaa suoraan kaavan I mukaisen peptidin amidiin. Ryhmiä, jotka voivat tehokkaasti suojata aminohapporyhmän, ovat tavallisesti happoryhmät, esimerkiksi happoryhmä, joka on johdettu alifaattisesta, aromaattisesta, aralifaattisesta tai heterosyklisestä karbonihaposta, kuten asetyyli-, bentsoyyli- tai pyridiini-karboksyyliryhmä, tai happoryhmä, joka on johdettu karboksyylihaposta, kuten etoksikarbonyyli-, bentsyylioksidikarbonyyli-, t-butyylidoksidikarbonyyli- tai p-metoksibentsyyli-oksikarbonyyliryhmä, tai ryhmä, joka on johdettu sulfonihaposta, kuten bentseeni-sulfonyyli- tai p-tolueeni-sulfonyyliryhmä, mutta voidaan käyttää myös muita ryhmiä, kuten substituoituja tai substituoimattomia aryyli- tai aralkyyli-ryhmiä, esimerkiksi bentsyyli- ja trifenyylimetyyliryhmiä, tai sellaisia ryhmiä kuin o-nitrofenyyli-sulfenyyli- ja 2-bentsoyyli-1-metyylivinyyliryhmät. Usein on suositeltavaa, että lysiinin ϵ -aminoryhmä ja valinnaisesti tyrosiinin fenolihydroksyyli-ryhmä myös suojataan. Tämä jälkimmäinen suojaus ei kuitenkaan aina ole olennainen. Tavallisia suojaryhmiä tässä yhteydessä ovat tertiäärinen butyylidoksidikarbonyyli tai tosyyliryhmä lysiinin ϵ -aminoryhmälle ja bentsyyli-ryhmä tyrosiinin fenolihydroksyyli-ryhmälle.

Suojaryhmät voidaan lohkaista erilaisin tavallisin menetelmin, riippuen kyseessä olevan ryhmän luonteesta, esimerkiksi trifluorietikkahapon avulla tai lievästi pelkistämällä, esimerkiksi vedyllä ja katalyytillä, kuten palladiumilla, tai HBr:llä jääetikassa.

Keksinnön mukaisia peptidejä, joissa on (L tai D)Met($\rightarrow$ O) tai desamino-Met($\rightarrow$ O) N-terminaalisisena tähteenä, voidaan valmistaa vastaavasta Met- tai desamino-Met-peptidistä lievästi hapettaen tunnetulla tavalla, esimerkiksi laimealla vetyperoksidilla tai jollakin perhapolla. Tällaisen hapettamisen seurauksena saadaan S- ja R-sulfoksidien seos, joka voidaan hajottaa antamaan erilliset diastereo-isomeerit sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi selektiivisesti kiteyttämällä. Erilliset diastereo-isomeerit saadaan myös suoraan yhdistämällä (L tai D)-metioniini-S(tai R)-sulfonsidi tai sen vastaava desamino-johdannainen peptidi-osasen tähteen kanssa.

Tämän keksinnön mukaisia peptidejä, joissa on (L tai D)-Met($\rightarrow$ O₂) tai desamino-Met($\rightarrow$ O₂) N-terminaalisisena osana, voidaan saada hapettamalla (desamino)Met-peptidi I tai yhdistämällä (desamino)Met-sulfoni peptidi-osasen tähteen kanssa.

Yleisen kaavan I peptidien toiminnallisilla johdannaisilla ymmärretään:

1. Happoadditiosuoloja tai metallisuoloja, edullisesti alkalimetallisuoloja, kuten natriumsuoloja;

2. Yleisen kaavan I peptidejä, joissa yksi tai useampi vapaista aminoryhmistä on substituoitu asyyli-ryhmällä, joka on johdettu alifaattisesta karbonihaposta, jossa on 1-6 hiiliatomia, esim. asetyylillä, propionyyllillä, butyryyllillä jne.,

3. Näiden peptidien amideja, valinnaisesti alkyylisubstituituja, kuten substituoimattomia amideja tai mono- tai di-alkyyli(1-6C) amideja, esim. mono- tai dimetyyliamideja,

4. Näiden peptidien estereitä, jotka on johdettu alifaattisista tai aralifaattisista alkoholeista, joissa on 1-18 C-atomia,

5. Metallikomplekseja, jotka on muodostettu saattamalla tässä tarkoitettuja peptidejä kosketukseen metallin, edullisesti sinkin, niukasti liukenevan suolan, hydroksidin tai oksidin kanssa.

Happoadditiosuolat saadaan saattamalla tässä tarkoitettut peptidit reagoimaan farmaseuttisesti hyväksyttävän hapon, kuten halogeenivedyn, fosforihapon, etikkahapon, maleiinihapon, viinihapon tai sitruunahapon kanssa.

Tämän keksinnön peptidejä ja edellä määriteltäviä johdannaisia voidaan antaa sekä suun kautta että ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti. Peptidejä käytetään edullisesti ruiskeena annettavina valmisteina, jotta tarkoitusta varten ne liuotetaan, suspendoidaan tai emulgoidaan sopivaan nesteväliaineeseen. Sekoitettuna sopivien kantajien tai täyteaineiden kanssa, ne voidaan saattaa myös muotoon, joka on sopiva suun kautta annettavaksi, kuten pillerit, tabletit tai rakeet. Tässä tarkoitettuja peptidejä voidaan antaa myös peräpuikon tai suihkeen muodossa.

Keksinnön mukaisia peptidejä tai peptidi-johdannaisia käytetään edullisesti ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti päivittäisen annoksen ollessa väliltä 0,01 µg - 1 mg ja suun kautta päivittäisenä annoksena väliltä 0,1 mg - 50 mg/kg kehon painoa, riippuen peptidin vaikutustasosta.

Erityisen arvokkaita valmisteita saadaan, kun nämä peptidit käsitellään muotoon, jossa vaikutusaikaa on pidennetty. Tässä yhteydessä tarkoitetaan erityisesti peptidien metallikomplekseja. Näitä metallikomplekseja voidaan saada saattamalla peptidit kosketukseen niukkaliukoisten metallisuolojen, metallihydroksidien tai metallioksidien kanssa. Metallifosfaatteja, metallipyrofosfaatteja metallipolyfosfaatteja käytetään yleensä niukkaliukoisina metallisuoloina.

Metalleja, joita voidaan käyttää tässä käsittelyssä, ovat metallit, jotka kuuluvat siirtymäalkuaineisiin, esimerkiksi koboltti, nikkeli, kupari, rauta ja edullisesti sinkki sekä myös metallit, jotka

kuuluvat jaksottaisen järjestelmän pääryhmiin ja jotka pystyvät muodostamaan komplekseja, kuten magnesium ja alumiini. Näiden metallikompleksien valmistus tapahtuu tavalliseen tapaan.

Metallikompleksi voidaan esimerkiksi saada lisäämällä peptidiä ja niukkaliukoista metallisuolaa, metallihydroksidia tai metallioksidia vesipitoiseen väliaineeseen. Metallikompleksi saadaan myös lisäämällä alkalinen väliaine peptidin ja liukoisen metallisuolan vesipitoiseen liuokseen, minkä tuloksena muodostuu liukenematon peptidi-metallihydroksidikompleksi.

Metallikompleksi voidaan lisäksi saada lisäämällä peptidi, liukoinen metallisuola ja muu liukoinen suola vesipitoiseen, edullisesti alkaliseen väliaineeseen, jolloin muodostuu in situ liukenematon peptidi-metallisuolakompleksi.

Metallikompleksit voidaan välittömästi käyttää suspensioina, tai voidaan esimerkiksi kuivata jäädyttären tai myöhemmin suspendoida uudelleen.

A:n määritelmä käsittää tähteet Met, desamino-Met, tähteiden Met ja desamino-Met vastaavan sulfoksidin ja sulfonin sekä myös aminohappotähteen $H_2N-B-CO$, jossa B on haarautunut tai haarautumaton alkeeni- tai alkylideeni-osa, jossa on 1-6 hiiliatomia, ja edullisesti 1-5 hiiliatomia. Jälkimmäinen aminohappotähte käsittää edullisesti luonnolliset α -aminohappotähteet Gly, Ala, Val, Leu ja Ile, sekä myös muita tähteitä, kuten β -Ala tai (α -Me)Ala.

Aminohappotähteet $HN-CHR_1-CO$ ja $HN-CHR_2-CO$ tämän keksinnön mukaisissa peptideissä edustavat samoja tai eri alifaattisia α -aminohappotähteitä. Edullisia aminohappotähteitä tässä yhteydessä ovat ne, joissa R_1 ja R_2 ovat vety tai alkyyli (1-4 C) ja erityisesti luonnon aminohappotähteet Gly, Val, Leu, Ile ja erityisesti Ala.

α -aminotähte Q, joka on määriteltä $HN-CHR-CO$:ksi, keksinnön peptideissä, käsittää luonnolliset aminohapot Ala, Val, Leu, Ile, Tyr, Trp ja Phe. Aminohappotähteet Phe, Leu ja ne tähteet, joissa R on alempi alkyyli-ryhmä (1-4 C), erityisesti Ala ($R = CH_3$) ovat edullisia.

Keksinnön peptidien esterit johdetaan edullisesti alkanoleista, joissa on 1-8 hiiliatomia, ja erityisesti 1-4 hiiliatomia, kuten metanolista, etanolista, propanolista ja butanolista ja niitä voidaan valmistaa esteröimällä lopullinen peptidi tai esteröimällä kyseessä oleva lähtöaminohappo, jolloin esteriosa voi toimia suojarahmnanä peptidisynteesin aikana. Amideja valmistetaan samalla tavalla joko lopullisen esterin aminolyysillä tai aloittamalla peptidisynteesi kyseessä olevan aminohapon amidista.

Yleisen kaavan I peptideistä ovat edullisia ne peptidit, joissa R_1 ja R_2 edustavat samanlaisia ryhmiä, esimerkiksi metyyliä (joka antaa aminohappotähteen Ala), isopropyliä (joka antaa aminohappotähteen Val) tai 2-metyylipropyliä (joka antaa aminohappotähteen Leu).

Yleisessä kaavassa I on "A" edullisesti L-Met tai desamino-Met, tai näistä kahdesta happotähteestä johdettuja sulfoksideja tai sulfoneja.

Symboli "Q" yleisessä kaavassa I edustaa edullisesti jompaakumpaa aminohappotähteistä L-Phe tai L-Ala.

Symboli "Z" yleisessä kaavassa I on edullisesti aminohappotähde L-Phe-OH tai valinnaisesti peptiditähde L-Phe-Gly-OH, vaikkakin tämä jälkimmäinen vapaa valinta edustaa lisäystä ketjun pituudessa ilman muuta aktiivisuuden lisääntymistä.

Tässä mainituista keksinnön peptideistä ovat erityisen edullisia seuraavat:

H-L-Met-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH,
 H-L-Met(O)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH,
 H-L-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH,
 H-Met-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-Gly-OH,
 H-L-Met(O)-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-Gly-OH,
 H-L-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-OH,
 desamino-Met-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH,
 desamino-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH,
 desamino-Met(O)-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-Gly-OH.

Seuraavat huomautukset on tehty myöhemmin seuraavia esimerkkejä varten.

I. Jos optista muotoa ei ole annettu, tarkoitetaan L-muotoa.

II. Seuraavat lyhennykset on annettu käytetyille suoja- ja aktivoisryhmille:

Boc	= tertiäärinen butyylioksikarbonyyli
tBu	= tertiäärinen butyyli
Me	= metyyli
ONP	= p-nitrofenyylioksi
Bzl	= bentsyyli
ONB	= nitrobentsyylioksi
OSu	= sukkiiniamidi-N-oksi
Z	= bentsyylioksikarbonyyli.

III. Seuraavat lyhennykset on annettu käytetyille liuottimille tai reagensseille:

Bz	= bentseeni
To	= tolueeni
EtOH	= etanoli
Bu	= butanoli
Py	= pyridiini
Ac	= etikkahappo
EtOAc	= etyyliasetaatti
Fo	= muurahaishappo
Am	= amyylialkoholi
iPro	= isopropanoli
DMF	= dimetyyliformamidi
THF	= tetrahydrofuraani
DCCI	= disykloheksyylikarbodi-imidi
DCHU	= disykloheksyyliurea
TAA	= trietyyliamiini
TFA	= trifluori-etikkahappo
Wa	= vesi
NEM	= N-etyylimorfoliini
HOBt	= N-hydroksibentstriatsoli

IV. Seuraavia lyhennyksiä on käytetty aminohapporyhmille:

Met	= metionyyli
Met($\rightarrow$ O)	= metionyylin sulfoksidi
Met($\rightarrow$ O ₂)	= metionyylin sulfoni
Phe	= fenyyli-alanyyli
Tyr	= tyrosyyli
Lys	= lysyyli
Trp	= tryptofyyli
Gly	= glysyli
Val	= valyyli
Leu	= leusyyli
Ala	= alanyyli
Ile	= isoleusyyli
β -Ala-	= β -alanyyli
(α -Me)Ala	= α -metyyli-alanyyli.

V. Seuraavia lyhennyksiä on käytetty ryhmistä, jotka ovat sukua aminohappotähteille:

PPA	= N-(3-fenyylipropyyli)amino
PEA	= N-(2-fenyylietyyli)amino
HPEA	= N-(p-hydroksifenyylietyyli)amino
Amf	= N-(2-fenyyli-isopropyyli)amino, johdettu amfetamiinista
Tra	= N-(β -indolylietyyli)amino, johdettu tryptamiinista
desamino-Met	= desamino-metionyyli
desamino-Met($\rightarrow$ O)	= desamino-metionyylin sulfoksidi (tai 4-metyylisulfinyylibutyryyli)
desamino-Met($\rightarrow$ O ₂)	= desamino-metionyylin sulfoni (tai 4-metyylisulfonylibutyryyli).

Lähtöaineiden valmistus

I. N-terminaalinenosa

1. Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃

a). Boc-Ala-Ala-OMe: 20,79 g Boc-Ala-OH liuotetaan 150 ml:aan DMF. Jäähdyttämisen jälkeen -10°C :seen, lisätään 15,84 ml TAA, mitä seuraa 10,45 ml etyyliklooriformiaattia. Seosta sekoitetaan 10 minuuttia -10°C :ssa, minkä jälkeen lisätään liuos, jossa on 13,9 g H-Ala-OMe.HCl 150 ml:ssa DMF ja 14,4 ml:ssa TAA, reaktioseokseen ja seosta sekoitetaan vielä 15 minuuttia -10°C :ssa, kaksi tuntia 0°C :ssa ja lopuksi kahdeksan tuntia huoneen lämpötilassa. Jäähdyttämisen jälkeen -10°C :seen, TAA.HCl suodatetaan erilleen ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännös liuotetaan 250 ml:aan metyyliasetaattia ja pestään peräkkäin vedellä, HCl:llä (0,05N), K₂CO₃-liuoksella (5 %) ja NaCl-liuoksella (30 %). Kuivaamisen jälkeen Na₂SO₄:llä suodos haihdutetaan ja jäännös kiteytetään eetteri/petrolieetteristä.

Saalis 19,3 g; sulamispiste 108/110 $^{\circ}\text{C}$.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,50 SiO₂:lla.

b). H-Ala-Ala-OMe.HCl: 18,75 g Boc-Ala-Ala-OMe ((a):sta) liuotetaan 150 ml:aan meteenikloridia ja HCl johdetaan liuokseen 45 minuuttia jatkuvasti jäävedessä jäähdyttäen.

Suojaamattoman tuotteen saanto 14,3 g.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,01 SiO₂:lla.

c). Boc-Met-Ala-Ala-OMe: 15,8 g Boc-Met-N₂H₃, liuotettuna 150 ml:aan DMF, aktivoidaan -20°C:ssa 28,0 ml:lla 4,2N HCl THF:ssa ja 8,10 ml:lla isoamyylinitriittiä. 20 minuutin aktivoinnin jälkeen -15°C:ssa liuos neutraloidaan 14,5 ml:lla NEM, minkä jälkeen lisätään liuos, jossa on 14,3 g H-Ala-Ala-OMe.HCl ((b):sta) 75 ml:ssa DMF, ja leq. NEM. Sen jälkeen, kun pH on säädetty 7,2:een NEM:lla reaktioseosta pidetään 48 tuntia noin 4°C:ssa. 48 tunnin kuluttua NEM.HCl suodatetaan erilleen ja suodos haihdutetaan. Jäännös liuotetaan 300 ml:aan etyyliasetaattia, minkä jälkeen se pestään vedellä, 0,005N HCl:llä, 5-prosenttisella NaHCO₃:lla ja jälleen vedellä.

Kuivaamisen jälkeen Na₂SO₄:llä suodos haihdutetaan kuiviin ja jäännös kiteytetään etyyliasetaatti/petrolieetteristä (1:1).

Saanto 16,2 g; sulamispiste 128-129°C.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,46 SiO₂:lla.

d). Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃: 15,9 g Boc-Met-Ala-Ala-OMe (kohdasta c) liuotetaan 160 ml:aan metanolia ja lisätään 16,0 ml hydratsiinihydraattia. 3,5 tunnin sekoittamisen jälkeen lisätään 200 ml kuivaa eetteriä. Jäähdyttämisen jälkeen 0°C:seen suodatetaan jähmeä aine erilleen.

Saanto 12,6 g; sulamispiste 207-208°C.

Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5) 0,41 SiO₂:lla.

Seuraavat peptidit valmistetaan samalla tavalla kuin I.1:ssa esitettiin:

2. Boc-Ala-Ala-Ala-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,44
3. Boc-Val-Ala-Ala-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,40
4. Boc-Ala-Leu-Leu-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,38
5. Boc-Met-Ala-Leu-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,39
6. Boc-Met-Val-Val-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,38
7. Boc-Met(O ₂)-Ala-Ala-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,30
8. Desamino-Met-Ala-Ala-N ₂ H ₃ ;	
Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5)	= 0,34

9. Desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-N₂H₃;

Rf Am:iPro:Wa:ssa (10:4:5) = 0,23

II. C-terminaalinenosa

1. H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu:n synteesi

1) Z-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

10,03 g Z-D-Lys(Boc)-ONP liuotetaan 50 ml:aan DMF ja liuos lisätään jäädyttämisen jälkeen -20°C:seen liuokseen, jossa on 4,1 g H-Phe-OtBu 75 ml:ssa DMF. Yhden tunnin sekoittamisen jälkeen 0°C:ssa ja vielä 20 tunnin sekoittamisen jälkeen 20°C:ssa reaktioseos haihdutetaan. Keltainen jäännös liuotetaan etyyliasetaatti/veteen ja pestään 5-prosenttisella kaliumkarbonaatilla, vedellä, 5-prosenttisella sitruunahapolla ja jälleen vedellä. Orgaaninen faasi kuivataan ja haihdutetaan. Jäännös liuotetaan etyyliasetaattiin ja lisätään petrolieetteriä (40-60) kunnes liuos samenee. Syntynyt saostuma suodatetaan sen jälkeen erilleen.

Rf To:EtOH:ssa (9:1) = 0,63 (SiO₂).

2) H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

3 g dipeptidiä liuotetaan 60 ml:aan metanolia. Sen jälkeen, kun on lisätty 10-prosenttista palladium/hiiltä johdetaan vetyä, kunnes CO₂:n kehittyminen lakkaa (kaksi tuntia). Suodattamisen jälkeen hyflolla suodos haihdutetaan, jolloin saadaan vaahto.

Rf To:EtOH:ssa (9:1) = 0,21 (SiO₂).

3) Z-Phe-C-Lys(Boc)-Phe-OtBu

2,18 g Z-Phe-ONP liuotetaan 15 ml:aan DMF. Sen jälkeen, kun on lisätty liuos, jossa on 2,24 g H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu (kohdassa 2) 30 ml:ssa DMF, seosta sekoitetaan 15 minuuttia 20°C:ssa.

Keltaisen liuoksen kuiviin haihduttamisen jälkeen jäännös liuotetaan 15 ml:aan etyyliasetaattia, minkä jälkeen lisätään 50 ml petrolieetteriä. Seoksen annetaan tämän jälkeen seistä kahdeksan tuntia 0°C:ssa, minkä jälkeen muodostunut saostuma suodatetaan erilleen. Sulamispiste 135-138°C.

4) H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

2,5 g kohdassa 3) saatua tripeptidiä hydrataan kohdassa 2) kuvatulla tavalla.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,38 (SiO₂).

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

1) Z-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

Z-Leu-ONP (3,2 g) liuotetaan 40 ml:aan DMF. 3,6 g H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu lisätään sitten liuokseen, minkä jälkeen seosta sekoitetaan 20 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseoksen haihduttamisen jälkeen jäännös liuotetaan 100 ml:aan etyyliasetaattia ja saatu liuos pestään 10-prosenttisella K_2CO_3 -liuoksella, 30-prosenttisella NaCl-liuoksella, sitruunahappoliuoksella ja jälleen 30-prosenttisella NaCl-liuoksella. Etyyliasetaattiliuos kuivataan sitten ja haihdutetaan pienempään tilavuuteen, minkä jälkeen väkevöitteeseen lisätään petrolieetteriä. Muodostunut saostuma suodatetaan erilleen. Sulamispiste $102-105^\circ C$.

Saanto 4,8 g.

2) H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

Kohdassa 1) saatu tripeptidi hydrataan Pd/C (10 %) katalyyttinä kohdalla II.1.2. kuvatulla tavalla.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,41 SiO_2 :lla.

3. H-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

2,8 g Z-Ala-ONP liitetään 3,6 g:aan H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu samalla tavalla kuin kohdassa 2 kuvattiin ja saatu suojattu tripeptidi hydrataan.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,37 SiO_2 :lla.

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

1. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

Z-Leu-D-Lys(Boc)-Tra saadaan II.1.3:ssa kuvatulla tavalla lähtien 3,1 g:sta Z-Leu-ONP ja 3 g:sta H-D-Lys(Boc)-Tra (valmistettu Z-D-Lys(Boc)-Tra:sta).

Saanto 65 %.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,72 SiO_2 :lla.

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

2 g peptidiä (kohdasta 1) liuotetaan 25 ml:aan metanolia ja hydrataan 10-prosenttisen palladium/hiilen läsnäollessa II.1.2:ssa kuvatulla tavalla. Kuiviin haihduttaminen antaa vaahdon.

Saanto 95 %.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,47 (SiO_2).

5. H-Phe-D-Lys(Boc)-Tra

Samoin kuin 4:ssä.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,33.

6. H-Ala-D-Lys(Boc)-Tra

Samoin kuin 4:ssä.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,35.

7. H-Tyr-D-Lys(Boc)-Tra

Samoin kuin 4:ssä.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,24.

8. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe; H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

1. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe

5,57 g Z-Leu-OH liuotetaan 50 ml:aan DMF ja liuoksen jäädyttämisen jälkeen 0°C:seen lisätään 3,0 ml TAA ja 2,0 ml etyyliklooriformiaattia. Reaktioseosta sekoitetaan 15 minuuttia, minkä jälkeen lisätään 8,64 g H-D-Lys(Boc)-Trp-OMe 50 ml:ssa DMF -10°C:ssa ja seosta sekoitetaan tässä lämpötilassa 30 minuuttia. Vielä kaksituntisen sekoittamisen jälkeen 0°C:ssa ja sen jälkeen noin viiden tunnin sekoittamisen jälkeen huoneen lämpötilassa seos suodatetaan ja suodos haihdutetaan. Jäännös liuotetaan sitten etyyliasetaattiin ja saatu liuos pestään peräkkäin vedellä, 5-prosenttisellä NaHCO₃-liuoksella, vedellä, 0,1N HCl:llä ja 30-prosenttisellä NaCl-liuoksella.

Liuos kuivataan sitten ja haihdutetaan (öljy).

Saanto 10,5 g.

Rf To:EtOH:ssa (9:1) = 0,41 SiO₂:lla.

2. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

Tripeptidiesteri kohdasta 1 (5 g) liuotetaan 100 ml:aan dioksaaania, minkä jälkeen lisätään 15,3 ml 0,94N NaOH. Reaktioseosta sekoitetaan kaksi tuntia huoneen lämpötilassa ja pH säädetään 7:ään 2N HCl:llä. Dioksaani poistetaan sen jälkeen haihduttamalla ja jäännökseen lisätään etyyliasetaatti/vettä. Seos (vesipitoinen kerros) tehdään sitten happameksi (pH 2) erottamatta kerroksia. Orgaaninen faasi pestään 10-prosenttisellä NaCl-liuoksella ja kuivataan sitten. Poistamalla liuotin tislamalla saadaan vaahto.

Saanto 3,8 g.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,38 SiO₂:lla.

3. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

3,15 g kohdassa 2 saatua tripeptidiä liuotetaan 50 ml:aan DMF ja 1,67 ml:aan 4N HCl. Sitten liuokseen lisätään 50 mg Pd/C (10 %) ja sen läpi johdetaan vetyä neljä tuntia. Katalyytti suodatetaan sitten eroon ja suodos haihdutetaan (öljy).

Rf To:EtOH:ssa (9:1) = 0,10 SiO₂:lla.

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe

Peptidiesteri kohdasta 1 hydrataan kohdassa 3 kuvatulla tavalla, jolloin saadaan öljy.

Rf Am:Py:Wa:ssa (5:3:2) = 0,29 SiO₂:lla.

9. H-Leu-D-Lys(Boc)-fenyylialkyyliamidien valmistus

1. Z-D-Lys(Boc)-PPA

10,33 g (20,6 mmoolia) Z-D-Lys(Boc)-ONP liuotetaan 80 ml:aan meteenikloridia n. 0°C:ssa. Sitten lisätään 2,7 g 3-fenyylipropyyliamiinia tähän liuokseen, minkä jälkeen seosta sekoitetaan 1,5 tuntia 0°C:ssa ja vielä 18 tuntia huoneen lämpötilassa. Liuotin poistetaan haihuttamalla ja jäännös liuotetaan 200 ml:aan etyyliasetaattia. Etyyliasetaattiliuos pestään nyt peräkkäin natriumkarbonaattiliuoksella (10 %), NaCl-liuoksella (30 %), 0,1N HCl:llä ja 30-prosenttisella NaCl-liuoksella, minkä jälkeen etyyliasetaattikerros kuivataan ja haihdutetaan n. 80 ml:n tilavuuteen. Sitten lisätään riittävästi eetteriä aikaansaamaan samentuminen ja seos pannaan jääkaappiin. Muodostunut sakka suodatetaan pois kahden tunnin kuluttua.

Rf Bz:EtOH:ssa (9:1) = 0,50 SiO₂:lla.

2. H-D-Lys(Boc)-PPA

8,75 g kohdassa 1 saatua yhdistettä liuotetaan 120 ml:aan metanolia, johon on lisätty 1,2 g 10-prosenttista palladium/hiiltä. Sitten johdetaan liuoksen läpi vetyä 3,5 tuntia sekoittaen, minkä jälkeen katalyytti suodatetaan pois. Suodoksen haihuttamisen jälkeen saadaan miltei väritön öljy, joka välittömästi käytetään jatkoreaktioita varten.

Rf Am:Fo:Wa:ssa (7:2:1) = 0,54 SiO₂:lla.

3. Z-Leu-D-Lys(Boc)-PPA

6,39 g kohdassa 2 saatua suojattua aminohappojohdannaisista liuotetaan 68 ml:aan dimetyyliformamidia ja lisätään liuos, jossa on 7,0 g Z-Leu-ONP 20 ml:ssa dimetyyliformamidia. Seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa

20 tuntia, minkä jälkeen liuotin poistetaan haihduttamalla tyhjöissä. Jäänös liuotetaan 170 ml:aan etyyliasetaattia ja pestään peräkkäin 5-prosenttisella kaliumkarbonaattiliuoksella, 30-prosenttisella NaCl-liuoksella, 0,1N HCl:llä ja 30-prosenttisella NaCl-liuoksella. Etyyliasetaattikerros kuivataan sitten Na_2SO_4 :llä ja haihdutetaan.

Rf Bz:EtOH:ssa (8:2) = 0,64 SiO_2 :lla.

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-PPA

9,0 g kohdassa 3 saatua peptidi-johdannaista liuotetaan 300 ml:aan dimetyyliformamidia, johon on lisätty 4 ml 4N HCl ja 1,5 g 10-prosenttista palladium/hiiltä. Sitten johdetaan sekoittaen vetyä 3,5 tuntia, minkä jälkeen katalyytti suodatetaan pois ja suodos haihdutetaan antamaan miltei väritön öljy.

Rf Bu:Ac:Wa:ssa (4:1:1) = 0,55 SiO_2 :lla.

5. Seuraavat valmistetaan vastaavalla tavalla:

1. H-Leu-D-Lys(Boc)-L-Amf;

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,50 SiO_2 :lla.

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-PEA;

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,42 SiO_2 :lla.

3. H-Leu-D-Lys(Boc)-HPEA;

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,34 SiO_2 :lla.

10. H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH:n synteesi

a). Z-Phe-D-Lys(Boc)-OMe: 29,9 g Z-Phe-OH ja 14,8 g HOBt liuotetaan 200 ml:aan DMF. Jäähdyttämisen jälkeen -22°C :seen lisätään peräkkäin seuraavat: liuos, jossa on 32,6 g H-D-Lys(Boc)-OMe.HCl 210 ml:ssa DMF ja leq. TAA:ssa, sekä liuos, jossa on 22,7 g DCCI 100 ml:ssa DMF. Seosta sekoitetaan 15 minuuttia -22°C :ssa, kaksi tuntia 0°C :ssa ja n. 16 tuntia huoneen lämpötilassa.

Jäähdyttämisen jälkeen muodostunut DCHU suodatetaan pois ja suodos haihdutetaan. Jäänös liuotetaan etyyliasetaattiin ja pestään vedellä, 5-prosenttisella sitruunahapolla, 5-prosenttisella natriumbikarbonaatilla ja jälleen vedellä, minkä jälkeen liuos haihdutetaan ja kiteytetään.

Saanto: 51,6 g; sulamispiste $122-123^\circ\text{C}$.

b). Z-Phe-D-Lys(Boc)-OH: 13,7 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-OMe kohdasta a).

liuotetaan 180 ml:aan dioksaani/ H_2O (9:1) ja lisätään 15 ml 2N NaOH.

Seosta sekoitetaan kaksi tuntia huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen reak-

tioseoksen pH asetetaan 7:ään NHCl :llä. Reaktioseoksen tilavuus pienennetään sen jälkeen n. 50 ml:ksi (dioksaani-vapaa) ja lisätään 250 ml etyyliasettaattia. Seos pestään vedellä ja kuivataan Na_2SO_4 :llä. Na_2SO_4 suodattetaan pois ja suodos haihdutetaan. Jäännös kiteytetään eetteri/petrolieetteristä (1:3).

Saanto: 11,3 g; sulamispiste $72-75^\circ\text{C}$.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,12 SiO_2 :lla, ja Am:Py:Wa:ssa (5:3:2) = 0,69 SiO_2 :lla.

c). Boc-Phe-Gly-OBzl: leq. NEM, jota seuraa liuos, jossa on 25,5 g Boc-Phe-ONP 100 ml:ssa DMF, lisätään liuokseen, jossa on 12,6 g H-Gly-OBzl.HCl 100 ml:ssa DMF. Sekoittamisen jälkeen yli yön huoneen lämpötilassa reaktioseos haihdutetaan. Jäännös liuotetaan 300 ml:aan etyyliasettaatti/vettä (5:1) ja pestään vedellä.

Kuivaamisen jälkeen Na_2SO_4 :llä suodoksen tilavuus alennetaan haihduttamalla n. 100 ml:ksi, minkä jälkeen lisätään 50 ml petrolieetteriä ja 250 ml kuivaa eetteriä.

Saanto: 16,7 g; sulamispiste $126-127^\circ\text{C}$.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,56 SiO_2 :lla.

d). H-Phe-Gly-OBzl.HCl: 8,25 g Boc-Phe-Gly-OBzl liuotetaan 120 ml:aan meteenikloridia ja HCl-kaasua johdetaan liuokseen sekoittaen ja jäädyttään (jää/vesi) yksi tunti.

Tunnin kuluttua HCl:n johtaminen lopetetaan ja reaktioseos haihdutetaan.

Saanto: 6,98 g vahtomaista tuotetta.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,33 SiO_2 :lla.

e). Z-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OBzl: Menetelmä sama kuin kohdassa a). kuvattu menetelmä. Tarvittavat reagoivat aineet: 9,25 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-OH (kohdasta b.), 2,92 g HOBt 6,98 g H-Phe-Gly-OBzl.HCl ja 4,12 g DCCI. Kiteyttäminen etyyliasettaatti/petrolieetteristä.

Saanto: 12,0 g; sulamispiste $157-159^\circ\text{C}$.

Rf To:EtOH:ssa (8:2) = 0,39 SiO_2 :lla.

f). H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH: 4,11 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OBzl liuotetaan 75 ml:aan DMF. Pd/C:n lisäämisen jälkeen johdetaan vetyä kolme tuntia. Katalyytti suodatetaan pois hyflo/asbestilla ja suodos haihdutetaan.

Saanto 2,9 g.

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,46 SiO₂:lla.

Seuraavat peptidit valmistetaan edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla:

11. H-Trp-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH;

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,52 SiO₂:lla.

12. H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH;

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,40 SiO₂:lla.

13. H-Val-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH;

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,42 SiO₂:lla.

14. H-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH;

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,37 SiO₂:lla.

15. H-Tyr-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH;

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,48 SiO₂:lla.

Esimerkki I

H-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH

a). Boc-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH (I.1. + II.14)

1,62 g Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃ liuotetaan 20 ml:aan DMF. Jäähdyttämisen jälkeen -20°C:seen lisätään 1,68 ml 4,74N HCl/THF, mitä seuraa 0,60 ml isoamyyliinitriittiä, ja seosta sekoitetaan 20 minuuttia -15°C:ssa, minkä jälkeen lisätään 0,6 ml NEM, mitä seuraa liuos, jossa on 2,3 g H-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH 20 ml:ssa DMF ja 1,68 ml 4,74N HCl/THF. Reaktioseoksen pH säädetään 7,2:een NEM:lla, minkä jälkeen reaktioseosta pidetään kaksi päivää n. 4°C:ssa. NEM.HCl suodatetaan sitten pois ja suodos haihdutetaan. Jäännös liuotetaan 125 ml:aan sek.butanoli/CHCl₃ (2:3) ja 25 ml:aan H₂O ja saatu liuos pestään peräkkäin vedellä, 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella ja jälleen vedellä. Kuivaamisen jälkeen Na₂SO₄:llä suodos haihdutetaan. Jäännös liuotetaan 40 ml:aan metanolia, johon sitten lisätään 160 ml vettä, minkä jälkeen jähmeä aine suodataan erilleen ja kuivataan.

Saanto 2,6 g; sulamispiste 202-203°C (hajoaa).

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,62 SiO₂:lla.

b). H-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-OH-asetaatti

2,6 g kohdassa a). Saatua peptidiä liuotetaan 25 ml:aan 90-prosent-

tista TFA. 45-minuuttisen sekoittamisen jälkeen huoneen lämpötilassa typpiatmosfäärissä liuos lisätään tiputtaen 250 ml:aan kuivaa eetteriä. Syntynyt sakka suodatetaan erilleen ja kuivataan, minkä jälkeen kiinteä aine liuotetaan 40 ml:aan tert. butanoli/vettä (1:1) ja saatua liuosta sekoitetaan ioninvaihtohartsin kanssa asetaattimuodossa. 30 minuutin sekoittamisen jälkeen ioninvaihtohartsi suodatetaan pois ja suodos haihdutetaan. Jäännös puhdistetaan sitten vastavirtaperiaatteella.

Saanto 78 %.

Rf Bu:Py:Ac:Wa:ssa (4:0,75:0,25:1) = 0,25 SiO₂:lla.

Esimerkki II

Seuraavat peptidit valmistetaan asetaattisuoloinaan tavalla, joka vastaa esimerkissä I kuvattua:

- | | |
|---|---------------|
| 1. H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.1 + II.10) |
| Rf = 0,24 | |
| 2. H-Met-Ala-Ala-Trp-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.1 + II.11) |
| Rf = 0,27 | |
| 3. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.1 + II.12) |
| Rf = 0,22 | |
| 4. H-Met-Ala-Ala-Val-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.1 + II.13) |
| Rf = 0,18 | |
| 5. H-Met-Ala-Ala-Tyr-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.1 + II.15) |
| Rf = 0,23 | |
| 6. H-Ala-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.2 + II.10) |
| Rf = 0,21 | |
| 7. H-Val-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.3 + II.10) |
| Rf = 0,26 | |
| 8. H-Ala-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.2 + II.14) |
| Rf = 0,20 | |
| 9. H-Ala-Leu-Leu-Leu-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.4 + II.12) |
| Rf = 0,19 | |
| 10. H-Met-Ala-Leu-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.5 + II.10) |
| Rf = 0,18 | |
| 11. H-Met-Val-Val-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.6 + II.10) |
| Rf = 0,22 | |
| 12. H-Met(O ₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH | (I.7 + II.10) |
| Rf = 0,16 | |

13. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.8 + II.10)

Rf = 0,36

14. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH

Rf = 0,28

Esimerkki III

Seuraavat peptidit valmistetaan asetaatti-suoloinaan tavalla, joka vastaa esimerkissä I kuvattua:

1. H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.1 + II.1)
Rf = 0,27
2. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Phe-OH (I.1 + II.2)
Rf = 0,28
3. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-OH (I.7 + II.3)
Rf = 0,18
4. H-Met-(O₂)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Tra (I.7 + II.4)
Rf = 0,11
5. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Tra (I.8 + II.5)
Rf = 0,14
6. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Tra (I.9 + II.6)
Rf = 0,18
7. H-Met-Ala-Leu-Tyr-D-Lys-Tra (I.5 + II.7)
Rf = 0,17
8. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OMe (I.1 + II.8)
Rf = 0,31
9. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OH (I.1 + II.8.3)
Rf = 0,18
10. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PPA (I.1 + II.9.4)
Rf = 0,22
11. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-L-Amf (I.1 + II.9.5.1)
Rf = 0,24
12. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PEA (I.1 + II.9.5.2)
Rf = 0,21
13. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-HPEA (I.1 + II.9.5.3)
Rf = 0,26
14. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.7 + II.1)
Rf = 0,19

15. H-Ala-Leu-Leu-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.4 + II.1)

Rf = 0,32

16. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.8 + II.1)

Rf = 0,35

Ellei toisin ole osoitettu, ovat Rf:n arvot, jotka on annettu esimerkeissä II ja III, eluentille Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) SiO₂:lla.

Esimerkki IV

Sulfoksidit

0,06 mmoolia peptidiä liuotetaan 5 ml:aan etikkahappoa ja liuokseen lisätään 15 µl 30-prosenttista vetyperoksidia ja liuosta sekoitetaan tunti huoneen lämpötilassa. Sitten lisätään suspensio, jossa on 20 mg platinamustaa 2,5 ml:ssa jääetikkaa. Seosta sekoitetaan 30 minuuttia, min-kä jälkeen se suodatetaan. Suodos haihdutetaan tyhjössä ja jäännös lisätään 10 ml:aan tert.butanoli/vettä. Seos lyofiloidaan sitten. Seuraavien peptidien asetaatit valmistetaan tällä tavalla.

1. H-Met(0)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH

Rf = 0,12

2. H-Met(0)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH

Rf = 0,10

3. H-Met(0)-Ala-Leu-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH

Rf = 0,11

4. desamino-Met(0)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH

Rf = 0,26

5. H-Met(0)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH

Rf = 0,13

6. desamino-Met(0)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Tra

Rf = 0,15

7. H-Met(0)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PPA

Rf = 0,08

8. desamino-Met(0)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH

Rf = 0,19

9. H-Met(0)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OMe

Rf = 0,21

Rf-arvot on annettu Bu:Py:Ac:Wa:lle (4:0,75:0,25:1) SiO₂:lla.

Esimerkki VSulfonit

0,2 mmoolia peptidiä liuotetaan seokseen, jossa on 0,5 ml vettä, 0,1 ml 4N perkloorihappoa ja 0,02 ml 0,5M ammoniummolybdaattia, minkä jälkeen lisätään 0,06 ml 30-prosenttista vetyperoksidia tähän seokseen. Seosta sekoitetaan kaksi tuntia n. 10°C:n lämpötilassa, minkä jälkeen se laimennetaan 25 ml:lla tert.butanoli/vettä. Ioninvaihtoharts (Dowex X-8 asetaattimuodossa) lisätään sitten seokseen, jota sekoitetaan 30 minuuttia. Seos suodatetaan sen jälkeen ja suodos lyofiloidaan. Tällä tavalla valmistetaan seuraavat asetaatit:

1. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,18
2. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,20
3. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,23

Annetut Rf-arvot ovat Bu:Py:Ac:Wa:lle (4:0,75:0,25:1) SiO₂:lla.

Esimerkki VISinkkikompleksit

1,5 ml sinkkikloridin liuosta, joka sisältää 50 mg sinkkiä/ml, lisätään liuokseen, jossa on 31,5 mg Na₂HPO₄·2H₂O 30 ml:ssa tislattua vettä. Näin muodostunut sinkkifosfaattisakka liuotetaan uudelleen lisäämällä 4N HCl, minkä jälkeen seokseen lisätään 175 mg NaCl ja 0,5 g bentsyylialkoholia. Tähän seokseen liuotetaan sitten 1,5 mg heksapeptidiä H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (esimerkki III.1) ja sen jälkeen lisätään riittävästi N natriumhydroksidia seoksen pH:n säätämiseksi 8,5:een. Tilavuus täydennetään sitten 50 ml:ksi tislattulla vedellä.

1 ml suspensiota sisältää:

30 µg heksapeptidiä

1,5 mg sinkkiä

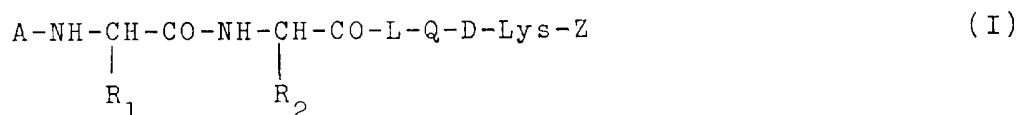
0,63 mg Na₂HPO₄·2H₂O

3,5 mg NaCl

10 mg bentsyylialkoholia

Patenttivaatimus

Menetelmä uusien psykofarmakologisesti aktiivisten peptidijohdannaisten valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa

A on H-L-Met, H-L-Met($\rightarrow$ O), H-L-Met($\rightarrow$ O₂), desamino-Met, desamino-Met($\rightarrow$ O), desamino-Met($\rightarrow$ O₂) tai ryhmä H₂N-B-CO,

B on haaroittunut tai suoraketjuinen 1-6 hiiliatomia sisältävä alkyyleeni tai 1-6 hiiliatomia sisältävä alkylideeni,

Q on aminohappotähde -NH-CHR-CO, jossa R merkitsee 1-4 hiiliatomia sisältävää alkyyliä p-hydroksifenyyylimetyyliä, 3-indolyylimetyyliä tai fenyyylimetyyliä, R₁ ja R₂ merkitsevät vetyä tai 1-4 hiiliatomia sisältävää alkyyliä, ja

Z on N-(fenyylietyyli)amino, N-(β-indolylietyyli)amino, L-Trp-OH, L-Phe-OH, L-Trp-Gly-OH tai L-Phe-Gly-OH,

tai niiden toiminnallisten johdannaisten valmistamiseksi, joita ovat farmaseuttisesti hyväksyttävät happoadditiosuolat, alifaattisesta C₁₋₆-karboksyylihaposta johdetut asyylijohdannaiset, substituotomat tai alemmalla alkyylillä (1-6 C) substituoidut amidit, 1-8 hiiliatomia sisältävistä alifaattisista alkoholeista johdetut esterit, sekä metallikompleksit, jotka on saatu saattamalla peptidi kosketukseen koboltin, nikkelin, kuparin, raudan tai edullisesti sinkin niukkaliukoisen suolan, hydroksidin tai oksidin kanssa, t u n n e t t u siitä, että tarvittavat aminohapot, karboksyylihapot, amiinit tai peptidifragmentit yhdistetään oikeassa järjestyksessä

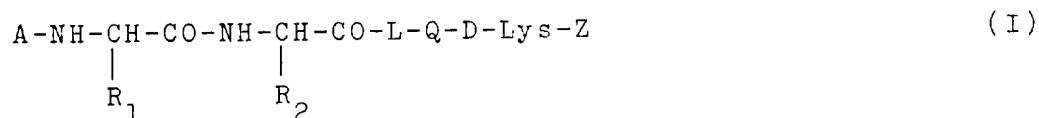
a) kondensoimalla kondensoimisaineen läsnäollessa yhdiste (aminohappo, peptidi), joka sisältää vapaan karboksyyli-ryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on suojattu, yhdisteen kanssa (aminohappo, peptidi tai amiini), joka sisältää vapaan aminoryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät samoin on suojattu, tai

b) kondensoimalla yhdiste (aminohappo, peptidi), joka sisältää aktivoitua karboksyyli-ryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on valinnaisesti suojattu, yhdisteen (aminohappo, peptidi, amiini)

kanssa, joka sisältää vapaan aminoryhmän ja jossa muut reaktiiviset ryhmät on suojattu; minkä jälkeen mahdollinen suojaryhmä (mahdolliset suojaryhmät) poistetaan, ja sen jälkeen näin saatu peptidi mahdollisesti muutetaan edellä määritellyksi toiminnalliseksi johdannaiseksi ja/tai saatu peptidi hapetetaan vastaavaksi peptidisulfoksidiksi tai peptidisulfoniksi, jälkimmäiseksi siinä tapauksessa, että N-terminaalinen ryhmä A on Met tai desamino-Met.

Patentkrav

Förfarande för framställning av nya psykofarmakologiskt aktiva peptidderivat med formeln



vari

A är H-L-Met, H-L-Met($\rightarrow$ O), H-L-Met($\rightarrow$ O₂), desamino-Met, desamino-Met($\rightarrow$ O), desamino-Met($\rightarrow$ O₂) eller en grupp H₂N-B-CO,

B är en förgrenad eller rakkedjad alkylen innehållande 1-6 kolatomer, eller alkyliden innehållande 1-6 kolatomer,

Q är en aminosyrarest -NH-CHR-CO, vari R betyder alkyl med 1-4 kolatomer, p-hydroxifenylmetyl, 3-indolylmetyl eller fenylmetyl, R₁ och R₂ betyder väte eller alkyl med 1-4 kolatomer, och

Z är N-(fenyletyl)amino, N-(β -indolyletyl)amino, L-Trp-OH, L-Phe-OH, L-Trp-Gly-OH eller L-Phe-Gly-OH,

eller deras funktionella derivat, vilka utgörs av farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalter, acylderivat härledda från en alifatisk C₁₋₆-karboxylsyra, osubstituerade eller med en lägre alkyl (1-6 C) substituerade amider, estrar härledda från alifatiska alkoholer med 1-8 kolatomer, samt metallkomplex, vilka har erhållits genom bringande av peptiden i kontakt med ett svårlösligt salt, hydroxid eller oxid av kobolt, nickel, koppar, järn eller företrädesvis zink, k ä n n e - t e c k n a t därav, att de erforderliga aminosyrorna, karboxylsyror, aminosyrorna och peptidfragmenten förenas i riktig ordning

a) genom att kondensera i närvaro av ett kondenseringsmedel en förening (aminosyra, peptid), vilken innehåller en fri karboxylgrupp och i vilken de andra reaktiva grupperna är skyddade, med en förening (aminosyra, peptid eller amin), vilken innehåller en fri aminogrupp och i vilken de andra reaktiva grupperna på samma sätt är skyddade, eller

b) genom att kondensera en förening (aminosyra, peptid), vilken innehåller en aktiverad karboxylgrupp och i vilken de andra reaktiva grupperna valfritt är skyddade, med en förening (aminosyra, peptid, amin), vilken innehåller en fri karboxylgrupp och i vilken

de andra reaktiva grupperna är skyddade, varefter den eventuella skyddsgruppen (de eventuella skyddsgrupperna) avlägsnas, och därefter omvandlas den så erhållna peptiden eventuellt till ett ovan definierat funktionellt derivat och/eller den erhållna peptiden oxideras till en motsvarande peptidsulfoxid eller peptidsulfon, till den senare i det fall att den N-terminala gruppen A är Met eller desamino-Met.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—