

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) FI 781241 A7

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **781241**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.04.1978**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **21.04.1978**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.10.1978**

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

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

22.04.1977 US 789898

23.01.1978 US 871563

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • F. Hoffmann-La Roche & Co., Grenzachersstrasse 124-184, 4002 basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Wang, Su-Sun, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

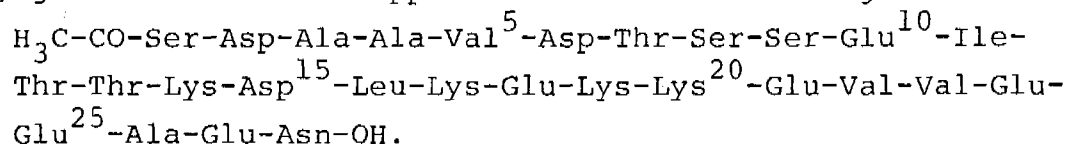
Menetelmä tymosiinialfa ja analogin valmistamiseksi

Förfarande för framställning av tymosinalfa och en analog

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel, Sveitsi

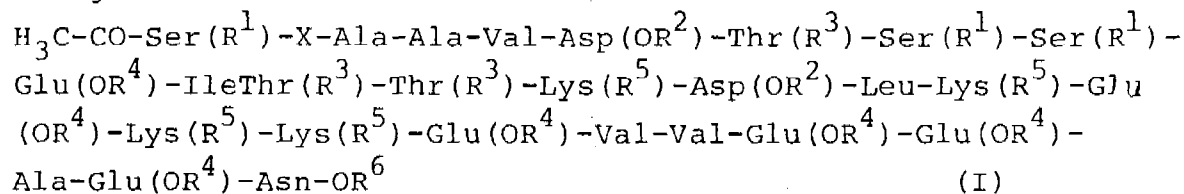
Menetelmä tymosiini α_1 ja analogin valmistamiseksi - Förfarande för framställning av tymosin α och en analog

Tymosiini α_1 on lämpöä kestävä, erittäin hapan polypeptidi-yhdiste, jossa on 28 aminohappotähdettä seuraavan sarjan muodossa:



Tämän peptidin, joka on tehokas immunoiva aine, eristivät tymosiinifraktiosta 5 Goldstein ym. käyttämällä ioninvaihtokromatografian ja geelisuodatuksen yhdistelmää. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 725-729 (1977)).

Tämä keksintö koskee tymosiini α_1 :n tai sen $[\text{Asn}^2]$ -analogin ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen synteesiä poistamalla suojaryhmät suojatusta oktakosapeptidistä, joka koostuu tähdesarjasta:



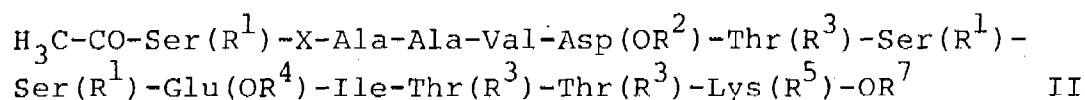
jossa x on Asn tai Asp(OR²); R¹ on tavanomainen seriinitähteen hydroksyyli-ryhmän suojaryhmä; R², R⁴ ja R⁶ ovat tavanomaisia karboksyyli-ryhmän suojaryhmiä; R³ on tavanomainen treoniinin hydroksyyli-ryhmän suojaryhmä ja R⁵ on tavanomainen lysiinitähteen ω-amino-ryhmän suojaryhmä, ja muuttamalla, haluttaessa, saatu yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

Esimerkkeinä R¹-ryhmistä ovat bentsyyli, asetyyli, bentsoyyli, tert.-butyyli, trityyli, 4-bromibentsyyli, 2,6-diklooribentsyyli ja bentsyylioksikarbonyyli, bentsyylin ollessa ensisijainen. Esimerkkeinä R²-, R⁴- ja R⁶-ryhmistä ovat aryyli-ryhmät, erityisesti fenyyli tai fenyyli, jossa on substituenttina pienalkyyli, halogeeni, nitro, merkapto tai substituoitu merkapto kuten metyyli-; aralkyyli-ryhmät kuten bentsyyli tai bentsyyli, jossa on substituenttina metoksi, halogeeni tai nitro; pienalkyyli-ryhmät kuten metyyli, etyyli, tert.-butyyli ja tert.-amyyli; substituoitujen pienalkyyli-ryhmät kuten 2-halogeenietyyli, β,β-dimetyyliaminoetyyli ja syaanometyyli; bentshydryyli- ja fenasyyli-ryhmät, bentsyylin ollessa ensisijainen. Esimerkkejä R³-ryhmistä ovat bentsyyli, asetyyli, bentsoyyli, tert.-butyyli, trityyli, 2,6-diklooribentsyyli, 4-bromibentsyyli ja bentsyylioksikarbonyyli, bentsyylin ollessa ensisijainen. Esimerkkejä R⁵-ryhmistä ovat bentsyylioksikarbonyyli, jonka aromaattisessa renkaassa voi valinnaisesti olla substituentteina esimerkiksi 4-kloori, 2-bromi, 4-bromi, 2,4-dikloori, 4-nitro, 4-metoksi, 3,5-dimetoksi, 4-metyyli, 2,4,6-trimetyyli, 4-fenyyliatso, 4-(4-metoksi-fenyyliatso), 2-(N,N-dimetyylikarbamido) ja 2-nitro-4,5-dimetoksi, uretaani-tyyppiset suojaryhmät kuten 4-tolueenisulfonyylietyylioksikarbonyyli, 9-fluorenyylimetyylioksikarbonyyli ja näiden kaltaiset emäksellä lohkaistavissa olevat ryhmät, 5-bentsisoksatsolyylimetyleni-oksikarbonyyli, metyyli- ja metyyli-sulfonyylietyylioksikarbonyyli, isonikotinyylioksikarbonyyli, halogeenietyylioksikarbonyyli, di-isopropyylimetyylioksikarbonyyli, bentshydryylioksikarbonyyli, isobornyylioksikarbonyyli, dinitrodifenyyylimetyylioksikarbonyyli, tert.-butyylioksikarbonyyli, tert.-amyylioksikarbonyyli, adamantyylioksikarbonyyli, syklopentyylioksikarbonyyli, metyyli-syklobutyylioksikarbonyyli, metyyli-sykloheksyylioksikarbonyyli, 2-aryyli-isopropylioksikarbonyyli-ryhmät kuten 2-(p-bifenyyli)-isopropylioksikarbonyyli, 2-(4-pyridyyli)-isopropylioksikarbonyyli ja näiden kaltaiset tyypilliset uretaaniryhmät; asyyli-ryhmät kuten formyyl, trifluoriasetyyli, ftaloyyli, bentseenisulfonyyli, aseto-asetyyli, klooriasetyyli, 2-nitrobentsoyyli, 4-tolueenisulfonyyli,

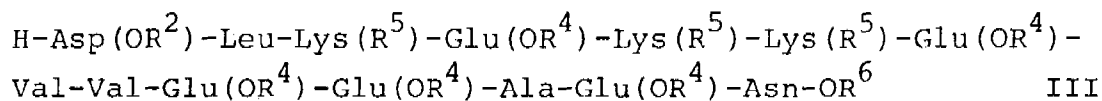
sulfenyyli-ryhmät kuten bentseenisulfenyyli, o-nitrofenyyli-sulfenyyli ja näiden kaltaiset sulfenyyli-ryhmät, ja aryyli-pienalkyyli-ryhmät kuten difenyyli-metyyli ja trifenyyli-metyyli, bentsyyli-oksikarbonyyli-ryhmän ollessa ensisijainen.

Suojaryhmien poistaminen suojatusta sarjan I oktakosapeptidistä suoritetaan helposti tunnetuin menetelmin, kuten esimerkiksi käsittelemällä vedettömällä hapolla kuten fluorivedyllä lähinnä anisolin läsnäollessa.

Tämän keksinnön mukaisesti sarjan I suojattua oktakosapeptidiä voidaan syntetisoida kondensoimalla suojattua tetradekapeptidiä, joka on sarjan:



mukainen, suojatun tetradekapeptidin kanssa, joka on sarjan:



mukainen, jossa X, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ja R^6 ovat edellä määritellyjä ja R^7 on vety tai aktivoiva ryhmä.

Edellä mainittu kytkentäreaktio voidaan suorittaa käyttämällä hyvin tunnettuja menetelmiä, joita sovelletaan peptidejä liuosfaasissa syntetisoitaessa. Täten, esimerkiksi, aminopäätteisen tetradekapeptidin voidaan antaa reagoida l-hydroksibentsotriatsoolin (HOBT) ja disyκλοheksyylikarbodi-imidin (DCC) kanssa, jolloin saadaan aktivoitua esterä, jonka annetaan sitten reagoida karboksyyli-päätteisen tetradekapeptidin kanssa, jolloin saadaan haluttua oktakosapeptidiä suojatussa muodossa.

Suojattuja tetradekapeptidejä voidaan valmistaa alan hyvin tunnettujen menetelmien mukaisesti.

Suojatun karboksyyli-päätteisen tetradekapeptidi III:n /X = Asp(OBzl)/ kemiallisessa synteesissä käytetty menettelytapa oli seuraava: H-Glu(OBzl)-OH kytkettiin ensin yhdisteeseen Boc-Ala-OSu, jolloin saatiin suojattua dipeptidiosaa Boc-Ala-Glu(OBzl)-OH, joka kondensoitiin sitten yhdisteen HCl·H-Asn-OBzl kanssa käyttäen Wünsh'in ja Drees'in DCC/HOSu-menetelmää, Chem.Ber. 99, 110 (1966).

Asparagiinibentsyyliesterin hydrokloridisuolaa valmistettiin yhdisteestä Boc-Asn-OBzl, jota puolestaan syntetisoitiin kaupallisesti saatavasta yhdisteestä Boc-Asn-OH ja bentsyylibromidista käyttämällä aminohapon seesiumsuolaa. Boc-suojaryhmä poistettiin käsittelemällä 30 minuuttia 4-norm. HCl:n kuivassa tetrahydrofuraaniliuoksessa.

H-Glu(OBzl)-OH:n ja Boc-Glu(OBzl)-OSu:n välisessä reaktiossa muodostui yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH värittömänä kirkkaana öljynä. Sitä käytettiin myöhemmin syntetisoitaessa suojattua pentapeptidiä Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl DCC/HOSu:n välittämässä lohkokondensaatioissa käyttämällä yhdistettä HCl·H-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl, jota saatiin yhdisteestä Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl käsittelemällä 4-normaalilla HCl/tetrahydrofuraanilla. Edellä mainittua suojattua pentapeptidiä saatiin hyvin saannoin kiteisenä, puhtaana aineena.

Suojatun oktapeptidin Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl valmistamiseksi valmistettiin ensin tarvittavaa suojattua tripeptidiä Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH. Yhdisteen Boc-Val-OSu annettiin reagoida vapaan valiinin kanssa, jolloin saatiin yhdistettä Boc-Val-Val-OH, josta lohkaisemalla 4n HCl:n THF-liuoksella ja antamalla tuotteen sen jälkeen reagoida yhdisteen Boc-Glu(OBzl)-OSu kanssa saatiin haluttua tripeptidiä, joka kiitetytettiin sykloheksyyliamiinisuolana Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH·CHA. Sykloheksyyliamiinisuola muutettiin vapaaksi hapoksi ja kytkettiin sitten DCC:n kanssa HOSu:n läsnäollessa yhdisteeseen HCl·H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl, jota saatiin yhdisteestä Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl saatiin puhtaana, amorfisena, kiinteänä aineena. Siitä poistettiin suojaryhmät hydraamalla, minkä jälkeen seurasi käsittely trifluorietikkahapolla tavalliseen tapaan, jolloin saatiin vapaata oktapeptidiä Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn. Tämä tuote puhdistettiin kromatograafisesti ioninvaihtokolonissa, jolloin saatiin ainetta, joka levykromatograafisen analyysin ja paperielektroforeesi-analyysin perusteella oli homogeenista.

Suojatun undekapeptidin Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl synteesiä varten syntetisoitiin tarvittavaa tripeptidi-osaa lähtemällä yhdisteistä Boc-Lys(Z)-OSu ja H-Lys(Z)-OH. Näin saatua dipeptidiä Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH käsiteltiin 4n HCl:n THF-liuoksen kanssa ja muodostuneen

suolan HCl.H-Lys(Z)-Lys(Z)-OH annettiin sitten reagoida yhdisteen Boc-Glu(OBzl)-OSu kanssa, jolloin saatiin haluttua tripeptidiä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH. Tripeptidi aktivoitiin sitten DCC:llä ja HOSu:lla Weygand'in ym. menetelmällä, Z.Naturforsch. 21b, 426 (1966), ja in situ valmistetun aktiivisen tripeptidiesterin Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OSu liuos yhdistettiin yhdisteen H-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl trifluoriasetaattisuolan kanssa, jota oli saatu vastaavasta suojatusta oktapeptidistä käsittelemällä tätä 30 minuutin ajan TFA:n kanssa. Lisäämällä pieni määrä emästä tällä tavalla saatiin haluttua suojattua undekapeptidiä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl.

Poistamalla suojaryhmät suojatusta undekapeptidistä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl vedettömällä fluorivetyhapolla, saatiin vapaata undekapeptidiä Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn, joka ionivaihtokolonnissa tapahtuneen kromatografioinnin jälkeen suoritettuna paperi-elektroforeesianalyysin perusteella oli homogeenista.

Suojatun tetradekapeptidin synteesin jälkeen seurasi saman kaavan mukainen menettely. Boc-Leu-OSu kytkettiin yhdisteeseen H-Lys(Z)-OH, jolloin saatiin yhdistettä Boc-Leu-Lys(Z)-OH. Kun N^α-Boc-ryhmä oli poistettu 4n HCl:n THF-liuoksella ja yhdiste reagoi yhdisteen Boc-Asp(OBzl)-OSu kanssa, suojattua tripeptidiä Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OH saatiin kiteisenä, puhtaana, kiinteänä aineena. Se muutettiin aktiiviseksi esteriksi Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OSu ja kondensoitiin yhdisteen H-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl trifluoriasetaattisuolan kanssa, jota oli saatu suorittamalla vastaavan suojatun undekapeptidin TFA-käsittely. Haluttua tuotetta Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl saatiin hyvin saannoin. Levykromatograafinen analyysi osoitti, että tuote oli homogeenista. Vapaata tetradekapeptidiä Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn saatiin suojatusta yhdisteestä käsittelemällä vedettömällä fluorivetyhapolla ja puhdistamalla ioninvaihtokolonnissa.

Samalla tavalla koottiin suojattu aminopäätteinen tetradekapeptidi H₃C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser-

(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH asetyyli-tetrapeptidi-lohkosta, heksapeptidistä ja toisesta tetrapeptidistä käyttämällä peptidisynteesialan hyvin tuntemia menetelmiä. Amino-päätteisen asetyylitetrapeptidin syntetisoimiseksi yhdisteestä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-OH}$ ja bentsyylibromidista valmistettiin aminohapon seesiumsuolan kautta yhdistettä $\text{H}_2\text{C-CO-Ser(Bzl)-OBzl}$. Hydratsinolysoimalla yhdiste $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-OBzl}$ saatiin hyvin saannoin yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-HNNH}_2$ puhtaana, kiteisenä, kiinteänä aineena. Lohkaisemalla suojaryhmä yhdisteestä Boc-Ala-Ala-OH saatiin dipeptidi-hydrokloridisuolaa HCl.H-Ala-Ala-OH . Kytkeällä tämä dipeptidi yhdisteeseen Boc-Asp(OBzl)-OSu saatiin suojattua tripeptidiä Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH, joka eristettiin disykloheksyyliamiinisulana. Poistamalla aminosuojaryhmä ja kondensoimalla yhdisteen $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-HNNH}_2$ kanssa käyttämällä Honzl'in ja Rudinger'in atsidimenetelmää, Collection Czech, Chem, Commun. 26, 2333 (1961) saatiin osittain suojattua tetrapeptidiä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH}$, josta tämän reagoidessa ekvivalenttimäärän kanssa hydratsiinia DCC:n välityksellä HOBT:n läsnäollessa muodostui haluttua väliyhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-HNNH}_2$.

Suojatun heksapeptidin Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH₂ syntetisoimiseksi käytettiin menetelmää, johon sisältyi peptidiketjun vaiheittainen laajentaminen C-pääteisestä päästä. Täten H-Glu(OBzl)-OH kytkettiin yhdisteeseen Boc-Ser(Bzl)-OSu suojatun dipeptidin Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH muodostamiseksi, josta poistamalla Boc-ryhmä ja antamalla yhdisteen reagoida edelleen yhdisteen Boc-Ser(Bzl)-OSu kanssa saatiin tripeptidiä Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH. Poistamalla aminoryhmän suojaryhmä ja kondensoimalla sen jälkeen saatu tripeptidisuola HCl.H-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH yhdisteen Boc-Thr(Bzl)-OSu kanssa saatiin suojattua tetrapeptidiä Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH, josta käsittely HCl:n kanssa THF:ssa poisti Boc-ryhmän ja yhdisteen reagoidessa edelleen yhdisteen Boc-Asp(OBzl)-OSu kanssa muodostui suojattua pentapeptidiä Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH. Tämän yhdisteen Boc-ryhmä poistettiin käsittelemällä HCl:n kanssa ja muodostunut tuote HCl.H-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH kytkettiin sen jälkeen yhdisteeseen Boc-Val-OSu, jolloin saatiin yhdistettä Boc-Val-Asp(OBzl)-

Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH kiteisenä puhtaana aineena.

Edellä mainitun heksapeptidin päässä olevan glutamiinihappotähteen α -karboksyyli-ryhmä muutettiin sitten spesifisesti hydratsidi-funktioksi antamalla sen reagoida ekvivalenttimäärän kanssa hydratsiinia käyttämällä kytkentäaineena DCC:tä HOBT:n läsnäollessa. Haluttu suojattu heksapeptidi-hydratsidi Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH₂ eristettiin puhtaana, kiteisenä, kiinteänä aineena kohtuullisin saannoin.

Suojatun tetrapeptidin Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH syntetisoimiseen sovellettiin samanlaista vaiheittaista menetelmää käyttämällä Anderson'in ym:n N-hydroksisukkiini-imidi-aktiivi-esteri-menetelmää, J.Amer.Chem.Soc. 86, 1839 (1964).

Yhdisteiden Boc-Thr(Bzl)-OSu ja H-Lyst(Z)-OH välisessä reaktio-sa saatiin dipeptidiä Boc-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH öljynä, josta poistettiin α -aminopäänteen suojaryhmä ja annettiin reagoida yhdisteen Boc-Thr(Bzl)-OSu kanssa, jolloin saatiin tripeptidiä Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH kiteisenä kiinteänä aineena. Poistamalla Boc-ryhmä ja antamalla saadun aineen HCl.H-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH reagoida yhdisteen Boc-Ile-OSu kanssa saatiin haluttua suojattua tetrapeptidiä Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH kiteisenä puhtaana yhdisteenä silikageelikonnissa suoritettua kromatografioinnin jälkeen. Tästä tetrapeptidiosasta poistettiin sitten pääteaminoryhmän suojaryhmä ja sen jälkeen se kondensoitiin suojatun heksapeptidin Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH₂ kanssa atsidi-menetelmällä, jolloin saatiin hyvin saannoin suojattua dekaeptidiä Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH.

Poistamalla Boc-ryhmä dekaeptidi-yhdisteestä TFA:lla ja kytkemällä se sitten N-päänteiseen tetrapeptidiin Ac-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-HNNH₂ atsidi-menetelmällä muodostui haluttua suojattua tetradekaeptidiä H₃C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH. Lopullista kytkentää varten tämä asetyyli-tetradekaeptidi aktivoitiin DCC:llä ja HOBT:llä ja muodostuneen aktivoituneen esterin annettiin sitten reagoida yhdisteen TFA.H-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl kanssa, jota oli saatu vastaavasta suojatusta yhdisteestä käsittelemällä TFA:n kanssa, jolloin saatiin suojattua asetyyli-oktakosapeptidiä H₃C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp-

(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OMzl)-Asn-OBzl. Käsittely vedettömällä HF:lla poisti kaikki suojaryhmät ja puhdistettaessa ioninvaihtokromatografiaa käyttäen saatiin yhdistettä tymosiini α_1 .

Suojatusta tetradekapeptidistä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH}$ saatiin samalla tavalla vapaata tetradekapeptidiä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-OH}$.

/Asn²/-tymosiini (α_1 :n synteesi noudatti samaa kaavaa kuin tymosiini α_1 :tä syntetisoitaessa. Kaikki käytetyt väliyhdisteet olivat muuten samoja paitsi N-päätteinen asetyyli-tetrapeptidi-hydratsidi $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH}_2$. Tämän yhdisteen syntetisoimiseksi Boc-Ala-Ala-OH muutettiin ensin yhdisteeksi Boc-Ala-Ala-OBzl, josta poistamalla HCl:lla selektiivisesti Boc-ryhmä saatiin dipeptidiesterisuolaa HCl.H-Ala-Ala-OBzl. Dipeptidi kytkettiin sitten yhdisteeseen Boc-Asn-OH käyttämällä Köning'in ja Geiger'in DCC/HOBT-menetelmää, Chem. Ber. 103, 788, (1970), jolloin saatiin suojattua tripeptidiesteriä Boc-Asn-Ala-Ala-OBzl, jota käsiteltiin HCl:n kanssa THF:ssa Boc-ryhmän poistamiseksi. Saatu tuote HCl.H-Asn-Ala-Ala-OBzl kondensoitiin sitten (DCC/HOBT-menetelmällä) yhdisteen $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-OH}$. DCHA kanssa, jolloin saatiin haluttua suojattua tetrapeptidiä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-OBzl}$.

Vastaava hydratsidia $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH}_2$ saatiin hyvin saannoin hydratsinolysoimalla tätä yhdistettä. Suorittamalla hydratsidin ja decapeptidin TFA.H-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH välinen kondensointi muodostui suojattua tetradekapeptidiä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH}$. Tämä yhdiste kytkettiin sitten edellä mainitun tetradekapeptidi-TFA-suolan kanssa, jonka C-päätteestä suojaryhmä oli poistettu, jolloin saatiin vastaavaa suojattua /Asn²/-tymosiini α_1 :tä. Poistamalla kaikki suojaryhmät käsittelemällä kuivan HF:n kanssa ja puhdistamalla sen jälkeen kromatograafisesti ioninvaihtokolonnissa saatiin haluttua /Asn²/tymosiini α_1 :tä, kun taas samalla menetelmällä käyttämällä suojattua tetradekapeptidiä

$\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Asn}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Ile}-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{OH}$ saatiin asetyloitua tetradekapeptidiä $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}-\text{Asn}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Lys}-\text{OH}$.

Tämän keksinnön lisäkohteena on todettu, että useilla väliyhdiste-peptideillä, joita on käytetty edellä syntetisoitaessa tymosiini α_1 :tä ja $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :tä, on vaikutusta T-solujen säätelykykyyn, erottelukykyyyn ja toimintaan, nimittäin yhdisteillä:

$\text{Glu}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Asn};$

$\text{Glu}-\text{Lys}-\text{Lys}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Asn};$

$\text{Asp}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Glu}-\text{Lys}-\text{Lys}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Asn};$

$\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}-\text{Asn}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Lys};$ ja

$\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}-\text{Asp}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Lys}.$

Tymosiini α_1 :tä, $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :tä, tai edellä mainittuja uusia okta-, undeka- tai tetradekapeptidejä, jotka muodostavat osan tästä keksinnöstä, ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja voidaan antaa lämmينverisille nisäkkäille aplikoimalla parenteraalisesti joko laskimonsisäisesti, ihonalaisesti tai lihaksensisäisesti. Nämä yhdisteet ovat voimakkaita immuuniutta edistäviä aineita päivittäisen annostuksen ollessa laskimonsisäisesti annettaessa rajoissa noin 1-100 mg kehon painon kiloa kohden päivässä. Tarvittava annostus riippuu ilmeisesti kyseisestä käsiteltävästä sairaustilasta, tilan vakavuudesta ja joidon kestosta. Sopiva farmaseuttiseen käyttöön soveltuva annosmuoto on 1 mg kylmäkuivattua tymosiini α_1 :tä, $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :tä, tai jotakin sen edellä mainittua peptidifragmenttia modifioituna ennen käyttöä lisäämällä steriliä vettä tai suolaliuosta.

Tämän keksinnön piiriin sisällytettäviä ovat myös thymosiini α_1 :n, $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :n ja niiden edellä mainittujen peptidifragmenttien farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Sopivia suoloja ovat natrium- ja kaliumsuolat tai suolat vahvan orgaanisen emäksen kuten guanidiinin kanssa. Valmisteeseen voidaan lisätä myös näiden kationien vastaioneja kuten kloridi-, bromidi-, sulfaatti-, fosfaatti-, maleaatti-, asetaatti-, sitraatti-, bentsoaatti-, sukki-naatti-, malaatti- tai askorbaatti-ioneja ja näiden kaltaisia ioneja.

Tässä käytetyillä lyhenteillä on seuraavat merkitykset:

Boc	= t-butyylisikarbonyyli
Bzl	= bentsyyli
DCC	= disykloheksyylikarbodi-imidi
DMF	= dimetyyliformamidi
THF	= tetrahydrofuraani
HOsu	= N-hydroksisukkiini-imidi
Triton B	= 40-prosenttinen trimetyyllibentsyyliammonium-hydroksidin metanoliliuos
NMM	= N-metyylimorfoliini
CHA	= sykloheksyyliamiini
DCHA	= disykloheksyyliamiini
Z	= bentsyylioksikarbonyyli
DMSO	= dimetyylisulfoksidi
TFA	= trifluorietikkahappo
TLC	= levykromatografia
Et ₃ N	= trietyyliamiini
HOBT	= 1-hydroksibentsotriatsoli

Seuraavat esimerkit kuvaavat yksityiskohtaisesti tymosiini α_1 :n ja $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :n synteesejä.

Vaikkakin tymosiini α_1 :n ja $[\text{Asn}^2]$ -tymosiini α_1 :n synteesejä selostettaessa on käytetty tiettyjä suojaryhmiä, alan asiantuntija voi tällaisissa synteeseissä käyttää hyväksi ekvivalentteja suojaryhmiä.

Esimerkki 1

A.a) Yhdistettä Boc-Asn-OH (11,0 g, 47,5 mmoolia) liuotettiin 200 ml:aan MeOH:a ja lisättiin 20 ml vettä. Liuos titrattiin pH-arvoon 7,0 20-prosenttisella Cs_2CO_3 :n vesiliuoksella (noin 55 ml). Seos haihdutettiin kuiviin ja jäännös haihdutettiin uudelleen kuiviin kaksi kertaa DMF:sta (kullakin kerralla 120 ml:sta, 45°C). Saatua valkeata kiinteätä ainetta sekoitettiin sitten 8,9 gramman kanssa bentsyylibromidia (52 mmoolia) 120 ml:ssa DMF:a 6 tunnin ajan. Haihduttamalla liuos kuiviin ja käsittelemällä suuren tilavuusmäärän kanssa vettä tuote muuttui heti kiinteäksi. Se koottiin talteen suodattamalla, liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin vedellä, kuivattiin Na_2SO_4 :lla, haihdutettiin kiinteäksi massaksi ja kiteytettiin etyyliasetaatista petrolieetterillä.

Saanto: 13,8 g (90,3 %) yhdistettä Boc-Asn-OBzl; sp. 120-122°C; $[\alpha]_D^{25} = -17,29^\circ$ (c = 1, DMF).

Boc-Asn-OBzl (13,7 g, 42,4 mmoolia) liuotettiin 80 ml:aan THF:a ja käsiteltiin 500 ml:n kanssa 4-normaalista HCl:n THF-liuosta. Seoksen annettiin olla paikoillaan 45 minuuttia, jona aikana alkoi saostua jonkin verran tuotetta. Käsiteltäessä 1000 ml:n kanssa eetteriä muodostui heti valkeata kiinteätä ainetta. Tuote suodatettiin erilleen, pestiin eetterillä ja kuivattiin NaOH-rakeiden päällä vakuuissa. Saanto: 10,3 g (94 %) yhdistettä HCl.H-Asn-OBzl; sp. 122-126°C; $[\alpha]_D^{25} = +6,82^\circ$.

b) H-Glu(OBzl)-OH (7,0 g, 29,5 mmoolia) jauhettiin hienoksi huhmaressa petkeleellä ja sen jälkeen sitä sekoitettiin 8,88 gramman (32,3 mmoolia) kanssa yhdistettä Boc-Ala-OSu 48 tuntia 250 ml:ssa DMF:a, jolloin läsnä oli 6 ml NMM:a. Reaktioseoksen pitämiseksi reaktion aikana lievästi emäksisenä lisättiin jonkin verran NMM:a. Liuotin haihdutettiin pois ja jäännös jaettiin 300 ml:aan etyyliasettaattia ja 500 ml:aan H₂O:ta, jossa oli 2 ml 10-prosenttista H₂SO₄:a, liukeneviin osiin. Orgaaninen kerros pestiin sen jälkeen kolme kertaa vedellä, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote liuotettiin tilavuudeltaan pieneen eetterimäärään ja käsiteltiin tilavuudeltaan suurella petrolieetterimäärällä. Saatiin valkeata amorfista kiinteätä ainetta, joka oli TLC:n perusteella homogeenista. Saanto: 11,0 g (91,5 %) yhdistettä Boc-Ala-Glu(OBzl)-OH; sp. 84-88°C; $[\alpha]_D^{25} = 8,08^\circ$ (c=1, DMF).

Yhdisteitä Boc-Ala-Glu(OBzl) (10,4 g, 25,4 mmoolia), HCl, H-Asn-OBzl (6,56 g, 25,4 mmoolia) ja HOSu (5,9 g, 50,8 mmoolia) liuotettiin DMF:iin (250 ml, 0°C). Lisättiin DCC:tä (5,7 g, 27,6 mmoolia) ja heti sen jälkeen trietyyliamiinia (3,5 ml). Seosta sekoitettiin 0°C:ssa 2 tuntia ja sitten 25°C:ssa 40 tuntia, jona aikana lisättiin silloin tällöin trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Muodostuneet liukenemattomat sivutuotteet suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin: Jäljelle jäänyt öljymäinen aines muuttui kiinteäksi käsiteltäessä veden kanssa. Raakatuote liuotettiin kloroformiin, pestiin vedellä (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin pienitilavuiseksi. Tässä vaiheessa muodostunut vähäinen kiinteä aine suodatettiin pois (epäpuhtautena huomattavasti disykloheksyyliureaa) ja suodosta käsiteltiin petrolieetterin kanssa. Saatiin kiteistä tuotetta. Saanto: 8,0 g (51,4 %) yhdistettä Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. 102-105°C; $[\alpha]_D^{25} = 12,5^\circ$ (c = 1, DMF).

c) H-Glu(OBzl)-OH (4,74 g, 20 mmoolia) jauhettiin hienoksi

huhmaressa petkeleellä ja sitä sekoitettiin yhdisteen Boc-Glu(OBzl)-OSu (0,7 g, 20 mmoolia) kanssa DMF:ssä 36 tuntia, jolloin läsnä oli 3,6 ml NMM:a. Muodostunut liuos haihdutettiin siirapiksi ja käsiteltiin veden kanssa. Öljymäinen sakka liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin peräkkäin 5-prosenttisella HOAc:lla ja vedellä (3 x), kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 14,03 g kirkasta öljyä. Sen annettiin olla paikoillaan petrolieetterin alla. Jällelle jäänyt öljymäinen Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH painoi 10,2 g (90,0 %). TLC-analyysi osoitti tuotteen olevan homogeenista. $[\alpha]_D^{25} = -7,59^\circ$ (c = 1, DMF).

d) Yhdistettä Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (28,2 g; 46 mmoolia) käsiteltiin 1,1 litran kanssa 4-norm. HCl:n THF-liuosta tunnin ajan. Haihdutettaessa liuotin ja ylimääräinen happo pois jällelle jäi öljyä, joka haihdutettaessa liuotin ja ylimääräinen happo pois jällelle jäi öljyä, joka haihdutettiin kuiviin vielä kahdesti tuoreen THF:n kanssa. Jällelle jäänyt öljy muuttui kiinteäksi kun sitä käsiteltiin suuren tilavuusmäärän kanssa eetteriä. Kiinteätä yhdistettä HCl.H-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl sekoitettiin yhdisteiden Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH (25,6 g, 46 mmoolia), HOSu (10,6 g, 92 mmoolia) ja DCC (10,9 g, 53 mmoolia) kanssa DMF:ssä (540 ml) 0°C :ssa tunnin ajan ja sitten 25°C :ssa 48 tunnin ajan. Reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä koko ajan lisättiin trietyyliamiinia (kaikkiaan noin 16 ml trietyyliamiinia). Muodostuneet liukenemattomat sivutuotteet suodatettiin erilleen ja suodos haihdutettiin kuiviin. Raakatuote liuotettiin CHCl_3 :een, pestiin vedellä (3 x), kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote muuttui kiinteäksi käsiteltäessä petrolieetterin kanssa. Kiteyttämällä uudelleen isopropanolista saatiin 28,9 g (59,8 %) yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. $169-175^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -11,78^\circ$ (c = 1, DMF).

Yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (3,9 g, 3,48 mmoolia) käsiteltiin 15 ml:n kanssa 4-norm. HCl:n THF-liuosta 30 minuutin ajan. Alkoi muodostua jonkin verran kiteistä tuotetta. Lisättiin eetteriä (210 ml) ja saostunut kiinteä aine koottiin talteen ja pestiin eetterillä. Raakamateriaali kiteytettiin MeOH:sta ja eetteristä. Saanto: 2,58 g (75,1 %) yhdistettä HCl.H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. $148-151^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -3,65^\circ$ (c = 1, DMF).

e) Yhdisteitä Boc-Val-OSu (12,6 g, 40 mmoolia) ja H-Val-OH (4,68 g, 40 mmoolia) kondensoitiin DMF:ssa (250 ml) 96 tunnin ajan, jolloin oli läsnä 2 ml trietyyliamiinia. Reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä lisättiin tarvittaessa trietyyliamiinia. Jällelle jäävä liukenematon aine suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin (45°C). Jäännös jaettiin eetteriin ja laimeaan H₂SO₄:ään (noin 1 %) liukeneviin osiin ja orgaaninen kerros pestiin vedellä (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin vaahtomaiseksi lasimaiseksi aineeksi. Tuote kiteytettiin eetteristä ja petrolieetteristä. Saanto: 12,2 g (96,4 %) yhdistettä Boc-Val-Val-OH; sp. 155-158°C; $\alpha_D^{25} = +1,10^\circ$ (c = 1, DMF).

Yhdistettä Boc-Val-Val-OH (40,5 g, 128 mmoolia) käsiteltiin 1,8 litran kanssa 4-norm THF:a 60 minuutin ajan. Ylimääräisen hapon ja liuottimen haihduttamisen ja sitä seuranneen eetterillä käsittelyn jälkeen saatiin 34,5 g yhdistettä HCl.H-Val-Val-OH valkeana amorfisena jauheena. Sitä käsiteltiin yhdisteen Boc-Glu(OBzl)-OSu (55,6 g, 128 mmoolia) kanssa litrassa DMF:a 24 tunnin ajan, jolloin oli läsnä 54 ml trietyyliamiinia. Reaktioseos suodatettiin vähäisen liukenemattoman aineksen poistamiseksi ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jällelle jäänyt öljymäinen jäännös liuotettiin etyyliasettaattiin (1,5 l) ja pestiin 5-prosenttisella etikkahapolla (2 x) ja sen jälkeen vedellä (3 x). Orgaaninen kerros kuivattiin (Na₂SO₄) ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin väritöntä kirkasta öljyä, joka ei kiteytynyt. Se liuotettiin niin ollen 3,2 litraan eetteriä ja käsiteltiin CHA:n (17 ml) kanssa kunnes seoksen pH oli 7,5. Saatua kiinteä suola koottiin talteen ja kiteytettiin uudelleen MeOH:sta ja eetteristä. Saanto: 58,9 g (72,7 %) yhdistettä Boc(Glu(OBzl)-Val-Val-OH).CHA; sp. 158-160°C; $\alpha_D^{25} = 33,41^\circ$ (c = 1, MeOH).

Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH.CHA:ta (1,69 g, 2,66 mmoolia) suspendoitiin veteen (40 ml) ja etyyliasettaattiin (40 ml) erotussuppilossa lisättäessä 4 ml 1-mol. H₂SO₄:a. Voimakkaan ravistelun jälkeen kiinteä aine liukeni ja orgaaninen kerros pestiin useaan kertaan vedellä, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin öljyksi (1,45 g). Näin saatua vapaata tripeptidiä kondensoitiin sitten 2,58 g:n kanssa yhdistettä HCl.H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (2,61 mmoolia) 15 ml:ssa DMF:a, jolloin oli läsnä yhdisteitä HOSu (0,612 g, 5,32 mmoolia), NMM (0,3 ml, 2,66 mmoolia) ja DCC (0,63 g, 3,06 mmoolia), tunnin ajan 0°C:ssa ja 60 tuntia 25°C:ssa. Tarvittaessa lisättiin, reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä, yhdistet-

tä NMM. Muodostunut liukenematon sivutuote suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin (45°C). Jällelle jäänyt öljymäinen jäännös muuttui kiinteäksi vedellä käsiteltäessä. Raaka kiinteä aine liuotettiin DMF:iin (50 ml) ja saostettiin MeOH:lla (300 ml). Saanto: 2,25 g (58,7 %) yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. $277-280^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12,43^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

Tätä tuotetta (0,72 g, 0,49 mmoolia) hydrattiin 5-prosenttisella Pd/BaSO₄:lla (0,5 g) 3 tuntia 3,4 atm:n paineessa seoksessa, jossa oli 40 ml DMF/30 ml MeOH/2 ml H₂O. Sen jälkeen seos suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin. Sen jälkeen sitä käsiteltiin 30 minuutin ajan 5 ml:n kanssa TFA:a ja hapon poishaihduttamisen jälkeen saatu jäännös trituroitiin useaan kertaan eetterin kanssa. Muodostunut valkea kiinteä aine liuotettiin veteen (20 ml) ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 0,47 g raakatuotetta. Yhdistettiin 3 x 32 cm:n kolonniin, jossa oli vahvasti emäksistä polystyreenihartsia (Bio-Rad AGL-X 2), joka oli tasapainoitettu ammoniumasetatti-puskurilla, jonka pH oli 8,1 (2-prosenttista etikkahappoa, jonka pH oli säädetty NH₃:lla arvoon 8,1). Kolonni eluoiattiin peräkkäin 200 ml:n erillä liuoksia 0,025-mol. NH₄OAc (pH 5,5), 0,025-mol. HOAc, 0,05-mol. HOAc, 0,1-mol. HOAc, 0,25-mol. HOAc, 0,5-mol. HOAc, 0,75-mol. HOAc, 1-mol. HOAc. Koottiin 12 ml:n fraktioita ja kustakin putkesta otettu eluaatti tutkittiin levykromatograafisesti. Haluttua ainetta sisältävät fraktiot (putket 225-229) yhdistettiin ja kylmäkuivattiin kahdesti, jolloin saatiin 0,223 g (48,1 %) puhdasta yhdistettä Glu-Val-Val-Glu-Ala-Glu-Asn, joka oli TLC- ja paperielektroforeesi-analyysin perusteella homogeenista.

f) Yhdistettä Boc-Lys(Z)-OH (15 g, 39,5 mmoolia) sekoitettiin HOSu:n (5,8 g, 50,5 mmoolia) ja DCC:n (8,66 g, 42 mmoolia) kanssa THF:ssa (250 ml) 3 tuntia. Liukenematon sivutuote suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jällelle jäänyttä siirappia (24,2 g) käsiteltiin iso-propanolin (150 ml) ja petroli-eetterin (150 ml) kanssa, jolloin saatiin öljymäistä tuotetta (21 g), joka ei kiteytynyt. Raakaa aktiivista esterä Boc-Lys(Z)-OSu käytettiin näin ollen kondensointiin yhdisteen H-Lys(Z)-OH (10,6 g, 38 mmoolia) kanssa DMF:ssa (250 ml) reaktioajan ollessa 72 tuntia, jolloin läsnä oli 5,5 ml trietyyliamiinia. Tarvittaessa lisättiin vielä trietyyliamiinia sekoitetun reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Sen jälkeen pieni määrä liukenematonta ainetta

suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin (45°C). Jällelle jäänyttä öljymäistä jäännöstä käsiteltiin litran kanssa 5-prosenttista HOAc:a. Saostunut tuote uutettiin etyyliasetaattiin ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin öljyksi. Se kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista (300 ml), jossa oli yhdistettä DCHA (10 ml) suolan muodossa. Kiteyttämällä uudelleen MeOH:sta ja eetteristä saatiin 22,7 g (72,5 %) yhdistettä Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH. DCHA; sp. 160-162°C; $[\alpha]_D^{25} = -2,21^\circ$ (c = 1, eOH).

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH.DCHA (10 g, 12,14 mmoolia) jaettiin EtOAc:iin (1 litra) ja 0,1-norm. H₂SO₄:ään (1 litra) liukeneviin osiin, orgaaninen kerros pestiin sitten vedellä (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin (7,9 g). Näin saatua vapaata happoa, Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH, käsiteltiin vastavalmistetulla 4-norm. HCl:n THF-liuoksella 30 minuutin ajan. Liuotin ja ylimääräinen happo haihdutettiin pois (30°C) ja jäännös haihdutettiin uudelleen kahdesti kuiviin THF:a käyttäen. Jällelle jäänyt jäännös muuttui kiinteäksi käsiteltäessä eetterin kanssa. Suola HCl.H-Lys(Z)-Lys(Z)-OH koottiin talteen suodattamalla ja pestiin useaan kertaan eetterillä, jolloin saatiin 6,7 g valkeata jauhetta. Se liuotettiin DMF:iin (70 ml), jäähdytettiin jäähauteessa ja sen jälkeen käsiteltiin trietyyliamiinin (1,63 ml) kanssa ja sen jälkeen yhdisteen Boc-Glu(OBzl)-OSu (5,4 g, 12,76 mmoolia) kanssa. Seosta sekoitettiin 0°C:ssa tunnin ajan ja sitten 25°C:ssa 24 tuntia. Tämän ajan kuluessa lisättiin vielä trietyyliamiinia reaktioseoksen pH:n pitämiseksi suunnilleen arvossa 7,5. Reaktioseoksen tekemiseksi happameksi (pH 3,5) lisättiin muutama millilitra etikkahappoa ja liuotin poistettiin haihduttamalla kuiviin. Muodostunut jäännös liuotettiin EtOAc:iin, pestiin vedellä (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin tuote alkoi muuttua kiinteäksi. Sitä trituroitiin eetterissä ja kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista.

Saanto: 7,26 g (69,5 %) yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH; sp. 153-155°C; $[\alpha]_D^{25} = -2,71^\circ$ (c = 1, THF).

g) Yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (1,7 g, 1,16 mmoolia) käsiteltiin TFA:n kanssa (24 ml) 30 minuutin ajan. Kun ylimääräinen happo oli haihdutettu pois (30°C) jäännöstä trituroitiin eetterin kanssa. Saatu jauhe pestiin perus-

teellisesti eetterillä ja petrolieetterillä ja kuivattiin NaOH:n päällä vakuumissa, jolloin saatiin oktapeptidin trifluoriasetaatti-suolaa (1,71 g). Aktiivista esterä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OSu muodostettiin sitten in situ sekoittamalla yhdisteitä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH (0,998 g, 1,16 mmoolia), HOSu (0,16 g, 1,4 mmoolia) ja DCC (0,274 g, 1,33 mmoolia) 15 ml:ssa dimetyyliformamidia 0°C:ssa 3 tunnin ajan. Tähän liuokseen, jossa oli tripeptidin aktiivista esterä, lisättiin oktapeptidisuolaa $\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{H-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl}$ (1,71 g) yhdessä 0,2 ml:n kanssa trietyyliamiinia. Lisättiin vielä muutama tippa trietyyliamiinia ja dimetyyliformamidia (15 ml) ja seosta sekoitettiin 3 päivää 25°C:ssa. Muodostui gelatinoitunutta puolikiinteätä ainetta. Se tehtiin happameksi etikkahapolla ja käsiteltiin veden kanssa. Valkea kiinteä sakka koottiin talteen ja pestiin (H_2O , MeOH, eetteri), jolloin saatiin 2,25 g raakatuotetta, joka sulii 310-313°C:ssa. Se liuotettiin dimetyyliformamidiin ja saostettiin MeOH:lla. Saanto: 1,75 g (68,3 %) yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. 314-16°C; $[\alpha]_D^{25} = 13,68^\circ$ ($c = 1$, DMSO); levykromatograafisesti homogeenista.

Yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (0,5 g, 0,226 mmoolia) liuotettiin 2 ml:aan trifluori-etikkahappoa ja sekoitettiin 15 ml:n kanssa fluorivetyä 0°C:ssa 15 minuutin ajan. Kun ylimääräinen happo oli haihdutettu pois (0°C:ssa), jäännös liuotettiin 5-prosenttiseen etikkahapon vesiliuokseen, pestiin eetterillä (3 x), haihdutettiin pienempään tilavuuteen ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 0,34 g raakatuotetta. Se kromatografioitiin ioninvaihtokolonissa kuten edellä oktapeptidin osalta on selostettu, jolloin saatiin 0,13 g (42,1 %) puhdasta yhdistettä Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Ala-Glu-Asn; $[\alpha]_D^{25} = -85,65^\circ$ ($c = 1$, H_2O).

h) Yhdisteitä Boc-Leu-OSu (4,0 g, 12,2 mmoolia) kondensoitiin dimetyyliformamidissa (75 ml) 48 tuntia trietyyliamiinin (1,7 ml) läsnäollessa. Reaktioseoksen pH pidettiin arvossa 7,5 lisäämällä kuten tavallista ajoittain trietyyliamiinia. Jäljelle jäänyt liukenematon aine suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin. Muodostunut vaahtomainen, lasimainen aine liuotettiin eetteriin (200 ml) ja seosta käsiteltiin 3 ml:n kanssa disykloheksyyliamiinia, jolloin saatiin kiteistä ainetta, joka koottiin talteen,

pestiin eetterillä ja kiteytettiin uudelleen MeOH:sta ja eetteristä. Saanto: 5,7 g (69,5 %) yhdistettä Boc-Leu-Lys(Z)-OH.DCHA; sp. 140-142°C; $[\alpha]_D^{25} = -7,20^\circ$ (c = 1, MeOH).

Boc-Leu-Lys(Z)-OH.DCHA (2,97 g, 4,4 mmoolia) muutettiin vapaaksi hapoksi (jaettu etyyliasetaattiin ja 0,1-norm. H₂SO₄:ään liukeneviin osiin) ja saatua väritöntä öljyä (2,2 g) käsiteltiin 4n HCl:n tetrahydrofuraaniliuoksen kanssa (40 ml) 30 minuutin ajan. Ylimääräinen happo ja liuotin haihdutettiin pois (30°C) ja jäännöstä käsiteltiin eetterin kanssa. Jällelle jäänyt öljy liuotettiin eetteriin ja haihdutettiin vielä kahdesti tuoreen eetterin kanssa kuiviin. Jäännöstä sekoitettiin sitten Boc-Asp(OBzl)-OSu:n kanssa (1,85 g, 4,4 mmoolia) trietyyliamiinin (1,85 ml) läsnäollessa yön ajan. Sitten reaktioseos haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin öljymäistä jäännöstä, joka liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin vedellä (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin uudelleen. Näin saatu raakatuote kiteytettiin etyyliasetaatista ja petrolieetteristä ja saatiin 1,52 g (49,6 %) puhdasta yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OH; sp. 109-111°C; $[\alpha]_D^{25} = -16,14^\circ$ (c = 1, DMF).

Yhdistettä Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (1,2 g, 0,545 mmoolia) käsiteltiin 35 ml:n kanssa trifluorietikkahappoa 30 minuutin ajan. Ylimääräinen happo haihdutettiin nopeasti pois ja jäännöstä trituroitiin eetterin kanssa useaan kertaan, jolloin saatiin 1,2 g undekapeptidin trifluorietikkahapposuolaa valkeana jauheena. Se liuotettiin dimetyyliformamidin (5 ml) ja dimetyylisulfoksidin (2 ml) seokseen ja käsiteltiin yhdisteen Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OSu kanssa, jota oli muodostettu in situ sekoittamalla yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OH (0,381 g, 0,545 mmoolia) HOSu:n (0,126 g, 1,1 mmoolia) ja DCC:n (0,124 g, 0,599 mmoolia) kanssa 3 ml:ssa dimetyyliformamidia 0°C:ssa 3 tuntia. Seosta, jossa oli tripeptidin aktiivista esterä ja undekapeptidiä sekoitettiin 0°C:ssa 2 tuntia ja sitten 25°C:ssa 3 päivää, jona aikana lisättiin ajoittain, pH:n pitämiseksi lievästi emäksisenä, trietyyliamiinia. Muodostui gelatinoitunutta ainetta. Se trituroitiin 5-prosenttisen etikkahapon kanssa ja saatu valkea, kiinteä aine suodatettiin erilleen ja pestiin vedellä, MeOH:lla ja eetterillä, jolloin saatiin 1,28 g raakatuotetta, joka sulii 325-326°C:ssa. Saostettaessa uudelleen DMF/DMSO-seoksesta (10 ml/5 ml) ja MeOH:sta (230 ml)

saatiin 1,22 g (80,2 %) puhdasta yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; sp. 326-327°C; $[\alpha]_D^{25} = -15,71^\circ$ (c = 1, DMF/DMSO).

Tätä tuotetta (1,128 g, 0,404 mmoolia) sekoitettiin 7 ml:n kanssa anisolia ja käsiteltiin 25 ml:n kanssa kuivaa HF:ä 0°C:ssa 15 minuutin ajan. Ylimääräinen happo haihdutettiin pois (0°C) ja jällelle jäänyt jäännös jaettiin eetteriin ja veteen liukeneviin osiin. Vesikerros pestiin kahdesti eetterillä, haihdutettiin puoleen alkuperäisestä tilavuudesta ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 0,69 g raakatuotetta. Se kromatografioitiin edellä oktapeptidin osalta selostetulla tavalla. Eluoitu aine putkista 101-120 yhdistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 0,25 g tuotetta, jonka osoitettiin olevan lievästi vähäisten epäpuhtausmäärien likaamaa. Niin muodoin se kromatografioitiin uudelleen samassa kolonnissa, jolloin saatiin 0,155 g (22 %) puhdasta Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-yhdistettä. Paperielektroforeesi-analyysi osoitti sen olevan homogeenista. $[\alpha]_D^{25} = -86,27^\circ$ (c = 1, 0,1 norm. HCl).

B.a) Yhdistettä H-Ser(Bzl)-OH (18,6 g, 95,4 mmoolia) liuotettiin 45 ml:aan Triton B:tä, haihdutettiin kuiviin, ja jäännös haihdutettiin uudelleen kuiviin kahdesti dimetyyliformamidin kanssa (100 ml kummallakin kerralla). Jäännöstä sekoitettiin sitten AcOSu:n kanssa (16,9 g, 95,4 mmoolia) 150 ml:ssa dimetyyliformamidia 20 tuntia. Ajoittain lisättiin N-metyylimorfoliinia reaktio-seoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Liuotin poistettiin ja tuotteen uuttumista etyyliasetaattiin seurattiin pesemällä pienillä tilavuusmäärillä 10-prosenttista etikkahappoa ja H₂O:lla (tuote on vesiliukoista, vettä käytetään pienin tilavuusmäärin). Kuivaamalla Na₂SO₄:llä ja haihduttamalla jälleen kuiviin saatiin kirkasta öljyä (14,5 g, Ac-Ser(Bzl)-OH). Yhdiste ei kiteytynyt. Niin ollen se liuotettiin seokseen, jossa oli 300 ml MeOH:a ja 30 ml H₂O:ta, titrattiin pH-arvoon 7,0 20-prosenttisella Cs₂CO₃:lla ja haihdutettiin kiinteäksi massaksi. Suola haihdutettiin uudelleen kuiviin vielä kahdesti dimetyyliformamidin kanssa ja sekoitettiin bentsyylibromidin kanssa (15,4 g, 91 mmoolia) 250 ml:ssa dimetyyli-formamidia 18 tunnin ajan. Liuottimen haihduttamisen jälkeen jäännös liuotettiin H₂O:hon (600 ml) ja muodostunut öljymäinen tuote

uutettiin etyyliasetaatettiin. Se pestiin H_2O :lla, kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin siirapiksi, joka siemenkiteiden ympärimisen jälkeen kiteytyi heti. Kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista ja petrolieetteristä, jolloin saatiin 10,42 g (kokonaisuus 32,2 %) yhdistettä $H_3C-CO-Ser(Bzl)-OBzl$; sp. 89-91°C.

Yhdistettä $H_3C-CO-Ser(Bzl)-OBzl$ (2,2 g, 6,73 mmoolia) liuotettiin 75 ml:aan etyylialkoholia ja sekoitettiin hiljaa yön ajan 5 ml:n kanssa yhdistettä H_2NNH_2 . Vähäinen määrä saostunutta liuonematonta ainetta suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka muuttui kiinteäksi käsiteltäessä eetterin kanssa. Tuote kiteytettiin uudelleen pienestä tilavuusmäärästä etanolia ja eetteriä, jolloin saatiin 1,40 g (82,8 %) yhdistettä $H_3C-CO-Ser(Bzl)-HNNH_2$; sp. 128-130°C; $[\alpha]_D^{25} = +5,80^\circ$ (c = 1, MeOH).

b) L-alaniiniä (3,57 g, 40 mmoolia), haihdutettiin kuiviin, ja öljymäinen jäännös haihdutettiin uudelleen kuiviin kahdesti dimetyyliformamidin kanssa (kummallakin kerralla 30 ml DMF). Saatua suolaa sekoitettiin 11,45 g:n kanssa yhdistettä Boc-Ala-OSu (40 mmoolia) 40 ml:ssa dimetyyliformamidia, johon oli lisätty 4 ml N-metyyli-morfoliinia, 20 tuntia. Liuotin poistettiin ja jäännös liuotettiin 10-prosenttiseen etikkahappoon (100 ml). Tuote uutettiin etyyliasetaatettiin (4 x 100 ml), pestiin kahdesti pienellä tilavuusmäärällä H_2O :ta, kuivattiin Na_2SO_4 :lla, haihdutettiin pienitilavuiseksi, ja käsiteltiin petrolieetterin kanssa kunnes ilmaantui samentumista. Varastoitaessa yön ajan jääkaapissa muodostui kiteistä tuotetta. Saanto: 8,2 g (76,3 %) yhdistettä Boc-Ala-Ala-OH; sp. 115-118°C.

Yhdistettä Boc-Ala-Ala-OH (36,2 g, 139 mmoolia) käsiteltiin 3 litran kanssa 4-norm. HCl:n tetrahydrofuraaniliuosta 30 minuutin ajan. Haihduttamalla kuiviin ja käsittelemällä edelleen tavalliseen tapaan saatiin öljymäistä massaa, joka muuttui kiinteäksi eetterin kanssa käsiteltäessä. Tuote kiteytettiin uudelleen metanolista eetterillä, jolloin saatiin 9,1 g (33,3 %) yhdistettä HCl.H-Ala-Ala-OH; sp. 209-211°C.

HCl.H-Ala-Ala-OH (2,36 g, 12 mmoolia) liuotettiin 20 ml:aan dimetyyliformamidia, jäähdytettiin jäähauteessa, ja käsiteltiin 1,68 ml:n kanssa trietyyliamiinia (12 mmoolia) ja sen jälkeen Boc-Asp(OBzl)-OSu:n (12 mmoolia) kanssa. Seosta sekoitettiin hiljaa 0°C:ssa 2 tuntia ja sitten 25°C:ssa yön ajan, jona aikana lisättiin vielä yksi ekvivalentti trietyyliamiinia (12 mmoolia) pienin erin

pitämällä reaktioseoksen pH lähellä arvoa 8,0. Lisättiin muutama ml etikkahappoa ja happameksi tehty seos haihdutettiin kuiviin. Muodostunut tuote uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin H_2O :lla (3 kertaa), kuivattiin Na_2SO_4 :lla, ja haihdutettiin öljymäiseksi jäännökseksi (6 g). Se liuotettiin etyyliasetaattiin ja titrattiin pH-arvoon 8,0 disykloheksyyliamiinilla. Saostui kiteistä suolaa ja tämä kiteytettiin uudelleen isopropanolista ja petrolieetteristä, jolloin saatiin 5,1 g (65,7 %) yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH.DCHA; sp. 138-141 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25} = -13,33^{\circ}$ (c = 1, MeOH).

Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH.DCHA (3,5 g, 5,4 mmoolia) jaettiin 500 ml:aan etyyliasetaattia ja 350 ml:aan vettä, jossa oli 10 ml 10-prosenttista H_2SO_4 :a, liukeneviin osiin. Vesikerros uutettiin vielä kerran etyyliasetaatilla (250 ml) ja yhdistetty etyyliasetaattikerros pestiin kahdesti H_2O :lla, kuivattiin Na_2SO_4 :lla, ja haihdutettiin kuiviin, jolloin jällelle jäi lasimaista kiinteätä ainetta, yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH (2,5 g). Tätä ainetta käsiteltiin 200 ml:lla vastavalmistettua 4n HCl:n tetrahydrofuraaniliuosta 30 minuutin ajan. haihdutettiin 32 $^{\circ}$ C:ssa siirapiksi, ja haihdutettiin uudelleen kuiviin kahdesti THF:n kanssa. Öljymäinen jäännös muuttui kiinteäksi eetterin kanssa käsiteltäessä. Tätä yhdistettä HCl.H-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH (1,93 g, 4,83 mmoolia) käytettiin sitten seuraavassa reaktiossa, johon sisältyi atsidin kytkentä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-N}_3$:n kanssa, jota oli valmistettu 1,24 grammasta yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-HNNH}_2$ (4,9 mmoolia) 25 ml:ssa dimetyyli-formamidia (-25 $^{\circ}$ C) 7,42 ml:n kanssa 3,3-norm. HCl:n THF-liuosta (24,5 mmoolia) ja 0,99 ml:n kanssa i-amyylinitriittiä (7,35 mmoolia), jota oli sekoitettu -30 $^{\circ}$ C:ssa 30 minuuttia. Valmistettu atsidiliuos jäähdytettiin -35 $^{\circ}$ C:seen, sekoitettiin 4,1 ml:n kanssa trietyyliamiinia ja sen jälkeen seosta käsiteltiin edellä valmistetulla, valkeana jauheena olevalla yhdisteellä HCl.H-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH (1,93 g). Seosta sekoitettiin -20 $^{\circ}$ C:ssa 30 minuuttia ja sitten 4 $^{\circ}$ C:ssa 2 päivää. Reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä lisättiin hiukan trietyyliamiinia. Tavalliseen tapaan jatkokäsittelmällä saatiin kiteistä massaa, joka kiteytettiin uudelleen THF:sta ja petrolieetteristä, jolloin saatiin 1,85 g (65,6 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH}$; sp. 167-170 $^{\circ}$ C; $[\alpha]_D^{25} = -18,91^{\circ}$ (C = 1, DMSO).

$\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH}$ (0,825 g, 1,41 mmoolia) liuotettiin 4 ml:aan dimetyyliformamidia ja jäähdytettiin 0°C :seen jäähauteessa. Liuokseen lisättiin yhdistettä H_2NNH_2 (54,3 mg, 1,69 mmoolia) ja sen jälkeen yhdisteitä $\text{HOBT.H}_2\text{O}$ (0,475 g, 3,10 mmoolia) ja DCC (0,32 g, 1,55 mmoolia). Seoksen pH säädettiin arvoon 7,5 N-metyylimorfoliinilla ja sekoitettiin 2 tuntia 0°C :ssa ja sen jälkeen 17 tuntia 25°C :ssa. Reaktioseos muuttui tänä aikana geeliksi. Laimennettiin MeOH:lla ja järeille jäänyt kiinteä aine otettiin talteen suodattamalla imua käyttäen ja pestiin perusteellisesti MeOH:lla, eetterillä ja petrolieetterillä, jolloin saatiin ainetta, joka sulii $229-232^\circ\text{C}$:ssa. Tuote saostettiin sitten dimetyyliformamidista ja MeOH:sta, jolloin saatiin 0,51 g (61,0 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-HNNH}_2$; sp. $230-232^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -17,94^\circ$ ($c = 1$, DMSO).

c) Yhdisteitä H-Glu(OBzl)-OH (39,4 g, 166 mmoolia) ja Boc-Ser(Bzl)-OSu (65,0 g, 166 mmoolia) sekoitettiin keskenään 900 ml:ssa dimetyyliformamidia yön ajan trietyyliamiinin (2,3 ml, 165 mmoolia) läsnäollessa. Tänä aikana lisättiin vielä trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Kirkas liuos haihdutettiin kuiviin ja öljymäinen jäännös jaettiin etyyliasetaattiin (1,5 litraa) ja 5-prosenttiseen etikkahappoon (2 litraa) liukeneviin osiin. Orgaaninen kerros pestiin H_2O :lla (2 kertaa), kuivatettiin Na_2SO_4 :lla, ja konsentroitiin kirkkaaksi öljyksi (90,0 g), joka liuotettiin 3 litraan eetteriä ja käsiteltiin 25 ml:n kanssa sykloheksyyliamiinia. Muodostunut kiinteä aine kiteytettiin uudelleen MeOH:sta ja eetteristä. Saanto: 76,2 g (74,8 %) yhdistettä $\text{Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH.CHA}$; sp. $154-156,5^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = +6,32^\circ$ ($c = 1$, MeOH).

$\text{Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH.CHA}$ (76,2 g, 124 mmoolia) suspendoitiin seokseen, jossa oli 1,5 litraa H_2O :ta ja 1,5 litraa etyyliasetaatia. Tähän seokseen lisättiin 10-prosenttista H_2SO_4 :a kunnes se tuli happameksi (pH noin 2,5) ja kiinteä aine liukeni. Vaapaata dipeptidihappoa sisältävä orgaaninen kerros pestiin H_2O :lla (2 kertaa), kuivatettiin, ja haihdutettiin kuiviin, jolloin järeille jäi kirkasta öljyä (68,5 g). Sitä käsiteltiin 3 litralla vastavalmistettua 4,1-normaalista HCl :n THF-liuosta 45 minuutin ajan ja haihdutettiin öljymäiseksi jäännökseksi, joka haihdutettiin uudelleen kuiviin vielä kaksi kertaa THF:n kanssa. Jäännös (HCl.H-Ser

(Bzl)-Glu(OBzl)-OH) liuotettiin dimetyyliformamidiin (500 ml), jäädytettiin 0°C:seen, ja käsiteltiin Boc-Ser(Bzl)-OSu:n (48,66 g, 124 mmoolia) kanssa, ja heti sen jälkeen 27 ml:n kanssa trietyyliamiinia. Seosta sekoitettiin yön ajan 25°C:ssa, jona aikana lisättiin tarvittaessa trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Vähäinen määrä liukenematonta ainesta poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin 5-prosenttisella etikkahapolla ja H₂O:lla, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin jälleen kuiviin. Tuote kiteytettiin etyyliasetaatista petrolieetterillä. Saanto: 71,8 g (83,7 %) yhdistettä Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; sp. 112-113°C; $[\alpha]_D^{25} = +17,91^\circ$ (c = 1, THF).

Yhdistettä Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (71,6 g, 104 mmoolia) käsiteltiin 2,7 litran kanssa vastavalmistettua 3,9-norm. HCl:n THF-liuosta 45 minuutin ajan. Seos haihdutettiin kuiviin ja jäännös haihdutettiin vielä kaksi kertaa kuiviin THF:n kanssa, jolloin saatiin kiinteätä massaa (59,3 g, sp. 161-165°C). Se koottiin talteen ja pestiin eetterillä ja sekoitettiin 500 ml:ssa dimetyyliformamidia yhdisteen Boc-Thr(Bzl)-OSu (38,2 g, 94 mmoolia) kanssa trietyyliamiinin läsnäollessa (25 ml) 0°C:ssa tunnin ajan ja sitten 25°C:ssa 15 tuntia. Tämän ajan kuluessa lisättiin useana eränä trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Vähäinen liukenematon aines suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka liuotettiin etyyliasetaattiin (1,5 litraa), pestiin 5-prosenttisella etikkahapolla, H₂O:lla (2 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kiinteäksi massaksi. Tuote kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista ja petrolieetteristä, jolloin saatiin 64,8 g (78,1 %) yhdistettä Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; sp. 115-118°C; $[\alpha]_D^{25} = +11,64^\circ$ (c = 1, DMSO).

Yhdistettä Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (54,5 g, 61,7 mmoolia) käsiteltiin HCl:n kanssa THF:ssa (1,5 litraa, 4,1-norm.) ja jatkokäsittely tapahtui tavalliseen tapaan, jolloin saatiin yhdistettä HCl.H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; (46,3 g, 56,6 mmoolia) valkeana jauheena. Sen jälkeen sitä sekoitettiin DMF:ssa (500 ml) yhdisteen Boc-Asp(OBzl)-OSu (23,7 g, 56 mmoolia) kanssa 0°C:ssa 2 tuntia trietyyliamiinin läsnäollessa

(16 ml). Seosta sekoitettiin edelleen 25°C:ssa 15 tuntia, jona aikana lisättiin vielä 7,4 ml trietyyliamiinia. Tuotetta käsiteltiin edelleen tavalliseen tapaan ja kiteytettiin CH₂Cl₂:sta ja petrolieetteristä. Saanto: 50,35 g (82,7 %) yhdistettä Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; sp. 111-113°C; $[\alpha]_D^{25} = +7,21$ (c = 1, DMSO).

Yhdisteestä Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (50,0 g, 46 mmoolia) poistettiin suojaryhmät HCl:lla (4,15-norm.) THF:ssa ja jatkokäsittelyssä tavalliseen tapaan saatiin 45,4 g valkeata kiinteätä ainetta. Se liuotettiin THF:iin (1,5 litraan) ja käsiteltiin eetterin (7 litraa) kanssa. Varastoidessa 0°C:ssa yön ajan saatiin valkeata kiinteätä jauhetta (44,0 g, sp. 179-184°C). Osa tästä aineesta, yhdisteestä HCl.H-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (43,7 g, 42,7 mmoolia) liuotettiin sitten 500 ml:aan dimetyyliformamidia, jäähdytettiin 0°C:een ja käsiteltiin Boc-Val-OSu:n (15,4 g, 49 mmoolia) ja trietyyliamiinin (10 ml) kanssa. Seosta sekoitettiin 15 tuntia, jona aikana lisättiin vielä useana eränä trietyyliamiinia (7,9 ml) reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Liukenematon aines poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin. Öljymäinen jäännös liuotettiin CH₂Cl₂:iin, pestiin 5-prosenttisella etikkahapolla, H₂O:lla, kuivattiin Na₂SO₄:lla, ja haihdutettiin pienempään tilavuuteen (0,5 litraksi), minkä jälkeen sitä käsiteltiin petrolieetterin kanssa. Tuote kiteytyi hitaasti liuoksen ollessa paikoillaan yön ajan. Se kiteytettiin uudelleen THF:sta ja isopropanolista, jolloin saatiin 26,3 g (51,4 %) yhdistettä Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; sp. 174-177°C; $[\alpha]_D^{25} = +0,84^\circ$ (c = 1, THF).

Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (13,0 g; 10,94 mmoolia) liuotettiin dimetyyliformamidiin (50 ml), jäähdytettiin 0°C:een, ja käsiteltiin H₂NNH₂:n (0,421 g; 13,14 mmoolia), HOBT:n (3,688 g; 24,1 mmoolia), ja DCC:n (2,48 g; 12,04 mmoolia) kanssa. Sen jälkeen lisättiin N-metyylimorfoliinia kunnes reaktioseoksen pH oli 7,5. Seosta sekoitettiin 18 tuntia ja suodatettiin ja jäännöstä käsiteltiin H₂O:n kanssa. Muodostunut kiinteä aine koottiin talteen ja kiteytettiin DMF:sta ja isopropanolista,

jolloin saatiin 8,7 g (66,4 %) yhdistettä Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH₂; sp. 215-218°C; $[\alpha]_D^{25} = +7,62^\circ$ (c = 1, DMSO).

d) Yhdistettä Boc-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (14,0 g, 24,5 mmoolia) käsiteltiin 500 ml:n kanssa 4,0-norm. HCl:n THF-liuosta 30 minuutin ajan haihdutettiin kuiviin, ja haihdutettiin uudelleen kahdesti kuiviin tuoreesta THF:sta. Öljymäinen jäännös muuttui kiinteäksi käsiteltäessä eetterin kanssa. Kuivattu dipeptidi-hydrokloridisuolajauhe (11,4 g, 21,6 mmoolia) liuotettiin sitten 140 ml:aan dimetyyli-formamidia, jäähdytettiin 0°C:seen, ja käsiteltiin yhdisteen Boc-Thr(Bzl)-OSu (8,8 g, 21,6 mmoolia) kanssa ja sen jälkeen 3,5 ml:n kanssa trietyyliamiinia. Sekoitettaessa seosta edelleen 24 tuntia 25°C:ssa lisättiin muutama tippa trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Se tehtiin happameksi 5 ml:lla etikkahappoa ja sitten laimennettiin suurella tilavuusmäärällä vettä. Saostunut kiinteä raakatuote koottiin talteen, liuotettiin etyyliasetaat-tiin, pestiin H₂O:lla, kuivattiin Na₂SO₄:lla, ja haihdutettiin kuiviin, jolloin jällelle jäi lasimaista kiinteätä massaa. Kiteyttämäl-lä etyyliasetaatista ja petrolieetteristä saatiin 13,8 g (83,7 %) yhdistettä Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; sp. 110-112°C; $[\alpha]_D^{25} = +19,45^\circ$ (c = 1, etyyliasetatti).

Yhdistettä Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (41,5 g, 54 mmoolia) käsiteltiin 500 ml:n kanssa vastavalmistettua 3,55-norm.HCl:n THF-liuosta 25 minuutin ajan ja haihdutettiin siirapiksi, joka haihdutettiin uudelleen kuiviin kaksi kertaa tuoreesta THF:sta. Öljymäinen jäännös muuttui kiinteäksi käsiteltäessä eetterin kanssa. Se koottiin talteen ja pestiin eetterillä, jolloin saatiin 37,4 g raakaa tripeptidin hydrokloridisuolaa, joka liuotettiin 500 ml:aan dimetyyli-formamidia, jäähdytettiin 0°C:seen, ja käsiteltiin Boc-Ile-OSu:n (17,4 g; 53 mmoolia) kanssa, ja sen jälkeen 16 ml:n kanssa trietyyliamiinia. Seosta sekoitettiin 25°C:ssa yön ajan, jona aikana lisättiin pienin erin trietyyliamiinia (yhteensä 6,2 ml) reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Saatu seos suodattettiin ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka uutettiin etyyliasetaat-tiin, pestiin 5-prosenttisella etikkahapolla, H₂O:lla, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin keller-tävää öljyä. Se kiteytettiin etyyliasetaatista ja petrolieetteristä. Näin saadussa ra'assa kiinteässä aineessa (39,6 g, sp. 140-142°C) todettiin olevan useita vähäisempiä epäpuhtauksia. Aine kromato-grafioitiin sitten silikageelikolonissa (70-230 mesh, 4,7 x 67 cm)

käyttämällä eluointiaineena seosta $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (tilsuhde 95:5). Haluttua tuotetta sisältävät fraktiot (analysoitu levykromatograafisesti) yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin öljymäistä tuotetta, joka kiteytettiin CHCl_3 :sta ja petrolieetteristä. Saanto: 19,1 g (41,2 %) yhdistettä Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; sp. 144-146°C; $[\alpha]_D^{25} = +2,40^\circ$ (c = 1, CHCl_3).

Yhdistettä Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,439 g, 0,496 mmoolia) käsiteltiin 4-norm.HCl:n THF-liuoksen kanssa 30 minuuttia ja jatkokäsittely tapahtui tavalliseen tapaan, jolloin saatiin 0,39 g yhdistettä HCl.H-Ile-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH. Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH₂ (0,59 g, 0,492 mmoolia) liuotettiin sitten 6 ml:aan dimetyyliformamidia, jäähdytettiin -25°C:seen, ja käsiteltiin 0,57 ml:n kanssa 4,3-norm. HCl:n THF-liuosta (2,46 mmoolia), ja heti sen jälkeen 0,1 ml:n kanssa i-amyylinitriittiä (0,74 mmoolia). Kun seosta oli sekoitettu -20°C - -25°C:ssa 30 minuuttia, lämpötila alennettiin -35°C:seen lisättäessä 0,42 ml trietyyliamiinia ja yhdistettä HCl.H-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,39 g, valmistettu edellä). Seosta sekoitettiin -20°C:ssa 30 minuuttia ja sitten 4°C:ssa 48 tuntia, jona aikana lisättiin aika ajoin trietyyliamiinia pH:n pitämiseksi noin arvossa 7,5. Seos laimennettiin sitten 250 ml:lla 5-prosenttista etikkahappoa ja muodostunut kiinteä tuote koottiin yhteen ja pestiin H₂O:lla, MeOH:lla, eetterillä, ja kuivattiin NaOH-rakeiden päällä vakuumissa, jolloin saatiin 0,82 g raakaa ainetta (sp. 244-254°C). Se liuotettiin DMSO:iin ja saostettiin lisäämällä MeOH:a. Saanto: 0,698 g (81,7 %) yhdistettä Boc-Val-Asp(Bzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; sp. 268-271°C.

Yhdiste H₃C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-HNNH₂ (0,408 g, 0,68 mmoolia), suspendoituna 10 ml:aan dimetyyliformamidia, jäähdytettiin -20°C:seen ja käsiteltiin vastavalmistetulla 5,43-norm. HCl:n THF-liuoksella (0,627 ml, 3,4 mmoolia) ja sen jälkeen 10-prosenttisella i-amyylinitriitin DMF-liuoksella (1,39 ml, 1,03 mmoolia). Kun seosta oli sekoitettu 30 minuuttia, se jäähdytettiin -30°C:seen lisättäessä trietyyliamiinia (0,476 ml, 3,4 mmoolia) ja sen jälkeen dekaeptidin H-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH TFA-suolaa (1,334 g, 0,68 mmoolia).

Seosta sekoitettiin -20°C :ssa 30 minuuttia ja sitten 4°C :ssa 5 päivää, jona aikana lisättiin enemmän trietyyliamiinia ja dimetyylisulfoksidia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä ja geelin muodostumisen estämiseksi. Reaktioseos kaadettiin 5-prosenttiseen etikkahappoon (300 ml) ja muodostunut kiinteä sakka koottiin yhteen, pestiin H_2O :lla, MeOH :lla, eetterillä, ja kuivattiin, jolloin saatiin 1,49 g ainetta, joka sulii $296-299^{\circ}\text{C}$:ssa. Tuote saostettiin uudelleen DMSO:sta MeOH :lla. Saanto: 1,40 g (85,37 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C}-\text{Co}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Ile}-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{OH}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6,37^{\circ}$ ($c = 1$, DMSO).

Saatua tetradekapeptidiä (1,35 g, 0,558 mmoolia) sekoitettiin yhdisteen $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,188 g, 1,23 mmoolia) kanssa muutama minuutin ajan seoksessa, jossa oli 15 ml DMF:a ja 15 ml DMSO:a. Seosta jäähdytettiin sitten jäähauteessa lisättäessä DCC:tä (0,126 g, 0,614 mmoolia) ja sekoittamista jatkettiin 24 tuntia samassa lämpötilassa. Yhdistettä $\text{Boc}-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Leu}-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Val}-\text{Val}-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Ala}-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Asn}-\text{OBzl}$ (4,0 g, 1,43 mmoolia) käsiteltiin erillisessä pullossa 40 ml:n kanssa trifluorietikkahappoa 25 minuutin ajan ja muodostuneen tetradekapeptidin TFA-suola saostui nopeasti lisättäessä tilavuudeltaan suuri määrä eetteriä. Muodostunut kiinteä aine koottiin talteen ja pestiin perusteellisesti eetterillä, jolloin saatiin 3,74 g valkeata jauhetta (C-päätteisen tetradekapeptidin TFA-suolaa). Osa tästä aineesta (1,567 g, 0,5583 mmoolia) lisättiin aktiivisen esterin joukkoon, jota oli saatu edellä esitetyllä tavalla amino-päätteisestä tetrapeptidistä DMF/DMSO-seoksessa. Reaktioseoksen pH:n saattamiseksi välille 7,5-8,0 lisättiin muutama pisara N-metyylimorfoliinia, ja sekoittamista jatkettiin tunnin ajan 0°C :ssa ja sitten 5 päivää 25°C :ssa. Sen jälkeen reaktioseos kaadettiin 1,5 litraan 5-prosenttista etikkahappoa. Saostunut tuote pestiin perusteellisesti H_2O :lla, MeOH :lla, DMF:lla, MeOH :lla ja eetterillä, jolloin saatiin 2,21 g haluttua tuotetta, yhdistettä $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Ile}-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Leu}-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Glu}(\text{OBz.})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Val}-\text{Val}-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Ala}-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Asn}-\text{OBzl}$, joka sulii 300°C :n yläpuolella.

Suojattua oktakosapeptidiä (2,21 g, 0,435 mmoolia) liuotettiin 8 ml:aan trifluorietikkahappoa, sekoitettiin 4 ml:n kanssa anisolia ja sekoitettiin vedettömän HF:n kanssa 0°C:ssa 30 minuuttia. Hapot poistettiin 0°C:ssa (vakuumitislauus) ja järeille jäänyt kiinteä jäännös liuotettiin 200 ml:aan H₂O:ta, pestiin kahdesti eetterillä, haihdutettiin puoleen tilavuudesta ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 1,1 g raakatuotetta. Se puhdistettiin laskemalla Sephadex® G-10 kolonnin läpi (3 x 80 cm; 0,2-mol.etikkahappo) ja sitten DEAE-Sephades® -kolonnin läpi (3 x 75 cm) eluoimalla (koncentraatiota lisäten) ammoniumasetatiliuoksilla (pH 7,0, 0,025-mol., 0,25-mol.) ja sen jälkeen laimealla etikkahapolla. Haluttua ainetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 0,281 g yhdistettä H₃C-CO-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn /tymosiini α_1 / amorfisena valkeana jauheena.

Akryyliamidi-geelillä isoelektrisesti fokusoitaessa synteettinen aine migraa identtisesti luonnon tymosiini α_1 :n kanssa, jota on eristetty naudan kateenkorvarauhasesta (Proc.Natl.Acad.Sci.(USA), 74, 725 (1977)).

Esimerkki 2

Boc-Ala-Ala-OH (7,23 g, 27,9 mmoolia) liuotettiin seokseen, jossa oli 200 ml MeOH:ta ja 20 ml H₂O:ta. Lisättiin Cs₂CO₃-liuosta (20-prosenttista vesiliuosta) kunnes pH oli saavuttanut arvon 7,0 (noin 30 ml) ja syntynyt neutraali liuos haihdutettiin kuiviin. Jäännös haihdutettiin uudelleen kuiviin kahdesti DMF:n kanssa (150 ml) ja järeille jäänyttä geelimäistä kiinteätä ainetta sekoitettiin 120 ml:ssa dimetyyliformamidia bentsyylibromidin (7,2 g, 42 mmoolia) kanssa 15 tuntia. Sen jälkeen liuotin poistettiin haihduttamalla ja jäännöstä käsiteltiin 500 ml:n kanssa vettä. Tuote saostui öljynä, joka muuttui asteettain varastoinnin aikana kiinteäksi. Se liuotettiin etyyliasetaattiin (400 ml), pestiin H₂O:lla (3 x), kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin siirapiksi, joka petrolieetterin kanssa käsiteltäessä alkoi kiteytyä. Tuote kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista ja petrolieetteristä, jolloin saatiin 7,2 g (73,8 %) yhdistettä Boc-Ala-Ala-OBzl; sp. 71-73°C.

Yhdistettä Boc-Ala-Ala-OBzl (6,0 g, 17,15 mmoolia) käsiteltiin 380 ml:n kanssa vastavalmistettua 4-norm. HCl:n THF-liuosta 30

minuutin ajan. Ylimääräinen happo ja liuotin haihdutettiin pois ja jällelle jäänyt siirappi haihdutettiin uudelleen kuiviin kahdesti tuoreen THF:n kanssa. Jäännös kiteytyi heti eetterin kanssa käsiteltäessä. Se kiteytettiin uudelleen MeOH:sta ja eetteristä, jolloin saatiin 4,30 g (76,4 %) yhdistettä HCl.H-Ala-Ala-OBzl; $[\alpha]_D^{25} = -38,86^\circ$ (c = 1, MeOH).

HCl.H-Ala-Ala-OBz. (4,25 g, 14,83 mmoolia) liuotettiin dimetyyliformamidiin (60 ml), jäähdytettiin 0°C :seen, ja sekoitettiin yhdisteiden Boc-Asn-OH (3,45 g, 14,83 mmoolia), HOBT (4,02 g, 28,6 mmoolia), NMM (2 ml) ja DCC (3,37 g, 16,35 mmoolia) kanssa 0°C :ssa 2 tuntia ja sitten 25°C :ssa 20 tuntia. Aika ajoin lisättiin vielä N-metyylimorfoliinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä. Muodostuneet liukenemattomat sivutuotteet suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin. Öljymäinen jäännös muuttui heti kiinteäksi veden kanssa käsiteltäessä. Se liuotettiin etyyliasetaatattiin, pestiin H_2O :lla (3 x), kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin pienempään tilavuuteen, jolloin tuote alkoi kiteytyä. Lisättiin tilavuudeltaan saman suuruinen määrä petroli-eetteriä ja seoksen annettiin olla paikoillaan yön ajan. Raakatuote kiteytettiin uudelleen THF:sta ja petroli-eetteristä, jolloin saatiin 5,2 g (75,6 %) yhdistettä Boc-Asn-Ala-Ala-OBzl; sp. 153-155 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -55,61^\circ$ (c = 1, MeOH).

Yhdistettä Boc-Asn-Ala-Ala-OBzl (2,2 g, 4,75 mmoolia) käsiteltiin 220 ml:n kanssa 4,0-norm. HCl:n THF-liuosta 30 minuutin ajan. Ylimääräinen happo ja liuotin haihdutettiin pois ja jäännös haihdutettiin uudelleen kaksi kertaa kuiviin tuoreen THF:n kanssa. Öljymäinen tuote muuttui kiinteäksi eetterin kanssa käsiteltäessä. Sitä trituroitiin lisätyn tuoreen eetterin kanssa ja koottiin talteen, jolloin saatiin valkeata jauhetta (1,85 g). Näin saatu hydrokloridisuola liuotettiin 40 ml:aan dimetyyliformamidia ja jäähdytettiin 0°C :seen, jolloin lisättiin yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser-Ser(Bzl)-OH}$.DCHA (1,97 g, 4,75 mmoolia). Kun seosta oli sekoitettu 0°C :ssa 30 minuuttia, havaittiin DCHA.HCl:n saostumista ja lisättiin yhdistettä HOBT (1,19 g) ja sen jälkeen DCC:tä (1,08 g, 5,23 mmoolia). Reaktioseoksen pH säädettiin sitten arvoon 7,5 muutamalla tipalla N-metyylimorfoliinia ja sekoitettiin 0°C :ssa 2 tuntia ja sitten 25°C :ssa yön ajan. Liukenematon sivutuote poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin lievästi värilliseksi kiinteäksi massaksi. Se pestiin perusteellisesti H_2O :lla ja etyyliasetaatilla, jolloin

saatiin ruskeankeltaista jauhetta, joka kiteytettiin DMF:sta (40 ml) ja isopropanolista (500 ml). Saanto 1,57 g (56,9 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-OBzl}$; sp. 213-215°C; $[\alpha]_D^{25} = -23,11^\circ$ (c = 1, DMSO).

Yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-OBzl}$ (1,57 g, 2,69 mmoolia) liuotettiin 20 ml:aan dimetyyliformamidia ja sekoitettiin 2 ml:n kanssa yhdistettä H_2NNH_2 18 tuntia. Muodostunut kiinteä tuote koottiin talteen ja pestiin perusteellisesti DMF:lla, EtOH:lla ja eetterillä, jolloin saatiin 1,22 g (89,6 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH}_2$; sp. 262-264°C; $[\alpha]_D^{25} = -26,7^\circ$ (c=1, DMSO).

Yhdistettä Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,698 g, 0,358 mmoolia) käsiteltiin 10 ml:n kanssa trifluorietikkahappoa 30 minuutin ajan ja peptidisuola saostettiin eetterillä. Se koottiin talteen suodattamalla imua käyttäen, pestiin eetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 0,652 g raaka-ainetta (0,333 mmoolia TFA-suolana). Yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH}_2$ (0,17 g, 0,335 mmoolia) suspendoitiin erillisessä pullossa 7 ml:aan dimetyyliformamidia ja käsiteltiin 0,27 ml:n kanssa 6,18-norm. HCl:n THF-liuosta -20°C:ssa. Seokseen lisättiin 0,68 ml 10-prosentista i-amyylinitriitin DMF-liuosta ja liuosta sekoitettiin samassa lämpötilassa 30 minuutin ajan. Lämpötila alennettiin -30°C:een, jolloin lisättiin 0,234 ml trietyyliamiinia (1,67 mmoolia) ja sen jälkeen edellä valmistettua dekapeptidin TFA-suolaa (0,652 g). Seos laimennettiin 3 ml:lla DMSO:a -20°C:ssa ja seoksen pH säädettiin lievästi emäksiseksi (pH 7,5) muutamalla pisaralla trietyyliamiinia. Seosta sekoitettiin -20°C:ssa 30 minuuttia ja sitten 4°C:ssa 5 päivää. Tänä aikana lisättiin vielä DMSO:a (5 ml) ja trietyyliamiinia reaktioseoksen pitämiseksi lievästi emäksisenä ja estämiseksi muuttumasta geelimäiseksi. Koko liuos kaadettiin sitten 5-prosenttiseen etikkahappoon (250 ml), jolloin saatiin valkeata sakkaa, joka koottiin talteen, pestiin H_2O :lla, MeOH:lla, eetterillä, ja kuivattiin. Raakatuote (0,702 g; sp. 290-291°C) saostettiin uudelleen DMSO:sta MeOH:lla. Saanto: 0,348 g (42,0 %) yhdistettä $\text{H}_3\text{C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr-}$

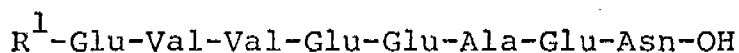
(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; sp. 296-298°C (haj.); $[\alpha]_D^{25} = +3,77^\circ$ (c = 1, DMSO).

Saatua tuotetta (0,866 g, 0,373 mmoolia) sekoitettiin yhdisteen HOBT.H₂O (0,126 g, 0,82 mmoolia) kanssa seoksessa, jossa oli DMSO:a (8 ml) ja DMF:a (6 ml) ja jäädytettiin jäähauteessa. Seosta käsiteltiin DCC:n kanssa (0,085 g, 0,411 mmoolia) ja sen jälkeen sekoitettiin 0°C:ssa 24 tuntia. Sen jälkeen sitä sekoitettiin esimerkissä 1B.d) esitetyllä tavalla valmistetun tetradekapeptidin TFA-suolan kanssa (1,05 g, 0,373 mmoolia) ja lisätyn 2 ml:n kanssa DMSO:a. pH:n säätämiseksi välille 7,5-8,0 lisättiin muutama tippa N-metyylimorfoliinia ja sekoittamista jatkettiin 0°C:ssa tunnin ajan ja sen jälkeen 25°C:ssa 5 päivää. Suorittamalla jatkokäsittely esimerkissä 1B.d) selostetulla tavalla saatiin 1,5775 g täysin suojattua oktakosapeptidiä H₃C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl.

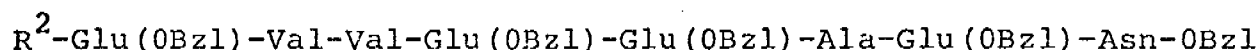
Täysin suojattua oktakosapeptidiä (1,57 g, 0,32 mmoolia) liuotettiin 10 ml:aan TFA:a, jossa oli 3 ml anisolia. Seosta sekoitettiin 45 ml:n kanssa HF:a 0°C:ssa 30 minuutin ajan ja jatkokäsittely suoritettiin sen jälkeen esimerkissä 1B.d) selostetulla tavalla. Puhdistamalla Sephadex[®] G-10- ja DEAE-Sephadex[®]-kolonneissa edellä selostetulla tavalla, saatiin 0,283 g yhdistettä H₃C-CO-Ser-Asn-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn $[(Asn^2)-tymosiini \alpha_1]$ valkeana amorfisena tuotteena. Yhdiste migrautui positiossa hieman vähemmän happamana kuin luonnon tymosiini α_1 akryyliamidi-geellillä isoelektrisesti fokusoitaessa rakenne-eroavuuden mukaisesti.

Patenttivaatimus

Menetelmä terapeuttisesti käytettävän, yleisen kaavan



mukaisen peptidin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolojen valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 on vety, H-Glu-Lys-Lys- tai H-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-, t u n n e t - t u siitä että, poistetaan suojaryhmät yleisen kaavan



mukaisesta suojatusta peptidistä, jossa kaavassa

R^2 on Boc, Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)- tai Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-,

Boc on tert-butylioksikarbonyyli,

Bzl on bentsyyli ja

Z on bentsyylioksikarbonyyli,

ja haluttaessa muutetaan saatu yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

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

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Goldstein et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977)
2: 725-729

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

Leena Antta

Allekirjoitus