

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 961584 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **961584**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 5/08
C07K 5/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.05.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.04.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.04.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **16.05.1994** **PCT/EP1994/001574**
Internationell ansökan - International
application

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

12.10.1993 IT 93002154

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Italfarmaco S.p.A., Viale Fulvio Testi, 330 Milano, Italia, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Caretto, Patrizia, Italy, ITALIA, (IT)
2 • Leoni, Flavio, Italia, ITALIA, (IT)
3 • Marcucci, Fabrizio, Italy, ITALIA, (IT)
4 • Gromo, Gianni, Italy, ITALIA, (IT)
5 • Mascagni, Paolo, Italy, ITALIA, (IT)
6 • Pinori, Massimo, Italia, ITALIA, (IT)
7 • Cappelletti, Silvana, Italia, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Forssén & Salomaa Oy, Lautatarhankatu 8 B, 00580 Helsinki

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

C-reaktiivisista proteiinifragmenteista johdetut oligopeptidit
Oligopeptider härledda från C-reaktiva proteinfragment

C-reaktiivisista proteiinifragmenteista
 johdetut oligopeptidit
 Oligopeptider härledda från
 C-reaktiva proteinfragment

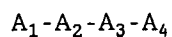
5

Tämä keksintö liittyy oligopeptideihin, jotka on johdettu C-reaktiivisista proteiinifragmenteista (tämän jälkeen CRP), ja niiden käyttöön
 10 immunomoduloivina aineina ja sydänverisuoni- ja tulehdustautien hoidossa.

CRP on proteiini, jonka konsentraatio veressä yleisesti ottaen on hyvin matala. Se on kaksituhatta kertaa korkeampi tulehdusten jälkeen
 15 [J.J. Morley ja I. Kushner, Am. N.Y. Acad. Sci., 389, 406-418 (1989)]. F.A. Robey et al., J. Biol. Chem., 262, No. 15, 7053-7057 (1987) esittää kolme CRP-tetrapeptidisekvenssiä, jotka ovat hyvin samanlaisia kuin tuftsiini. Kemiallisesti syntetisoidut tetrapeptidit stimuloivat fagotsyyttisiä leukosyyttejä ja superoksidin tuotantoa ja saa aikaa yksiytimisiä soluja interleukiinin 1 tuottamiseksi tuftsiinimaisella tavalla.
 20 Kuten tuftsiini, nämä kolme CRP-tetrapeptidiä metabolisoituvat nopeasti ja inaktivoituvat proteaasien toimesta in vivo.

Nyt on yllättäen havaittu, että mainittujen CRP-tetrapeptidifragmentien kemiallisesti modifioiduilla analogeilla on immunomoduloivaa vaikutusta ja ne ovat käyttökelpoisia sydänverisuonitautien ja tulehdustautien hoidossa, esim. septisen shokin terapiassa.

Siksi tämä keksintö liittyy kaavan (I) mukaisiin oligopeptideihin
 30



(I)

jossa

35 A_1 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat treoniini, leusiini, isoleusiini, valiini, sarkosiini, alaniini, glysiini ja (C_{2-6}) asyyliglysiini, tai se ei ole läsnä;

A_2 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu leusiini, isoleusiini, valiini, lyysiini, ornitiini, $N\alpha$ -substituoitu ainakin yhdellä (C_{1-6}) alkyyllillä, bentsyyllillä tai (C_{2-6}) asyyliryhmällä;

- 5 A_3 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu proliini, leusiini, isoleusiini ja valiini;

A_4 on aminohappojäännös joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu arginiini, leusiini ja glutamiini, valinnaisesti aminodoitu C-päätteessä tai
10 on agmatiinijäännös, tai ei ole läsnä;

sillä edellytyksellä, että ainakin yksi ryhmistä A_1 , A_2 ja A_4 voi olla poissa; jolloin mainitut yhdisteet lisäksi on tunnettu siitä, että edellä olevat aminohappojäännösten sivuketjoryhmät ja agmatiinijäännös
15 voidaan valinnaisesti substituoida yhdellä tai useammalla ryhmällä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu (C_{1-6}) alkyyli, bentsyyli tai (C_{2-6}) asyyli; tai kukin mainituista aminohappojäännöksistä voi olla D- tai L-muodossa $C\alpha$ -kohdassa, tai mahdollisten diastereoisomeerien tai enantiomeerien muodossa;

20 ja niiden suolat farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen tai emästen kanssa.

Edullinen keksinnön mukaisten yhdisteiden ryhmä on kaavan (I) mukaiset
25 yhdisteet, joissa A_1 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu glysiini, treoniini, leusiini, isoleusiini, valiini, sarkosiini, alaniini, (C_{2-6}) asyyliglysiini, tai sitä ei ole läsnä;

A_2 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu glysiini, $N\alpha$ -substituoitu (C_{1-6}) alkyyllillä, bentsyyllillä tai (C_{2-6}) asyyliryhmällä;
30

A_3 on proliini;

35 A_4 on glutamiini, leusiini, arginiini, valinnaisesti aminodoitu C-päätteessä tai on agmatiinijäännös, tai sitä ei ole läsnä;

jolloin yhdisteet lisäksi on tunnettu siitä, että mainitun aminohappojäännöksen ja agmatiinijäännöksen sivuketjoryhmät voidaan valinnaisesti substituoida yhdellä tai useammalla substituentilla, joka on valittu ryhmästä (C₁₋₆)alkyyli, bentsyyli tai (C₂₋₆)asyyli; ja kukin mainituista aminohappojäännöksistä voi olla C α :ssa D- tai L-muodossa mahdollisten diastereoisomeerien tai enantiomeerin muodossa;

ja niiden suolat farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen tai emästen kanssa.

10

(C₁₋₆)alkyyllillä tarkoitetaan sellaista ryhmää kuin metyyli-, etyyli-, propyyli-, i-propyyli-, butyyli-, sec-butyli-, tert.-butyyli-, n-pentyyli-, 3-metyyli-pentyyli-, n-heksyyli-ryhmä, ja asiaankuuluvat mahdolliset isomeerit. (C₂₋₆)asyyli on sellainen ryhmä kuin formyyl-, asetyyli-, propionyyli-, butyryyli-, pentanoyyli-, heksanoyyli ja asiaankuuluvat mahdolliset isomeerit.

15

Tämän keksinnön toinen kohde liittyy kaavan (I) mukaisten oligopeptidien käyttöön immunomoduloivina aineina ja sydänverisuoni- ja tulehdus- tautien, kuten septisen shokin terapiassa.

20

Yleisen kaavan (I) mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa käyttämällä peptidisynteesimenetelmiä, sekä kiinteässä faasissa että liuoksessa, jotka ovat tunnettuja alalla [kts. esim. Merrified, R.B., Biochemistry, 25 3, 1385 (1964)]. Jos ei muuta sanota, aminohappojäännökset on tarkoitettu käytettäväksi L-konfiguroinnissa C α -kohdassa.

Edullisesti synteesi suoritetaan liuoksessa lähtemällä valitusta aminohaposta ja kokoamalla oligopeptidi asteittaisella valittujen aminohappojen lisäyksellä. Joka tapauksessa voidaan myös käyttää esirakennettuja di- tai tripeptidiyksiköitä. Vaikka oligopeptidin synteesi voidaan aloittaa mistä vain aminohaposta ja se voi edetä sekä N-päättteen että C-päättteen suunnassa, on edullista suorittaa se N-päättteen suunnassa. Aminohapot tai haluttaessa esimuodostetut di- tai tripeptidit voidaan 30 käyttää sellaisenaan tai asianmukaisten johdannaisien muodossa, joiden karboksiryhmä on suojattu esteröinnillä, esim. tert.-butyyli-, 35

(tBu)-ryhmällä ja/tai amiiniryhmä amidoinnilla, esim. bentsyylioksikarbonyylillä (Z), ja, jos se on sopivasti suojattu näissä sivuketjoryhmissä, esim. 2,2,5,7,8-pentametyyli-kroman-6-sulfonyylillä (Pmc), tert.-butyylioksikarbonyylillä (Boc) tai trifluorietikkahapolla (TFA).

- 5 Nämä suojaukset voidaan suorittaa menetelmillä, jotka ovat tuttuja peptidikemia-alan ammattihenkilöille.

- Joka tapauksessa edellä mainitut suojatut johdannaiset ovat myös kaupallisesti saatavia tuotteita. α -amino-osuuden suojaryhmä edullisesti poistetaan ennen kondensointia sen jälkeisellä aminohapolla, esim. asidolyysillä keskivahvoilla hapoilla (esim. trifluorietikkahappo) tai katalyyttisen hydrogenolyysin avulla käyttämällä kaasumaista vetyä tai vetydonoreita, kuten esim. muurahaishappoa tai niiden suoloja, trietyylisylaania, hydratsiinia alkalissa, jne., jotka on valittu aminohapon ja muiden suojanpoisto huomioon ottaen, jos läsnä, sopivien palladium-
- 10 poistetaan ennen kondensointia sen jälkeisellä aminohapolla, esim. asidolyysillä keskivahvoilla hapoilla (esim. trifluorietikkahappo) tai katalyyttisen hydrogenolyysin avulla käyttämällä kaasumaista vetyä tai vetydonoreita, kuten esim. muurahaishappoa tai niiden suoloja, trietyylisylaania, hydratsiinia alkalissa, jne., jotka on valittu aminohapon
- 15 ja muiden suojanpoisto huomioon ottaen, jos läsnä, sopivien palladiumkatalysaattorin läsnäollessa. Sitten sen jälkeisen aminohappojäännöksen kondensointi suoritetaan, jolloin sellainen jäännös on sopivasti suojattu osuuksissa, jotka eivät saa sekaantua mainittuun reaktioon.

- 20 Sellainen kondensointi voidaan suorittaa useilla tunnetuilla menetelmillä. Varsinkin aktiivisia estereitä voidaan käyttää, esim. sukkiiniimidiä (Su), fluoridia (F) tai kondensointiaineita, kuten bentsotriatsol-1-yyli-oksi-tris-(dimetyyliamino)-fosfonium heksafluorifosfaattia (BOP), bromi-tris-pirrolidium-fosfonium heksafluorifosfaattia (PyBroP),
- 25 disykloheksyylikarboimidia (DCC), jne., valinnaisesti katalyytin läsnäollessa, joita ovat esim. 1-hydroksi-bentsotriatsoli (HOBT), 4-dimetyyli-amino-pyridiini (DMAP), trietyyliamiini (TEA), N-metyyli-morfoliini, N-metyyli-imidatsoli jne.

- 30 Mitä tulee aminohappojen $N\alpha$ -alkyylijohdannaisiin, ne saadaan käsittelemällä sopivalla aldehydillä alhaisessa lämpötilassa asianoboorigidridin läsnäollessa, selektiivisen pelkistysaineen, ja polaarissa liuottimessa, edullisesti metanolissa.

- 35 Kun halutaan kaavan (I) mukainen oligopeptidi, jolla on C-pääteasema amidin muodossa, kaupallisesti saatavia aminohappoja, joilla on sellai-

nen osuus, voidaan käyttää lähtöaineina tai C-päätteinen aminohappo voidaan amidoida HOBt-ammoniumsuolalla tai kun A_4 on agmatiinijäännös itse agmatiinillä.

- 5 Kaavan (I) mukaiset yhdisteet, joissa A_1 ja/tai A_2 ovat asyloituja aminohappojäännöksiä, saadaan käsittelemällä sopivalla asyylianhydriidillä alhaisessa lämpötilassa katalyytin läsnäollessa, kuten DMAP:n. Vaihtoehtoisesti kaupallisesti saatavia $N\alpha$ -asyyliaminohappojäännöksiä voidaan käyttää.

10

Tuloksena olevat tuotteet voidaan puhdistaa kiteyttämällä sopivista liuottimista tai tarvittaessa tunnetuilla kromatograafisilla tekniikoilla kuten käänteisfaasi-kromatografialla ja ioninvaihto-kromatografialla.

15

Seuraavaksi esitetään esimerkkejä joidenkin keksinnön mukaisten modifioitujen oligopeptidien valmistuksesta.

- Aminohappojohdannaisten ja modifioitujen oligopeptidien suojustujen
20 fragmenttien HPLC-analyysi suoritettiin seuraavissa koeolosuhteissa:

	Kolonne:	Lichrosorb RP-18
	Lämpötila:	25°C (jos ei muuta mainita)
	Virtaus:	1,5 ml/min.
25	Detektori:	Jasco 875-UV (230nm)
	Eluentti A:	90 % vettä, 10 % asetonitriiliä, 0,1 % trifluorietikkahappoa (TFA)
	Eluentti B:	asetonitriili, 0,1 % TFA
	Eluentti C:	vetä, 0,1 % TFA
30	Gradientit:	(I): 0-40 %:sta B:tä A:ssa (20'), 80 %:iin B:tä A:ssa (10') (II): 0-50 %:sta A:tä C:ssä (20'), 100 %:iin A:ta (3'), 40 %:iin B:tä A:ssa 20'.

35

Jos ei muuta mainita, kaikki synteettiset vaiheet suoritetaan huoneenlämmössä.

Aminohappojen suhteet ja koostumus määritettiin hydrolyysin jälkeen 6M HCl:llä lämpötilassa 110°C 22 tunnin ajan Beckman SYSTEM GOLD -amino-happoanalysaattorilla.

Selvyyden vuoksi, käytettyjen lyhennysten tarkoitukset seuraavissa esimerkeissä on lueteltu seuraavassa:

10	BDHA-Cl -	bentsyylidimetyyliheksadekyyliammoniumkloridi
	Boc -	tert.-butyylioksikarbonyyli
	(Boc) ₂ O -	di-tert.butyyli-dikarbonaatti
	BOP -	bentsotriatsol-1-yyli-oksi-tris-(dimetyyli-amino)-fosfonium heksafluorifosfaatti
15	BSA -	N,O-bis(trimetyylisilyyli)-asetamidi
	DCC -	disykloheksyylikarbodi-imidi
	DMAP -	4-dimetyyliamino-pyridiini
	DMF -	dimetyyliformamidi
20	F -	fluoridi
	HOBT -	1-hydroksi-bentsotriatsoli
	Pmc -	2,2,5,7,8-pentametyyli-kromi-6-sulfonyyli
	PyBrop -	bromi-tris-pirrolidinium-fosfonium heksafluorifosfaatti
25	tBu -	tert.-butyyli
	TBAF -	tetrabutyyliammoniumfluoridi
	TEA -	trietyyliamiini
	TFA -	trifluorietikkahappo
	Su -	sukkiini-imidi
30	Z -	bentsyylioksikarbonyyli

ESIMERKKI 1

H-Sar-Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 5 A) Lietteeseen, joka sisälsi 6,9 g (12 mmol) Z-Arg-(Pmc)-OH:ta
60 ml:ssa dikloorietaania, lisättiin 8,64 ml (36 mmol) N,N-dime-
tyyliformamidi-di-tert.-butyyliasetaalia 60 minuutissa lämpöti-
lassa 50°C. Lisäyksen lopussa reaktioseosta pidettiin sekoitukses-
sa 40 minuuttia lämpötilassa 50°C, sitten siihen lisättiin 20 ml
10 5% natriumvetykarbonaatin vesiliuosta. Dikloorietaani haihdutet-
tiin vakuumissa ja vesifaasi laimennettiin 100 ml:lla etyyli-
asetaattia. Orgaaninen faasi erotettiin ja pestiin 5% natrium-
vetykarbonaatin vesiliuoksella ja natriumkloridin kyllästetyllä
vesiliuoksella neutralisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin
15 sitten vesi ja haihdutettiin vakuumissa ja tuloksena saatu raaka-
aine puhdistettiin silikageelikolonnilla (eluentti: etyyliase-
taatti/n-heksaani 6:4). Saatiin 3,4 g Z-Arg(Pmc)-OtBu:ta (HPLC,
gradientti (I): R.t. 32 min.; puhtaus 99 %).
- 20 B) Liuokseen, joka sisälsi 3,385 g (5,36 mmol) yhdistettä A) 80
ml:ssa metanolia lisättiin 1,416 g (21,44 mmol) ammoniumformaat-
tia 3 ml:ssa vettä ja Pd-sientä (noin 1 g). Reaktioseosta sekoi-
tettiin hitaasti noin 2 tuntia huoneenlämmössä. Katalysaattorin
poissuodattamisen jälkeen liuotin haihdutettiin vakuumissa ja
25 jäännös, joka otettiin ylös etyyliasetaatettiin pestiin 5% natrium-
vetykarbonaatin vesiliuoksella, sitten vedellä neutralisuuteen.
Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumis-
sa, jolloin saatiin 2,88 g H-Arg(Pmc)-OtBu•HCOOH:ta (HPLC, gra-
30 dientti (I): R.t. 23,40 min.; puhtaus 99.3 %).
- C) Yhdiste kohdassa B) liuotettiin 30 ml:aan DMF/metyleenikloridia
1:1. Erikseen 1,403 g (5,63 mmol) Z-Pro-OH:ta liuotettiin
20 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1, lisättiin BOP (2,49 g,
5,63 mmol), HOBT (0,76 g, 5,63 mmol) ja TEA (1,56 g, 11,26 mmol).
35 Nämä kaksi liuosta sekoitettiin ja tuloksena saatua reaktioseosta
sekoitettiin yhden tunnin. Liuotin haihdutettiin vakuumissa ja

jäännös otettiin etyyliasetaattiin ja pestiin 5%:lla natriumvetykarbonaatilla ja vedellä neutralisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa ja jäännös trituroitiin etyylieetteriin, jolloin saatiin 3,71 g Z-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta (HPLC, gradientti (I): R.t. 29,49 min.; puhtaus 99,6 %).

D) Liuokseen, joka sisälsi 3,709 g (5,08 mmol) kohdan C) yhdistettä 50 ml:ssa metanolia lisättiin 350 mg Pd/C typessä, ja sen jälkeen hyvin hitaasti 4 ml (24 mmol) trietyylisylaania. Noin kahden tunnin jälkeen reaktioseos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin vakuuissa ja silloin saatiin 3,01 g H-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta (HPLC, gradientti (I): R.t. 24,25 min.; puhtaus 99,56 %).

E) Kohdan D) yhdiste (2,375 g, 4 mmol) liuotettiin 20 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1 t/t. Z-Lys-(Boc)-OH (1,826 g, 4,8 mmol) liuotettiin 20 ml:aan samaa seosta, sitten lisättiin BOP (2,12 g, 4,8 mmol), HOBT (0,648 g, 4,8 mmol) ja TEA (1,33 g, 9,6 mmol). Nämä kaksi liuosta sekoitettiin ja tämä reaktioseos jätettiin sekoitukseen yhdeksi tunniksi ja sitten käsiteltiin kuten on kuvattu kohdassa C). Jäännös tituroitiin etyylieetterissä ja siten saatiin 3,64 g Z-Lys-(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.

F) Liuokseen, joka sisälsi 3,64 g (3,8 mmol) kohdan E) yhdistettä 70 ml:ssa metanolia, lisättiin 1,321 g (20 mmol) ammoniumformaatia 3 ml:ssa vettä, ja noin 1 g tuoretta Pd-sientä. Kohdassa B) kuvattua menetelmää käytettiin ja saatiin 3,27 g H-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.

G) Z-Sar-OH (0,196 g, 0,88 mmol) liuotettiin 4 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1 t/t, ja sen jälkeen lisättiin BOP (0,39 g, 0,88 mmol), HOBT (0,119 g, 0,88 mmol) ja TEA (0,24 g, 1,76 mmol) ja kohdan F) yhdistettä (0,694 g, 0,8 mmol) liuotettuna 4 ml:aan samaa seosta. Liuos jätettiin sekoitukseen yhdeksi tunniksi. Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös, joka otettiin etyyliasetaattiin, pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla, 2,5 %:lla kaliumvetysulfaattilla ja vedellä neutralisuuteen. Or-

gaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa ja jäännös trituroitiin etyylietteriin, jolloin saatiin 0,746 g Z-Sar-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.

- 5 H) Kohdan G) yhdiste (0,746 g, 0,726 mmol) liuotettiin 10 ml:aan 95 % TFA vedessä. 75 minuutin jälkeen reaktioseos laimennettiin vedellä ja haihdutettiin vakuumissa. Jäännös otettiin veteen, pestiin etyylietterillä ja jäähdytyskuivattiin. Tuloksena saatu tuote puhdistettiin käänteisfaasisyrjäytys-kromatografialla.
- 10 Tuote liuotettiin 3 ml:aan TFA:n vesiliuosta (0,1 % t/t) ja ladattiin virtauksella 0,5 ml/min. VYDAC C18 -kolonnilla (250x10 mm) aikaisemmin tasapainoitettu vedellä, joka sisälsi TFA (0,1 % t/t). Kolonni eluoitiin 50 mM BDHA-Cl vesiliuoksella, joka sisälsi TFA (0,1 % t/t) virtauksella 0,5 ml/min. Noin yhden tun-
- 15 nin eluoinnin jälkeen 0,5 ml:n fraktiot kerättiin, kunnes syrjäytin eluoitiin. Fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen yhdistettiin ja jäähdytyskuivattiin. Tuloksena saatiin 0,2 g Z-Sar-Lys-Pro-Arg-OH:ta (HPLC, gradientti (I): R.t. 11,04 min.; puhtaus >95 %).
- 20 I) Kohdan H) yhdiste (0,2 g, 0,28 mmol) liuotettiin 85 %:iin muura-
- 25 haishappoa (5 ml) ja lisättiin tuoretta Pd-sientä. Reaktioseos jätettiin lievään sekoitukseen 100 minuutiksi. Kun katalysaattori oli suodatettu pois, reaktioseos laimennettiin vedellä ja jäähdytyskuivattiin. Tuote puhdistettiin ioninvaihtokromatografialla S-Sepharose F/F -kolonnilla (16x200 mm) ja eluoitiin ammonium-
- asetaanin gradientilla pH:ssa 5 0,015 M:stä 0,15 M:ään 300 minuutissa virtauksella 3 ml/min. Kerätyt fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen, yhdistettiin
- 30 ja jäähdytyskuivattiin useamman kerran, jolloin saatiin 0,1 g otsikkotuotetta.

HPLC: gradientti (II) R.t. 7,30 min., puhtaus > 99 %

FAB-MS: m/z-471 amu [M+H]⁺

35

¹-H-NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; NH-Lys) 8,06;
 (1H; NH-Arg) 7,17;
 m (1H; C α -Pro) 4,63;
 m (1H; C α -Lys) 4,32:4,24;
 5 q (1H; C α -Arg) 3,79;
 m (1H; C δ -Pro) 3,70;
 s (2H; C α -Sar) 3,05;
 t (3H; C α -Arg) 3,03;
 t (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
 10 s(3H; CH₃-Sar) 2,24;
 m (4H; C β + γ -Pro) 1,99:1,85;
 s (6H; CH₃COO⁻) 1,81;
 m (10H; C β + γ -Arg; C β + γ + δ -Lys) 1,72:1,29.

15 ESIMERKKI 2

H-(D)Ala-Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- Lähtemällä 0,122 g:sta (0,55 mmol) Z-(D)Ala-OH ja 0,434 g:sta
 20 (0,5 mmol) esimerkin 1 yhdistettä kohdasta F), ja etenemällä olennai-
 sesti kuten on kuvattu esimerkissä 1, G-I, saatiin 0,089 g otsikko-
 yhdistettä.

HPLC: gradientti (II) R.t. 9,59 min., puhtaus > 99 %

- 25 FAB-MS: m/z-471 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; NH-Lys) 8,12;
 d (1H; NH-Arg) 7,17;
 30 m (1H; C α -Pro) 4,60;
 m (1H; C α -Lys) 4,31:4,25;
 q (1H; C α -Arg) 3,78;
 m (2H; C δ -Pro) 3,70;
 q (1H; C α -Ala) 3,31;
 35 t (2H; C α -Arg) 3,03;
 t (2H; C ϵ -Lys) 2,74;

- m (14H; $C\beta + \gamma$ -Arg);
 $C\beta + \gamma$ -Pro);
 $C\beta + \gamma + \delta$ -Lys) 2,09:1,28;
s (6H; CH_3COO^-) 1,80;
5 d (3H; CH_3 -Ala) 1,12.

ESIMERKKI 3

Ac-Gly-Lys-Pro-Arg-OH•AcOH

10

Lähtemällä Ac-Gly-OH (0.09 g, 0,77 mmol) ja esimerkin 1 yhdisteestä kohdasta F) (0,607 g, 0,7 mmol) ja suorittamalla esimerkin 1 kohdan G-H menetelmä, saatiin 0,116 g otsikkotuotetta.

- 15 HPLC: gradientti (II) R.t. 13,06 min., puhtaus > 99 %
FAB-MS: m/z-499 amu $[M+H]^+$

1H -NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; NH-Lys) 8,15;
20 t (1H; NH-Gly) 8,11;
d (1H; NH-Arg) 7,47;
m (1H; $C\alpha$ -Pro) 4,59:4,48;
m (1H; $C\alpha$ -Lys) 4,33:4,25;
m (5H; $C\delta$ -Arg; $C\alpha$ -Gly; $C\alpha$ -Pro) 3,84:3,59:
25 t (2H; $C\alpha$ -Arg) 3,01;
t (2H; $C\epsilon$ -Lys) 2,70;
m (14H; $C\beta + \gamma$ -Arg; $C\beta + \gamma$ -Pro; $C\beta + \gamma + \delta$ -Lys) 2,03:1,28;
s (3H; CH_3COO^-) 1,85;
s (3H; CH_3 -CO-NH) 1,72.

30

ESIMERKKI 4

H-Gly-(Et)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 35 a) Esimerkin 1 yhdiste, kohta F, (0,96 g, 1,1 mmol) liuotettiin
8 ml:aan metanolia ja siihen lisättiin 0,071 g (1,12, mmol) nat-

- riumsyanoboorihydridiä. Reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan -15°C ja siihen lisättiin 0,062 ml (1,12, mmol) asetaldehydiä. 60 minuutin jälkeen reaktioseos haihdutettiin vakuuissa ja jäännös otettiin veteen ja lisättiin HCl:ää pH-arvoon 3. Saostuma suodattettiin ja pestiin HCl:llä pH-arvossa 3. Saatiin 0,825 g valkoista kiinteätä ainetta, jota muodostui 70 %:sesti H-(Et)Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu ja 26 % siitä oli dialkyloinnin sivutuotetta.
- 5
- B) Z-Gly-OH (0,994 g, 4,75 mmol) liuotettiin 3 ml:aan DMF/metyleenikloridia (4:6 t/t), ja sen jälkeen lisättiin PyBrop (2,21 g, 4,75 mmol), di-isopropylietyyliamiinia (2,4 ml, 14,25 mmol) ja kiinteä aine, joka saatiin kohdassa A) liuotettiin 6 ml:aan samaa seosta. Reaktioseos jätettiin sekoitukseen 80 minuutiksi. Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös otettiin etyyliasetaattiin ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla, 2,5 %:lla kaliumvetysulfaattilla ja vedellä neutralisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa. Saatiin 0,95 g seosta, joka sisälsi 60 % Z-Gly-(Et)Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.
- 10
- 15
- 20
- C) Lähtien 0,75 g:sta kohdan B yhdistettä ja etenemällä kuten on kuvattu esimerkissä 1 kohdassa H), saatiin 0,125 g Z-Gly-(Et)Lys)-Pro-Arg-OH:ta.
- 25
- HPLC: gradientti (I), R.t. 12 min.; puhtaus 94,5 %.
- D) Yhdiste kohdassa C) puhdistettiin ioninvaihtokromatografialla CM-Sephadex C-25 -kolonnilla (16.200 mm) eluoimalla virtauksella 3 ml/min ammoniumasetattigradientilla pH-arvossa 6 0,02 M:stä 0,2 M:ään 270 minuutin ajan. Fraktiot, jotka kerättiin, analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen, yhdistettiin ja jäähdytyskuivattiin useampaan kertaan, jolloin saatiin 0,1 g Z-Gly-(Et)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH:ta (ITF 1931).
- 30
- 35
- HPLC: gradientti (I) R.t. 12 min., puhtaus 97,5 %
FAB-MS: m/z-619 amu [M+H]⁺

^1H -NMR (200 MHz; DMSO):

- t (1H; NH-Gly) 7,46;
 m (5H; CH-aryyli) 7,37;
 d (1H; NH-Lys) 7,24;
 5 m (1H; C α -Lys) 5,19;
 s (2H; C α -Arg) 5,05;
 m (1H; C α -Pro) 4,23;
 m (2H; C α -Gly) 3,92;
 m (1H; C α -Arg) 3,81;
 10 m (2H; C δ -Pro) 3,58;
 m (2H; CH₂-Et) 3,46;
 m (2H; C α -Arg) 2,99;
 m (2H; C ϵ -Lys) 2,65;
 m (4H; C β - ja C γ -Pro) 2,03:1,76;
 15 m (19H, C β - ja C γ -Lys ja -Arg, ja C δ -Lys) 1,69:1,19;
 s (6H, CH₃Coo⁻) 1,66;
 t (3H, CH₃-Et) 1,04.

- E) Kohdan D) yhdistettä käsiteltiin kuten on kuvattu esimerkissä 1,
 20 kohdassa I. Saatiin 0,089 g otsikkotuotetta.

HPLC: kolonnin lämpötila 60°C; gradientti (I) R.t. 7,39 min.,
 puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z-485 amu [M+H]⁺

25

^1H -NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; N α -Lys) 7,12;
 m (0,8H; C α -Pro) 5,24;
 m (0,2H; C α -Pro) 4,34;
 30 m (1H; C α -Lys) 4,28:4,16;
 m (1H; C α -Arg) 3,81;
 m (1H; C δ -Pro e CH₂-N) 3,70:3,16;
 s (2H; C α -Gly) 3,41;
 t (2H; C δ -Arg) 3,03;
 35 t (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
 m (4h; C α + γ -Pro) 2,12:1,75;

s (6h; CH_3COO^-) 1,79;
 m (10H; $\text{C}\beta + \gamma + \delta\text{-Lys}$) 1,70:1,14;
 t (2,4H; $\text{C}^*\text{H}_3\text{-CH}_2$) 0,98;
 t (0,6H; $\text{C}^*\text{H}_3\text{-CH}_2$) 0,89.

5

ESIMERKKI 5

Ac-Lys-Pro-Arg-OH•TFA

- 10 a) Esimerkin 1 yhdiste F) (0,3 g, 0,34 mmol) liuotettiin 1 ml:aan metyleenikloridia. Liuotin jäähdytettiin lämpötilaan -20°C ja siihen lisättiin DMAP (0,048 g, 0,38 mmol) ja etikkahapon anhydridiä (0,035 ml, 0,38 mmol). 30 minuutin jälkeen liuotin pestiin
- 15 5 % natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella ja natriumkloridin kyllästetyllä liuoksella. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa, jolloin saatiin 0,28 g Ac-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.
- B) Kohdan A yhdiste (0,28 g, 0,324 mmol) käsiteltiin kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa H. Saatiin 0,085 g otsikkotuotetta.
- 20

HPLC: gradientti (II) R.t. 13,64 min., puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z -442 amu $[\text{M}+\text{H}]^+$

- 25 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; DMSO):
 d (0,15H; NH-Lys) 8,45;
 d (0,85H; NH-Lys) 8,21;
 d (1H; NH-Arg) 8,09;
 m (1H; $\text{C}\alpha\text{-Pro}$) 4,55:4,45;
 30 m (1H; $\text{C}\alpha\text{-Lys}$) 4,43:4,33;
 m (1H; $\text{C}\alpha\text{-Arg}$) 4,21:4,1;
 m (2H; $\text{C}\delta\text{-Pro}$) 3,77:3,47;
 q (2H; $\text{C}\delta\text{-Arg}$) 3,13;
 m (2H; $\text{C}\delta\text{-Lys}$) 2,78;
 35 m (14H; $\text{C}\beta + \gamma\text{-Arg}$; $\text{C}\beta + \gamma\text{-Pro}$; $\text{C}\beta + \gamma + \delta\text{-Lys}$) 2,18:1,28;
 s (6H; $\text{C}^*\text{H}_3\text{COO}^-$ ja $\text{C}^*\text{H}_3\text{-CO-NH}$) 1,84.

ESIMERKKI 6

H-Gly-(D)Lys-pro-Arg-OH•2AcOH

- 5 a) Lähtemällä 0,544 g:sta (1,43 mmol) (D)Lys(Boc)-OH:ta ja 0,772 g:sta (1,3 mmol) esimerkin 1 kohdan d) yhdistettä ja etenemällä kuten on kuvattu esimerkissä 1 kohdassa G saatiin 1,2 g Z-(D)Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.
- 10 B) Kohdan A yhdiste (1,2 g, 1,29 mmol) liuotettiin 30 ml:aan metanolia ja liuokseen lisättiin 0,325 g (5,16 mmol) ammoniumformaattia 0,3 ml:ssa vettä ja noin 0,2 g tuoretta Pd-sientä. Kahden tunnin jälkeen katalysaattori suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin vakuumissa. Jäännös otettiin 50 ml:aan etyyliasetaattia ja pestiin 5 %:sella natriumvetykarbonaatilla vedessä ja vedellä
- 15 ja pestiin 5 %:sella natriumvetykarbonaatilla vedessä ja vedellä neutraalisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa, jolloin saatiin 1,119 g H-(D)Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmac)-OtBu•HCOOH.
- 20 C) Lähtemällä 0,229 g:sta (1,43 mmol) Z-Gly-OH:ta ja 1,119 g:sta (1,29 mmol) esimerkin 1 kohdan B) yhdistettä ja etenemällä kuten on kuvattu esimerkissä 1 kohdassa G saatiin 0,23 g otsikkotuotetta.

HPLC: gradientti (II) R.t. 9,53 min., puhtaus > 99 %.

25 FAB-MS: m/z-457 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

d (1H; NH-Lys) 8,12;

d (0,6H; NH-Arg) 7,37;

30 d (0,4H; NH-Arg) 7,27;

m (0,6H; C α -Pro) 4,80;

m (0,4H; C α -Pro) 4,61;

m (1H; C α -Lys) 4,34:4,15;

q (0,6H; C α -Arg) 3,95;

35 t (0,4H; C α -Arg) 3,81;

m (2H; C δ -Pro) 3,58:3,35;

- s (0,4H; C α -Gly 3,26;
 s (0,6H; C α -Gly) 3,11;
 t (2H; C δ -Arg) 3,05;
 m (2H; C ϵ -Lys) 2,71;
 5 m (14H; C β + γ -Arg; C β + γ -Pro; C β + δ -Lys) 2,11:1,13;
 s (6H; CH₃COO⁻) 1,79.

ESIMERKKI 7

10 H-Gly-Lys-Pro-Arg-NH₂•3AcOH

- A) Z-Arg(Pmc)-OH (2,87 g, 5 mmol) liuotettiin 15 ml:aan DMF, sitten lisättiin 0,837 g (5,5 mmol) HOBt ammoniumsuolaa, ja reaktioseos jäädytettiin lämpötilaan 0°C. Kun oli lisätty 1,135 g (5,5 mmol)
 15 DCC:tä, reaktioseos tuotettiin huoneenlämpöön ja pidettiin sekoi-
 tuksessa 300 minuuttia. Kun oli suodatettu disykloheksyyliurea
 pois, liuotin haihdutettiin vakuumissa ja otettiin 25 ml:aan
 etyyliasetaattia ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatin vesi-
 liuoksella ja sitten vedellä neutraalisuuteen. Orgaanisesta faa-
 20 sista poistettiin vesi, liuotettiin haihdutettiin vakuumissa ja
 jäännös kiteytettiin etyylietteri/n-heksaanista. Tuloksena saa-
 tiin 2,8 g Z-Arg(Pmc)-NH₂:ta [HPLC gradientti 20-60 % B:tä A:ssa
 20 minuutin ajan): R.t. 15,7 min.; puhtaus 98 %.
- 25 B) Kohdan A) yhdisteen liuokseen 1,045 g (1,82 mmol) 50 ml:ssa me-
 tanolia lisättiin 150 mg Pd/C typessä ja sen jälkeen hyvin hi-
 taasti 2 ml (12 mmol) trietyylisylaania. 120 minuutin jälkeen
 reaktioseos suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin vakuumissa
 ja siten saatiin 0,8 g H-Arg(Pmc)-NH₂:ta [HPLC gradientti 20-60 %
 30 B:tä A:ssa 20 minuutin ajan): R.t. 8,6 min.; puhtaus 98,5 %.
- C) Lähtien Z-Pro-OH:sta (0,499 g, 2 mmol) ja kohdan B) yhdisteestä
 (0,8 g, 1,82 mmol) ja edeten olennaisesti kuten on kuvattu esi-
 merkissä 1 kohdassa G), saatiin 1,2 g Z-Pro-Arg(Pmc)-NH₂:ta. Tämä
 35 yhdiste liuotettiin 25 ml:aan metanolia ja lisättiin 100 mg 10 %
 Pd/C, jonka jälkeen hyvin hitaasti lisättiin 1,52 g (9,1 mmol)

trietyylisilaania. 130 minuutin jälkeen reaktioseos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin vakuumissa ja siten saatiin 0,955 g H-Pro-Arg(Pmc)-NH₂:ta.

- 5 D) Lähtemällä 0,745 g:sta (1,96 mmol) Z-Lys(Boc)-OH:ta ja 0,955 g:sta (1,78 mmol) kohdan C) yhdistettä ja etenemällä kuten on kuvattu kohdassa C) saatiin 1,19 g H-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-NH₂:ta.
- 10 E) Lähtemällä 0,385 g:sta (1,71 mmol) Z-Gly-OH:ta ja 1,19 g:sta (1,55 mmol) kohdan D) yhdistettä ja etenemällä kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa G-I) saatiin raakatuote, joka sitten puhdistettiin ioninvaihtokromatografialla 16x200 mm CM-52 -selluloosakolonnin läpi eluoiden 2 ml/min nopeudella ammoniumasetatigradientilla pH-arvossa 7 0,025-0,30 M 240 minuutissa. Kerätyt fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja puhtaat yhdistettiin ja jääähdytyskuivattiin useita kertoja, jolloin saatiin 0,283 g ot-sikkoyhdistettä.
- 20 HPLC: gradientti (II) R.t. 4,7 min., puhtaus 99,3 %.
FAB-MS: m/z-456 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- d (0,2H; N α -Arg) 8,89;
- 25 m 1,8H; N α -Lys ja N α -Arg) 8,16:8,03;
- s (0,2H; NH₂-Arg) 7,77;
- s (0,8H; NH₂-Arg) 7,76;
- s (0,8H; NH₂-Arg) 7,07;
- 2 (0,2H; NH₂-Arg) 7,00;
- 30 m (1H; C α -Pro) 4,61:4,50;
- m (1H; C α -Lys) 4,47:4,34;
- m (1H; C α -Arg) 4,26:4,15;
- m (2H; C δ -Pro) 3,77:5,43;
- s (2H; C α -Gly) 3,13;
- 35 m (2H; C δ -Arg) 3,06;
- t (2H; C ϵ -Lys) 2,67;

m (14H; C β + γ -Arg; C β + γ -Pro; C β + γ + δ -Lys) 2,12:1,26;
s (9H; CH₃COO⁻) 1,77.

ESIMERKKI 8

5

H-Gly-Lys-Pro-Arg•3AcOH

- 10 A) Z-Lys-OH (0,84 g, 3 mmol) liuotettiin 6 ml:aan liuosta, joka sisälsi 3 ml 1M natriumhydroksidia ja 3 ml dioksaania, ja lisättiin sitten 0,57 ml (4,5 mmol) etyyliolitritrifluoriasetaattia. Reaktioseosta sekoitettiin lämpötilassa 40°C noin 7 tunnin ajan, sitten liuotin haihdutettiin vakuumissa ja jäännös otettiin 40 ml:aan 5% natriumvetykarbonaattia. Vesifaasi pestiin etyyliasetaatilla, pH-arvo säädettiin arvoon 2 ja uutettiin etyyliasetaatilla. 15 Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja liuotin haihdutettiin vakuumissa ja siten saatiin 1 g Z-Arg(TFA)-OH:ta öljynä [HPLC gradientti (I): R.t. 19,7 min.; puhtaus 96 %.
- 20 B) H-Pro-OtBu•HCl (0,283 g, 1,364 mmol) liuotettiin 9 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1. Kohdan A) yhdiste (0,565 g, 1,5 mmol) liuotettiin 9 ml:aan samaa seosta, sitten lisättiin BOP (0,66 g, 1,5 mmol), HOBT (0,202 g, 1,5 mmol) ja TEA (0,63 ml, 4,5 mmol). Nämä kaksi liosta yhdistettiin ja tuloksena saatua seosta sekoitettiin 30 minuuttia ja sitten menetelmä, joka on kuvattu esimerkiksi 1, kohdassa G, käytettiin, jolloin saatiin 0,725 g Z-Lys (TFA)-Pro-OtBu:ta öljynä [HPLC gradientti (I): R.t. 26,12 min.; puhtaus 95,5 %.
- 30 C) Liuokseen, joka sisälsi 0,725 g (1,36 mmol) kohdan B) yhdistettä 20 ml:ssa metanolia lisättiin 80,26 g (4,1 mmol) ammoniumformaattia liuotettuna 0,1 ml:aan vettä, ja noin 0,2 g tuoretta Pd-sientä. Kahden tunnin jälkeen katalysaattori suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin vakuumissa. Jäännös otettiin 40 ml:aan etyyliasetaatia ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla 35 vedessä ja sitten vedellä neutraalisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa, jolloin saatiin

0,5 g H-Lys-(TFA)-Pro-OtBu•HCOOH [HPLC gradientti (I): R.t. 16,24 min.; puhtaus 95 %.

- D) Kohdan C) yhdiste liuotettiin 10 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1. Z-Gly-OH (0,291 g, 1,4 mmol) liuotettiin 10 ml:aan samaa seosta, sitten lisättiin BOP (0,615 g, 1,4 mmol), HOBT (0,188 g, 1,4 mmol) ja TEA (0,39 ml, 2,8 mmol). Nämä kaksi liosta yhdistettiin ja tuloksena saatua seosta sekoitettiin 60 minuuttia, sitten käytettiin olennaisesti menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa G. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa öljyisen jäännöksen saamiseksi, joka kromatografioitiin silikageelikolonnilla (eluentti: etyyliasetaatti/-n-heksaani 9:1), jolloin saatiin 0,588 g Z-Gly-Lys(TFA)-Pro-OtBu:ta (HPLC gradientti (I): R.t. 24,51 min.; puhtaus 99.3 %).
- E) Kohdan D) yhdiste liuotettiin 15 ml:ssa 37 % HCl, joka oli aiemmin jäähdytetty lämpötilaan 0°C. 8 minuutin jälkeen lämpötilassa 0°C reaktioseos laimennettiin 15 ml:lla vettä ja haihdutettiin vakuumissa. Jäännös otettiin veteen, pestiin etyylietterillä ja jäähdytyskuivattiin, jolloin saatiin 0,531 g Z-Gly-Lys(TFA)-Pro-OH:ta (HPLC gradientti (I): R.t. 17,69 min.; puhtaus 95 %).
- F) Kohdan E) yhdiste (0,53 g, 1 mmol) liuotettiin 5 ml:aan etyyliasetaattia, lisättiin 0,138 g (1,2 mmol) N-hydroksisukkiiniimidiä ja reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan -20°C. Sitten lisättiin 0,248 g (1,2 mmol) DCC:tä. Reaktioseos jätettiin huoneenlämpöön 90 minuutiksi, sitten saostuma suodattiin pois ja liuotin haihdutettiin. Täten saatiin 0,625 g Z-Gly-Lys(TFA)-Pro-OSu:a. Natriumvetykarbonaattia (0,115 g, 1,09 mmol) liuotettiin 22 ml:aan vettä ja sen jälkeen lisättiin järjestyksessä agmatiiinisulfaattia (0,498 g, 2,18 mmol) ja N-metyyli-imidatsolia (0,087 ml, 1,09 mmol). Tähän liuokseen lisättiin 0,57 g (0,91 mmol) Z-Gly-Lys(TFA)-Pro-Ou:a. Reaktioseos pidettiin seoksesta 30 minuuttia huoneenlämmössä, sitten seoksen pH säädettiin arvoon 3 ja pestiin etyyliasetaatilla. Vesifaasi jäähdytyskuivattiin. Täten saatiin 0,58 g Z-Gly-Lys(TFA)-Pro-Agm.

- G) Kohdan F) yhdiste liuotettiin 35 ml:aan vettä ja lisättiin 1M natriumhydroksidia pH-arvoon 12,7. 30 minuutin jälkeen pH säädettiin arvoon 7 1M HCl:llä ja vesifaasi jäädytyskuivattiin. Tuloksena saatu jäännös otettiin absoluuttiseen etanoliin, suolat suodatettiin pois ja liuos haihdutettiin vakuumissa. Saatu tuote puhdistettiin käänteisfaasi-syrjäytyskromatografialla esimerkin 1 kohdan H) mukaisesti. Täten saatiin 0,251 g Z-Gly-Lys-Pro-Agm. (HPLC gradientti (I): R.t. 10,77 min.; puhtaus 97,5 %).
- 10 H) Kohdan G) yhdiste käsiteltiin olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 1 kohdassa I). Saatiin 0,229 g otsikkoyhdistettä.

HPLC: gradientti (II) R.t. 10,93 min., puhtaus 98,5 %.

FAB-MS: m/z-413 amu [M+H]⁺

15

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

t (0,2H; N α -Agm) 8,54;

d 81H; N α -Lys) 8,10;

t (0,8H; N α -Agm) 7,96;

20 q (0,8H; C α -Pro) 4,55;

q (0,2H; C α -Pro) 4,41;

m (1H; C α -Lys) 4,28:4,22;

m (2H; C δ -Pro) 3,75:3,34;

m (6H; C α -Gly; C α + δ -Agm) 3,21:2,93;

25 t (2H; C ϵ -Lys) 2,67;

m (14H; C β + γ -Agm; C β + γ -Pro; C β + γ + δ -Lys) 2,11:1,25;

s (9H; CH₃COO⁻) 1,76.

ESIMERKKI 9

30

H-Gly-Lys-Pro-OH•AcOH

- A) Z-Lys(Boc)-OH (1,487 g, 3,8 mmol) liuotettiin 15 ml:aan DMF/metyleenikloridia (1:1 t/t), ja lisättiin peräkkäin BOP (1,72 g, 3,8 mmol), HOBT (0,52 g, 3,8 mmol), TEA (1,08 ml, 7,8 mmol) ja
- 35

- H-Pro-OtBu (0,623 g, 3 mmol) liuotettuna 15 ml:aan samaa seosta. Reaktioseos jätettiin sekoitukseen yhdeksi tunniksi. Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös otettiin etyyliasetaattiin ja pestiin 5 %:sella natriumvetykarbonaatilla vedessä, 2,5 %:sella kaliumvetysulfaattilla vedessä ja vedellä neutraalisuuteen. Or-
- 5 gaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa ja jäännös trituroitiin etyleenieetterissä, jolloin saatiin 1,6 g Z-Lys(Boc)-Pro-OtBu:ta.
- 10 B) Kohdan A) yhdistettä (1,50 g, 2,9 mmol) liuotettiin 20 ml:aan metanolia ja tuloksena saatuun liuokseen lisättiin ammoniumformaattia (0,731 g, 11,6 mmol) liuotettuna 0,6 ml:aan vettä, ja noin 0,5 g tuoretta Pd-sientä. Kahden tunnin jälkeen katalysaattori suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin vakuuissa. Jään-
- 15 nös otettiin 50 ml:aan etyyliasetaattia ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla vedessä ja sitten vedellä neutraalisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa, jolloin saatiin 1,119 g H-Lys(Boc)-Pro-OtBu•HCOOH.
- 20 C) Z-Gly-OH (0,762 g, 3,64 mmol) liuotettiin 15 ml:aan DMF/metyleenikloridia (1:1 t/t) ja sitten lisättiin peräkkäin BOP (1,61 g, 3,64 mmol), HOBT (0,491 g, 3,64 mmol), TEA (1,01 ml, 7,28 mmol) ja H-Lys(Boc)-Pro-OtBu (1,119 g, 2,8 mmol) liuotettiin 15 ml:aan samaa seosta. Reaktioseos käsiteltiin kuten on kuvattu
- 25 kohdassa A). Täten saatiin 1,16 g Z-Gly-Lys(Boc)-Pro-OtBu:ta.
- D) Kohdan C) yhdiste (0,746 g, 0,726 mmol) liuotettiin 20 ml:aan 95 % TFA vedessä. Yhden tunnin jälkeen reaktioseos laimennettiin vedellä ja haihdutettiin vakuuissa. Jäännös otettiin sitten
- 30 veteen, pestiin etyylieetterillä ja jäähdytyskuivattiin. Tuloksena saatu tuote puhdistettiin syrjäytyskäänteisfaasi-kromatografialla. Tuote liuotettiin 3 ml:aan TFA:n vesiliuosta (0,1 % t/t) ja ladattiin VYDAC C18 -kolonnille (250x10 mm), joka oli aikaisemmin tasapainoitettu vedellä, joka sisälsi TFA (0,1 % t/t)
- 35 virtauksella 0,5 ml/min. Kolonni eluoitiin sitten nopeudella 0,5 ml/min 50 mM BDHA-C1 vesiliuoksella, joka sisälsi TFA

(0,1 % t/t). Noin yhden tunnin eluoinnin jälkeen 0,5 ml:n fraktiot kerättiin, kunnes syrjäytin oli eluoitunut. Fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen yhdistettiin ja jäähdetytskuivattiin. Tuloksena saatiin 0,325 g
 5 Z-Gly-Lys-Pro-OH:ta. (HPLC, gradientti (I): R.t. 11,48 min.; puhtaus HPLC > 95 %).

E) Kohdan D) yhdiste (0,325 g, 0,59 mmol) liuotettiin 5 ml:aan 85 %
 10 muurahaishappoa ja lisättiin tuoretta Pd-sientä. Reaktioseos jätettiin lievään sekoitukseen noin tunniksi. Kun katalysaattori oli suodatettu pois, muurahaishappoa laimennettiin vedellä ja jäähdetytskuivattiin. Tuote puhdistettiin ioninvaihtokromatografi-
 15 fialla S-Sepharose F/F -kolonnilla (16x200 mm) ja eluoitiin nopeudella 3 ml/min. ammoniumasetatin gradientilla pH-arvossa 5 0,015 M:stä 0,15 M:ään viidessä tunnissa. Kerätyt fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen, yhdistettiin ja jäähdetytskuivattiin useamman kerran, jolloin saatiin 0,165 g otsikkotuotetta.

20 HPLC: gradientti (II) R.t. 3,97 min., puhtaus > 99 %.
 FAB-MS: m/z-301 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):
 d (1H; Nα-Lys) 8,17;
 25 m (1H; Cα-Pro) 4,60;
 m (1H; Cα-Lys) 4,14;
 m (2H; Cδ-Pro) 3,61;
 s (2H; Cα-Gly) 3,12;
 t (2H; Cε-Lys) 2,73;
 30 m (10H; Cβ + γ + δ-Pro) 2,62:1,40;
 s (3H; CH₃COO⁻) 1,88.

ESIMERKKI 10

H-(Et)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 5 A 0,4 g esimerkin 4 kohdan A) yhdistettä puhdistettiin silikageeli-kromatografialla Lobar LiChroprep Si 60 -kolonnilla, 40-63 μm (31x2,5 cm), joka aiemmin oli tasapainotettu kloroformi/metanolilla (9/1 t/t). Kolonni eluointiin sitten samalla seoksella virtauksella 8 ml/min. Fraktiot, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen
- 10 yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin vakuumissa. Täten saatiin 0,28 g H-(Et)Lys(Boc)-Pro-Arg(Pmc)-OtBu:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 28,5 min., puhtaus > 99 %.

- 15 B) Kohdan A) yhdiste (0,28 g, 0,33 mmol) liuotettiin 6 ml:aan 95 % TFA vedessä. 70 minuutin jälkeen reaktioseos laimennettiin vedellä ja haihdutettiin vakuumissa. Jäännös otettiin sitten veteen, pestiin etyylietterillä ja jäähdytyskuivattiin. Tuote puhdistettiin ioninvaihtokromatografialla CM-Sephadex C-25 -kolonnilla (16x200 mm) ja eluointiin nopeudella 3 ml/min. ammoniumasetatin gradientilla pH-arvossa 6 0,015 M:stä 0,15 M:ään
- 20 270 minuutissa. Kerätyt fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja ne, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen, yhdistettiin ja jäähdytyskuivattiin useamman kerran, jolloin saatiin 0,14 g otsikko-
- 25 tuotetta.

HPLC: (kolonnin lämpötila: 60°C) gradientti (II) R.t. 7,15 min., puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z-428 amu [M+H]⁺

30

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

d (1H; N α -Arg) 7,15;

m (1H; C α -Pro) 4,30;

q (1H; C α -Arg) 3,79;

35 m (2H; C δ -Pro) 3,64;

m (1H; C α -Lys) 3,41;

- m (2H; C δ -Arg) 3,02;
 m (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
 q (2H; CH₂-Et) 2,44;
 m (14H; C β ja γ -Pro, Lys ja -Arg, C δ -Lys) 2,11:1,21;
 5 s (6H; CH₃COO⁻) 1,80;
 t (3H; CH₃-Et) 0,97.

ESIMERKKI 11

10 (Et)2Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- A) 0,425 g esimerkin 4 kohdan A) yhdistettä liuotettiin 7 ml:aan me-
 tanolia ja lisättiin 0,063 g (1 mmol) natriumsyanoboorihydridiä.
 Reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan -15°C ja lisättiin 0,155 ml
 15 (2,5 mmol) asetaldehydiä. 90 minuutin jälkeen reaktioseos haihdu-
 tettiin vakuumissa ja jäännös liuotettiin veteen ja lisättiin
 HCl:ää pH-arvoon 3. Tuloksena saatu saostuma suodatettiin ja
 pestiin kloorivetyhapolla pH-arvossa 3. Tuloksena saatiin 0,4 g
 (Et)2Lys(Boc)-Pro-Agm(Pmc)-OtBu:ta.

20

HPLC: gradientti (I) R.t. 30,3 min.; puhtaus > 98 %.

- B) Kohdan A) yhdistettä (0,4 g, 0,455 mmol) käsiteltiin kuten esi-
 merkissä 10, kohdassa B). Tuloksena saatiin 0,14 g otsikkotuotet-
 25 ta.

HPLC: (kolonnin lämpötila: 60°C) gradientti (II) R.t. 11,08 min.;
 puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z-456 amu [M+H]⁺

30

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; NH-Arg) 7,08;
 m (1H; C α -Pro) 4,21;
 m (3H; C α -Pro) 3,98:3,65;
 35 m (1H; C α -Lys) 3,54;
 m (2H; C δ -Arg) 3,03;

- m (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
 (2H; CH₂-Et) 2,38;
 m (2H; CH₂-Et) 2,36;
 m (4H; C β ja γ -Pro 2,18:1,81;
 5 s (6H; CH₃COO⁻) 1,76;
 m (10H; C β ja C γ -Lys ja -Arg, C δ -Lys) 1,74:1,33;
 t (6H; CH₃-Et) 0,96.

ESIMERKKI 12

10

H-Gly-(Et)Lys-Pro-Leu-OH•AcOH

- A) Esimerkin 9 kohdan A yhdiste (5,33 g, 10 mmol) liuotettiin
 130 ml:aan absoluuttista etanolia Pd/C:n läsnäollessa. Asetalde-
 15 hydiä (0,745 ml, 12 mmol) tiputettiin 30 minuutissa, liuotettuna
 20 ml:aan absoluuttista etanolia ja sen jälkeen trietyylisilaania
 (9,56 ml, 60 mmol) 60 minuutissa. 75 minuutetin jälkeen kata-
 lyyssaattori suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin vakuuissa.
 Öljymäinen jäännös liuotettiin 50 ml:aan vedetöntä etyylietteriä
 20 ja lisättiin 3 metyyliasettaattia, joka oli kyllästetty HCl:llä.
 Tuloksena saatu saostuma suodatettiin ja kuivattiin vakuuissa.
 Tuloksena saatiin 4,25 g H-(Et)Lys(Boc)-Pro-OtBu-HCl:ää.

HPLC: gradientti (I) R.t. 19,83 min., puhtaus > 98 %.

25

- B) Z-Gly-OH:ta (3,78 g, 18 mmol) liuotettiin seokseen, joka sisälsi
 12 ml DMF:ää ja 67 ml metyleenikloridia. Liuos jäähdytettiin
 lämpötilaan -15°C ja lisättiin DCC:tä (1,86 g, 9.03 mmol). 15 mi-
 nuutin jälkeen reaktioseos suodatettiin ja lisättiin kohdan A)
 30 yhdistettä (2,6 g, 6,02 mmol) liuotettuna 40 ml:aan metyleeni-
 kloria. N-metyyli-morfoliinin lisäyksen jälkeen (0,66 ml,
 6,02 mmol) reaktioseos pidettiin lämpötilassa 35°C 60 minuuttia.
 Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös otettiin etyyliase-
 taattiin ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla vedessä ja
 35 2,5 %:lla kaliumvetysulfaattilla vedessä. Orgaanisesta faasista

poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa. Tuloksena saatiin 3,7 g Z-Gly-(Et)Lys(Boc)-OtBu:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 28,60 min., puhtaus 94 %.

5

C) Kohdan B) yhdiste (3,7 g, 6 mmol) liuotettiin 15 ml:aan 95 % TFA vedessä. 15 minuutin jälkeen reaktioseos kaadettiin hitaasti etyylietteeriin ja tuloksena saatu saostuma suodatettiin ja kuivatettiin vakuumissa. Tuloksena saatiin 2,9 g Z-Gly-(Et)Lys-Pro-OH:ta.

10

HPLC: gradientti (I) R.t. 14,93 min., puhtaus 94 %.

D) Kohdan C) yhdistettä (1 g, 1,73 mmol) liuotettiin 6,92 ml:aan liuosta, joka sisälsi dioksaania/natriumhydroksidia 0,5 M vedessä (1/1 t/t). Liuotin jäähdytettiin lämpötilaan 0°C ja lisättiin (Boc)20 (0,415 g, 1,903 mmol). Reaktioseos pidettiin huoneenlämmössä 45 minuuttia pH-arvossa 12. Liuotin haihdutettiin vakuumissa ja jäännös otettiin veteen ja pestiin etyylietterillä. Vesifaasi tehtiin happamaksi pH-arvoon 3 ja uutettiin 30 ml:lla etyyliasetaattia. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuumissa. Tuloksena saatiin 0,96 g Z-Gly(Et)Lys(Boc)-Pro-OH:ta.

15

20

25 HPLC: gradientti (I) R.t. 23,04 min., puhtaus 92 %.

E) Kohdan D) yhdiste (0,281 g, 0,5 mmol) liuotettiin 4 ml:aan DMF/metyleenikloridia 1:1 ja lisättiin BOP (0,221 g, 0,5 mmol), HOBT (0,067 g, 0,5 mmol), TEA (0,219 ml, 1,57 mmol) ja H-Leu-OtBu•HCl (0,117 g, 0,525 mmol). Sitten käytettiin olennaisesti menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa C. Tuloksena saatiin 0,365 g Z-Gly(Et)Lys(Boc)-Pro-Leu-OtBu:ta.

30

HPLC: gradientti (I) R.t. 29,86 min.; puhtaus > 99 %).

35

F) Lähtemällä kohdan E) yhdisteestä (0,365 g, 0,5 mmol) ja etenemällä olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa H-I, saattin 0,155 g otsikkotuotetta.

5 HPLC: gradientti (I) R.t. 6,3 min.; puhtaus 98 %.

FAB-MS: m/z-422 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- d (1H; NH-Leu) 6,93;
- 10 m (1H; C α -Lys) 5,23;
- m (1H; C α -Pro) 4,15;
- m (1H; C α -Leu) 3,84;
- m (6H; C δ -Gly, C δ -Pro ja CH₂-Et) 3,72:3,03;
- m (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
- 15 m (4H; C β ja γ -Pro) 2,17:1,77;
- s (3H; CH₃COO⁻) 1,85;
- m (9H; C β ja C γ -Lys ja -Leu ja C δ -Lys) 1,68:1,05;
- t (3H; CH₃-Et) 0,96;
- d (3H; CH₃-Leu) 0,88;
- 20 d (3H; CH₃-Leu) 0,86.

ESIMERKKI 13

H-Gly-(Et)Lys-Pro-Agm•3AcOH

25

A) Lähtemällä esimerkin 12, kohdan D) yhdisteestä (0,425 g, 0,75 mmol), N-hydroksisukkiini-imidiä (0,103 g, 0,9 mmol), DCC (0,186 g, 0,9 mmol), ja perätysten lisättiin natriumkarbonaattia (0,095 g, 0,9 mmol), agmatiinisulfaattia (0,411 g, 1,8 mmol) ja

30 N-metyyli-imidatsolia (9,072 ml, 0,9 mmol), käytettiin olennaisesti menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 8, kohdassa F). Tuloksena saatiin 0,5 g Z-Gly-(Et)Lys-Pro-Agm.

35

HPLC: gradientti (I) R.t. 20,6 min.; puhtaus 85 %.

B) Lähtemällä kohdan A) yhdisteestä (0,5 g, 0,74 mmol) ja etenemällä olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa H-I, saatiin 0,169 g otsikkotuotetta.

5 HPLC: kolonnin lämpötila 60°C; gradientti (II) R.t. 13,87 min.;
puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z-441 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- 10 t (1H; NH-Agm) 7,98;
m (1H; Cα-Lys) 5,26;
m (1H; Cα-Pro) 4,15;
m (10H; Cα-Gly, Cα-Agm, Cδ-Pro, Cδ-Agm ja CH₂-Et) 3,65:2,91;
m (2H; Cε-Lys) 2,66;
15 m (14H; Cβ ja Cγ-Lys, -pro ja -Agm ja Cδ-Lys) 2,18:1,16;
s (9H; CH₃COO⁻) 1,76;
t (3H; CH₃-Et) 0,99.

ESIMERKKI 14

20

H-Gly-(Et)Lys-Pro-OH•2AcOH

Lähtemällä esimerkin 12 kohdan C) yhdisteestä (0,2 g, 0,344 mmol) ja etenemällä olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa I, saatiin 0,085 g otsikkotuotetta.

HPLC: kolonnin lämpötila 60°C; gradientti (II) R.t. 9,32 min.;
puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z-441 amu [M+H]⁺

30

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- m (1H; Cα-Lys) 5,16;
m (1H; Cα-Pro) 4,05;
m (6H; Cα-Gly ja Cδ-Pro ja CH₂-Et) 3,87:2,92;
35 m (2H; Cε-Lys) 2,67;
m (4H; Cβ ja Cγ-Pro) 2,10:1,65;

s (6H; CH₃COO⁻) 1,78;
 m (6H; Cβ + γ + δ-Lys) 1,59:1,24,
 t (1,3H; CH₃-Et) 1,06;
 t (1,7 H; CH₃-Et) 1,02.

5

ESIMERKKI 15

H-Leu-(Et)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 10 A) Esimerkin 12 kohdan A) yhdiste (0,732 g, 1,5 mmol) liuotettiin
 työssä 8 ml:aan asetonitriiliä. Sitten lisättiin 0,733 ml
 (3 mmol) BSA, 1,6 g (6 mmol) Z-Leu-F (L.A. Carpina, E.M.E. Man-
 sour, D. Sadat-Aalae, J. Org. Chem., 1991, 56, 2611-2614) ja
 0,094 g (0,3 mmol) TBAF liuotettuna 2 ml:aan asetonitriiliä.
- 15 Reaktioseos pidettiin sekoituksessa 240 minuuttia huoneenlämmös-
 sä. Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös otettiin etyyli-
 asetaattiin ja pestiin 5 %:lla natriumvetykarbonaatilla ja
 2,5 %:lla kaliumvetysulfaattilla neutraalisuuteen. Orgaanisesta
 faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa ja jäännös
- 20 puhdistettiin silikageelikromatografiolla käyttämällä Lobar
 LiChroprep Si 60 -kolonna, 40-63 mm, (4x3,7 cm), joka oli ai-
 kaisemmin tasapainoitettu heksaani/etyyliasetaatilla (7/3 t/t).
 Kolonni eluointiin samalla seoksella nopeudella 16 ml/min. Frak-
 tiot, jotka sisälsivät puhtaan tuotteen kerättiin ja liuotin
- 25 haihdutettiin vakuuissa. Tuloksena saatiin 0,5 g Z-Leu(Et)Lys-
 (Boc)-Pro-OtBu:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 31,5 min.; puhtaus 94 %.

- 30 B) Kohdan A) yhdistettä (0,5 g, 0,74 mmol) käsiteltiin kuten on
 kuvattu esimerkissä 12, kohdassa C-D). Tuloksena saatiin 0,43 g
 Z-Leu-(Et)Lys(Boc)-Pro-OH:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 31,5 min.; puhtaus 98 %.

35

- C) Kohdan B) yhdiste (0,43 g, 0,695 mmol) liuotettiin 9 ml:aan 1,2-dimetoksietaania ja lisättiin N-hydroksisukkiini-imidiä (0,128 g, 1,112 mmol) ja jäädyttämisen jälkeen lmpötilaan -20°C DCC (0,215 g, 1,042 mmol). 15 minuutin jälkeen reaktioseos suodatettiin ja tuloksena saatuun liuokseen lisättiin H-Arg-OH:ta liuotettuna 21 ml:aan DMF/KCl 0,15 M vedessä (2/1 t/t). Reaktioseos pidettiin sekoituksessa 110 minuuttia huoneenlämmössä. Liuotin haihdutettiin sitten vakuumissa ja jäännös otettiin useamman kerran absoluuttiseen etanoliin ja suodatettiin. Tuloksena saatiin 0,455 g Z-Leu-(Et)Lys(Boc)-Pro-Arg-OH:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 24,38 min.; puhtaus 84 %.

- D) Kohdan C) yhdistettä käsiteltiin kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa H), jolloin saatiin Z-Leu-(Et)Lys-Pro-Arg-OH:•TFA (ITF 1929).

HPLC: gradientti (I) R.t. 17,63 min.; puhtaus 98 %.

- 20 FAB-MS: m/z-676 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- t (1H; NH_ε-Arg) 7,77;
 d (1H; NL-Leu) 7,68;
 25 m (5H; CH-aryyli) 7,37;
 d (1H; NH_α-Arg) 7,34;
 m(1H; C_α-Lys) 5,15;
 s (2H; CH₂-Z) 5,03;
 m (1H; C_α-Leu) 4,42;
 30 m (1H; C_α-Pro) 4,26;
 m (1H; C_α-Arg) 3,99;
 m (4H; C_δ-Pro ja CH₂-Et) 3,68:3,18;
 m (2H; C_δ-Arg) 3,11;
 m (2H; CH_ε-Lys) 2,74;
 35 m (17H; C_β ja C_γ-Leu, -Lys, -Pro ja -Arg, ja C_δ-Lys) 2,18:1,19;
 t (3H; CH₃-Et) 1,12;
 d (6H; CH₃-Leu) 0.89.

E) Kohdan D) yhdistettä (0.341 g, 0,44 mmol) käsiteltiin kuten on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa I). Tuloksena saatiin 0,06 g otsikkoyhdistettä.

5 HPLC: gradientti (II) R.t. 29,13 min.; puhtaus 97 %.

FAB-MS: m/z-541 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

- 10 d (1H; NH-Arg) 7,10;
 m (1H; C α -Lys) 5,20;
 m (1H; C α -Pro) 4,19;
 m (1H; C α -Arg) 3,81;
 m (5H; C α -Lys, CH₂-Et ja C δ -Pro) 3,66:3,10;
 15 m (2H; C δ -Arg) 3,03;
 m (2H; C ϵ -Lys) 2,74;
 m (17H; C β ja C γ -Leu, -Lys, -Pro ja -Arg, ja C δ -Lys) 2,10:1,18;
 s (6H; CH₃COO⁻) 1,77;
 t (3H; CH₃-Et) 1,03;
 20 d (3H; CH₃-Leu) 0,87.

ESIMERKKI 16

H-Gly-(isoBu)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 25 A) Esimerkin 9 kohdan B) yhdiste (2,38 g, 5,95 mmol) liuotettiin 34 ml:aan metanolia ja lisättiin 20,4 ml etikkahappoa. Reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan -20°C ja kun oli tiputettu isobutyryrialdehydiä (1,36 ml, 14,87 mmol) lisättiin natriumsyanoboorihydridiä (0,748 g, 11,9 mmol). Reaktioseos pidettiin sekoituksessa 100 minuuttia huoneenlämmössä. Liuotin haihdutettiin sitten vakuuissa ja jäännös otettiin etyyliasetaattiin ja pestiin 5 % natriumkarbonaatilla, HCl:llä pH-arvossa 2,5 ja vedellä neutraalisuuteen. Orgaanisesta faasista poistettiin vesi ja haihdutettiin vakuuissa. Tuloksena saatiin 2,65 g H-(isoBu)Lys(Boc)-Pro-OtBu:ta.
- 30
- 35

HPLC: gradientti (I) R.t. 22,85 min.; puhtaus 97 %.

- B) Lähtemällä kohdan A) yhdisteestä (2,2 g, 4,8 mmol) ja Z-Gly-F:stä (4,2 g, 20 mmol) ja etenemällä kuten on kuvattu esimerkissä 15, kohdassa A-D), saatiin 0,2 g otsikkoyhdistettä.

HPLC: gradientti (II) R.t. 12,58 min.; puhtaus > 98 %.

FAB-MS: m/z-513 amu [M+H]⁺

10

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

d (1H; NH-Arg) 7,09;

m (1H; C α -Lys) 5,25;

m (0,3H; C α -Pro) 4,43;

- 15 m (0,7H; C α -Pro) 4,16;

m (3H; C α -Arg ja C δ -Pro) 3,83:3,56;

m (2H; C α -Gly) 3,38;

m (4H; CH₂-iBu ja C δ -Arg) 3,09:2,93;

m (2H; C ϵ -Lys) 2,75;

- 20 m (15H; C β ja C γ -Lys, -Pro ja -Arg, ja C δ -Lys ja CH-iBu) 2,13:1,16;

s (6H; CH₃COO⁻) 1,79;

d (2,1H; CH₃-iBu) 0,81;

d (3H; CH₃-iBu) 0,76;

d (0,9H; CH₃-iBu) 0,69.

25

ESIMERKKI 17

H-Gly-(isoBut)Lys-Pro-OH•AcOH

- 30 Lähtemällä esimerkin 16 kohdan A) yhdisteestä (0,455 g, 1 mmol) ja Z-Gly-fluoridista (0,84 g, 4 mmol) ja etenemällä olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 15, kohdassa A) ja sitten esimerkissä 10, kohdassa B), saatiin 0,172 g otsikkotuotetta.

- 35 HPLC: (kolonnin lämpötila: 60°C), gradientti (II) R.t. 23,48 min.; puhtaus > 98 %.

FAB-MS: m/z -357 amu $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; DMSO):

- m (1H; $\text{C}\alpha$ -Lys) 5,13;
- 5 m (0,3H; $\text{C}\alpha$ -Pro) 4,30;
- m (0,7H; $\text{C}\alpha$ -Pro) 4,00;
- m (4H; $\text{C}\alpha$ -Gly ja $\text{C}\delta$ -Pro) 3,68:3,31;
- m (2H; CH_2 -iBu) 3,03;
- m (2H; C -Lys) 2,81:61;
- 10 m (11H; $\text{C}\beta$ ja $\text{C}\gamma$ -Lys ja -Pro, $\text{C}\delta$ -Lys ja CH-iBu) 2,05:1,24;
- s (3H; CH_3COO^-) 1,86;
- d (2,1H; CH_3 -iBu) 0,82;
- d (3H; CH_3 -iBu) 0,77;
- d (0,9H; CH_3 -iBu) 0,69.

15

ESIMERKKI 18

H-Gly-(Bzl)Lys-Pro-Arg-OH•2AcOH

- 20 Lähtemällä esimerkin 9 kohdan B) yhdisteestä (1,36 g, 3 mmol) ja bentsaldehydistä (0,546 g, 5,4 mmol) ja etenemällä olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 16, kohdassa A-B) saatiin 0,395 g otsikkotuotetta.

- 25 HPLC: gradientti (II) R.t. 27,85 min.; puhtaus > 99 %.

FAB-MS: m/z -546 amu $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; DMSO):

- 30 m (6H; CH-aryyli ja NH-Arg) 7,39:6,97;
- m (0,7H; $\text{C}\alpha$ -Lys) 5,42;
- m (0,3H; $\text{C}\alpha$ -Lys) 4,93;
- m (2H; $\text{C}\alpha$ -Pro ja $\text{C}\alpha$ -Arg) 4,65:4,44;
- m (4H; $\text{C}\alpha$ -Gly ja $\text{C}\delta$ -Pro) 4,00:3,43;
- 35 m (2H; CH_2 -aryyli) 3,30,
- m (2H; $\text{C}\delta$ -Arg) 3,03;

m (2H; C ϵ -Lys) 2,75;
 m (14H; C β - ja C γ -Lys, -Pro ja -Arg, ja C δ -Lys) 2,29:1,14;
 s (6H; CH₃COO⁻) 1,79.

5 ESIMERKKI 19

H-Gly-Pro-Pro-Arg-OH•AcOH

10 A) Lähtemällä H-Pro-OtBu•HCl:stä (0,315 g, 1,5 mmol) ja Z-Pro-OH:sta (0,397 g, 1,59 mmol) käytettiin olennaisesti menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa C-D). Tuloksena saatiin 0,4 g H-Pro-Pro-OtBu:ta.

HPLC: gradientti (I) R.t. 11,38 min.; puhtaus 93 %.

15

B) Lähtemällä Z-Gly-OH:sta (0,333 g, 15,59 mmol) ja kohdan A) yhdisteestä (0,4 g, 1,5 mmol) käytettiin olennaisesti menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1, kohdassa G-H), jolloin saatiin 0,6 g Z-Gly-Pro-Pro-OH:ta.

20

HPLC: gradientti (I) R.t. 14,81 min.; puhtaus > 98 %.

25 C) Kohdan B) yhdistettä käsiteltiin olennaisesti kuten on kuvattu esimerkissä 15, kohdassa C-D). Tällöin saatiin 0,045 g otsikko-tuotetta.

HPLC: (kolonnin lämpötila: 60°C), gradientti (II) R.t. 23,48 min.; puhtaus > 98 %.

30 FAB-MS: m/z-426 amu [M+H]⁺

¹H-NMR (200 MHz; DMSO):

d (1H; NH-Arg) 7,34;

m (0,2H; C α -Pro) 4,73;

35 m (0,8H; C α -pro) 4,61;

m (0,2H; C α -Pro) 4,39;

- m (0,8H; C α -Pro) 4,33;
 m (7H; C α -Arg ja -Gly, ja 2C δ -Pro) 3,83:3,26;
 m (2H; C δ -Arg) 3,00;
 m (12H; C β - ja C γ -Pro ja -Arg) 2,22:1,26;
 5 s (3H; CH₃COO⁻) 1,83.

Esillä olevan keksinnön yhdisteillä osoittautui olevan immunosäätävää, sydänverisuoniin ja tulehduksiin vaikuttavaa aktiivisuutta. Varsinkin ne osoittautuivat olevan käyttökelpoisia terapeuttisina aineina skeptistä shokkia vastaan. Tämä aktiivisuus määritettiin seuraavan farmakologisen testin avulla.

BALB/c-naarashiiriin, painoltaan 20-22 g, istutettiin vatsakalvon sisäisesti 1 mg / hiiri LPS:ää (lipopolysakkaridi-serotyyppi 0127:B8 - Sigma) 0,5 ml:ssa fysiologista liuosta. Sen jälkeen ne jaettiin 10 eläimen ryhmiin, jokaiseen istutettiin vatsakalvon sisäisesti 62,5 μ g / hiiri joitakin keksinnön mukaisia yhdisteitä, 20 ja 120 minuuttia LPS:n annostelun jälkeen. Erästä eläinryhmää käsiteltiin ainoastaan LPS:llä ja niitä käytettiin vertailuun. Eläimiä tarkkailtiin ainakin 4 päivää.

20

Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa.

TAULUKKO

25	Esimerkki	Eloonjäämisprosentti
	(vertailu)	3,5
	2	23
	4	40
	5	23
30	14	38
	19	23

Keksinnön mukaisten yhdisteiden vaikutus sydänverisuoniin tutkittiin testin avulla, joka tähtäsi sydäntä suojaavan vaikutuksen arvioimiseen iskeemian jälkeen, joka oli saatu aikaan vasempaan sydänarteeriin rotassa, joka oli nukutettu ja joka testi suoritettiin olennaisesti kuten
 5 on kuvattu julkaisussa C. Clark et al. Journl. Exp. Methods, 3, 357, 1980. Tiedetään, että sydänverisuonten tukkeuma aiheuttaa useita asioita, jotka muuttavat ECG-käyrää, joihin mm. kuuluu hapen niukkuus, sydämen rytmihäiriöt ja koe-eläinten mahdollinen kuolema.

10 Tässä testissä Charles River -urosrottia, jotka oli jaettu 12 eläimen ryhmiin, nukutettiin nembutalilla (65 mg/kg vatsakalvon sisäisesti) ja kytkettiin sähköiseen sydänpöytä ECG:n jatkuvaksi tarkkailuksi. Sen jälkeen eläimet läpikävivät rintaontelon avauksen ja sydänpussin leikkaamisen jälkeen saumalanka laitettiin vasemman sydänverisuonen ympäri
 15 sen alun lähelle. 10 minuutin toipumisen jälkeen ja sillä edellytyksellä, että sydänpöydän muutos oli rekisteröity annosteltiin eläimille suonensisäisesti keksinnön mukaisten yhdisteiden ennalta määrättyjä annoksia, jotka oli liuotettu tai suspendoitu suolaliuokseen. Yhdelle eläinryhmälle (vertailuryhmälle) annosteltiin suonensisäisesti suolaliuosta. 5 minuutin jälkeen vasen sydänverisuoni sidottiin ja sidosta
 20 pidettiin 30 minuuttia.

Edustuskelpoisissa kokeissa saatiin merkittävä sydämen tiheälyöntisyyden (VT) pienennys, ontelomaisen fibrilloinnin (VF) pienennys ja kuolleisuus havaittiin jopa annoksilla 0,4 mg/kg. Varsinkin havaittiin,
 25 että esimerkin 4 yhdiste, kun annosteltiin 3 µg/kg, aiheutti kuolleisuuden pienenemisen, joka esiintyi vasta 18 minuuttia sidonnan jälkeen yli 80 %:ssa vertailuista, kun taas VT ja VF pieneni noin 50 %.

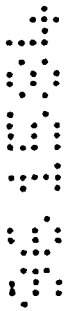
30 Tämän keksinnön kohteena on myös uuden oligopeptidin käyttö immunomoduloivina aineina ja sydänverisuoni- ja tulehdustautien käsittelyssä viitaten kaikkiin teollisiin suoritustuotoihin, jotka kytkeytyvät mainittuun käyttöön myös mukaanlukien sen farmaseuttiset koostumukset. Esimerkkejä tällaisista farmaseuttisista koostumuksista ovat tabletit,
 35 sokeripäällysteiset ja kalvopäällysteiset tabletit, siirapit ja lääkepullot, jälkimmäisten ollessa sopivia sekä suun kautta tapahtuvaan että

suonensisäiseen ja verisuonen ulkopuoliseen annosteluun. Tällaiset koostumukset sisältävät aktiivisen ainesosan yksinomaan tai yhdessä yhteisten farmaseuttisesti hyväksyttävien kantajien ja täyteaineiden kanssa.

5

Aktiivisen ainesosan annos voi vaihdella laajoissa rajoissa riippuen käytetystä yhdisteestä, joka voidaan annostella yhden tai useamman ker-
ran päivässä terapeuttien tarpeiden mukaisesti.

10



Patenttivaatimukset

1. Kaavan (I) mukaiset oligopeptidit

5 $A_1-A_2-A_3-A_4$ (I)

jossa

10 A_1 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat glysiini, treoniini, leusiini, isoleusiini, valiini, sarkosiini,alaniini, (C_{2-6}) asyyliglysiini, tai sitä ei ole;

15 A_2 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu leusiini, isoleusiini, valiini, lysiini, ornitiini, $N\alpha$ -substituoitu ainakin yhdellä (C_{1-6}) alkyyllillä, bentsyyllillä tai (C_{2-6}) asyyliryhmällä;

A_3 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu proliini, leusiini, isoleusiini ja valiini;

20 A_4 on aminohappojäännös joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu arginiini, leusiini ja glutamiini, valinnaisesti amidoitu C-päätteessä tai on agmatiinijäännös, tai sitä ei ole; sillä edellytyksellä, että ainoastaan yksi ryhmistä A_1 , A_2 ja A_4 voi olla poissa; jolloin mainitut yhdisteet lisäksi on tunnettu siitä, että edellä olevat aminohappojäännösten
25 ja agmatiinijäännöksen sivuketjoryhmät voidaan valinnaisesti substituoida yhdellä tai useammalla ryhmällä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu (C_{1-6}) alkyyli, bentsyyli tai (C_{2-6}) asyyli; tai kukin mainituista aminohappojäännöksistä voi olla D- tai L-muodossa hiiliatomilla, joka kantaa sivuketjua, tai voi olla diastereoisomeerien tai enantiomeerien
30 muodossa;

ja niiden suolat farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen tai emästen kanssa.

35 2. Patenttivaatimuksessa 1 määritelty oligopeptidi, tunnettu siitä, että A_1 on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon

kuuluu glysiini, sarkosiini, alaniini, (C₂₋₆)asyyliglysiini, tai sitä ei ole;

A₂ on aminohappojäännös, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu glysiini
5 ja glysiini, joka on valinnaisesti N α -substituoitu (C₁₋₆)alkyyllillä, bentsyyllillä tai (C₂₋₆)asyyliryhmällä;

A₃ on proliini;

10 A₄ on arginiini, arginiini, joka on valinnaisesti amidoitu C-päänteessä tai sen agmatiinijäännöksessä;

jolloin mainitut yhdisteet lisäksi on tunnettu siitä, että mainitun aminohappojäännöksen sivuketjuryhmät ja agmatiinijäännöksen sivuketju-
15 ryhmät voidaan valinnaisesti substituoida yhdellä tai useammalla substituentilla, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluu (C₁₋₆)alkyyli, bentsyyli tai (C₂₋₆)asyyli; ja kukin mainituista aminohappojäännöksistä voi olla C α :n D- tai L-muodossa tai mahdollisten diastereoisomeerien tai enantiomeerien muodossa;

20

ja niiden suolat farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen tai emästen kanssa.

3. Patenttivaatimuksessa 1 määritelty oligopeptidi, t u n n e t t u
25 siitä, että A₁ on glysiini, A₂ on N α -etyylilyysiini, A₃ on proliini ja A₄ on arginiini;

ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät happo- ja emässuolat.

30 4. Patenttivaatimuksessa 1 määritelty oligopeptidi, t u n n e t t u siitä, että A₁ on poissa, A₂ on N α -asetyyliilyysiini, A₃ on proliini ja A₄ on arginiini;

ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät happo- ja emässuolat.

35

5. Patenttivaatimuksessa 1 määritelty oligopeptidi, t u n n e t t u siitä, että A_1 on glysiini, A_2 on $N\alpha$ -etyylilyysiini, A_3 on proliini ja A_4 on poissa;

5 ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät happo- ja emässuolat.

6. Patenttivaatimusten 1-5 mukaiset yhdisteet terapeuttisina aineina.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset yhdisteet sydänverisuoniaineina.

10

8. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset yhdisteet tulehduksen vastaisina aineina.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset yhdisteet terapeuttisina aineina
15 septisen shokin hoitoon.

10. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen oligopeptidin yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän täyte-
aineen kanssa.

20



Patentkrav

1. Oligopeptider med formeln (I)

5 $A_1-A_2-A_3-A_4$ (I)

där

10 A_1 är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av glycin, treonin, leucin, isoleucin, valin, sarkosin, alanin, (C_{2-6}) acylglycin, eller den är frånvarande;

15 A_2 är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av leucin, isoleucin, valin, lycin, ornitin, $N\alpha$ -substituerad med åtminstone en (C_{1-6}) alkyl, bensyl eller (C_{2-6}) acylgrupp;

A_3 är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av prolin, leucin, isoleucin och valin;

20 A_4 är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av arginin, leucin och glutamin, valbart amiderad vid C-ändpositionen eller är en agmatinrest eller är frånvarande; med den förutsättningen att endast en av grupperna A_1 , A_2 och A_4 kan vara frånvarande; varvid nämnda föreningar vidare är kännetecknade av att grupperna av sidokedjorna
25 av nämnda aminosyrarester och av agmatinresten kan valbart vara substituerad med en eller flera substituenten som är valda från en grupp som består av (C_{1-6}) alkyl, bensyl eller (C_{2-6}) acyl; och vardera av nämnda aminosyrarester kan vara i D- eller L-form på kolatomen som bär sidokedjan eller i form av en av möjliga diastereoisomerer eller enantio-
30 merer;

och farmaceutiskt acceptabla syra- och bassalter av dessa.

35 2. Oligopeptid som definierats i patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att

A₁ är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av glycin, sarkosin, alanin, (C₂₋₆)acylglycin, eller den är frånvarande;

A₂ är en aminosyrarest som väljes från en grupp som består av lysin och
 5 lysin valbart N α -substituerad med åtminstone en (C₁₋₆)alkyl, bensyl eller (C₂₋₆)acylgrupp;

A₃ är prolin;

10 A₄ är arginin, arginin, valbart amiderad vid C-ändpositionen eller är en agmatinrest;

varvid nämnda föreningar vidare är kännetecknade av att sidokedjorna av nämnda aminosyrarester och av agmatinresten valbart kan vara substi-
 15 tuerade med en eller flera substituenten som är valda från en grupp som består av (C₁₋₆)alkyl, bensyl eller (C₂₋₆)acyl; och vardera av nämnda aminosyrarester kan vara i D- eller L-form på C α , eller i form av en av möjliga diastereoisomerer eller enantiomerer;

20 och farmaceutiskt acceptabla syra- och bassalter av dessa.

3. Oligopeptid som definierats i patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att A₁ är glycin, A₂ är N α -etyllysin, A₃ är prolin och A₄ är arginin;

25 och farmaceutiskt acceptabla syra- och bassalter av dessa.

4. Oligopeptid som definierats i patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att A₁ är frånvarande, A₂ är N α -acetyllysin, A₃ är prolin och A₄
 30 är arginin;

och farmaceutiskt acceptabla syra- och bassalter av dessa.

5. Oligopeptid som definierats i patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att A₁ är glycin, A₂ är N α -etyllysin, A₃ är prolin och A₄ är
 35 frånvarande;

och farmaceutiskt acceptabla syra- och bassalter av dessa.

6. Föreningar enligt patentkraven 1-5 som terapeutiska ämnen.

5 7. Föreningar enligt patentkrav 6 som hjärtblodkärlsämnena.

8. Föreningar enligt patentkrav 6 som inflammationsmotverkande ämnen.

9. Föreningar enligt patentkrav 6 som terapeutiska ämnen för behandling
10 av septisk shock.

10. Farmaceutisk sammansättning som innefattar en oligopeptid enligt
patentkrav 1, som används tillsammans med en farmaceutiskt acceptabelt
fyllnadsmedel.

15