

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 803849 A7**

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

(21)	Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application	803849
(51)	Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification C07C	
(22)	Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date	10.12.1980
(23)	Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date	10.12.1980
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public	15.06.1981
(43)	Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date	12.06.2019
(32) (33) (31)	Etuoikeus - Prioritet - Priority	
	14.12.1979 CH 11096/79-6	

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • CIBA-GEIGY AG, TOWN UNKNOWN, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Rink, Hans, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • Sieber, Peter, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • Kamber, Bruno, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

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

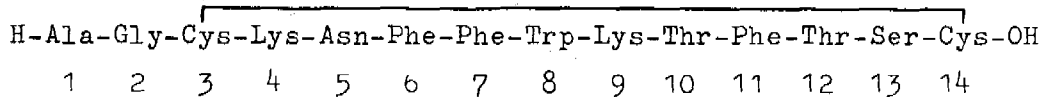
Uudet asyylpeptidit, niistä valmistetut farmaseuttiset valmisteet, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö.

Nya acylpeptider, farmaceutiska preparat därav, förfarande för deras framställning och deras användning

Uudet asyylipeptidit, niistä valmistetut farmaseuttiset valmisteet, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö - Nya acylpeptider, farmaceutiska preparat därav, förfarande för deras framställning och deras användning

- 5 Keksinnön kohteena ovat uudet somatostatiinista ja sen analogeista johdetut asyylipeptidit, menetelmä näiden asyylipeptideiden valmistamiseksi, näitä sisältävät farmaseuttiset valmisteet sekä näiden yhdisteiden tai vast. valmisteiden käyttö terapeuttisiin tarkoituksiin. Keksinnön mukaiset asyylipeptidit ovat somatostatiinin ja siitä johdettujen analogien johdannaisia, joissa 9-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä ja mahdollisesti myös 4-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä ja/tai N-terminaalinen aminoryhmä on substituoitu jonkin karbonihapon tähteellä, jolloin somatostatiinin aminohappojärjestys voi olla modifioitu jättämällä pois yksittäisiä aminohappoja tai vaihtamalla ne toisiksi aminohapoiksi.

Somatostatiini, kaavan



- 20 mukainen syklinen tetradekapeptidi [*Science* 179, 77 (1973)] estää tunnetusti kasvuhormonin (somatotropiinin) hypofyysin ohjaamaa sekreetiota. Tämän lisäksi se estää endokriinisen haiman sekretorista aktiivisuutta, kuten insuliinin ja glukagonin sekreetiota. Nämä arvokkaat ominaisuudet eivät pääse itse somatostatiinissa täysin käytännön käyttöön, koska tällä yhdisteellä on liian lyhyt vaikutusaika. Tämän lisäksi pidetään usein parempana sitä, että vaikuttava aine vaikuttaa estävästi pääasiassa yhteen mainituista hormoneista. Tästä syystä pyritäänkin modifioimalla perusjärjestystä, etenkin jättämällä pois yksittäisiä alkuperäisiä aminohappoja ja/tai vaihtamalla ne toisiksi, usein myös "epäluonnollisiksi" aminohapoiksi saavuttamaan estovaikutuksen dissosiointi sekä mahdollisimman pitkä vaikutuksen kesto.

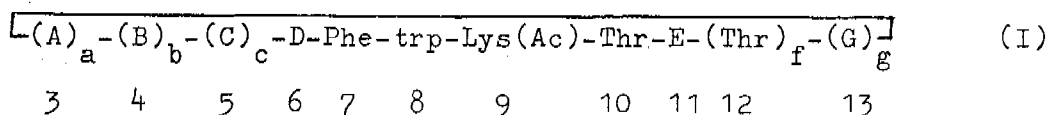
Yllättäen todettiin nyt, että muuntamalla aivan epätavallisesti perusrakennetta, nimittäin asyloimalla somatostatiinin tai

sen samalla tavoin vaikuttavien rakenneanalogien 9-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä mahdollisesti substituoidun alkaanikarbonihapon kanssa muodostuu asyylipeptidi, jossa ei ainoastaan säily perusrakenteen alkuperäinen aktiivisuus, vaan usein sitä myös parannetaan ja syvennetään edelleen yllä esitettyssä merkityksessä, etenkin vaikutuksen kestoon nähden. Tällainen tulos yllättää sitäkin enemmän, koska siten kumotaan Lys⁹-tähteen pääteasemassa olevan aminoryhmän emäksinen luonne, jota pidetään välttämättömänä somatostatiinin ja analogisten vaikuttavien aineiden biologiselle vaikutukselle.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat usein myös teknisesti edullisia, koska niiden pienemmistä rakenne-elementeistä tapahtuvassa synteesissä ei tarvita kyseisten aminoryhmien, etenkin lysiinitähteissä olevien ϵ -aminoryhmien selektiivistä suojaa ja siten synteesiä yksinkertaistetaan.

Tästä näkökannasta lähdettäessä pidetään keksinnön mukaisista asyylipeptideistä yleensä, sekä myöhemmin erityisesti hyvinä pidetyistä edustajista edullisina sellaisia, joissa kaikissa kyseeseen tulevilla aminoryhmissä on sama asyylihäde.

Keksinnön kohteena ovat etenkin somatostatiinista ja sen analogeista johdetut, yleisen kaavan (I)



mukaiset asyylipeptidit, jolloin

Ac merkitsee mahdollisesti substituoidun alkaanikarbonihapon vapaassa aminoryhmässä olevaa asyylihähdettä,

A merkitsee osakaavan Ala¹-Gly²-Cys³- -cys¹⁴-OH,

Ac-Ala¹-Gly²-Cys³- -cys¹⁴-OH, H-Cys³- -cys¹⁴-OH,

Ac-Cys³- -cys¹⁴-OH tai Bmp- -cys¹⁴-OH mukaista tähdettä

(jolloin cys merkitsee ryhmää L-Cys tai D-Cys ja Bmp merkitsee desaminosysteini-tähdettä), tai osakaavan -NH-CH(R)-(CH₂)_n-CO mukaisen ω -aminoalempialkaanikarbonihapon tähdettä (jossa n merkitsee jotakin kokonaisluvusta

- O - 6 ja R merkitsee vetyä tai karboksyyliä), mikä myös jos $n = 2$ ja R on vetyä, voi olla substituoitu sykklisellä hydrokarbyylitähteellä ja tällaisessa tapauksessa sitä merkitään edelleen ryhmänä Gaba(Ar),
- 5 B merkitsee ryhmää Lys, Lys(Ac) tai Lys(X) (jolloin X merkitsee ϵ -aminosuojarahmää),
- C merkitsee ryhmää Asn, Ala tai His,
- D merkitsee ryhmää Phe, tai mikäli tähteessä A ei esiinny mitään rikkipitoisia aminohappotähteitä, se voi olla yhdessä
- 10 ryhmän E kanssa tähte $\overline{-Cys^6- -Cys^{11}-}$,
- trp merkitsee ryhmää L-Trp, D-Trp tai jotakin analogista tähdettä, joka sisältää indoliytimessä, esim. 5-asemassa halogeenin, etenkin fluorin,
- E merkitsee ryhmää Phe tai Tyr, tai sillä voi olla yhdessä
- 15 symbolin D kanssa yllä esitetty merkitys,
- G merkitsee ryhmää L-Ser, D-Ser tai jonkin korkeintaan 8 hiiliatomia sisältävän sekundäärisen α -aminohapon tähte, ja a, b, c, f ja g merkitsevät riippumattomasti lukua 0 tai 1.
- Samoin keksinnön kohteena ovat näiden asyylipeptidien ei-toksiset
- 20 suolat ja farmakologisesti käyttökelpoiset kompleksit.

Asyyliähteen Ac perustana olevalla alkaanikarbonihapolla on mieluummin korkeintaan 18 hiiliatomia, kun se on substituointon, ja mieluummin korkeintaan 8 hiiliatomia, kun se on substituoitu. Substituentteina ovat toisaalta hydroksyyli-, merkapto-,

25 alempialkyylimerkapto-, kuten metyylimerkapto-, guanidino-, karboksyyli-, karboksamido- ja ennen kaikkea primääriset aminoryhmät, tai jokin kahteen eri hiiliatomiin sitoutunut iminoryhmä, toisaalta mono- tai bisykliset hydrokarbyyli- tai heterosyklilyli-

30 tähteet, kuten etenkin fenyyli, p-hydroksifenyyli, 1- tai 2-naftyyli, 2-, 3- tai 4-pyridyyli, 2- tai 3-indolyli, 2- tai 4-imidatsolyli, 2-, 4- tai 5-tiatsolyli, 2-tienyyli tai 2-furyyli. Hapto voi sisältää yhden tai useamman samanlaisen tai erilaisen substituentin, jolloin hiiliatomeja mukaanlukien hiilipitoiset substituentit on mieluummin korkeintaan 18. Erityisen edullisia ovat

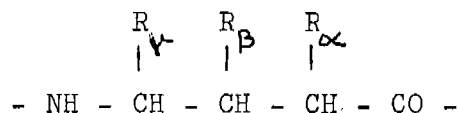
35 asyyliähteet, jotka on johdettu yksinkertaisesti haarautuneista tai etenkin suoraketjuisista substituomattomista alkaani-(mono-

tai di)-karbonihapoista, jolloin ensiksi mainituilla on korkeintaan 18, viimeksi mainituilla korkeintaan 9 hiiliatomia, kuten toisaalta etikka-, propioni-, voi-, isovoi-, valeriaana-, isovaleriaana-, kaproni-, enantyyli-, undekaani-, lauriini-, myristiini-, palmitiini- ja steariinihaposta ja toisaalta maloni-, meripihka-, glutaari-, adipiini-, pimeliini- ja korkkihaposta johdetut.

Erityisen edullisia ovat myös asyyliitähteet, jotka on johdettu luonnossa, etenkin peptidi-rakennneosina esiintyvistä L-muodon α -aminohapoista ja niiden läheisistä analogeista, kuten etenkin "epäluonnollisen" D-muodon enantiomeereistä. Edullisista α -aminohapoista tulevat aivan erityisesti kysymykseen esimerkiksi seuraavat: glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini, fenyylialaniini, asparagiinihappo, glutamiinihappo, arginiini, lysiini ja histadiini, edelleen β -alaniini, α -aminovoihappo, γ -aminovoihappo, norvaliini, isovaliini, norleusiini ja ornitiini sekä myös asparagiini, glutamiini, tyrosiini, tryptofaani, metioniini, treoniini, seriini ja aivan erityisesti myös proliini ja hydroksiproliini, joissa α -aminoryhmä on suljettu alkyylitähteen kanssa renkaaksi.

Symbolilla X merkityllä Lys⁴-tähteen ϵ -aminosuojarahmällä on myöhemmin esitettävät merkitykset. Se eroaa yllä karakterisoidusta asyyliiryhmästä Ac periaatteessa siten, että se on lohkaistavissa selektiivisesti vapautettaessa aminoryhmä, jota vastoin asyyliiryhmä Ac ei ole erotettavissa ϵ -aminoryhmästä haittaamatta samanaikaisesti peptidisiä amidi-sidoksia.

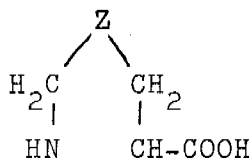
Ryhmänä Gaba(Ar) merkitty tähde määritellään lähemmin kaavan



avulla, jossa kulloinkin yksi symboleista R_α , R_β ja R_γ on jokin substituomaton tai substituoitu syklinen hydrokarbyylitähde Ar ja muut kaksi merkitsevät vetyä. Tähdettä Gaba(Ar) vastavalla substituoidulla γ -aminovoihapolla on lyhenteenä H-Gaba(Ar)-OH.

set erityisen edulliset tähteet seuraavista voihapoista: 4-amino-3-fenyyli-, 4-amino-3-sykloheksyyli-, 4-amino-3-(2-naftyyli)- ja ennen kaikkea 4-amino-3-(1-naftyyli)-voihaposta ja 4-amino-3-(3-fenoksifenyyli)-voihaposta.

- 5 Symbolissa G mainittu sekundäärinen, korkeintaan 8 C-atomia sisältävä α -aminohappo on jokin α -alempialkyyliaminoalempialkyylikarbonihappo, jossa molemmat alempialkyyliähteet voivat olla yhdistetty yhteen C-C-sidoksen, happiatomin, rikki(II)atomin tai mahdollisesti alempialkyyloidun typpi-atomin avulla, jolloin kumpikin yksittäinen alempialkyyliähte sisältää korkeintaan 6 hiiliatomia ja kumpikin yhdessä korkeintaan 7 hiiliatomia. Alempialkyyliähteessä, joka on karbonihapon hiilirungon perustana on mielummin useampi kuin yksi C-atomi ja se on etenkin sellainen, joka esiintyy luonnollisissa aminohapoissa, kuten butyyli, iso-
- 10 butyyli, pentyyli ja etenkin etyyli tai isopentyyli. Alempialkyyli, joka esiintyy aminoryhmän tai typpisillan substituenttina, on mielummin metyyli. C-C-sidos, joka yhdistää mahdollisesti molemmat alempialkyyliähteet, on mielummin yksinkertainen sidos. α -aminoryhmä on mielummin sellaisessa steerisessä konfiguraatiossa,
- 15 joka vastaa luonnollisia aminohappoja, s.o. L-aminohappoja. Edullisina pidetään etenkin sellaisten sekundääristen α -aminohappojen tähteitä, jotka ovat tunnettuja luonnossa esiintyvänä aminohappoina, kuten ennen kaikkea L-proliini, tai ovat niille välittömästi rakenteellisesti analogisia, kuten toisaalta 4-oks-
- 20 ja etenkin kaavan

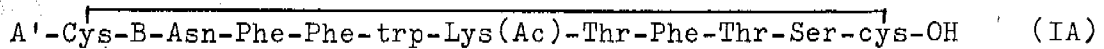


mukainen 4-tiaproliini, jossa Z on happi tai rikki, ja toisaalta jokin N-alempialkyyloitu, etenkin N-metyloitu, alifaattinen aminohappo, ennen kaikkea N-metyyli-L-leusiini.

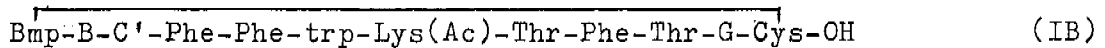
- 30 Keksinnön mukaisista asyylipeptideistä on korostettava etenkin niitä, jotka on johdettavissa sinänsä tunnetuista, eri-

tyisen arvokkaista somatostatiinin tapaisista peruspeptideistä ja jotka karakterisoidaan seuraavilla spesifisillä kaavoilla:

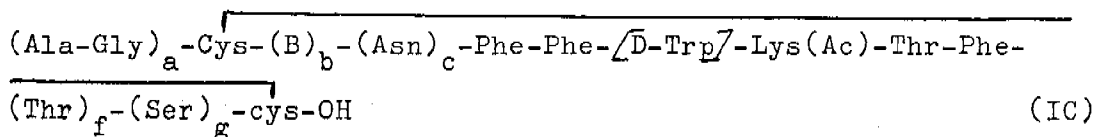
5 Siten on somatostatiini, D-Trp⁸-somatostatiini, $\overline{\Delta}$ D-Trp⁸-D-Cys¹⁴]-somatostatiini, $\overline{\Delta}$ (5-F)-D-Trp⁸]-somatostatiini ja des- $\overline{\Delta}$ Ala¹-Gly²]-somatostatiini kaavan IA mukaisten asyylipeptidien perustana:



10 jossa A' merkitsee Ala-Gly-, Ac-Ala-Gly-, H- tai Ac-ryhmiä ja ryhmillä Ac, B, trp ja cys on alussa mainitut merkitykset. Des- $\overline{\Delta}$ Ala¹-Gly²]-desamino-Cys³-somatostatiinista ja sen rakenneanalogeista on johdettu kaavan IB mukaiset asyylipeptidit:

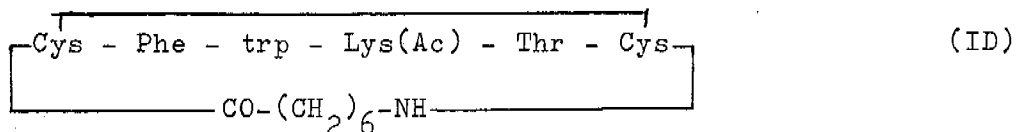


15 jossa ryhmillä Ac, Bmp, trp ja G on alussa mainitut merkitykset ja C' tarkoittaa ryhmää Asn tai His. Oligopeptideistä, joissa on jätetty yksi tai useampi aminohapoista pois $\overline{\Delta}$ D-Trp⁸]-somatostatiinin tai $\overline{\Delta}$ D-Trp⁸-D-Cys¹⁴]-somatostatiinin 1-, 2-, 4-, 5-, 12- ja 13-asemissa, on johdettavissa kaavan IC mukaiset asyylipeptidit:

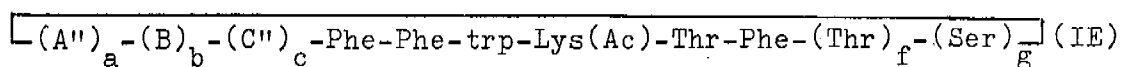


20 jossa ryhmillä Ac, B ja cys on alussa esitetyt merkitykset ja a, b, c, f ja g merkitsevät riippumattomasti lukua 0 tai 1.

(6-11)-systiini-siltoja sisältävistä analogeista ovat peräisin kaavan I mukaiset bisykliset asyylipeptidit, jossa A merkitsee ω -aminoheptaanihapon tähdettä $\overline{\text{Cys}^6 - \text{Cys}^{11}}$ -, a merkitsee lukua 1 ja b, c, f ja g merkitsevät lukua 0 ja jotka vastaavat kaavaa ID



jossa ryhmällä Ac ja trp on alussa mainitut merkitykset. Viimeksi ovat somatostatiini-renkaan aminohappojen vähintään 6 ja korkeintaan 11 osasekvenssiä sisältävät rikittömät syklopeptidit
 5 kaavan IE mukaisten asyylipeptidien perustana:

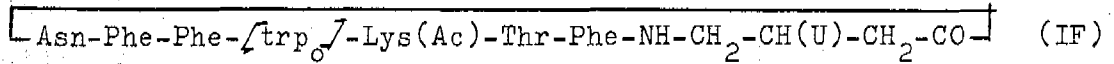


jossa a, b, c, f ja g merkitsevät riippumattomasti lukua 0 tai 1, ryhmällä Ac, trp ja B on alussa mainitut merkitykset, A'' merkitsee
 10 alussa karakterisoitua tähdettä $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ tai vast. Gaba(Ar) ja C'' merkitsee ryhmää Asn tai Ala.

Kaavan IE mukaisista asyylipeptideistä ovat etenkin ne edullisia, joissa ryhmällä Ac on alussa määritellyt yleiset ja erityisesti korostetut merkitykset, trp merkitsee ryhmää D-trp,
 15 A'' merkitsee ω -aminoalempialkaanikarbonihappo-tähdettä, jossa R tarkoittaa vetyä ja n on jokin kokonaisluvusta 0 - 3, B merkitsee ryhmää Lys, Lys(Ac) tai Lys(INOC) (jolloin INOC merkitsee ϵ -aminoryhmässä olevaa isonikotinyylioksikarbonyyliä), f ja ainakin yksi symboleista a, b, c ja g on yhtä kuin 1, jolloin muut mer-
 20 kitsevät riippumattomasti lukua 0 tai 1, kuten etenkin ne yhdisteet, joissa a = 0 ja b, c, f, g = 1 tai a, b = 0 ja c, f, g = 1, tai a, b, c = 0 ja f, g = 1 tai a, b, g = 0 ja c, f = 1.

Kaavan IE mukaisista asyylipeptideistä ovat aivan erityisen edullisia ne, joissa ryhmällä Ac on alussa määritellyt yleiset ja
 25 erityisesti korostetut merkitykset, trp merkitsee ryhmää D-Trp, A'' alussa määriteltä tähdettä Gaba(Ar), etenkin sellaista, jossa hydrokarbyyli Ar on β -asemassa, tai sellaista ω -aminoalempialkyyliekarbonihappo-tähdettä, jossa n on jokin kokonaisluvusta 0 - 6, etenkin 1 - 3, ja ennen kaikkea 2, ja R merkitsee karboksyyliä
 30 ja etenkin vetyä, C'' merkitsee ryhmää Ala ja etenkin ryhmää Asn, a = 1, c = 0 tai etenkin 1 ja b, f ja g = 0. Näistä on puolestaan korostettava yhdisteit, joissa tähteessä A'' n = 5 ja R on vety

tai karboksyyli, $a = 1$ ja b, c, f ja g ovat kaikki 0, ja ennen kaikkea kaavan IF



5 mukaisia yhdisteitä, joissa trp_0 tarkoittaa ryhmää D-Trp, joka voi sisältää 5-asemassa myös fluorin, ryhmällä Ac on alussa määritellyt yleiset ja erityisesti korostetut merkitykset ja U merkitsee vetyä ja alussa määriteltä tähdettä Ar, etenkin fenyyli-, sykloheksyyli-, 2-naftyyli- ja ennen kaikkea 1-naftyyli- tai m-fenoksifenyyli-tähdettä.

10 Tähteellä Ar tapahtuvan substituution tuloksena muodostuu γ -aminovoihapon β -hiiliatomissa asymmetriakeskus, joka saa aikaan keksinnön mukaisen syklopeptidin kulloinkin kahden diastereomeerisen muodon esiintymisen, jotka voidaan haluttaessa käyttää erikseen tai myös yhdessä diastereomeeriseoksena samoihin käyttö-
15 tarkoituksiin.

Aivan erityisen edullisia ovat yllä olevien kaavojen I - IF mukaiset asyylipeptidit, joissa Ac merkitsee jotakin suoritusesi-
merkkien mukaista asyyli-tähdettä, tai joilla on jonkin esimer-
keissä esitetyn asyylipeptidin perusrunko. Ennen kaikkea ovat
20 tällöin edullisia esimerkeissä esitetyt asyylipeptidit.

Yllä mainituista yleisesti tai edullisina karakterisoiduista, kaavan I mukaisista asyylipeptideistä ne, jotka sisältävät vapaan karboksyyli-ryhmän, voivat esiintyä myös suoloina, esim. natrium-, kalium-, kalsium- tai magnesiumsuoloina, tai myös ammo-
25 niumsuoloina, jotka on johdettu ammoniakista tai jostakin fysiologisesti sopivasta orgaanisesta typpipitoisesta emäksestä. Kaavan I mukaisista yllä yleisesti tai edullisina karakterisoiduista asyylipeptideistä ne, jotka sisältävät vapaan aminoryhmän, voivat myös esiintyä suolojen muodossa, nimittäin happoadditiosuolojen
30 muodossa. Haptoadditiosuoloina tulevat kysymykseen etenkin fysiologisesti sopivat, tavanomaisten terapeuttisesti käyttökelpoisten happojen kanssa muodostetut suolat. Epäorgaanisista hapoista mainittakoon halogeenivetyhapot, kuten kloorivetyhappo, mutta myös rikkihappo ja fosfori- tai vast. pyrofosforihappo. Orgaanisista
35 hapoista mainittakoon ensi sijassa sulfonihapot, esim. bentseeni-

tai p-tolueenisulfonihappo tai alempialkaanisulfonihapot, kuten metaanisulfonihappo, edelleen myös karbonihapot, kuten etikkahappo, maitohappo, palmitiini- ja steariinihappo, omenahappo, viinihappo, askorbiinihappo ja sitruunahappo.

5 Kaavan I keksinnön mukaiset asyylipeptidit voivat esiintyä myös komplekseina. Komplekseilla tarkoitetaan rakenteeltaan ei vielä täysin selvitettyjä yhdisteitä, jotka muodostuvat lisättäessä määrättyjä epäorgaanisia tai orgaanisia aineita peptideiksi ja antavat näille pidennetyn vaikutuksen. Tällaisia aineita on selitetty esimerkiksi ACTH:n ja muiden adrenokortikotrooppisesti
10 vaikuttavien peptidien yhteydessä. Mainittavia ovat esimerkiksi epäorgaaniset yhdisteet, jotka johdetaan metalleista, kuten kalsiumista, magnesiumista, alumiinista, koboltista ja etenkin sinkistä, ennen kaikkea vaikealiukoiset suolat, kuten fosfaatit, pyrofosfaatit ja polyfosfaatit, sekä näiden metallien hydroksidit,
15 edelleen alkalimetallipolyfosfaatit, esim. "Calgon[®] N", "Calgon[®] 322", "Calgon[®] 188" tai "Polyron[®] B 12". Orgaanisia aineita, jotka saavat aikaan vaikutuksen pidentymisen, ovat esimerkiksi ei-antigeeniset liivate-laadut, esim. polyoksiliivateet, polyvinyyli-pyrrolidoni ja karboksimeetyyliselluloosa, edelleen algiinihapon
20 sulfonihappo- tai fosforihappoesterit, dekstraani, polyfenolit ja polyalkoholit, ennen kaikkea polyfloretiinifosfaatti ja fytiinihappo, sekä emäksisten tai ennen kaikkea happamien aminohappojen polymeeraatit ja kopolymeraatit, esim. protamiini tai polyglutamiinihappo.
25

Mikäli toisin ei ole esitetty, koskevat aminohapotähteiden lyhenteet L-muodon α -aminohappojen tähteitä, jotka esiintyvät luonnossa.

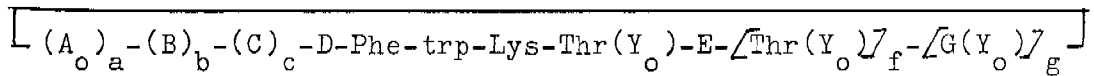
Mikäli toisin ei ole esitetty, merkitsee käsite "alempi",
30 missä tahansa se esiintyy orgaanisen tähteen tai yhdisteen yhteydessä, korkeintaan 7, mieluummin kuitenkin korkeintaan 4 hiiliatomia sisältävää tähdettä tai yhdistettä.

Uusilla keksinnön mukaisilla asyylipeptideillä on fysiologinen vaikutus, joka on perusluonteeltaan somatostatiinin vaikutuksen kaltainen. Niitä voidaan käyttää tästä syystä edullisesti samankaltaisissa terapeuttisissa indikaatioissa kuin tätäkin,
35 esim. etenkin toimintahäiriöiden käsittelyssä, joissa kasvuhormo-

nin tai glukagonin sekreetio on epänormaalin korkea, kuten akromegaliassa tai diabeteksessä. Koska ne tämän lisäksi estävät verenvuotoa gastro-intestinaalisella alueella, niitä voidaan käyttää tuloksellisesti myös tällä indikaatioalueella. Ne voivat toimia myös arvokkaina välituotteina valmistettaessa muita terapeuttisesti arvokkaita yhdisteitä, esim. sellaisia, joissa on yksi edelleen modifioitu asyyli­tähde Ac.

Keksinnön mukaiset uudet asyylipeptidit valmistetaan käyttämällä tavanomaisia, sinänsä tunnettuja peptidikemian valmistusmenetelmiä.

Ne valmistetaan esimerkiksi siten, että asyloidaan vastaava peptidi, jonka 9-asemassa olevassa lysiinitähteessä on vapaa ϵ -aminoryhmä, mahdollisesti suojaamalla tilapäisesti esiintyvät vapaat hydroksyyli­ryhmät ja/tai muut vapaat aminoryhmät. Asylointi tapahtuu etenkin siten, että kaavan (II)



(II)

mukainen peptidi, jossa A_o merkitsee alussa määriteltä tähdettä A vastaavaa tähdettä, jossa N-terminaalisen aminohapotähteen α -aminoryhmässä voi olla alla lähemmin määritellyn merkityksen omaava α -aminosuojaryhmä X' , Y_o on happiatomissa oleva vetyatomi tai alla lähemmin määritellyn merkityksen omaava hydroksyyli­suojaryhmä Y ja jossa muilla symboleilla on alussa esitetyt merkitykset, käsitellään alkaanikarbonihapolla Ac_oOH , jossa Ac_o merkitsee alussa mainittua asyyli­tähdettä Ac vastaavaa tähdettä, jossa esiintyvillä amino- ja hydroksyyli­ryhmillä voi olla suojaryhmiä X, X' tai vast. Y, tai tällaisen hapon reaktiokykyisellä johdannaisella ja haluttaessa tai mikäli on tarpeen, vapautetaan saadussa tuotteessa lohkaiesemalla suojaryhmät X, X' ja Y aminoryhmät tai vast. hydroksyyli­ryhmät.

N-terminaalisen aminohapon yllä mainittu tähde ei esiinny tähteiden A tai A_o kaikissa merkityksissä, vaan vain niissä, jotka on esitetty symbolilla A' , ja jota edustaa tähde $H-Ala^1$ tai $H-Cys^3$.

Symbolin X' merkitys vastaa laajasti α -aminosuojaryhmien niitä merkityksiä, joita käytetään peptidiketjun synteesissä ja jotka on selitetty myöhemmin yksityiskohtaisesti. Mieluummin käytetään samanlaatuisia tai vielä paremmin samanlaisia suojaryhmiä sekä tähteessä A_o että myös Ac_o ja ne lohkaistaan samanaikaisesti asylointireaktion jälkeen.

Hapon Ac_oOH reaktiokykyinen johdannainen on esimerkiksi jokin anhydridi, etenkin jokin kaavan Ac_o-O-Ac_o mukainen symmetrinen anhydridi tai jokin dikarbonihapon syklinen anhydridi, kuten sukkiinianhydridi tai glutaarianhydridi, tai myös jonkin toisen orgaanisen hapon, esim. trifluorietikkahapon, tai etenkin jonkin epäorgaanisen hapon kanssa muodostettu seka-anhydridi, esim. happoatsidi tai happohalogenidi, ennen kaikkea happokloridi. Reaktiokykyinen happojohdannainen on mieluummin jokin aktivoitu esteri, esim. sellainen, jossa happo Ac_oOH esteröidään 2,4,5-trikloorifenolilla, pentakloorifenolilla, pentafluorifenolilla, 2-nitrofenolilla tai etenkin 4-nitrofenolilla, tai jollakin N-hydroksiyhdisteellä, kuten N-hydroksisukkiiniimidillä, 1-hydrokdidibentso-triatsolilla tai N-hydroksipiperidiinillä, tai myös N,N'-disubstituidulla isovirtsa-aineella, kuten etenkin N,N'-disykloheksyyliisovirtsa-aineella, tai jollakin samankaltaisella peptidikemiasta tunnetulla aktivointikomponentilla, vrt. Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. painos, osa 15/I ja II, E. Wunsch (julkaisija): Synthese von Peptiden (Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1974).

Asylointi tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla, mieluummin tavanomaisissa liuottimissa, esimerkiksi dioksaanissa, tetrahydrofuraanissa, asetonitriilissä, pyridiinissä, dimetyyliformamidissa, dimetyyliasetamidissa, dimetyylisulfoksidissa, N-metyylipyrrolidonissa, heksametyylifosforitriamidissa, sekä kloroformissa ja metyleenikloridissa, ja näiden tarkoituksenmukaisissa seoksissa. Voidaan työskennellä myös lisäämällä orgaanista emästä, esim. kvaternääristä tai ennen kaikkea tertiääristä amiinia, kuten trietyyliamiinia, N-etyylimorfoliinia tai N-metyylipiperidiiniä, jotta saataisiin asyloitava aminoryhmä muodossa, josta on poistettu protonit. Reaktiolämpötila on tavanomaisesti -20° - +70°C, mieluummin noin 0°C:n ja huoneenlämpötilan välillä.

Asylointiaineina ovat yleensä aktiiviesterit siitä syystä edullisia, koska ne asyloivat aminoryhmiä edullisesti ennen hydroksyyli-ryhmiä ja tekevät siten hydroksyyli-ryhmien suojan käytännöllisesti katsoen tarpeettomaksi. Dikarbonihappojen ollessa kyseessä pidetään kuitenkin syklisiä anhydridejä parempana, sikäli kun ne ovat läsnä. Jotta vältettäisiin ei-toivottu O-asylointi, käytetään tavanomaisesti vain yhtä ekvivalenttia asylointiainetta kaavan II mukaisen lähtöaineen jokaista vapaata aminoryhmää varten.

Jos kuitenkin jostain syystä on edullisempaa luopua selektiivisestä asyloinnista, kuten asianlaita voi olla etenkin happokloridien kanssa suoritettavassa reaktiossa, niin otetaan asylointiaine ylimääränä ja vapautetaan mukana asyloidut hydroksyyli-ryhmät jälkikäteen samalla tavanomaisella tavalla kuin suojatut hydroksyyli-ryhmät, etenkin emäksisellä hydrolyysillä, esim. natrium- tai kaliumhydroksidin avulla veden läsnäollessa.

Esiintyvien suojaryhmien jälkikäteen tapahtuva lohkaus suoritetaan niiden laadun mukaan ja tapahtuu kulloinkin sinänsä tunnetulla tavanomaisella tavalla, kuten myöhemmin lähemmin esitetään. Tällöin on esiintyvien hydroksyyli-ryhmien Y, sekä tähteissä A_0 ja Ac_0 olevien α -aminosuojaryhmien X' lohkaus pakollinen toimenpide, kun taas ϵ -aminosuojaryhmä X⁴-asemassa olevassa lysiinitähteessä lohkaistaan vain haluttaessa.

Keksinnön mukaiset asyylipeptidit voidaan valmistaa myös siten, että syklisoidaan jokin asyylipeptidiä vastaava lineaarinen peptidi, mahdollisesti suojaamalla tilapäisesti esiintyvät vapaat hydroksyyli-, karboksyyli- ja/tai aminoryhmät. Vastaava lineaarinen peptidi on sellainen, jolla on samat aminohapot samassa järjestyksessä kuin keksinnön mukaisella syklisellä peptidillä, jolloin kuitenkin kahden mielivaltaisen vierekkäisen renkaan muodostavan aminohapon välinen sidos on katkaistu ja korvattu vastaavilla päätyasemassa olevilla funktionaalisilla ryhmillä, jotka voivat esiintyä myös aktivoituneissa muodossa. Kun rengas on katkaistu kahden mielivaltaisen peräkkäisen aminohapon välisessä amidisessa sidoksessa, ovat lineaarisen peptidin päätyasemassa olevat ryhmät kulloinkin karboksyyli- ja aminoryhmä. Jos rengas katkaistaan kuitenkin kahden systeinitähteen, kuten etenkin 3- ja 14-asemassa olevien välissä, niin katkeaa disulfidinen sidos,

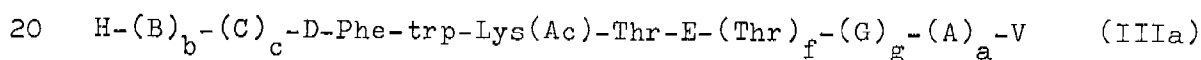
ja vastaavalla lineaarisella peptidillä on päätyasemassa olevina ryhminä kaksi vapaata tai funktionaalisesti muunnettua merkaptoryhmää. Päätyasemassa olevien ryhmien spesifisen tyyppin mukaan käytetään myös vastaavia syklistointimenetelmiä.

- 5 Keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa syklistoinnin avulla siten, että syklistoidaan jokin kaavan (III)

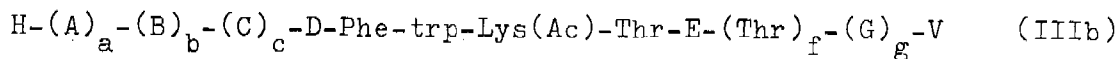


- mukainen vastaava lineaarinen peptidi, jossa I_a on kaavaa I vastaava tähde, jossa peptidirenkaan kahden mielivaltaisen vierekkäisen aminohappotähteen välinen amidinen sidos on katkaistu, ja V tarkoittaa vapaata hydroksyyli-ryhmää, aktivointiryhmän avulla muunnettua hydroksyyli-ryhmää tai hydratsinoryhmää $-\text{NH}-\text{NH}_2$, jolloin mahdollisesti esiintyvät, syklistointireaktioon osallistumattomat amino-, karboksyyli- ja hydroksyyli-ryhmät esiintyvät tarpeen mukaan suojatussa muodossa ja vapautetaan tämän jälkeen.

Kaavan III mukaisista lineaarisista peptideistä pidetään edullisina niitä, joissa tähde A on päätyasemassa olevana aminohappona tähteessä $\text{[I}_a\text{]}$. Nämä edulliset lähtöaineet on karakterisoitu kaavoilla



ja etenkin



- joissa symboleilla Ac, A, B, C, D, trp, E ja G sekä a, b, c, f ja g on alussa mainitut merkitykset ja symbolilla V välittömästi yllä esitetyt merkitykset. Aivan erityisen edullisia ovat kaavojen IIIa ja IIIb mukaiset yhdisteet, joissa tähteessä A ei esiinny mitään rikkipitoista aminohappoa.

- Symbolilla V esitetty funktionaalinen ryhmä täydentää C-terminaalisen aminohappotähteen karbonyyli-ryhmää ja muodostaa yhdessä sen kanssa jonkin vapaan karboksyyli-ryhmän, jonkin akti-voidun esteriryhmän, tai vastaavasti karbatsolyyli-ryhmän.

Aktivointiryhmä, jolla hydroksyyli-ryhmä on muunnettu, on etenkin sellainen, joka muodostaa N-hydroksisukkiini-imidin, 1-hydroksibentsoatriatsolin, N,N'-disykloheksyyli-isovirtsa-aineen, 2,4,5-trikloorifenolin, 2-nitrofenolin, 4-nitrofenolin, pentakloorifenolin tai pentafluorifenolin aktivoitun esterin, mutta myös
 5 jokin toinen peptidikemiasta tunnettu tämänlaatuinen aktivointiryhmä, vrt. Houben-Weyl, osa 15/II.

Kaavan III mukaisten lineaaristen peptidien keksinnön mukainen syklistointi tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla tavanomaisten,
 10 amidi-sidoksen muodostamiseksi käytettyjen liitännämenetelmien avulla, jolloin kuitenkin peptidipitoisia lähtöaineita käytetään hyvin alhaisessa konsentraatiossa, jotta siirretään kulkua intramolekulaarisen syklistoinnin hyväksi intermolekulaarisen polykondensaation kustannuksella.

Lineaarisia peptidejä käytetään edullisesti $1, 10^{-4}$ - n. $1, 10^{-2}$ moolin, mieluummin n. $1, 10^{-3}$ moolin konsentraatiossa, joka vastaa n. 0,01 - 1,0 %:n, mieluummin 0,1 %:n paino/tilavuuskonsentraatiota. Vastaava laimennus voidaan säätää reaktioseoksessa alusta alkaen, tai myös tiputtamalla hitaasti jatkuvasti
 20 lähtöaine ja mahdollisesti muut reagenssit reaktioseokseen.

Syklistointi tapahtuu mieluummin siten, että jossakin yllä mainituissa alkukonsentraatioissa a) kaavan III mukainen lähtöaine, jossa V merkitsee vapaata hydroksyyli-ryhmää suojaamalla tilapäisesti esiintyvät muut amino-, karboksyyli- sekä hydroksyyli-ryhmät käsitellään jollakin karbodi-imidillä, mahdollisesti
 25 jonkin aktiiviestereitä muodostavan komponentin kanssa, tai b) kaavan III mukainen lähtöaine, jossa V on aktivoitukseksi esteriksi muunnettu hydroksyyli-ryhmä ja päätyasemassa oleva aminoryhmä esiintyy protonoidussa muodossa, jolloin ainakin syklistointiin osallistumattomat aminoryhmät ja karboksyyli-ryhmät on suojattu,
 30 saatetaan reagoimaan orgaanisen emäksen kanssa, tai c) kaavan III mukainen lähtöaine, jossa V merkitsee ryhmää $-NHNH_2$, jolloin syklistointiin osallistumattomat aminoryhmät on suojattu, käsitellään ensin happamissa olosuhteissa typpihapokkeella tai sen jollakin
 35 alempialkyyliesterillä ja tämän jälkeen syklistoidaan jossakin yllä mainitussa alhaisessa konsentraatiossa ylimäärin käytetyn orgaanisen emäksen avulla.

Karboksyyliryhmä suojataan myöhemmin esitettävällä tavalla suojaryhmällä W. Amino- ja hydroksyyli ryhmien suojaksi käytetään tarkoituksenmukaisesti ryhmiä X, X' tai vast. Y.

5 Syklisointi suoritetaan sopivissa liuottimissa. Esimerkkeinä mainittakoon dioksaani, tetrahydrofuraani, asetonitriili, pyridiini, dimetyyliformamidi, dimetyyliasetamidi, dimetyylisulfoksididi, N-metyylypyrrolidoni, heksametyylifosforitriamidi, kuten myös kloroformi, metyleenikloridi tai etyyliasetatti sekä näiden seokset.

10 Menetelmän muunnelmassa a) syklisointi saadaan aikaan karbodiimidin avulla, mieluummin N,N'-disykloheksyylikarbodiimidin avulla, jota käytetään mieluummin ylimäärin. On oletettavaa, että tällöin kaavan III mukainen lähtöaine, jossa on vapaa karboksyyliryhmä, muuntuu primäärisesti disykloheksyyli-isovirtsa-

15 aineen (tai vast. jonkin analogisen isovirtsa-aineen) aktivoitukseksi esteriksi ja tämä in situ muodostettu aktiivinen esteri reagoi edelleen. Aktiivisen esterin muodostavan komponentin lisäksi apureagenssiksi johtaa epäilemättä aktiivisen esterin intermediaariseen muodostukseen. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää peptidiki-

20 kemiassa tavanomaisia aktiivisia estereitä muodostavia komponentteja, kuten etenkin 2,4,5-trikloorifenolia, 2- tai 4-nitrofenolia, pentakloori- ja pentafluorifenolia, mutta ennen kaikkea N-hydroksisihydriini-imidi, N-hydroksipiperidiini ja ennen kaikkea 1-hydroksisibentsotriatsoli. Tässä menetelmän muunnelmassa käytettävä työ-

25 kentelylämpötila on yleensä 0 - 70°, mieluummin 35 - 55°.

Muunnelmassa b), jossa käytetään valmiita aktiiviestereitä, etenkin jo korostettuja aktiiviestereitä, syklisointi tapahtuu spontaanisti, kun päätyasemassa oleva aminoryhmä vapautetaan or-

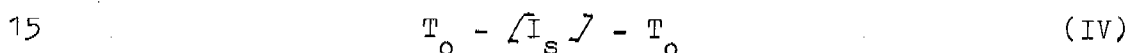
30 gaanisen emäksen avulla protoneista. Käytetyt emäkset ovat mieluummin kvaternäärisiä tai ennen kaikkea tertiäärisiä amiineja, esim. trietyyliamiinia tai N-etyylimorfoliinia. Mieluummin työskennellään 10 - 30°:n lämpötilassa, etenkin huoneenlämpötilassa.

Muunnelmassa c) voi ensimmäinen vaihe, s.o. happoatsidin

35 muodostaminen typpihapokkeella tai sen jollakin esterillä tapahtuvan käsittelyn avulla, voi tapahtua edullisesti lähtöaineen olennaisesti korkeammassa konsentraatiossa kuin tätä seuraava

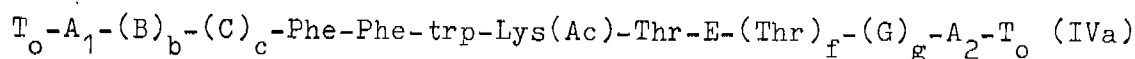
syklisointi. Tarkoituksenmukaisesti työskennellään suunnilleen jonkin alempiäalkyylinitriitin, kuten etyyli-, isoamyyli- ja etenkin tert.-butyyli-nitriitin yhdellä ekvivalentilla suolahappoisessa väliaineessa n. -30° - n. -5° :n, mieluummin n. -20° :n lämpötiloissa. Nitriitin vähäinen ylimäärä on sallittua. Tämän jälkeen saatetaan muodostuneen atsidin liuos tarpeellisen laimennuksen jälkeen n. 0° - n. 35° :n lämpötilassa emäksiseksi ylimääränä käytetyn orgaanisen, esim. jonkin yllä mainitun emäksen avulla ja siten saatetaan kuten menetelmän muunnelmassa b) spontaaniseen syklisointiin.

Erikoistapauksessa voidaan keksinnön mukaiset yhdisteet, sikäli kun ne sisältävät pari rikki-pitoista aminohappotähdettä, kuten D- ja L-systeiniinistä tai β -merkaptopropionihaposta, valmistaa siten, että jokin kaavan (IV)



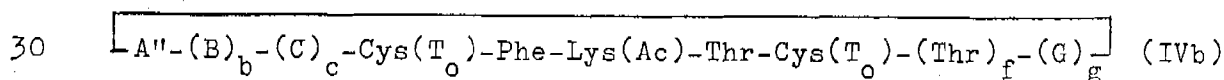
mukainen vastaava lineaarinen peptidi, jossa I_s on kaavaa I vastaava tähte, jossa rikki-pitoisten aminohappotähteiden välinen disulfidinen sidos on katkaistu, ja T_o merkitsee vetyä tai merkaptosuojaryhmää T, hapetetaan disulfidi-sillan muodostamiseksi mahdollisesti lohkaisemalla ensin tai samanaikaisesti merkaptosuojaryhmät T, ja vapautetaan mahdollisesti suojatussa muodossa esiintyvät amino-, karboksyyli- ja/tai hydroksyyli-ryhmät.

Lineaarinen peptidi IV on etenkin kaavan (IVa)



mukainen, jossa A_1 merkitsee ryhmää Ac-Ala-Gly-Cys-, H-Ala-Gly-Cys-, Ac-Cys-, H-Cys- tai Bmp-, A_2 ryhmää D- tai L-Cys-OH, tähteellä T_o on välittömästi yllä esitetty merkitys ja muilla symboleilla on alussa mainitut merkitykset.

Lineaarinen peptidi IV on kuitenkin myös jokin kaavan (IVb)



mukainen, jossa A'' merkitsee tähteen A merkityksissä esitettyä rikitöntä aminohappotähdettä, tähteellä T₀ on välittömästi yllä esitetty merkitys ja muilla symboleilla on alussa mainitut merkitykset.

5 Hapetuksen avulla tapahtuva syklistointi tapahtuu tavanomaisella, sinänsä yleisesti tunnetulla tavalla. Tällöin voidaan hapettaa jokin kaavan IV mukainen lineaarinen peptidi, jossa on kaikki suojaryhmät lohkaistu tätä ennen. Jos kuitenkin kaavan IV mukainen lineaarinen peptidi esiintyy suojattuja amino-, hydrok-

10 syyli- ja/tai karboksyyli-ryhmiä sisältävässä muodossa, kuten se useimmissa tapauksissa saadaan jossakin edeltävässä synteesissä, on edullista suorittaa ensin syklistointi ja vasta sitten suojaryhmien (s.o. ryhmien X, X', Y ja W) lohkaistu. Tällaisessa tapauksessa suojataan mieluummin esiintyvät karboksyyli-ryhmät tert-

15 butyyliesterinä, ε-aminoryhmät tert-butyylioksidikarbonyyli-ryhmillä, seriini- ja treoniinitähteiden hydroksyyli-ryhmät, mikäli ne yleensäkin suojataan, tert-butyylietterinä, ja merkaptoryhmät trityyli-, asetaminometyyli-, p-metoksibentsyyli-, PCH- tai vast. MPCH-, tai tetrahydropyranyyli-ryhmillä (Thp). Paitsi

20 asetaminometyyliä voidaan kaikki nämä funktionaaliset ryhmät lohkaista yhdessä vaiheessa happojen vaikutuksen avulla (asidolyysi). Merkaptosuojaryhmät, jotka ovat tyypiltään trityyliä, asetaminometyyliä ja tetrahydropyranyyliä, voidaan kuitenkin haluttaessa lohkaista säilyttämällä tert-butyyli-tyyppiset suojaryhmät ras-

25 kasetallisuusolojen, esim. merkuriasetaatin ja rikkivedyn avulla selektiivisesti. Siten saadaan vapaita merkaptoryhmiä sisältävä lineaarinen peptidi, joka voidaan syklistoida hapetuksen avulla sinänsä tunnetulla tavalla, esim. jodin avulla, dijodietaanin avulla orgaanisissa liuottimissa, tai hapen, etenkin ilman hapen

30 avulla, kuten ilman hapen avulla nestemäisessä ammoniakissa. Vielä edullisempaa on poistaa trityyli-, tetrahydropyranyyli- tai asyyliaminometyyli-ryhmillä suojatut merkaptoryhmät muodostamalla samanaikaisesti disulfidi-silta jodin avulla, esim. metanolissa, etikkahapossa tai etenkin dimetyyliformamidissa, jolloin mainitun

35 tyyppiset muut suojaryhmät jäävät jäljelle ja ne lohkaistaan jälkikäteen.

Suojaryhmien rajoitetumpi valinta suuntautuu erikoistarkoituksen mukaan, jolloin on valittava etenkin useiden suojattavien funktionaalisten ryhmien ollessa kyseessä tarkoituksenmukaiset yhdistelmät.

5 ϵ -amino-suojaryhmänä X voidaan käyttää jokaista peptidikemiassa tavanomaista amino-suojaryhmää, kuten ne on esitetty tiivistettyinä vastaavissa hakuteoksissa, esim. Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. painos, osa 15/I, E. Wunsch (julkaisija): Synthese von Peptiden (Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 10 1974).

Siten voidaan käyttää esim. pelkistyksen avulla tai emäksisesti lohkaistavia amino-suojaryhmiä, esim. etenkin bentsyylioksidikarbonyyli-ryhmää ja bentsyylioksidikarbonyyli-ryhmiä, jotka aromaattisessa osassa on substituoitu halogeeniatomeilla, nitroryhmillä, alempialkoksiryhmillä ja/tai alempialkyylitähteillä, kuten p-kloori- ja p-bromibentsyylioksidikarbonyyli-, p-nitrobentsyylioksidikarbonyyli-, p-metoksibentsyylioksidikarbonyyli-, p-tolyylioksidikarbonyyli-ryhmää, tai myös isonikotinyylioksidikarbonyyliryhmää, edelleen myös asyyliiryhmiä, kuten p-tolueenisulfonyyliä, bentseenisulfonyyliä, o-nitrobentseenisulfonyyliä tai vast. myös 15 formyylia, trifluoriasetyyliä tai ftaloyyliä.

Eräs edullinen ϵ -amino-suojaryhmä X on jokin etoksikarbonyyliryhmä, jolla on β -asemassa kolmella hiilivetytähteellä substituoitu silyyliryhmä, kuten trifenyylisilyyli-, dimetyyli- 25 butyyli-silyyli- ja ennen kaikkea trimetyylisilyyliryhmä. Tällainen β -(trihydrokarbyylisilyyli)-etoksikarbonyyliryhmä, kuten β -(trialempialkyylisilyyli)-etoksikarbonyyli-, esim. etenkin β -(trimetyylisilyyli)-etoksikarbonyyliryhmä, muodostaa suojattavan ϵ -aminoryhmän kanssa vastaavan β -trihydrokarbyylisilyyli-etoksi- 30 karbonyyliaminoryhmän (esim. β -trimetyylisilyylietoksikarbonyyliaminoryhmän), joka on stabiili happamen hydrolyysin ja hydrogenolyysin olosuhteissa, mutta joka voidaan lohkaista aivan erityisissä, hyvin miedoissa olosuhteissa fluoridi-ionien vaikutuksen avulla. Tässä suhteessa se käyttäytyy analogisesti kuin myö- 35 hemmin karboksyyli-suojaryhmänä kuvattu β -silyylietyyliesteriryhmä. (Tämä samankaltaisuus on otettava erityisesti huomioon synteesissä: yksittäistapauksia lukuunottamatta jonkin näiden

suojarahmien käyttö estää muiden suojarahmien samanaikaisen käytön.) Muut yksityiskohdat on esitetty myöhemmin karboksyyli-ryhmän suojauksen yhteydessä β -silyylietyyliesterinä.

Aivan erityisen edullisia ovat asidolyttisesti lohkaistavat ryhmät, kuten ensi sijassa tert-butoksikarbonyyliryhmä ja analogiset ryhmät, esim. tert-amyylioksikarbonyyli-, isopropylioksikarbonyyli-, di-isopropyylimetoksikarbonyyli-, allyylioksikarbonyyli-, syklopentyylioksikarbonyyli-, sykloheksyylioksikarbonyyli-, d-isobornyylioksikarbonyyli- ja adamantyylioksikarbonyyliryhmät, sekä myös aralkyyli-tyyppiset ryhmät, kuten bentshydryyli ja trifenyylimetyyli (trityyli), tai määrätyt 2-(p-bifenylyyli)-2-propyylioksikarbonyyli-tyyppiset aralkoksikarbonyyliryhmät, jotka on esitetty sveitsiläisessä patenttijulkaisussa 509 266.

Hydroksyyli-suojaryhmänä Y voidaan käyttää kaikkia tähän tarkoitukseen peptidi-kemiassa käytettyjä ryhmiä, vrt. yllä siteerattua teosta (Houben-Weyl). Edullisia ovat asidolyttisesti lohkaistavat ryhmät, kuten 2-tetrahydropyranyyli ja aivan erityisesti tert-butyyli, sekä myös tert-butoksikarbonyyli. Edelleen voidaan käyttää kuitenkin myös pelkistyksen avulla tai emäksisesti lohkaistavia hydroksyyli-suojaryhmiä, esim. bentsyyli- ja bentsyylioksikarbonyyliryhmiä, jotka aromaattisessa osassa voivat olla substituoituja halogeenilla, nitrolla ja/tai alempi-alkoksilla, tai vast. alempialkanoyylitähteitä, kuten asetyyliä, tai aroyylitähteitä, kuten bentsoyyliä. On myös mahdollista menetellä ilman hydroksyyli-ryhmien suojaa, kun noudatetaan määrättyjä rajoittavia toimenpiteitä.

Karboksyyli-suojaryhminä W voidaan käyttää jokaista tavantomaista tähän tarkoitukseen yleisesti käytettyä ryhmää, vrt. yllä siteerattua teosta (Houben-Weyl). Siten suojataan karboksyyli-ryhmät esimerkiksi hydratsidimuodostuksen avulla tai esteröimällä. Esteröintiin sopivat esim. alemmat, mahdollisesti substituoidut alkanolit, kuten metanolia, etanoli, syaanimetyylialkoholi, 2,2,2-trikloorietanoli, bentsoylimetyylialkoholi tai etenkin tert-butyylialkoholi, mutta myös jokin mahdollisesti substituoitu bentsyylialkoholi. Substituoitujen alkanolien aivan erityisen edullinen kategoria ovat etyylialkoholit, joilla on β -asemassa

trisubstituoitu silyyliryhmä, kuten trifenyylisilyyli-, dimetyyli-
butyyli-silyyli- tai ennen kaikkea trimetyylisilyyliryhmä. Kuten
esim. belgialaisessa patentissa n:o 851.576 on esitetty, nämä al-
koholit sopivat suojaamaan karboksyyli-ryhmiä erityisen hyvin sii-
5 tä syystä, koska vastaavilla β -silyylietyyliestereillä, esim.
 β -(trimetyylisilyyli)-etyyliestereillä on tosin tavanomaisten
alkyyliestereiden stabiilius, mutta ne voidaan lohkaista selektiiv-
visesti miedoissa edellytyksissä fluoridi-ionien vaikutuksella
säilyttäen kaikki muut suojaryhmät.

10 Merkaptosuojaryhmänä T voidaan käyttää kaikkia tähän tar-
koitukseen peptidi-kemiassa yleisesti käytettyjä ryhmiä, jolloin
merkaptoryhmät suojataan etenkin sopivan asyloinnin avulla. Asy-
lointiin sopii esim. asetyyli- tai bentsoyylitähde, jokin alempi-
alkyyli- (esim. etyyli-) -karbamoyyli tai jokin mahdollisesti,
15 kuten yllä on esitetty, substituoitu bentsyylioksidikarbonyyliryh-
mä (karbobentsoksi-ryhmä). Alkylointiin sopivat esim. tert-butyy-
li-, isobutyylioksimetyyli-, bentsyyliitiometyyli- tai tetrahydro-
pyranyylitähde tai mahdollisesti halogeenilla, alempialkoksilla
tai nitrolla substituoidut aryyli-metyylitähde, kuten bentsyyli,
20 p-metoksibentsyyli, difenyyli-metyyli, dimetoksibentsyhydriyli tai
aivan erityisesti trityyli, sekä myös fenyylisykloheksyyli (PCH),
p-metoksifenyyli-sykloheksyyli (MPCH), tienyyli(2)-sykloheksyyli
mm., vrt. Ber. 101, 681 (1968). Hyvin edullinen on myös yleisen
kaavan R_t -CO-NH-CH₂- mukainen asyyliminometyyli-tähde, jossa
25 R_t -CO- merkitsee jonkin karbonihapon tähdettä, vrt. Tetrahedron
Letters 1968 (26), 3057 ja saksalainen hakemusjulkaisu 2 060 969.
Asyylitähde R_t -CO- voi olla johdettu jostakin alifaattisesta,
sykloalifaattisesta, aromaattisesta, aralifaattisesta tai hetero-
syklisestä karbonihaposta tai jostakin hiilihappomonojohdannai-
30 sesta (kuten hiilihappomonoesteristä tai karbamiinihaposta).
Symbolilla R_t on esitetty ensi sijassa jokin mahdollisesti substi-
tuoitu alempialkyylitähde, esim. metyyli-, etyyli-, propyyli-,
isopropyyli-, n-butyyli- tai tert-butyyli-tähde, joka voi sisältää
substituentteina esim. kloorin, trifluorimetyylin tai nitroryh-
35 män. Edelleen merkitsee R_t esimerkiksi jotakin mahdollisesti
substituoitua 3-8, mieluummin 5-6 rengasatomia sisältävää syklo-
alkyyli-tähdettä, kuten syklopentyyli- tai sykloheksyyli-tähdettä

5 tai jotakin mahdollisesti substituoitua aromaattista tai aralifaattista, mieluummin monosyklistä tähdettä, ennen kaikkea jotakin mahdollisesti substituoitua fenyyli- tai bentsyyli-tähdettä, esim. substituimatonta tai fenyyli-tähteessä alempialkyyllillä, alempi-
 5 alkoksilla, halogeenilla tai nitrolla substituoitua fenyyliä tai bentsyyliä, tai jotakin monosyklistä heterosyklilyli-tähdettä, esim. tienyyliä tai furyyliä. Erityisen edullinen asyyliaminometyyli-ryhmistä on asetyliaminometyyliryhmä.

10 Mieluummin valitaan suojaryhmät Y ja W, sekä myöhemmin vielä lähemmin karakterisoitu α -aminosuojaryhmä X' siten, että ne ovat lohkaistavissa samankaltaisissa olosuhteissa. Erityisen edullisia ovat tällöin jo korostetut asidolyttisesti lohkaistavat ryhmät. Kaikkien näiden suojaryhmien lohkaistu tapahtuu täl-
 15 löin edullisesti yhdessä ainoassa toimenpiteessä. Voidaan kuitenkin käyttää myös erilaatuisia ryhmiä ja lohkaista jokainen yksit-
 täin.

Jos kuitenkin kaavan I mukaisessa loppuaineessa tulee suo-
 jaryhmän X, s.o. Lys⁴-tähteessä oleva ϵ -aminosuojaryhmän säilyä, niin tähteet X', Y ja W on valittava siten, että ne voidaan loh-
 20 kaista säilyttäen samalla ryhmä X.

Suojaryhmien lohkaistu tapahtuu yleisesti tunnetulla tavalla. Hapan hydrolyysi (asidolyysi) suoritetaan esim. trifluorietikka-
 hapon, suolahapon tai fluorivedyn avulla, happoherkkien suojaryh-
 mien ollessa kyseessä myös jonkin alempialifaattisen karbonihapon,
 25 kuten muurahaishapon ja/tai etikkahapon avulla veden ja mahdolli-
 sesti jonkin polyhalogenoidun alempialkanolin tai alempialkanonin,
 kuten 1,1,1,3,3,3-heksafluoripropan-2-olin tai heksafluoriasetonin
 läsnäollessa. Pelkistykseen avulla lohkaistavat ryhmät, etenkin
 bentsyyli-tähteitä sisältävät ryhmät poistetaan mieluummin hydro-
 30 genolyttisesti, esim. hydraamalla palladiumkatalyysissä. Iso-
 nikotinyylioksidikarbonyyliryhmä lohkaistaan mieluummin sinkki-
 pelkistykseen avulla.

Emäksisiä ryhmiä sisältävät keksinnön mukaiset loppuaineet
 saadaan riippuen eristyksen laadusta emäksinä tai happoadditiosuo-
 35 loina. Nämä voidaan muuntaa jälkikäteen sinänsä tunnetulla taval-
 la toisiinsa. Vastaavasti voivat happamia ryhmiä sisältävät lop-
 puaineet esiintyä myös suolojen muodossa, jolloin molemmat muodot

voidaan muuntaa toisiinsa tunnetulla tavalla.

Myös yllä mainittujen kompleksien muodostaminen tapahtuu tunnettujen menetelmien mukaisesti. Vaikealiukoisia metalli-, esim. alumiini- tai sinkkiyhdisteitä sisältävät kompleksit valmistetaan mieluummin samankaltaisella tavalla kuin on tunnettua ACTH:n kohdalla, esim. kyseisen metallin liukoisen suolan, esim. sinkkikloridin tai sinkkisulfaatin kanssa tapahtuvan reaktion avulla ja saostamalla alkalimetallifosfaatilla ja/tai -hydroksidilla. Kompleksit orgaanisten yhdisteiden kanssa, jotka ovat tyypiltään polyoksigelatiinia, karbometyyliselluloosaa, polyviinyyli-pyrrolidonia, polyfloretiinifosfaattia, polyglutamiinihappoa jne, saadaan sekoittamalla nämä substanssit peptidin kanssa vesipitoisessa liuksessa. Samalla tavoin voidaan valmistaa myös liukenemattomia yhdisteitä alkalimetallipolyfosfaattien kanssa.

Yllä karakterisoitujen kaavojen III ja IV mukaiset lähtöaineet ja, mikäli ei ole esitetty toisin, myös niiden synteessissä tarvittavat välituotteet ovat uusia ja niitä voidaan osaksi käyttää myös edullisesti muiden somatostatiinin analogien synteesiin, esim. sellaisten, jotka sisältävät analogisia aminohappo-osajaksoja. Ne kuuluvat samoin kuin niiden valmistusmenetelmätkin esillä olevan keksinnön kohteeseen. Ne saadaan sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti siten, että niiden rakenteeseen tarvittavat aminohapot tai vast. pienemmät peptidiyksiköt kondensoidaan keskenään muodostamalla CO-NH-sidoksia mielivaltaisessa ajallisessa järjestyksessä, jolloin voidaan suojata intermediaarisesti reaktioon osallistumattomat funktionaaliset ryhmät.

Valmistettaessa näitä lähtöaineita, kuten myös kaikkia muita tarvittavia välituotteita, tulevat suojaryhminä päätyasemassa olevia α -amino- ja karboksyyli-ryhmiä varten kysymykseen etenkin pitkäketjuisten peptidien synteessissä tavanomaiset suojaryhmät, jotka voidaan lohkaista esim. solvolyyysin tai pelkistuksen avulla helposti ja selektiivisesti. Ne mainittiin edellä jo useita kertoja ryhmien X' tai vast. W nimityksen yhteydessä.

α -amino-suojaryhmänä X' mainittakoon esim.: mahdollisesti esim. halogeenilla, nitrolla, alempialkyyllillä tai alempialkoksilla substituoidut di- tai triaryyli-alempialkyyli-ryhmät, kuten difenyyli-metyyli- tai trifenyyli-metyyli-ryhmät, esim. bentshydryyli,

trityyli, di-(p-metoksi)-bentshydriyli, tai ennen kaikkea hiilihaposta johdettavat hydrogenolyttisesti lohkaistavat ryhmät, kuten mahdollisesti aromaattisessa tähteessä halogeeni-atomeilla, nitrorryhmillä, alempialkyyli- tai alempialkoksiryhmillä substituoidut bentsyylioksikarbonyyliryhmät, esim. bentsyylioksikarbonyyli (s.o. karbobentsoksi), p-bromi- tai p-klooribentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli, p-metoksibentsyylioksikarbonyyli, edelleen myös 2-(p-bifenyyli)-2-propyylioksikarbonyyli ja vastaavat sveitsiläisessä patentissa 509 266 esitetyt arylioksikarbonyyliryhmät. Tällöin on huomattava, että α -aminosuojaryhmän X' on oltava lohkaistavissa selektiivisesti säilyttämällä samalla 4-asemassa olevan lysini-tähteen mahdollisesti esiintyvä ϵ -aminosuojaryhmä X. Usein on muuten edullista, kun tämän lohkaistuksen yhteydessä myös mahdollisesti esiintyvä karboksyyli- ja hydroksyyli-suojaryhmä W tai vast. Y pysyy vahingoittumattomana.

Tähän tarkoitukseen käytetyt karboksyyli-suojaryhmät ovat samat, jotka esitettiin symbolin W vastaavassa merkityksessä.

Nämä suojaryhmät voidaan lohkaista tunnetulla tavalla. Siiten voidaan lohkaista bentsyylioksikarbonyyliryhmä hydrogenolyyisin avulla, N-trityyliryhmä mineraalihapoilla, kuten halogeeni-veityhapoilla, esim. fluorivedyllä tai mieluummin kloorivedyllä, tai jollakin orgaanisella hapolla, kuten muurahaishapolla, etikkahapolla, kloorietikkahapolla tai trifluorietikkahapolla liuottimena käytetyssä vesipitoisessa tai absoluuttisessa trifluorietanolissa (vrt. DE-hakemusjulkaisu DT 2 346 147) tai vesipitoisella etikkahapolla. Tert-butyylioksikarbonyyliryhmä voidaan lohkaista trifluorietikkahapon tai suolahapon avulla, 2-(p-bifenyyli)-isopropyylioksikarbonyyliryhmä vesipitoisen etikkahapon tai esim. etikkahapon, muurahaishapon (82,8 %:sta) ja veden (7:1:2) seoksen avulla tai julkaisun DT 2 346 147 menetelmän mukaisesti.

β -silyylietyyliesteriryhmät lohkaistaan mieluummin fluori-di-ioneja luovuttavien reagenssien avulla, esim. kvaternääristen orgaanisten emästen fluoridien, kuten tetraetyyliammoniumfluoridin avulla. Ne voidaan myös lohkaista samoin kuin tavanomaiset alkyyliesterit alkalisella hydrolyysillä, esim. alkalimetallihydroksidien, -karbonaattien tai -bikarbonaattien avulla tai muuntaa

hydratsinolyysillä, esim. hydratsiinihydraatin avulla vastaaviksi karbatsoyyliryhmiksi. Tert-butyyliestereiden lohkaisuun käytetään mieluummin asidolyysiä, bentsyyliestereille hydrogenolyysiä.

5 Kaavojen III tai IV lähtöaineiden valmistamiseksi suoritettava aminohappo- ja/tai peptidiyksikköjen kondensointi tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla siten, että liitetään mieluummin jokin aminohappo tai jokin peptidi, jossa on suojattu α -aminoryhmä ja mahdollisesti aktivoitu terminaalinen karboksyyliiryhmä (=aktiivinen komponentti), aminohappoon tai peptidiin, jossa on vapaa α -aminoryhmä ja vapaa tai suojattu, esim. esteröity terminaalinen karboksyyliiryhmä (= passiivinen komponentti), vapautetaan muodostuneessa tuotteessa terminaalinen aminoryhmä ja tämä peptidi, joka sisältää vapaan α -aminoryhmän ja mahdollisesti suojatun terminaalisen karboksyyliiryhmän, saatetaan puolestaan reagoimaan
10 jonkin toisen aktiivisen komponentin, s.o. aktivoidun karboksyyliiryhmän ja suojatun α -aminoryhmän sisältävän aminohapon tai peptidin kanssa, jne. Karboksyyliiryhmä voidaan aktivoida esim. muuntamalla se happoatsidiksi-, -anhydridiksi, imidatsolidiksi, -isoksatsolidiksi tai aktivoiduksi esteriksi, kuten joksikin
15 myöhemmin mainituksi, tai karbodi-imidin, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin kanssa tapahtuvan reaktion avulla, mahdollisesti lisäämällä samalla N-hydroksisukkiini-imidiä, substituimatonta tai esim. halogeenilla, metyyllillä tai metoksilla substituotua 1-hydroksibentsotriatsolia tai 4-hydroksibentso-1,
20 2,3-triatsiini-3-oksidia (mm. vrt. DT 1 917 690, DT 1 937 656, DT 2 202 613) tai etenkin N-hydroksi-5-norborneeni-2,3-dikarboksimididiä, tai N,N'-karbonyylidi-imidatsolin avulla. Käytetyimpänä liitännämenetelmänä mainittakoon karbodi-imidi-menetelmä, edelleen myös atsidi-menetelmä, aktivoitujen estereiden menetelmä ja anhydridi-menetelmä sekä Merrfield-menetelmä ja N-karboksi-
30 anhydridien tai N-tiokarboksianhydridien menetelmä.

Yllä mainittujen aktivoitujen estereiden muodostamiseen soveltuvat esim. mahdollisesti elektroneja puoleensa vetävillä substituenteilla substituoidut fenolit ja tiofenolit, kuten
35 fenoli, tiofenoli, tiokresoli, p-nitrotiofenoli, 2,4,5- ja 2,4,6-trikloorifenoli, pentakloorifenoli, o- ja p-nitrofenoli, 2,4-dinitrofenoli, p-syanofenoli, edelleen esim. N-hydroksisukkiini-

imidi, N-hydroksiftalimidi ja N-hydroksipiperidiini.

Kaavojen III ja IV mukaisten peptidien erityisen edullisessa valmistuksessa käytetään liitöntämenetelmänä karbodi-imidimenetelmää N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin avulla 1-hydroksibentsotriatsolin läsnäollessa. Terminaalinen karboksyyli-ryhmä suojataan tällöin β -(trimetyylisilyyli)-etyyliesterin muodossa, aktivoitujen komponenttien α -aminoryhmä suojataan bentsyylioksidikarbonyyli-ryhmällä, joka lohkaistaan jokaisen liitöntävaiheen jälkeen hydrogenolyysillä. 4-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmän suojaksi käytetään tert-butoksidikarbonyyli-ryhmän avulla tapahtuvaa asylointia ja seriini- ja treoniinitähteen hydroksyyli-ryhmille tert-butyli-ryhmän avulla tapahtuvaa eetteröintiä. Nämä molemmat suojaryhmät voidaan haluttaessa lohkaista lopuksi yhdessä vaiheessa happamalla hydrolyysillä, esim. trifluorietikkahapon, suolahapon tai fluorivedyn avulla. 9-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä esiintyy asyloidussa muodossa eikä sitä tästä syystä tarvitse suojata.

Rikki-pitoiset aminohapotähteet (Bmp ja cys) johdetaan reaktioon mieluummin vasta synteessin viimeisissä vaiheissa, koska rikin läsnäolo voi tunnetusti haitata hydrauskatalyysaattoreiden aktiivisuutta ja siten asettaa kyseenalaiseksi muuten hyvin edullisten hydrogenolyttisesti lohkaistavien ryhmien käytön. Mainituissa hapoissa olevat merkatoryhmät suojataan edullisesti trietyyli-ryhmillä, jotka ovat erityisen sopivia edullisten menetelmän muunnelmien suorittamiseen.

Työskentelytavasta riippuen saadaan kaavan III ja IV mukaiset yhdisteet, riippuen niiden luonteesta, emästen tai happoadditiosuolojen muodossa, tai myös happojen ja niiden suolojen muodossa. Haptoadditiosuoloista voidaan valmistaa emäkset sinänsä tunnetulla tavalla. Viimeksi mainituista puolestaan voidaan valmistaa terapeuttisesti käyttökelpoisia haptoadditiosuoloja saatamalla ne reagoimaan happojen, esimerkiksi yllä mainittuja suoloja muodostavien happojen kanssa. Hapot ja niiden suolat ovat myös samankaltaisessa suhteessa toisiinsa. Yhdisteet, joilla on sekä yksi vapaa karboksyyli-ryhmä ja yksi emäksinen ryhmä, voivat esiintyä sisäisinä suoloina.

Vapaassa muodossa ja niiden suolojen muodossa olevien uusien yhdisteiden välisen läheisen suhteen johdosta tarkoitetaan edellä ja seuraavassa vapailla yhdisteillä tai niiden suoloilla merkityksen- ja tarkoituksenmukaisesti mahdollisesti myös vastaavia yhdisteitä tai vast. vapaita yhdisteitä.

Keksinnön kohteena ovat myös ne menetelmän sovellutusmuodot, joissa lähdetään mielivaltaisella menetelmän asteella välituotteen- ja saatavasta yhdisteestä ja suoritetaan puuttuvat menetelmän vaiheet, tai jolloin jokin lähtöaine muodostetaan reaktio-olosuhteissa tai käytetään sen johdannaisen muodossa, esim. suolan muodossa.

Esillä olevan keksinnön menetelmässä käytetään mieluummin sellaisia lähtöaineita, jotka johtavat alussa erityisen arvokkaina kuvattuihin yhdisteisiin.

Keksinnön kohteena ovat samoin farmaseuttiset valmisteet, jotka sisältävät kaavan I mukaisia yhdisteitä tai niiden farmaseuttisesti käyttökelpoisia suoloja tai komplekseja. Näitä valmisteita voidaan käyttää etenkin yllä esitetyissä indikaatioissa, kun ne annetaan intraperitoneaalisesti, kuten intravenoosisesti, intramuskulaarisesti tai subkutaanisti tai myös intranasaalisesti. Tarpeellinen annos riippuu erityisesti käsiteltävästä sairaudesta, sen vaikeusasteesta ja terapian kestosta. Yksittäisannosten lukumäärä ja määrä sekä annostussuunnitelma voidaan määrätä parhaiten kulloinkin kyseessä olevan potilaan yksilöllisen tutkimuksen perusteella. Näiden tekijöiden määrittäminen on ammattihenkilölle selvä. Yleensä on injektiossa kuitenkin tällaisen yhdisteen terapeuttisesti tehokkaan määrän annosalue n. 0,001 - n. 0,2 mg/paino-kg. N. 0,0015 - n. 0,15 mg/paino-kg on edullinen alue ja annostus tapahtuu intravenoosisen infuusion tai subkutaanisen injektion avulla. Vastaavasti sisältävät parenteraalisesti annettavat farmaseuttiset valmisteet yksittäismuodossa annostustavasta riippuen annosta kohden n. 0,08 - n. 15 mg jotakin keksinnön mukaisista yhdisteistä. Vaikuttavan aineen lisäksi ne sisältävät tavanomaisesti vielä jonkin puskuriaineen, esim. jonkin fosfaattipuskuriaineen, jonka tulee pitää pH-arvo arvoissa n. 3,5 - 7. Edelleen ne sisältävät natriumkloridia, manniittia tai sorbiittia isotonian säätämiseksi. Ne voivat esiintyä jäädy-

tyskuivatussa tai liuotetussa muodossa, jolloin liuokset voivat sisältää edullisesti jonkin antibakteerisesti vaikuttavan säilöntäaineen, esim. 0,2 - 0,3 % 4-hydroksibentsoehappo-metyyliesteriä tai -etyyliesteriä. Jos tällaisissa valmisteissa vaikuttavan aineen tulee esiintyä kompleksin muodossa, jolla on pidennetty vaikutusaika, niin tämä voidaan muodostaa suoraan lisäämällä kompleksin muodostavat komponentit injektiooliuokseen, joka on valmistettu esim. yllä mainittujen toimenpiteiden avulla. Lisäykseksi soveltuu esim. 0,1 - 1,0 paino-% sinkki(II)-suolaa (esim. sulfaattia) ja 0,5 - 5,0 paino-% protamiinia (esim. sulfaattina) yhdessä laskettuna injektiooliuksen koko tilavuuteen. Tämä valmiste esiintyy liuksena, jonka pH-arvo on n. 3,5 - n. 6,5, tai suspensiona, jonka pH-arvo on n. 7,5 - 8,0.

Intranasaalisesti annettava valmiste voi esiintyä vesipitoisena liuksena tai geleenä, öljymäisenä liuksena tai suspensiona tai myös rasvapitoisena salvana. Vesipitoisessa muodossa oleva liuos saadaan esim. siten, että kaavan I mukainen vaikuttava aine tai sen terapeuttisesti käyttökelpoinen happoadditiosuola liuotetaan vesipitoiseen puskuriliuokseen, jonka pH-arvo on 7,2, ja lisätään tähän isotonian tuottava aine. Vesipitoiseen liuokseen lisätään tarkoituksenmukaisesti polymeerinen kiinnitysaine, esim. polyvinyylipyrrolidonia ja/tai säilöntäainetta. Yksittäisannos on n. 0,08 - n. 15 mg, mieluummin 0,25 - 10 mg, jotka sisältyvät 0,05 ml:aan liuosta tai 0,05 g:aan geleetä.

Intranasaalisesti annettava öljyinen annostusmuoto saadaan esim. suspendoimalla kaavan I mukainen peptidi tai sen terapeuttisesti käyttökelpoinen happoadditiosuola jossakin öljyssä, mahdollisesti lisäämällä paisunta-aineita, kuten alumiinistearaattia ja/tai rajapinta-aktiivisia aineita (tensidejä), joiden HLB-arvo ("hydrophilic-lipophilic-balance") on alle 10, kuten moniarvoisten alkoholien rasvahappomonoestereitä, esim. glyseriinimonostearaattia, sorbitaanimonolauraattia, sorbitaanimonostearaattia tai sorbitaanimonoleaattia. Rasvapitoinen salva saadaan esim. suspendoimalla keksinnön mukainen vaikuttava aine sivellettävälle rasva-perustalle, mahdollisesti lisäämällä jokin tensidi, jonka HLB-arvo on alle 10. Emulsiosalva saadaan hiertämällä peptidipitoisen vaikuttavan aineen vesipitoista liuosta pehmeällä, sivellettävällä

5 rasva-alustalla lisäämällä jokin tensidi, jonka HLB-arvo on alle 10. Kaikki nämä intranasaaliset annostusmuodot voivat sisältää myös säilöntäaineita. Yksittäisannokset ovat n. 0,08 - n. 15 mg, mieluummin 0,25 - 10 mg, jotka sisältyvät n. 0,05 - n. 0,1 g:an perusmassaa.

10 Intranasaaliseen annostukseen soveltuvat edelleen inhalatio- tai vastl. insufflaatiovalmisteet, kuten insufflaatiokapselit, jotka mahdollistavat jauheen muodossa olevan vaikuttavan aineen insufflaation hengitysilman mukana, tai aerosolit tai sprayt, jotka voivat jakaa jauheen muodossa tai liuoksen tai suspension tip-
 15 pojen muodossa olevan farmakologisen vaikuttavan aineen. Valmisteet, joilla on jauhetta jakavia ominaisuuksia, sisältävät vaikuttavan aineen lisäksi tavanomaisesti myös apuaineita: insufflaatiokapselit sisältävät esim. kiinteitä kantoaineita, kuten laktoosia. Aerosoli- tai vast. sprayvalmisteet sisältävät esim. nestemäistä
 20 ponnekaasua, jonka kiehumispiste on alle huoneen lämpötilan, sekä haluttaessa muita kantoaineita, kuten nestemäisiä tai kiinteitä ei-ionisia tai anioniaktiivisia tensidejä ja/tai kiinteitä laimennusaineita. Valmisteet, joissa farmakologinen vaikuttava aine esiintyy liuoksena, sisältävät tämän lisäksi jonkin sopivan ponne-
 25 aineen, edelleen, mikäli tarpeellista, jonkin ylimääräisen liuottimen ja/tai stabilisaattorin. Ponnekaasun sijasta voidaan käyttää myös paineilmaa, joka tuotetaan tarvittaessa sopivan tiivistys- ja jännitystenpoistolaitteen avulla.

25 Keksinnön kohteena on samoin kaavan I mukaisten uusien yhdisteiden ja niiden terapeuttisesti käyttökelpoisten happoadditiosuolojen käyttö farmakologisesti aktiivisina yhdisteinä, etenkin alussa mainituissa indikaatioissa, mieluummin farmaseuttisten valmisteiden muodossa. Päivittäinen annos n. 70 kg painavalle läm-
 30 minveriselle on n. 0,1 - n. 120 mg.

35 Keksintöä selitetään lähemmin seuraavissa esimerkeissä, joihin se ei kuitenkaan ole rajoitettu. Lämpötilat on esitetty Celsius-asteina. Lyhenteinä, esim. aminohappojen, peptidien, suojaryhmien jne. nimeämiseksi käytetään tavanomaisia esim. julkaisuissa "Synthese von Peptiden" (julkaisija E. Wunsch), "Methoden der Org. Chemie" (Houben-Weyl) osa XV (1974; G. Thieme Verlag, Stuttgart) esitettyjä lyhenteitä. Etenkin käytetään seuraavia

lyhenteitä:

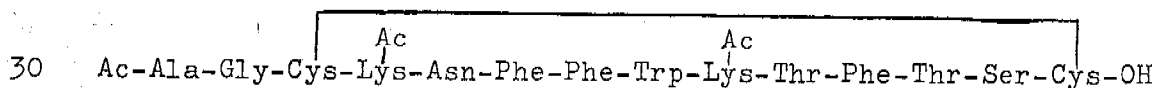
Boc	- tert-butoksikarbonyyli
But	- tert-butyli (eetterin muodostavana ryhmänä)
OTmse	- 2-(trimetyylisilyyli)-etoksi (esterin muodostavana ryhmänä)
Z	- bentsyylioksikarbonyyli (karbobentsoksi)
DC	- ohutkerroskromatografia

DC:ssa käytetään, mikäli toisin ei ole esitetty, piihappogeeliä adsorbenssina ja seuraavia järjestelmiä ajoaineina:

10	järjestelmä	52:	n-butanoli-etikkahappo-vesi (71,5:7,5:21)
		101:	n-butanoli-pyridiini-etikkahappo-vesi (38:24:8:30)
		104:	kloroformi-metanoli-17 %:nen vesipitoinen ammoniakki (41:41:18)
15		111B:	n-butanoli-pyridiini-25 %:nen ammoniakki-vesi (40:24:6:30)
		112A:	n-butanoli-pyridiini-muurahaishappo-vesi (42:24:4:20)
		151:	n-butanoli-pyridiini-etikkahappo-vesi (38:20:6:24)
20		157:	kloroformi-metanoli-vesi-etikkahappo (70:42:10:0,5)
		157B:	(85:13:1,5:0,5)
		157C:	(75:27:5:0,5)
25		157E:	(55:47:13:5)

Esimerkki 1:

$\sqrt{N^{\alpha}$ -asetyyli-Ala¹, N ^{ϵ} -asetyyli-Lys⁴, N ^{ϵ} -asetyyli-Lys⁹}-somatostaatiini



(Ac = CH₃CO-)

50 mg somatostatiinia (peptidipitoisuus 82 %, loput vettä ja etikkahappoa) 175 µl:ssa dimetyyliformamidia sekoitetaan 16 mg:an 4-nitrofenyyliasettaattia ja 12 µl:an trietyyliamiinia 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Eetteri-heksaanista saostettu tuote suodatetaan kloroformi-metanolissa (1:1) Sephadex LH-20[®]-pylvään kautta ja DC:n mukaan puhtaat fraktiot eristetään. Saanto: 44 mg.

DC: [kloroformi-metanoli-vesi-jäätikka (55:47:13:0,5)]

R_f 0,46

Esimerkki 2:

10 [D-Trp⁸, N^ε-asetyyli-Lys⁹-Gaba¹²]-syklo-somatostatiini(5-12)-oktapeptidi

[Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba]

(Ac = CH₃CO-)

100 mg [Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba] (asetaatina)
 15 liuotetaan yhdessä N-metyylimorfoliinin, jota on 15 µl, ja p-nitrofenyyliasettaatin kanssa, jota on 20 mg, 1,0 ml:an dimetyyliformamidia ja pidetään 20 tuntia huoneen lämpötilassa. Viimeistelyä varten reaktioseos saostetaan 20 ml:an etyyliasettaattia ja pestään kolme kertaa kulloinkin 5 ml:lla vettä. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatin päällä, minkä jälkeen se haihdutetaan tyhjöissä. Jäännös hierretään 5 ml:lla eetteriä, suodatetaan pois ja pestään eetterillä. Raakatuote kromatografoidaan pihapogeelipylväessä (70 g) kloroformi-metanoli-seoksen avulla (metanoliosuuden noustessa asteittain 5 %:sta 15 %:in). Sopivat ohut-
 20 kerroskromatografisesti yhtenäiset fraktiot yhdistetään, haihdutetaan tyhjöissä, liuotetaan 20 ml:ssa tert-butanolia ja lyofilisoidaan.
 25

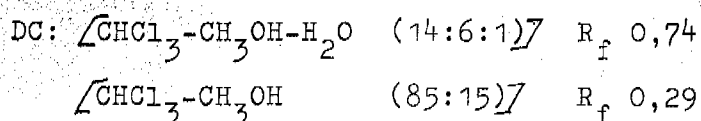
DC: [CHCH₃-CH₃OH-H₂O (14:6:1)] R_f 0,65

[CHCl₃-CH₃OH (85:15)] R_f 0,20

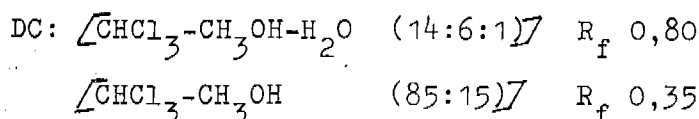
30 [n-butanoli-etikkahappo-H₂O (3:1:1)] R_f 0,77

Samankaltaisesti saadaan samasta peptidistä (vapaana emäksenä) ylläpitäen muut edellytykset seuraavat N^ε-asyyli-Lys⁹-johdannaiset, joita käytetään välituotteina seuraavan esimerkin 3 lopputuotteita varten:

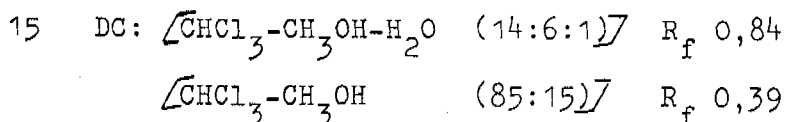
- 5 a) N^ε-(N-bentsyylioksidikarbonyyliglysyli)-Lys⁹-johdannainen (Ac = Z-Gly) saadaan 33 mg:lla Z-Gly-p-nitrofenyyliesteriä.



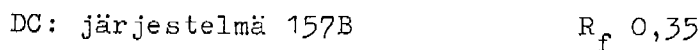
- 10 b) N^ε-(N-bentsyylioksidikarbonyylileusyyli)-Lys⁹-johdannainen (Ac = Z-Leu) saadaan 38 mg:lla Z-Leu-p-nitrofenyyliesteriä.



- c) N^ε-(N-bentsyylioksidikarbonyyli-fenyyialanyyli)-Lys⁹-johdannainen (Ac = Z-Phe) saadaan 42 mg:lla Z-Phe-p-nitrofenyyliesteriä.



- d) N^ε-(N-bentsyylioksidikarbonyyli-prolyyli)-Lys⁹-johdannainen (Ac = Z-Pro) saadaan 39 mg:lla Z-Pro-p-nitrofenyyliesteriä.



- 20 e) N^ε-(N-tert-butoksidikarbonyyli-N^ε-bentsyylioksidikarbonyyli-lysyli)-Lys⁹-johdannainen $\left[\text{Ac} = \text{Boc-Lys(Z)} \right]$ saadaan 49 mg:lla Boc-Lys(Z)-p-nitrofenyyliesteriä.



Esimerkki 3:

- 25 $\left[\text{D-Trp}^8 - \text{N}^{\epsilon} - \text{glycyyli} - \text{Lys}^9 - \text{Gaba}^{12} \right]$ -syklo-somatostatiini(5-12)-oktapeptidi

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba

(Ac = Gly)

Liukseen, jossa on 78 mg

- 5 Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Z-Gly)-Thr-Phe-Gaba (ks. esimerkki 2a), 10 ml:ssa metanolia ja 0,5 ml:ssa 1N-vesipitoista etikkahappoa lisätään 10 mg palladium-hiiltä (10 %), minkä jälkeen se hydrataan huoneenlämpötilassa ja normaalipaineessa 10 tunnin kuluessa. Viimeistelyä varten suodatetaan katalysaattorilta pois, suodos haihdutetaan tyhjiössä ja jäännös liuotetaan 20 ml:an tert-
- 10 butanolia ja lyofilisoidaan.

Samankaltaisella tavalla valmistetaan myös vastaava N^ε-leusylyli- (Ac = Leu), N^ε-fenyyli-alanyyli- (Ac = Phe), N^ε-prolyyli- (Ac = Pro) ja N^ε-(N^α-tert-butoksikarbonyyli)-lysylyli-johdannainen (Ac = Boc-Lys):

- 15 DC (silikageeli):

Järjestelmä	R _f /Ac=Gly	R _f /Ac=Leu	R _f /Ac=Phe	R _f /Ac=Pro	R _f /Ac=BocLys
101	0,60	0,69	0,71	-	-
111B	0,62	0,80	0,80	-	-
112A	0,58	0,70	0,82	-	-
20 151	0,59	0,70	0,70	-	-
157	-	-	-	-	0,65
157C	-	-	-	0,73	-

- Viimeksi mainittu N^ε-(N^α-tert-butoksikarbonyyli)-lysylyli-johdannainen (Ac = Boc-Lys) muunnetaan edelleen vastaavaksi peptidiksi, jossa on vapaa lysylyli-tähde, s.o. kaavan
- 25

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Lys)-Thr-Phe-Gaba

mukaiseksi D-Trp⁸-N^ε-lysylyli-Lys⁹-Gaba¹²-syklo-somatostatiini-(5-12)oktapeptidiksi seuraavasti:

- 100 mg Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc-Lys)-Thr-Phe-Gaba liuotetaan 30 1,9 ml:aan seosta, jossa on 89 tilavuus-% trifluorietikka-

happoa, 10 tilavuus-% vettä ja 1 tilavuus-% tioglykoli-happoa, ty-
pen vaikutuksessa 5^o:ssa, liuos lämmitetään heti 25^o:n lämpöti-
laan, annetaan seistä 25 minuuttia huoneenlämpötilassa ty-
pen vai-
kutuksessa. Tuote saostetaan 20 ml:lla eetteriä ja lyofilisoidaan
5 tert-butanolista.

DC: järjestelmä 101 R_f 0,55

Esimerkki 4:

$\left[\text{D-Trp}^8\text{-N}^\epsilon\text{-oktanoyyli-Lys}^9\text{-Gaba}^{12} \right]$ -syklo-somatostatiini(5-12)-ok-
tapeptidi

10 $\left[\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba} \right]$ $\left[\text{Ac-CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO-} \right]$

69 mg $\left[\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba} \right]$ (asetaattina), jo-
ka on 0,25 ml:ssa dimetyyli-formamidia, sekoitetaan 10 μl :an tri-
etyyliamiinia ja 23 mg:an kapryyli-happoanhydridiä (oktaanihappoan-
hydridi) ja annetaan tämän olla 15 tuntia huoneenlämpötilassa.

15 Tuote saostetaan vedellä ja suodatetaan sen puhdistamiseksi kloro-
formi-metanolissa (1:1) Sephadex LH-20[®]-pylvään kautta. DC:n mu-
kaan puhtaat fraktiot eristetään.

DC: $\left[\text{kloroformi-metanoli-vesi-jäätikka (90:10:1:0,5)} \right]$ R_f 0,23.

Esimerkki 5:

20 $\left[\text{D-Trp}^8\text{-N}^\epsilon\text{-stearoyyli-Lys}^9\text{-Gaba}^{12} \right]$ -syklo-somatostatiini(5-12)-ok-
tapeptidi

$\left[\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba} \right]$ $\left[\text{Ac-CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-} \right]$

25 Liuoksen, jossa on 66 mg $\left[\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba} \right]$
(asetaattina), 26 mg steariinihappo-p-nitrofenyyliesteriä ja 9 μl
trietyyliamiinia 0,2 ml:ssa dimetyyli-formamidia, annetaan seistä
yön yli huoneenlämpötilassa. Vedellä saostettu materiaali suoda-
tetaan tämän jälkeen kloroformi-metanolissa (1:1) Sephadex LH-20[®]-
pylvään kautta ja eristetään DC:n mukaan puhtaat fraktiot.

DC: $\left[\text{kloroformi-metanoli-vesi-jäätikka (75:26:5:0,5)} \right]$ R_f 0,18.

Esimerkki 6:

Δ -Trp⁸-N^ε-(β-karboksi-propionylyli)-Lys⁹-Gaba¹²]-syklo-somatostatiini(5-12)-oktapeptidi

$\boxed{\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba}}$ (Ac=HOOC-CH₂CH₂-CO-)

- 5 100 g $\boxed{\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba}}$ (asetaattina) liuotetaan 0,8 ml:an dimetyyliformamidia ja sekoitetaan 9 ml:an N-metyylimorfoliinia ja 8,2 g:an meripihkahappoanhydridiä. Reaktioaika on 1 tunti huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään 5 ml (peroksiditonta) eetteriä. Saostunutta, rasvaista raakatuotetta hierretään puhdistamista varten 5 ml:lla eetteriä, liuotetaan 10 5 ml:an tert-butanolia ja lyofilisoidaan.

DC:	$\boxed{\text{n-butanoli-etikkahappo-vesi (3:1:1)}}$	R _f 0,65
	järjestelmä 52	R _f 0,63
	järjestelmä 104	R _f 0,60
15	järjestelmä 111B	R _f 0,50
	järjestelmä 157E	R _f 0,58

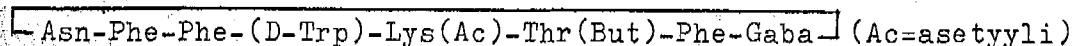
Esimerkki 7:

Δ -Trp⁸-N^ε-asetyyli-Lys⁹-Gaba¹²]-syklo-somatostatiini(5-12)-oktapeptidi

- 20 $\boxed{\text{Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-Phe-Gaba}}$ (Ac=CH₃CO)

- Liuos, jossa on 283 mg raakaa H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr-(But)-Phe-Gaba-OH (vaihe 7.7), 324 mg N-hydroksibentsotriatsolia ja 495 mg DCCI:a 240 ml:ssa dimetyyliformamidia, pidetään 20 tuntia 50^o:ssa. Viimeistelyä varten liuotin haihdutetaan suurtyhjössä pois noin 30^o:ssa ja jäännöstä hierretään 10 ml:lla etyyliasetaatia. Saostunut disykloheksyylivirtsa-aine poistetaan suodattamalla, suodos laimennetaan etyyliasetaatilla 50 ml:an, pestään kolum kerran kulloinkin 20 ml:lla 1N vesipitoisella oksaalihapolla ja sitten vedellä neutraaliksi, kuivataan natriumsulfaatin päällä ja haihdutetaan tyhjössä. Raakatuote alistetaan puhdistusta varten vastavirtajakaantumiseen järjestelmässä metanoli-
- 25
- 30

5 veäsi-kloroformi-tetrakloorietaani (2700:675:900:1575 tilavuus-
osaa) 430 vaiheen kautta. Elementeissä 210 - 254 saadut faasit
(K = 1,16) yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä. Jäännös liuote-
taan 20 ml:an tert-butanolia ja lyofilisoidaan, jolloin saadaan
kaavan



mukainen ohutkerroskromatografisesti yhtenäinen materiaali

DC: $\sqrt{\text{kloroformi-metanoli (85:15)}}$ R_f 0,15

$\sqrt{\text{kloroformi-metanoli-vesi (14:6:1)}}$ R_f 0,70

10 Tämä suojattu syklopeptidi (186 mg) liuotetaan 5^o:ssa N₂:n vaiku-
tuksessa 1,5 ml:an seosta, jossa on 89 tilavuus-% trifluorietik-
kahappoa, 10 tilavuus-% vettä ja 1 tilavuus-% tioglykoli-happoa,
liuos lämmitetään heti 25^o:n lämpötilaan ja saostetaan 90 minu-
tin kuluttua huoneenlämpötilassa N₂:n vaikutuksessa 15 ml:lla
15 eetteriä. Tuloksena saatu raakatuote lyofilisoidaan tert-buta-
nolista.

Saatu otsikkoyhdiste on kolmessa järjestelmässä ohutkerros-
kromatografisesti identtinen esimerkin 2 tuotteen kanssa.

20 Lähtöaineena käytetty lineaarinen oktapeptidi valmistetaan
seuraavalla tavalla:

Vaihe 7.1:

Z-(D-trp)-Lys(Ac)-OH

25 Liuokseen, jossa on 33,84 g Z-(D-Trp)-OH ja 17,42 g 8-hyd-
roksikinoliinia 50 ml:ssa asetonitriiliä, lisätään tipoitain 0^o-
5^o:ssa 45 minuutin kuluessa liuos, jossa on 21,87 g DCCI:a 100
ml:ssa asetonitriiliä. 30 minuutin kuluttua 5^o:ssa poistetaan
saostunut disykloheksyylivirtsa-aine suodattamalla ja pesemällä
50 ml:lla asetonitriiliä. Suodos sekoitetaan liuokseen, jossa on
20,70 g H-Lys(Ac)-OH 25,9 ml:ssa 4,25N-kalilipeää ja 80 ml:ssa
30 asetonitriiliä ja annetaan seistä 15 tuntia huoneenlämpötilassa.
Viimeistelyä varten reaktioseos haihdutetaan tyhjössä, jäännös
saostetaan 1 litraan etyyliasetaattia, pestään kolme kertaa kul-
loinkin 200 ml:lla 1N-suolahappoa 0^o:ssa ja kolme kertaa kulloin-
kin 200 ml:lla vettä, orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatin

päällä ja haihdutetaan tyhjössä. Saatu ruskea öljy liuotetaan 150 ml:an kloroformia ja tiputetaan sekoittamalla samalla voimakkaasti 1,5 litraan heksaania. Höytäleinen, tahmea saostuma suodattetaan pois, pestään 500 ml:lla heksaania ja kuivataan tyhjössä.

5 Lisäpuhdistusta varten materiaali liuotetaan 150 ml:an tetrakloorietaani-etyyliasettaattia (6:4 tilavuusosaa) ja kromatografoidaan pihappogeelipylväällä tämän liuosseoksen avulla. Sopivat ohutkerroskromatografisesti yhtenäiset fraktiot haihdutetaan tyhjössä, minkä ansiosta saadaan puhdas tuote vaahdomaisen massan muodossa.

10 DC: $\left[\text{kloroformi-metanoli-vesi (14:6:1)} \right]$ R_f 0,45

Vaihe 7.2

Z-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse

Liuos, jossa on 7,24 g raakaa (87 %:sta titrauksen mukaisesti) H-Thr(But)-Phe-OTmse:a ja 7,58 g Z-(D-Trp)-Lys(Ac)-OH (vaihe 7.1) 100 ml:ssa dimetyyliformamidia, sekoitetaan 5^o:ssa 2,28 g:an N-hydroksibentsotriatsolia ja 3,38 g:an DCCI:a ja reaktioseos pidetään 1 tunti 5^o:ssa ja vielä 15 tuntia huoneen lämpötilassa. Viimeistelyä varten saostunut disykloheksyylivirtsa-aine poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan suurtyhjössä. Jäännös saostetaan uudestaan kaksi kertaa etyyliasettaatti-petrolieetteristä ja kuivataan tyhjössä.

20 DC: $\left[\text{kloroformi-etyyliasettaatti (1:1)} \right]$ R_f 0,18

$\left[\text{tolueeni-asetoni (1:1)} \right]$ R_f 0,50

25 Vaihe 7.3

H-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse

Liukseen, jossa on 5,00 g Z-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse (vaihe 7.2) 300 ml:ssa metanolia, lisätään 0,50 g palladiumhiiltä (10 %), minkä jälkeen se hydrataan huoneenlämpötilassa ja normaalipaineessa 5 tunnin ajan. Viimeistelyä varten suodatetaan pois katalysaattorilta ja suodoksen haihdutuksen jälkeen jäljelle jäävä jäännös käytetään heti edelleen vaiheessa 7.4.

Vaihe 7.4

Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse

- Liuos, jossa on 632 mg Z-Asn-Phe-Phe-OH ja 803 mg H-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse (vaihe 7.3) 5 ml:ssa dimetyylidormamidia, sekoitetaan 210 mg:an N-hydroksibentsotriatsolia ja 276 mg:an DCCI:a ja annetaan sen olla 15 tuntia huoneenlämpötilassa.
- 5 Viimeistelyä varten poistetaan saostunut diheksyylivirtsa-aine suodattamalla ja suodos haihdutetaan suurtyhjössä. Öljyistä jäänöstä hierretään 5 ml:lla metanolia ja imetään pois. Liukenemattomia materiaaleja hierretään puhdistusta varten vielä kerran 5 ml:lla metanolia 50^o:ssa, imetään pois, pestään metanolilla ja
- 10 kuivataan tyhjössä. Tuote on DC:n mukaan yhtenäinen.

DC: $\sqrt{\text{kloroformi-metanoli (85:15)}}$ R_f 0,78
 $\sqrt{\text{kloroformi-metanoli-vesi (14:6:1)}}$ R_f 0,82

Vaihe 7.5

Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OH

- 15 900 mg Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OTmse:a (vaihe 7.4) liuotetaan 23 ml:an juuri valmistettua, vedetöntä 0,15N-tetraetyyliammoniumfluoridi-liuosta dimetyyliformamidissa ja pidetään 30 minuuttia 25^o:ssa. Jäähdytetään 5^o:n lämpötilaan, minkä jälkeen reaktioseos sekoitetaan samalla sekoittaen hyvin
- 20 0,68 ml:an 1N vesipitoista suolahappoa ja tuote saostetaan lisäämällä 70 ml vettä. Poissuodatettu materiaali pestään 5 ml:lla vettä, kuivataan tyhjössä fosforipentoksidin päällä ja käytetään suoraan vaiheeseen 7.6.

Vaihe 7.6

Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl

- Seos, jossa on 411 mg Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-OH:a (vaihe 7.5) ja 82 mg Gaba-bentsyyliesteri-p-tolueenisulfonaattia 2 ml:ssa dimetyyliformamidia, sekoitetaan 61 mg:an 1-hydroksibentsotriatsolia ja 93 mg:an DCCI:a ja pidetään 20 tuntia huoneenlämpötilassa. Viimeistelyä varten seos sekoitetaan
- 30 15 ml:an jääkylmää metanolia ja suodatetaan. Saatua kiinteää aine sekoitetaan lisäpuhdistusta varten 5 ml:an lämmintä metanolia 10 minuuttia, suspensio jäähdytetään 0^o:n lämpötilaan, puhdas tuote suodatetaan pois ja kuivataan tyhjössä.
- 35 DC: $\sqrt{\text{kloroformi-metanoli (85:15)}}$ R_f 0,75

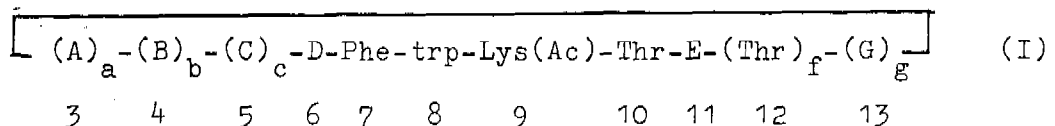
Vaihe 7.7H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-Thr(But)-Phe-Gaba-OH

Liukseen, jossa on 400 mg Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Ac)-
Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl:a (vaihe 7.6) 25 ml:ssa dimetyyliformamidia,
5 lisätään 50 mg palladium-hiiltä (10 %), minkä jälkeen se hydrataan
6 tunnin kuluessa huoneenlämpötilassa ja normaalipaineessa. Vii-
meistelyä varten liuos suodatetaan pois katalyysaattorilta, minkä
jälkeen sen konsentroidaan suurtyhjössä 2 ml:an ja tuote saoste-
taan 25 ml:lla peroksiditonta eetteriä, suodatetaan pois ja kui-
10 vataan tyhjössä. Raakatuote käytetään ilman lisäpuhdistusta lop-
puvaiheeseen (syklisointiin).

Patenttivaatimukset:

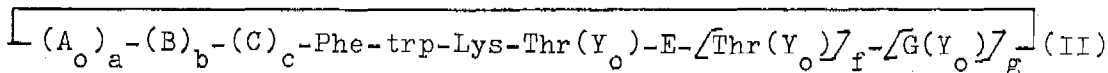
1. Menetelmä asyylipeptidien sekä niiden suoalojen ja kompleksien valmistamiseksi, jotka asyylipeptidit on johdettu somatostatiinista tai jostakin sen vaikutukseltaan analogisesta johdannaisesta, jonka aminohappojärjestys on modifioitu jättämällä pois yksittäisiä aminohappoja ja/tai vaihtamalla ne toisiksi aminohapoiksi, ja joissa asyylipeptideissä 9-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä, ja mahdollisesti myös 4-asemassa olevan lysiinitähteen ϵ -aminoryhmä ja/tai N-terminaalinen α -aminoryhmä sisältää mahdollisesti substituoidun alkaanikarbonihapon asyyli-
 15 tähteen, t u n n e t t u siitä, että asyloidaan vastaava peptidi jonka 9-asemassa olevassa lysiinitähteessä on vapaa ϵ -aminoryhmä, mahdollisesti suojaamalla tilapäisesti esiintyvät vapaat hydroksiryhmät tai muut vapaat aminoryhmät, tai syklisoidaan asyylipeptidiä vastaava lineaarinen peptidi mahdollisesti suojaamalla tilapäisesti esiintyvät vapaat hydroksyyli-, karboksyyli- ja/tai aminoryhmät ja haluttaessa muunnetaan suolan muodossa saadut yhdisteet vastaavaksi vapaaksi muodoksi tai saatu vapaa yhdiste joksi-
 20 kin vastaavaksi suolaksi, ja/tai haluttaessa muunnetaan saatu yhdiste sen kompleksiksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yleisen kaavan



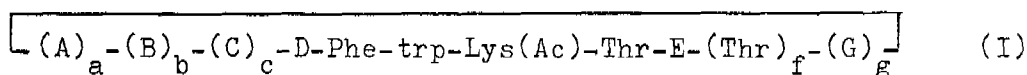
mukaisten asyylipeptidien sekä niiden ei-toksisten suojojen ja farmakologisesti käyttökelpoisten kompleksien valmistamiseksi, jossa kaavassa

- $\text{CH}_3\text{CO}-$ Ac
 Gly 5
 Leu
 Phe
 Pro
 Boc-Lys-D-Lys
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$
 $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ ¹⁰
 $\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-$
- A merkitsee mahdollisesti substituoidun alkaanikarbonihapon vapaassa aminoryhmässä olevaa asyyliähdettä,
 merkitsee osakaavojen $\text{Ala}^1-\text{Gly}^1-\text{Cys}^3-\text{cys}^{14}-\text{OH}$,
 $\text{Ac-Ala}^1-\text{Gly}^2-\text{Cys}^3-\text{cys}^{14}-\text{OH}$, $\text{H-Cys}^3-\text{cys}^{14}-\text{OH}$,
 $\text{Ac-Cys}^3-\text{cys}^{14}-\text{OH}$ tai $\text{Bmp}-\text{cys}^{14}-\text{OH}$ mukaista tähdettä,
 (jolloin cys merkitsee tähdettä L-Cys tai D-Cys ja Bmp des-aminosysteini-tähdettä) tai osakaavan $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ mukaisen α -aminoalempialkaanikarbonihapon tähdettä (jolloin n on jokin kokonaisluvusta 0 - 6 ja R merkitsee vetyä tai karboksyyliä), joka myös jos n = 2 ja R on vetyä, voi olla substituoitu jollakin syklisellä hydrokarbyylitähdeellä ja jolloin sitä merkitään symbolilla Gaba(Ar),
 B merkitsee tähteitä Lys, Lys(Ac) tai Lys(X) (jolloin X on ϵ -aminosuojarahva),
 C merkitsee tähteitä Asn, Ala tai His,
 D merkitsee tähdettä Phe, tai mikäli tähteessä A ei esiinny mitään rikkipitoisia aminohapotähteitä, yhdessä symbolin E kanssa tähdettä $-\text{Cys}^6-\text{Cys}^{11}-$,
 20 trp merkitsee tähteitä L-Trp, D-Trp tai jotakin analogista tähdettä, joka sisältää indoliytimessä, esimerkiksi 5-asemassa halogeenin, etenkin fluorin,
 25 E tarkoittaa tähdettä Phe tai Tyr, tai sillä on yhdessä symbolin D kanssa yllä mainittu merkitys,
 G merkitsee tähdettä L-Ser, D-Ser tai jonkin korkeintaan 8 hiiliatomia sisältävän sekundäärisen α -aminohapon tähdettä,
 ja
 30 a, b, c, f ja g merkitsevät riippumattomasti lukuja 0 tai 1, t u n n e t t u siitä, että kaavan (II)

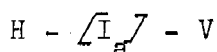


mukainen peptidi, jossa A_0 merkitsee jotakin yllä määritellyä tähdettä A vastaavaa tähdettä, jossa N-terminaalisen aminohapotähteen α -aminoryhmä voi sisältää α -aminosuojaryhmän X', Y_0 on vety tai jokin hydroksyyli-ryhmä Y, ja jossa muilla symboleilla on yllä mainitut merkitykset, käsitellään alkaanikarbonihapolla Ac_0OH , jossa Ac_0 merkitsee jotakin yllä määritellyä asyyli-ryhmää Ac vastaavaa tähdettä, jossa esiintyvät amino- ja hydroksyyli-ryhmät voivat olla varustettuja suojaryhmillä X, X' tai vast. Y, tai jonkin tällaisen hapon reaktiokykyisellä johdannaisella ja haluttaessa tai mikäli tarpeellista vapautetaan saadussa tuotteessa suojaryhmien X, X' ja Y lohkaisun avulla aminoryhmät tai vast. hydroksyyli-ryhmät.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yleisen kaavan

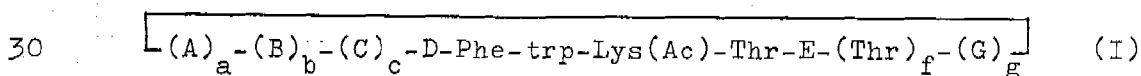


15 mukaisten asyylipeptidien valmistamiseksi, jossa symboleilla Ac, A, B, C, D, E, G, trp, a, b, c, f ja g on patenttivaatimuksessa 2 mainittu merkitys, t u n n e t t u siitä, että syklisoidaan kaavan



20 mukainen lineaarinen peptidi, jossa I_a on patenttivaatimuksessa 2 määritellyä kaavaa I vastaava tähti, jossa peptidirenkaan kahden mielivaltaisen vierekkäisen aminohapotähteen välinen amidin sidon on katkaistu, ja V merkitsee vapaata hydroksyyli-ryhmää, aktivointiryhmällä muunnettua hydroksyyli-ryhmää tai hydratsinoryhmää $-NH-NH_2$, jolloin mahdollisesti esiintyvät, syklisointireaktioon osallistumattomat amino-, karboksyyli- ja hydroksyyli-ryhmät esiintyvät tarpeen mukaan suojatussa muodossa ja ne vapautetaan tämän jälkeen.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yleisen kaavan



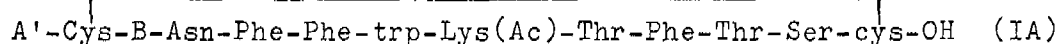
mukaisten asyylipeptidien valmistamiseksi, jossa symboleilla Ac, A, B, C, D, E, G, trp, a, b, c, f ja g on patenttivaatimuksessa

2 esitetty merkitys, t u n n e t t u siitä, että kaavan (IV)



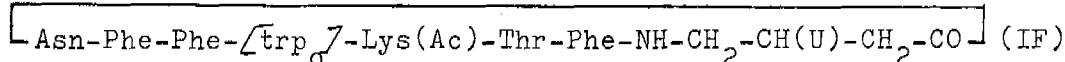
mukainen vastaava lineaarinen peptidi, jossa I_s on jokin patenttivaatimuksessa 2 määriteltyä kaavaa I vastaava tähde, jossa rikkipitoisten aminohappotähteiden välinen disulfidinen sidos on
 5 katkaistu, ja T_o merkitsee vetyä tai merkaptosuojaryhmää T, hape-
 tetaan disulfidi-sillan muodostamiseksi mahdollisesti lohkaisemal-
 la etukäteen tai samanaikaisesti merkaptosuojaryhmät T, ja vapau-
 tetaan mahdollisesti suojatussa muodossa esiintyvät amino-, karbok-
 10 syyli- ja/tai hydroksyyli-ryhmät.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä,
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yleisen kaavan (IA)



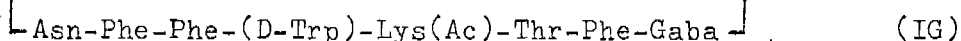
mukainen asyylipeptidi, jossa A' merkitsee ryhmiä Ala-Gly-,
 15 Ac-Ala-Gly-, H- tai Ac- ja symboleilla Ac, B, trp ja cys on pa-
 tenttivaatimuksessa 2 esitetyt merkitykset, tai tämän asyylipep-
 tidin ei-toksinen suola tai farmakologisesti käyttökelpoinen
 kompleksi.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä,
 20 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yleisen kaavan (IF)



mukainen asyylipeptidi tai sen ei-toksinen suola tai farmakologi-
 25 sestisesti käyttökelpoinen kompleksi, jolloin trp_o merkitsee tähdettä
 D-Trp tai D-(5F)Trp, symbolilla Ac on patenttivaatimuksessa 2
 määritellyt merkitykset ja U merkitsee vetyä tai jotakin mahdol-
 lisesti substituotua syklistä hydrokarbyylitähdettä Ar.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä,
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan (IG)



mukainen asyylipeptidi, jossa Ac tarkoittaa luonnossa esiintyvän α -aminohapon tai sen D-epimeerin tähdettä, tai tämän asyylipeptidin ei-toksinen suola tai farmakologisesti käyttökelpoinen kompleks.

5 8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan IG mukainen asyylipeptidi, jossa Ac tarkoittaa glysyylä, leusyyliä, fenyyli-alanyyliä tai tämän asyylipeptidin ei-toksinen suola tai farmakologisesti käyttökelpoinen kompleks.

10 9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan IG mukainen asyylipeptidi, jossa Ac tarkoittaa prolyyliä, tai tämän asyylipeptidin ei-toksinen suola tai farmakologisesti käyttökelpoinen kompleks.

15 10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan IG mukainen asyylipeptidi, jossa Ac tarkoittaa lysyyliä tai N^{α} -tert-butoksi-karbonyylilysyliä, tai tämän asyylipeptidin ei-toksinen suola tai farmakologisesti käyttökelpoinen kompleks.

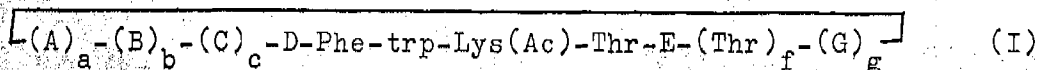
Patentkrav:

L 8

20 1. Förfarande för framställning av acylpeptider, som här leder sig från somatostatiner eller ett derivat därav med analog verkan, vars aminosyrasekvens har modifierats genom utelämnning av enskilda aminosyror och/eller genom utbyte av dessa mot andra aminosyror, och i vilka ϵ -aminogruppen av lysinresten i 9-ställningen och eventuellt också ϵ -aminogruppen av lysinresten i 25 4-ställningen och/eller den N-terminala α -aminogruppen innehåller en acylrest av en eventuellt substituerad alkankarbonsyra, samt salter och komplexer därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att man acylerar en motsvarande peptid med en fri ϵ -aminogrupp i 30 lysinresten i 9-ställningen, eventuellt under tillfälligt skydd av närvarande fria hydroxigrupper eller övriga fria aminogrupeer, eller cykliserar en acylpeptiden motsvarande linear peptid, eventuellt under tillfälligt skydd av närvarande fria hydroxyl-, karboxyl- och/eller aminogrupeer och, om så önskas, omvandlar i 35 form av salt erhållna föreningar till den motsvarande fria formen

eller en erhållen fri förening till ett motsvarande salt, och/ eller, om så önskas, överför en erhållen förening till dess komplex.

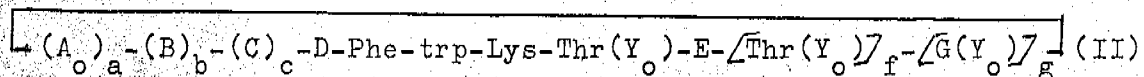
2. Förfarande enligt patentkravet 1 för att framställa acylpeptider med den allmänna formeln



i vilken

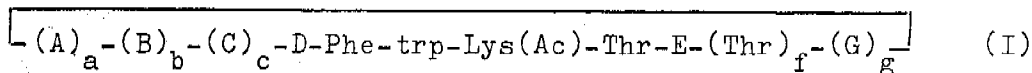
- Ac betyder en vid den fria aminogruppen befintlig acylrest av en eventuellt substituerad alkankarbonsyra,
- 10 A betyder en rest med delformeln $\text{Ala}^1 - \text{Gly}^2 - \overline{\text{Cys}^3 - \text{cys}^{14}} - \text{OH}$,
 $\text{Ac} - \text{Ala}^1 - \text{Gly}^2 - \overline{\text{Cys}^3 - \text{cys}^{14}} - \text{OH}$, $\text{H} - \overline{\text{Cys}^3 - \text{cys}^{14}} - \text{OH}$,
 $\text{Ac} - \overline{\text{Cys}^3 - \text{cys}^{14}} - \text{OH}$ eller $\overline{\text{Bmp} - \text{cys}^{14}} - \text{OH}$ (varvid cys står för L-Cys eller D-Cys och Bmp för desaminocystein-resten),
 eller resten av en ω -aminolägrealkankarbonsyra med delformeln $-\text{NH} - \text{CH}(\text{R}) - (\text{CH}_2)_n - \text{CO}-$ (varvid n betyder ett helt tal 0 - 6 R står för väte eller karboxyl), som också, om n = 2 och R är väte, kan vara substituerad med en cyklisk hydrokarbylrest, och i ett sådant fall betecknas med symbolen Gaba(Ar),
- 15 B betyder Lys, Lys(Ac) eller Lys(X) (varvid X är en ϵ -aminoskyddgrupp),
- C betyder Asn, Ala eller His,
- D betyder Phe, eller, om inga svavelhaltiga aminosyrarester förekommer i resten A, kan tillsammans med E betyda resten
- 25 $-\overline{\text{Cys}^6 - \text{Cys}^{11}} -$
- trp betyder L-Trp, D-Trp eller en analog rest, som i indolkärna, t.ex. i 5-ställningen innehåller halogen, särskilt fluor,
- E betyder Phe eller Tyr, eller har tillsammans med D den ovan angivna betydelsen.
- 30 G betyder L-Ser, D-Ser eller resten av en sekundär α -amino-syra med högst 8 kolatomer, och
- a, b, c, f och g står oberoende för 0 eller 1, samt icke-toxiska salter och farmakologiskt användbara komplex därav, k ä n n e -

t e c k n a t därav, att man behandlar en peptid med formeln (II)



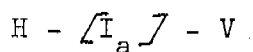
vari A_o betyder en den ovan definierade resten A motsvarande rest, i vilken α -aminogruppen av den N-terminala aminosyraresten kan innehålla en α -aminoskyddgrupp X' , Y_o är väte eller en hydroxylskyddsgrupp Y, och vari de övriga symbolerna har de ovan angivna betydelserna, med en alkankarbonsyra Ac_oOH , vari Ac_o betyder en den ovan definierade acylresten Ac motsvarande rest, i vilken närvarande amino- eller hydroxylgrupper kan vara försedda med skyddsgrupper X, X' resp. Y, eller med ett reaktivt derivat av en sådan syra och, om så önskas eller det är nödvändigt, frigör i den erhållna produkten aminogrudder resp. hydroxylgrupper genom avspjälkningen av skyddsgrupperna X, X' och Y.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 för att framställa acylpeptider med den allmänna formeln



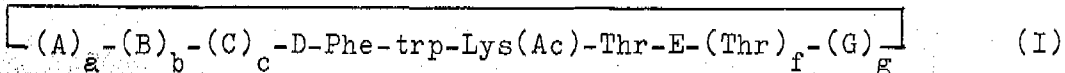
vari Ac, A, B, C, D, E, G, trp, a, b, c, f och g har den i patentkravet 2 angivna betydelsen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man cykliserar en linear peptid med formeln

20



vari I_a är en rest som motsvarar den i patentkravet 2 definierade formeln I, i vilken den amidiska bindningen mellan två godtyckliga intill-liggande aminosyrarester av en peptidring är avbruten, och V står för en fri hydroxylgrupp, en genom en aktiveringsgrupp omvandlad hydroxylgrupp eller hydrazinogruppen $-NH-NH_2$, varvid eventuellt närvarande i cykliseringsreaktionen icke deltagande amino-, karboxyl- och hydroxylgrupper vid behov föreligger i skyddad form och frigöres i efterhand.

4. Förfarande enligt patentkravet 1 för att framställa acylpeptider med den allmänna formeln

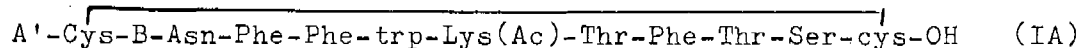


vari Ac, A, B, C, D, E, G, trp, a, b, c, f och g har den i patentkravet 2 angivna betydelsen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man oxiderar en motsvarande linear peptid med formeln (IV)



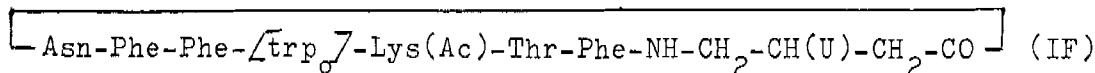
vari I_s är en rest motsvarande den i patentkravet 2 definierade formeln I, i vilken den disulfidiska bindningen mellan de svavelhaltiga aminosyraresterna är avbruten, och T_o står för väte eller en merkaptoskyddsgrupp T, för bildning av disulfid-bryggan, eventuellt under föregående eller samtidig ävspjälkning av merkaptoskyddsgrupperna T, och fri sätter eventuellt i skyddad form förekommande amino-, karboxyl- och/eller hydroxylgrupper.

10 5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med
15 den allmänna formeln



20 vari A' står för Ala-Gly-, Ac-Ala-Gly-, H- eller Ac- och Ac, B, trp och cys har de i patentkravet 2 angivna betydelserna, eller en icke-toxiskt salt eller en farmakologiskt användbart komplex därav.

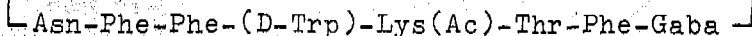
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med den allmänna formeln



25 vari trp_o står för D-Trp eller D-(5F)Trp, Ac har de i patentkravet 2 definierade betydelserna och U betyder väte eller en eventuellt substituerad hydrokarbylrest Ar, eller ett icke-toxiskt salt eller ett farmakologiskt användbart komplex därav.

30 7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med

formeln



(IG)

5 vari Ac står för resten av en i naturen förekommande α -amino-syra eller dess D-epimer, eller ett icke-toxiskt salt eller ett farmakologiskt användbart komplex därav

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n - n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med formeln IG, vari Ac står för glycyll, leucyll eller fenylalanyl, eller en icke-toxiskt salt eller ett farmakologiskt användbart
10 komplex därav.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n - n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med formeln IG, vari Ac står för prolyll, eller ett icke-toxiskt salt eller ett farmakologiskt användbart komplex därav.

15 10. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n - n e t e c k n a t därav, att man framställer en acylpeptid med formeln IG, vari Ac står för lysyll eller N⁺-tert-butoxikarbonyll-lysyll, eller ett icke-toxiskt salt eller ett farmakologiskt användbart komplex därav.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

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

FI H 751 320 (C07C103/52), H 760 539 (C07C103/52), H 762 252
(C07C103/52)

CH

DE H 2 659 758 (C07C103/52)

DK

FR

GB

NO

SE

US 3 904 594 (C07C103/52)

Merkitse hakemusjulkaisuun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen K ja vastaa-asti kuulutus- ja patenttijulkaisuun numeron eteen K ja P.

EP H O 001295 (C07L103/52)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Orainth Soreni

Allekirjoitus