

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 973338 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **973338**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C317/18
C07K 1/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **27.01.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.08.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.10.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **27.01.1996 PCT/KR1996/000012**
International ansökan - International
application

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

15.02.1995 RU 95102102

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Hyundai Pharm. Ind. Co. Ltd, 1110-2 Hwagok-dong, Gangseu-gu Soul 157-019, Republic of Korea, KOREAN TASAVALTA, (KR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Samukov, Vladimir Vasilyevich, Russian Federation, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

2 •Sabirov, Ayda Nadzhatovich, Russian Federation, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

3 •Pozdnyarkov, Pavel Ivanovich, Russian Federation, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

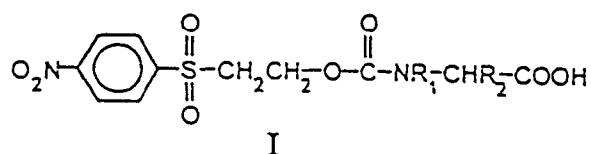
N2-2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliaminohappoja

N2-2-(4-nitrofenyylisulfonyl)etoxikarbonylaminosyror

N_{α} -2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliaminohappoja

Keksinnön tausta

Keksinnön ala koskee suojattuja aminohappojohdannaisia, jotka on tarkoitettu kiinteän faasin peptidisynteesiin, nimittäin N_{α} -2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliaminohappoja, joilla on yleinen kaava I:



jossa R_1 esittää vetyatomia ja R_2 voi esittää vetyatomia, metyyli-, isopropyyli-, 1-metyylipropyyli-, 2-metyylipropyyli-, tert.butoksimetyyli-, 1-tert.butoksietyyli-, 2-metyyllitioetyyli-, bentsyyli-, karboksamidometyyli-, 2-karboksamidoetyyli-, tert.butoksikarbonyylimetyyli-, 2-tert.butoksikarbonyylietyyli-, 4-(tert.butoksikarbamido)butyyli-, 4-tert.butoksibentsyyli-, indolyyli-3-metyyli-, S-(trifenyyylimetyyli)tiometyyli-, 1-(trifenyyylimetyyli)imidatsolyyli-4-metyyli-, 3-(N^G -mesityleenisulfonyyli)guanidiinipropyyli-, N-ksantyylikarboksamidometyyli-, 2-(N-ksantyylikarboksamido)etyyli- tai S-(asetamidometyyli)tiometyyli-ryhmää,

tai R_1 ja R_2 yhdessä esittävät propyleeniradikaalia, joita suojattuina

N_{α} -aminohappojohdannaisina kiinteän faasin peptidisynteesiin.

Kiinteän faasin peptidisynteesiä käytetään yleisesti biologisesti aktiivisten peptidien valmistukseen, joita käytetään lääketieteen ja biologian tutkimuksessa ja myös aktiivisina aineina lääkevalmistuksessa, eläinlääketieteessä ja taudinmäärityksessä.

Kiinteän faasin peptidisynteesin olemusta voidaan kuvata peptidiketjujen pidentämiseksi kemiallisten reaktioiden toistetuilla kiertojaksolla alkaen ensimmäisestä C-pääteaminohaposta, joka on kiinnitetty liukenemattomaan kantoaineeseen. Synteesin kuluessa kaikkien reaktioiden tavoitettuotteet jäävät sitoutuneiksi kantoaineeseen, kun taas ylimääräiset reagenssit ja sivutuotteet poistetaan suodattamalla ja pesemällä kantoaine.

Peptidin kiinteän faasin synteesin suorittamiseksi ensimmäinen aminohappo (tavoiteaminohapposekvenssin C-pääteosa) suojattuine α -aminoryhmineen yhdistetään kovalenttisesti liukenemattomaan polymeeriseen kantoaineeseen vapaan α -karboksyyli ryhmän välityksellä ester- tai amidisidoksen muodostuksella. Tämän jälkeen N_{α} -ryhmää suojaava ryhmä lohkaistaan se-

lektiivisesti irti näin saadusta N_α -suojatusta aminoasyylipolymeeristä ja muodostuu aminoasyylipolymeeri, jossa on vapaa α -aminoryhmä. Tämä polymeeri asyloidaan edelleen seuraavalla N_α -suojatulla aminohapolla, jolloin saadaan N_α -suojattu dipeptidyyli-polymeeri. Tällaisia synteesikiertojaksoja, jotka koostuvat N_α -suojausten lohkaisusta ja sen jälkeisestä vapaan aminoryhmän asyloinnista seuraavalla N_α -suojatulla aminohapolla, toistetaan kunnes tavoiteaminohapposekvenssin kokoonpano on saatu päätökseen.

Käytännön kiinteän faasin synteesissä käytetään tavallisesti suuria molaarisia ylimääriä (2 - 10-kertaisia) asyloivia reagensseja täydellisen konversion varmistamiseksi, minkä vuoksi kaikki aminohappojen sivuketjuissa olevat reaktiiviset ryhmät, kuten amino-, karboksyyli-, hydroksyyli-, tioli-, guadiiniiniryhmät on suljettava sopivilla suojaavilla ryhmillä. Tähän tarkoitukseen käytetyt suojaavat ryhmät on valittava huolellisesti sivuketjujen luotettavan ja pysyvän suojauksen aikaansaamiseksi peptidyyli-polymeerin asylointien olosuhteissa ja tilapäisen N_α -suojausten lohkaisun aikana. Toisaalta näiden sivuketjuja suojaavien ryhmien on annettava mahdollisuus suojauksen poistoon syntetisoidusta peptidistä yhdessä tai kahdessa vaiheessa kvantitatiivisesti ja vahingoittamatta sen rakennetta. Useimmissa tapauksissa peptidyyli-polymeerisidos tulisi myös lohkaista samanaikaisesti. On selvää, että aminohappojen sivuketjuille tarkoitettujen pysyvien suojaavien ryhmien rakennetta ja kemiallisia ominaisuuksia ei määrää vain suojattavan reaktiivisen funktion luonne, vaan suuressa määrin käytetyn tilapäisen N_α -ryhmää suojaavan ryhmän rakenne ja kemialliset ominaisuudet. Tämän vuoksi tilapäinen N_α -ryhmän suojaus on kiinteän faasin peptidisynteesin koko strategian ratkaiseva osatekijä.

Hyvin tunnettuja ja yleisesti käytettyjä kiinteän faasin peptidisynteesissä ovat N_α -tert.butoksikarbonyyliaminohapot (Boc-aminohapot), joita tähän tarkoitukseen on kuvannut R.B. Merrifield julkaisussa Biochemistry, vol. 3, sivu 1385. Tert.butoksikarbonyyli(Boc)ryhmä voidaan lohkaista keskivahvojen happamien reagenssien vaikutuksella, esimerkiksi trifluoretikkahapolla ja sen liuoksilla klooratuissa hiilivedyissä, kloorivedyn liuoksilla orgaanisissa liuotteissa, booritrifluoridi/dietyylieetterikompleksilla ja joillakin muilla hapoilla, jolloin muodostuu isobuteenia ja hiilidioksidia.

Yhdessä tilapäisen N_α -Boc-suojausten kanssa sivuketjujen pysyvään sulkemiseen käytetään suojaavia ryhmiä, jotka ovat stabiileja N_α -Boc-lohkaisun aikana, mutta voidaan lohkaista vahvemmillä happamilla reagens-

- seilla, jolloin samanaikaisesti katkaistaan peptidyyli-polymeerisidos. Tähän tarkoitukseen käytettyjä tunnettuja reagensseja ovat nestemäinen fluorivety, trifluorimetaanisulfonihappo ja niiden seokset anisolin, tioanisolin ja dimetyylisulfidin kanssa. Sen synteesistrategian päähaita, jossa käytetään tilapäistä
- 5 N_{α} -Boc-suojausta, on happohydrolyysin käyttö sekä tilapäisten että pysyvien suojaavien ryhmien lohkaistamiseen, mikä ei voi saada aikaan pysyvän suojauksen täydellistä stabiilisuutta. Kun syntetisoidun peptidin pituus kasvaa, pysyvät suojaavat ryhmät joutuvat happamien reagenssien kumulatiivisen vaikutuksen alaiseksi Boc:n lohkaistuvaiheen aikana, mikä voi johtaa näiden ryhmien osittaiseen menetykseen ja sivutuotteiden kertymiseen. Tämän ohella
- 10 kokoonpannun peptidyyli-polymeerin viimeinen käsittely ylihappamilla reagensseilla voi aiheuttaa tavoitepeptidin osittaista tuhoutumista. On myös mainittava, että superhappojen erittäin vaaralliset ominaisuudet vaativat erikoislaitteistoa ja tarkoituksenmukaisia turvallisuustoimenpiteitä käsittelyn aikana.
- 15 Ylihappamien reagenssien käytön välttämiseksi peptidin lopullisessa suojauksen poistossa useita erittäin happoherkkiä ryhmiä ehdotettiin aivan äskettäin tilapäiseksi N_{α} -suojaukseksi, joiden ryhmien katsotaan olevan yhteensopivia niin kutsutun tert.butyylyityypin pysyvän sivuketjun suojauksen kanssa, joka on lohkaistavissa keskivahvoilla happamilla reagensseilla. Eräs esimerkki tällaisesta N_{α} -ryhmää suojaavasta ryhmästä on 1-(3,5-di-tert.butyyli-
- 20 fenyyli)-1-metyyli-etoksikarbonyyli(t-Bumeoc)ryhmä, jota on kuvattu julkaisussa Collect. Czech. Chem. Commun., 1992, vol. 57, sivu 1707. N_{α} -t-Bumeoc-ryhmä lohkaistaan 1-%:isella trifluorietikkahapon dikloorimetaaniliuoksella ja sitä voidaan käyttää yhdessä t-butyylyityypin pysyvien suojaavien ryhmien
- 25 kanssa, jotka ovat lohkaistavissa puhtaalla trifluorietikkahapolla tai sen väkeville liuoksilla. Tässä tapauksessa superhappojen käyttö suljetaan pois, mutta differentiaalisen happohydrolyysin yleinen periaate säilyy edelleen muuttumattomana.
- Erilaista lähestymistapaa kiinteän faasin peptidisynteesin strategiaan on hahmotellut R.B. Merrifield julkaisussa Science, 1986, vol 232, sivu
- 30 341. Tämä lähestymistapa, jota kutsutaan "ortogonaalisuusperiaatteeksi", perustuu olettamukseen, että tilapäiset ja pysyvät suojaavat ryhmät pitäisi voida poistaa täysin erillisillä reagensseilla täysin erillisten kemiallisten mekanismien mukaisesti niin, että tilapäinen N_{α} -suojaus voitaisiin lohkaista täydellisen selektiivisesti aikaansaaden pysyvän suojauksen täysi säilyminen ja päinvastoin.
- 35

Nykyään "ortogonaalisuusperiaate" hyväksytään yleisesti suuntaviivaksi kiinteän faasin peptidisynteesin tehokkaiden strategioiden kehittämiseksi.

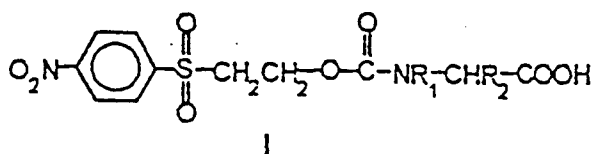
Esimerkkinä "ortogonaalisuusperiaatteen" toteuttamisesta N_α -ditiasukkinyyliaminohappojen (Dts-aminohappojen) käyttöä kiinteän faasin synteesissä kuvataan julkaisussa *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1987, vol. 30, sivu 740. N_α -ditiasukkinyyli(Dts)suojaryhmä on melko vastustuskykyinen keskivahvoja happamia reagensseja vastaan ja se lohkaistaan vaivattomasti tiolireagenssilla neutraaleissa väliaineissa, jolloin aminoryhmä vapautuu ja muodostuu hiilitio-oksidi. Dts-aminohappojen käyttö käytännön synteesissä on edelleen rajoitettua johtuen tehokkaiden menetelmien puutteesta niiden valmistamiseksi.

Tunnetuin ja yleisimmin käytetty strategia kiinteän faasin synteesin suorittamiseksi, joka vastaa "ortogonaalisuusperiaatetta", perustuu N_α -9-fluorenyylimetoksikarbonyyliaminohappojen (Fmoc-aminohappojen) käyttöön, kuten C.D. Chang ja J. Meienhofer ovat esittäneet julkaisussa *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1975, vol. 11, sivu 246. N_α -9-fluorenyylimetoksikarbonyyli(Fmoc)ryhmä kestää happamia reagensseja ja lohkaistun β -eliminointimekanismin mukaisesti orgaanisilla emäksillä aproottisissa liuottimissa, esimerkiksi morfoliindietiyyliamiinilla, piperatsiinilla tai piperidiinillä dimetyyliformamidissa (DMF) tai dikloorimetaanissa, jolloin aminoryhmä vapautuu ja muodostuu dibentsofulveenia yhdessä CO_2 :n kanssa. Kiinteän faasin synteesissä Fmoc-ryhmän lohkaus on edullista suorittaa käsittelemällä N_α -suojattua peptidyyli-polymeeriä 20 - 50-%:isella piperidiinillä DMF:ssä 10 - 30 minuutin ajan. Tällaiset olosuhteet sallivat käyttää pysyvää t-butyylityypistä happoherkkää suojausta yhdessä väliaikaisen N_α -Fmoc-suojauksen kanssa, mikä aikaansaa synteesistrategian "ortogonaalisuuden".

N_α -Fmoc-aminohappoja käytetään yleisesti käsin tehtävässä kiinteän faasin peptidisynteesissä samoin kuin kaikentyypisissä automaattisissa ja puoliautomaattisissa syntetisointilaitteissa. On kuitenkin huomattava, että N_α -Fmoc-suojauksen äärimmäinen emäsherkkyys ja sen tietty epästabiilisuus neutraaleissa aproottisissa liuottimissa vaatii asylointiolosuhteiden huolellista säätämistä ja myös käytettyjen liuottimien puhtautta. Erityistä huolellisuutta on noudatettava, kun N_α -Fmoc-aminohappoja käytetään pituudeltaan yli 30 happojäännöksen peptidien synteesiin. Sitä paitsi suhteellisen korkeat tuotantokustannukset estävät Fmoc-johdannaisten käytön suuren mittakaavan peptidin valmistuksessa.

Keksinnön yhteenveto

Näin ollen on toivottavaa kehittää uusia N_{α} -suojattuja aminohappojohdannaisia, jotka voivat olla hyödyllisiä tehokkaiden strategioiden kehittämisessä kiinteän faasin peptidisynteesiin. Esillä olevan keksinnön eräänä tavoitteena on saada aikaan uusia aminohappojohdannaisia, tarkemmin sanoen N_{α} -2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliaminohappoja (N_{α} -Nsc-aminohappoja), joilla on yleinen kaava I:



10

jossa R_1 esittää vetyatomia ja R_2 voi esittää vetyatomia, metyyli-, isopropyyli-, 1-metyylipropyyli-, 2-metyylipropyyli-, tert.butoksimetyyli-, 1-tert-butoksietyyli-, 2-metyylitioetyyli-, bentsyyli-, karboksamidometyyli-, 2-karboksamidoetyyli-, tert.butoksikarbonyylimetyyli-, 2-(tert.butoksikarbonyyli)etyyli-, 4-(tert.butoksikarbamido)butyyli-, 4-tert.butoksibentsyyli-, indolyyli-3-metyyli-, S-(trifenyyylimetyyli)tiometyyli-, 1-(trifenyyylimetyyli)imidatsolyyli-4-metyyli-, 3-(N-mesityleenisulfonyyli)guanidiinipropyyli-, N-ksantyylikarboksamidometyyli-, 2-(N-ksantyylikarboksamido)etyyli- tai S-(asetamidometyyli)tiometyyli-ryhmää;

20

tai R_1 ja R_2 yhdessä esittävät propyleeniradikaalia;

joita voidaan käyttää N_{α} -suojattuina aminohappojohdannaisina kiinteän faasin peptidisynteesissä.

Vielä muuna esillä olevan keksinnön tavoitteena on saada aikaan menetelmiä mainittujen N_{α} -Nsc-aminohappojen valmistamiseksi. Vielä muuna keksinnön tavoitteena on saada aikaan menetelmä peptidin syntetisoimiseksi kiinteässä faasissa käyttäen N_{α} -Nsc-aminohappoja. Nämä ja muut esillä olevan keksinnön tavoitteet käyvät ilmi seuraavasta kuvauksesta.

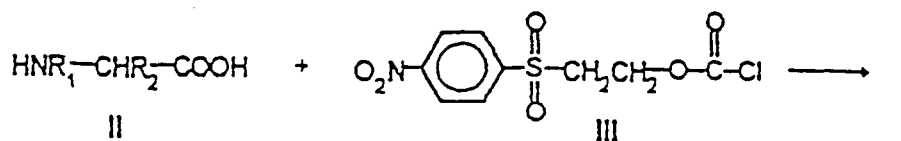
25

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

30

Esillä olevan keksinnön N_{α} -Nsc-aminohappoja (I) voidaan valmistaa käsittelemällä yleisen kaavan (II) aminohappoja, jossa kaavassa R_1 ja R_2 esittävät samaa kuin kaavan (I) yhteydessä esitettiin, 2-(nitrofenyylisulfonyyli)klooriformaatilla (III) veden ja orgaanisen liuottimen seoksessa emäksen läsnä ollessa ja 0 - 40 °C:n lämpötilassa, edullisesti 0 - 20 °C:ssa (kaavio 1).

Kaavio 1



Klooriformaattia (III) syötetään reaktioon 0,5 - 1,5 mooliekvivalentin, edullisesti 0,7 - 0,9 mooliekvivalentin, määrä aminohaposta laskettuna. Liuot-

timen orgaanisena komponenttina voidaan käyttää mitä tahansa aproottista orgaanista liuotinta, joka kykenee liuottamaan asylointireagenssin ja on se-

koittuva veden kanssa, esimerkiksi asetoniitriliä, DMF:a, tetrahydrofuraania tai dioksaania. Emäs voi olla orgaaninen tai epäorgaaninen emäs, esimerkiksi

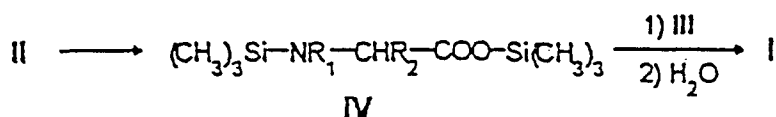
10 natrium- tai kaliumkarbonaatti, magnesium- tai kalsiumoksidi, trietyyliamiini, N-metyylimorfoliini.

Esillä olevan keksinnön toisen menetelmän mukaisesti yleisen kaa-

van (II) aminohapot konvertoidaan ensin N,O-bis-trimetyylisilyylijohtannaisiksi (IV) käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä ja käsitellään sitten klooriformaatilla (III) vedettömässä orgaanisessa liuottimessa, esimerkiksi dikloorimetaanissa. Väli-

15 väliuotteena olevien trimetyylisilyylijohtannaisten vesihydrolyysin jälkeen saadaan haluttuja N_α-Nsc-aminohappoja vapaassa muodossa (kaavio 2).

20 Kaavio 2



Kaavan I johdannaisia, jossa kaavassa R₁ on vetyatomi ja R₂ esittää

25 N-ksantyylikarboksamidometyyli- tai 2-(N-ksantyylikarboksamido)etyyliryhmää, voidaan valmistaa kaavan I johdannaisten reaktiolla, jossa kaavassa R₁ on vetyatomi ja R₂ esittää karboksamidometyyli- tai 2-(karboksamido)etyyliryhmää, ksanthydrolin kanssa aproottisessa orgaanisessa liuottimessa hapon läsnä ollessa. Liuottimena voidaan käyttää DMF:a ja edullinen happo on or-

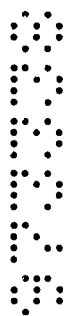
30 gaaninen happo, esimerkiksi trifluorietikka-, metaanisulfony- tai p-tolueeni-sulfonihappo.

Molekyylikaavasta nähdään, että yhdisteissä I on asymmetrinen α-hiiliatomi (paitsi yhdisteissä, joissa R₁ = R₂ = H). Koska α-hiiliatomi ei osallistu reaktioihin, joita käytetään yhdisteiden I valmistukseen, tämän lähtöami-

35 nohapoissa (II) olevan kiraalisen keskuksen konfiguraatio säilyy tuloksena olevissa N_α-Nsc-johdannaisissa I. Tämän vuoksi on ilmeistä, että esillä olevan

keksinnön menetelmiä voidaan käyttää N_α -Nsc-aminohappojen I valmistukseen, jotka ovat kummassa tahansa kiraalisessa muodossa (L tai D) samoin kuin raseemisten yhdisteiden valmistukseen riippuen lähtöyhdisteen (II) konfiguraatiosta.

- 5 Esillä olevan keksinnön mukaisissa kaavan I johdannaisissa olevien substituenttien R_1 ja R_2 merkitykset vastaavat luonnossa esiintyvien aminohappojen sivuketjujen rakenteita, jotka sisältävät tai eivät sisällä alalla tunnettuja suojaavia ryhmiä, enimmäkseen tert.butyylyityypisiä ryhmiä tai niitä vastaavia lohkausolosuhteet huomioon ottaen (taulukko 1).



Taulukko 1Substituenttien R₁ ja R₂ merkitykset yhdisteissä I.

Nro	R ₁	R ₂	Aminohappo	Lyhenne
I-1	H	H	Glysiini	Nsc-Gly-OH
I-2	H	Metyyli	Alaniini	Nsc-Ala-OH
I-3	H	Isopropyyli	Valiini	Nsc-Val-OH
I-4	H	1-metyylipropyyli	Isoleusiini	Nsc-Ile-OH
I-5	H	2-metyylipropyyli	Leusiini	Nsc-Leu-OH
I-6	H	tert.butoksimetyyli	O-tert.butyyli-se- riini	Nsc-Ser(tBu)-OH
I-7	H	1-tert.butoksimetyy- li	O-tert.butyyli-treo- niini	Nsc-Thr(tBu)-OH
I-8	H	2-metyylitioetyyli	Metioniini	Nsc-Met-OH
I-9	H	Bentsyyli	Fenyylialaniini	Nsc-Phe-OH
I-10	H	Karboksamido- metyyli	Asparagiini	Nsc-Asa-OH
I-11	H	2-karboksamido- etyyli	Glutamiini	Nsc-Gln-OH
I-12	H	tert.butoksikarbo- nyylimetyyli	Asparagiinihapon β-tert.butyyliesteri	Nsc-Asp(OtBu)-OH
I-13	H	2(tert.butoksikarbo- nyyli)etyyli	Glutamiinihapon γ- tert.butyyliesteri	Nsc-Glu(OtBu)-OH
I-14	H	4-(tert.butoksikarb- amido)butyyli	Nε-tert.butoksi- karbonyylisiini	Nsc-Lys(Boc)-OH
I-15	H	4-tert.butoksi-bent- syyli	O-tert.butyyli-tyro- siini	Nsc-Tyr(tBu)-OH
I-16	H	Indolyyli-3-metyyli	Tryptofaani	Nsc-Trp-OH
I-17	H	S-(trifenyylimetyyli)- tiometyyli	S-trifenyylimetyyli- kysteiini	Nsc-Gys(Trt)-OH
I-18	H	1-(trifenyylimetyyli)- imidatsolyyli-4-me- tyyli	Nτ-trifenyy- limetyyli-histidiini	Nsc-His(Trt)-OH
I-19	H	3-(N ^G -mesityleeni- sulfonyyli)guanidii- nipropyyli	N ^G -mesityleeni- sulfonyyliarginiini	Nsc-Arg(Mts)-OH

I-20	H	N-ksantyylikarboks- amidometyyli	N-ksantyyli-aspa- ragiini	Nsc-Asn(Xan)-OH
I-21	H	2-(N-ksantyylikar- boksamido)etyyli	N-ksantyyli-gluta- miini	Nsc-Gln(Xan)-OH
I-22	H	S-(asetamidome- tyyli)tiometyyli	S-asetamidome- tyylikysteiini	Nsc-Gys(Acm)-OH
I-23	H	$R_1 + R_2 =$ propeeni	Prolini	Nsc-Pro-OH

On ilmeistä, että taulukossa 1 esitetyt kaavan I yhdisteet edustavat täydellistä sarjaa suojattuja proteogeenisiä aminohappojohdannaisia, joita vaaditaan minkä tahansa aminohappokoostumuksen omaavan peptidin syn-
5 teesiin. On myös ilmeistä, että sellaisten aminohappojen N_α -Nsc-johdannaisia, joissa on muita rungon suojaustyyppijä, samoin kuin ei-proteogeenisten tai epätavallisten aminohappojen N_α -Nsc-johdannaisia voidaan syntetisoida aikaansaadulla menetelmällä.

N_α -Nsc-aminohapot I ovat kiteisiä yhdisteitä, jotka ovat liukenemat-
10 tomia tai niukasti liukenevia veteen ja liukoisia polaarisiin orgaanisiin liuottimiin ja stabiileja pitkäaikaisessa varastoinnissa $-10 - +25^\circ\text{C}$:ssa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti aikaansaadaan menetelmä kiin-
teen faasin peptidisynteesin suorittamiseksi käyttäen kaavan I N_α -Nsc-amino-
happoja.

15 Tällä menetelmällä ensimmäinen N_α -Nsc-aminohappo (tavoite aminosekvenssin C-pääte) liitetään kovalenttisesti liukenemattomaan polymeeri-
seen kantoaineeseen vapaan α -karboksyyli-ryhmän välityksellä ester- tai ami-
disidoksen muodostuksella, jolloin saadaan N_α -Nsc-aminoasyyli-polymeeri.
Monia eri polymeerejä voidaan käyttää polymeerisena kantoaineena, kuten
20 silloitettua tai makrohuokoista polystyreeniä, silloitettua poly-N,N-dimetyyliak-
ryyliamidia rakeisessa muodossa tai komposiittina piimaan, silloitettujen dekst-
raanien, selluloosien, papereiden ja muiden polymeerien kanssa, jotka ovat
alalla tunnettuja ja joita käytetään tähän tarkoitukseen.

25 Ensimmäisen N_α -Nsc-aminohapon kiinnittämistä varten polymeeri-
sen kantoaineen tulisi sisältää sopivia kiinnitysryhmiä. Useimmissä tapauksis-
sa edullisia ovat kiinnitysryhmät, jotka aikaansaavat syntetisoidun peptidin
lohkaisun polymeerisestä kantoaineesta vapauttaen C-päätekarboksyyli- tai
-karboksamidiryhmän käsiteltäessä peptidyli-polymeeriä happamilla reagens-
seilla, kuten trifluorietikkahapolla ja sen liuksilla tai kloorivetyliuksilla or-

gaanisessa liuottimessa. Tällaisia kiinnitysryhmiä esterityyppiseen kiinnitykseen voivat olla 4-hydroksimetyylifenoksi-alkyyli-, 4-kloori- tai 4-bromimetyylifenoksi-alkyyli-, α -hydroksidifenyylimetyyli- ja muut alalla tunnetut ryhmät; karboksamidityyppiseen kiinnitykseen voidaan käyttää tunnettuja di- ja trialkoksi-

5 bentshydriylamiiniryhmiä, 4-aminometyyli-3,5-dimetoksifenoksi-alkyyli-ryhmää ja myös muita tunnettuja ryhmiä tähän tarkoitukseen.

C-päätteisen N_{α} -Nsc-aminoryhmän kiinnittäminen polymeerisen kantoaineen kiinnitysryhmiin voidaan suorittaa alalla tunnetuilla menetelmillä.

N_{α} -ryhmää suojaavan ryhmän lohkaisemiseksi saadusta N_{α} -Nsc-aminoasyyli-polymeeristä mainittua suojattua aminoasyyli-polymeeriä käsitellään emäksisellä reagenssilla. Edullisia emäksisiä reagensseja tähän tarkoitukseen ovat typpiemäkset, esim. ammoniakki, morfoliini, piperidiini, piperatsiini, dietyyliamiini, 1,8-diatsabisyklo[5,4,0]undek-7-eeni, 1,1,3,3-tetrametyyliguanidiini ja niiden liuokset aproottisissa orgaanisissa liuottimissa. Edullisempi

10 emäksinen reagenssi on piperidiinin 20 - 50-prosenttinen liuos DMF:ssä. Tässä tapauksessa Nsc-ryhmä lohkaistaan muodostaen N-[2-(4-nitrofenyyli)sulfonyli]etyyli]piperidiiniä ja hiilidioksidia, jolloin α -aminoryhmä vapautuu.

Edelleen aminoasyyli-polymeeri, jossa on vapaa α -aminoryhmä, asyloidaan seuraavalla N_{α} -Nsc-aminohapolla, jolloin saadaan N_{α} -Nsc-

20 dipeptidyyli-polymeeriä. Tähän tarkoitukseen käytetään menetelmiä, jotka tunnetaan alalla ja joita tavallisesti käytetään tähän tarkoitukseen. Asylointiaineina voidaan käyttää esimerkiksi N_{α} -Nsc-aminohappojen 4-nitrofenyyli-, pentakloorifenyyli-, pentafluorifenyyli-, 1-hydroksibentsotriatsolyyli-estereitä ja muita aktiivisten estereiden tunnettuja tyyppejä, joita käytetään kiinteän faasin peptidisynteesissä; N_{α} -Nsc-aminohappojen symmetrisiä anhydridejä. Asylointi voi-

25 daan myös suorittaa N_{α} -Nsc-aminohapoilla tunnettujen liitosreagenssien, esim. disykloheksyylikarbodiimidin, di-isopropylikarbodiimidin tai bentsotriatsolyyli-1-oksi(tris-dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaatin läsnä ollessa.

Synteesin kiertojaksoja, jotka koostuvat N_{α} -Nsc-ryhmän lohkaisusta

30 ja sitä seuraavasta vapaan aminoryhmän asyloinnista seuraavalla N_{α} -Nsc-aminohapolla, toistetaan, kunnes tavoiteaminohapposekvenssin kokoonpano on saatu päätökseen.

Halutun N_{α} -Nsc-peptidyyli-polymeerin kokoonpanon jälkeen N_{α} -pääteryhmiä suojaava ryhmä lohkaistaan käyttäen edellä kerrottuja menetelmiä, minkä jälkeen useimmissa tapauksissa tavoitepeptidi irrotetaan kantoai-

35 neen kiinnitysryhmästä samanaikaisesti, kun pysyvä suojaus lohkaistaan ami-

nohappojen sivuketjuista. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää happamia reagensseja, joiden tiedetään alalla lohkaisevan tert.butyylyityypisiä suojaavia ryhmiä, esim. trifluorietikkahappoa, metaanisulfoni- tai p-tolueenisulfonihapon liuoksia, jotka sisältävät tai eivät sisällä tunnettuja lisäaineita kehittyneiden

5 karboniumionien pidättämiseksi, esim. vettä, anisolia, tioanisolia, dimetyylisulfidia, etaaniditioli-1,2-tri-isopropyylisilaania.

Valinnaisesti tavoitepeptideistä voidaan poistaa suojaus lohkaismatta sitä polymeerisestä kantoaineesta. Tällaisissa tapauksissa on käytettävä tunnettuja kiinnitysryhmiä, jotka voivat aikaansaada happoa kestävän peptidyyli-polymeerisidoksen.

10

Verrattuna Fmoc-ryhmään Nsc-ryhmä kestää paremmin emäksisiä reagensseja ja sen lohkeamisnopeus on merkittävästi pienempi samoissa olosuhteissa, mutta aika, joka on tavallisesti varattu N_α -suojauksen lohkaisuun kiinteän faasin synteessin toimintaohjeiden mukaisesti (15 - 20 min), on riittävä

15 N_α -Nsc-ryhmän kvantitatiiviseen lohkaisuun suojatusta peptidyyli-polymeeristä sellaisella emäksisellä reagenssilla kuin piperidiinin 20 - 50-%:isella liuoksella DMF:ssa. Toisaalta Nsc-ryhmän parempi emäksisten reagenssien vastustuskyky saa aikaan sen paremman stabiilisuuden neutraaleissa ja heikosti emäksisissä väliaineissa, joita on edullista käyttää asylointivaiheiden suorittamiseen.

20

Kuten edellä kuvattiin, Nsc-ryhmä voidaan lohkaista kvantitatiivisesti emäksisillä reagensseilla tert.butyylyityypisten suojaavien ryhmien läsnä ollessa, jotka kestävät orgaanisia emäksiä. Toisaalta Nsc-ryhmä kestää täysin happamien reagenssien vaikutusta, joita käytetään tavallisesti tert.butyylyityypisten suojaavien ryhmien lohkaisuun. Näin ollen yleisen kaavan I N_α -Nsc-aminohappojen käyttö, jotka sisältävät sivuketjuissa edullisesti tert.butyylyityypisen suojaavan ryhmän tai sitä vastaavan lohkaisuosuhteiden osalta, tekee mahdolliseksi kehittää kiinteän faasin peptidisynteesin uusia strategioita "ortogonaalisuusperiaatteen" mukaisesti.

25

Tätä keksintöä kuvataan nyt esimerkeillä, jotka esitetään kuvaamistarkoituksessa ja joiden ei ole tarkoitettu olevan rajoittavia. Kaikilla seuraavan kuvauksen aminohapoilla on L-konfiguraatio, ellei toisin mainita.

Esimerkki 1

N_α -Nsc-asparagiini (I-10)

35 3,95 g asparagiinia ja 7,7 g kaliumkarbonaattia liuotettiin 100 ml:aan vesi-dioksaaneista (3:1 tilavuudesta) ja jäähdytettiin jäähauteella,

- minkä jälkeen lisättiin tipoittain 15 min aikana samalla sekoittaen liuos, jossa oli 7,5 g 2-(4-nitrofenyyli)sulfonyyli)etyyliklooriformaattia III 70 ml:ssa dioksaania. Jäähdytyshaude poistettiin ja seosta sekoitettiin vielä 20 min, minkä jälkeen se haihdutettiin noin 100 ml:ksi alipaineessa ja siirrettiin erotussuppiloon.
- 5 100 ml vettä lisättiin ja saatu liuos uutettiin 2 x 50 ml:lla etyyliasetaattia. Vesikerros erotettiin, hapotettiin pH-arvoon 2 40-%:isella rikkihapolla ja jäähdytettiin jäähauteella. 30 min kuluttua muodostunut sakka suodatettiin pois, pestiin perusteellisesti jääkylmällä vedellä ja ilmakeivattiin, jolloin saatiin haluttua yhdistettä I-10 valkoisena kiteisenä pulverina (71 %). Karakterisoinnin suhteen
- 10 katso taulukko 2 (esimerkki 5).

Esimerkki 2

N_{α} -Nsc-leusiini (I-5)

- 4,92 g leusiinia ja 90 ml vedetöntä dikloorimetaania asetettiin 250 ml:n pyöreäpohjaiseen kolviin, joka oli varustettu palautusjäähdyttäjällä ja tiputussuppilolla. Suspensioon lisättiin 9,5 ml klooritrimetyylisilaania voimakkaasti sekoittaen ja seos kuumennettiin kiehuvaan 1 tunnin ajaksi. Saatu liuos jäähdytettiin jäähauteella, minkä jälkeen lisättiin 9,1 ml trietyyliamiinia ja 9,0 g klooriformaattia III. Seosta sekoitettiin 20 min jäähauteella, sen jälkeen vielä 1,5 tuntia huoneenlämpötilassa. Liutotin haihdutettiin alipaineessa ja jäännös
- 20 jaettiin 200 ml:aan etyyliasetaattia ja 250 ml:aan natriumdikarbonaatin 2,5-prosenttista vesiliuosta. Vesikerros erotettiin, pestiin 50 ml:lla eetteriä, hapotettiin pH-arvoon 2 1 N kloorivetyhapolla ja uutettiin sitten 3 X 70 ml:lla etyyliasetaattia. Yhdistetyt uutteen kuivattiin vedettömällä natriumsulfaattilla ja haihdutettiin alipaineessa. Jäännöksen uudelleenkiteytys heksaani-etyyliasetaattista tuotti haluttua tuotetta I-5 valkoisen, kiteisen pulverin (80 %) muodossa. Karakterisoinnin suhteen katso taulukko 2 (esimerkki 5).
- 25

Esimerkki 3

N_{α} -Nsc-asparagiinihapon β -tert.butyyliesteri (I-12)

- 7,09 g asparagiinihapon β -tert.butyyliesteriä ja 90 ml vedetöntä dikloorimetaania asetettiin 250 ml:n pyöreäpohjaiseen kolviin, joka oli varustettu palautusjäähdyttäjällä ja tiputussuppilolla. Seokseen lisättiin voimakkaasti sekoittaen 12,7 ml di-isopropyylitrietyyliamiinia ja sitten 9,5 ml klooritrimetyylisilaania ja seos kuumennettiin kiehuvaan 1,5 tunnin ajaksi. Reaktioseos jäähdytettiin sitten jäähauteella, 9,0 g klooriformaattia III lisättiin yhdellä kertaa ja se-
- 30

- koitusta jatkettiin 1,5 tuntia huoneenlämpötilassa. Liuotin haihdutettiin alipaineessa ja jäännös jaettiin 200 ml:aan etyyliasetaattia ja 250 ml:aan natriumdi-karbonaatin 2,5-%:ista vesiliuosta. Vesikerros erotettiin, pestiin 50 ml:lla eette-riä, hapotettiin pH-arvoon 2 1 N kloorivetyhapolla ja uutettiin sitten 3 x 70 ml:lla etyyliasetaattia. Yhdistetyt uutteen kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja haihdutettiin alipaineessa. Jäännöksen uudelleenkiteytys heksaani-etyyliase-taatasta tuotti haluttua tuotetta I-12 valkoisen kiteisen pulverin muodossa (86 %). Karakterisoinnin suhteen katso taulukko 2 (esimerkki 5).

Esimerkki 4

10 N_α-Nsc-ksantyyliasparagiini (I-20)

- 3,89 g N_α-Nsc-asparagiinia (I-10) ja 2,6 g ksanthydroliä liuotettiin 20 ml:aan kuivaa DMF:a. Liuokseen lisättiin 0,4 ml metaanisulfonihappoa ja seok-sen annettiin seistä 2 vrk huoneenlämpötilassa. Saatu seos kaadettiin sitten 100 ml:aan jääkylmää vettä samalla sekoittaen, muodostunut sakka suodatet-tiin pois, pestiin vedellä ja sitten etyyliasetaatilla ja eetterillä. Epäpuhdas tuote liuotettiin 10 ml:aan lämmintä DMF:a, suodatettiin ja saostettiin uudelleen eetterillä. Sakka kerättiin talteen suodattamalla, pestiin eetterillä ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin haluttua yhdistettä I-20 kiteisenä pulverina (74 %). Karakterisoinnin suhteen katso taulukko 2 (esimerkki 5).

20 Esimerkki 5

N_α-Nsc-aminohappojen I ominaisuudet

- Taulukossa 2 esitetään ne kaavan I yhdisteet, jotka valmistettiin käyttäen aikaansaatuja menetelmiä, joita on kuvattu yksityiskohtaisesti esi-merkeissä 1 - 4. Sarakkeessa "menetelmä" olevat numerot vastaavat niiden esimerkkinumeroita, joissa kyseisiä menetelmiä on kuvattu. Optiset omi-naiskiertokulmat $[\alpha]_D^{25}$ mitattiin DIP-320-polarimetrillä (Jasco, Japani) 10 cm:n kyveteissä. Sulamispisteet määritettiin avonaisissa kapillaareissa eikä niitä korjattu. Kromatografiset liikkuvuusarvot R_f mitattiin ohutlevykromatografiale-vyillä Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Saksa); klorofo-rmi/metanoli/etikkahappoa suhteessa 95:5:3 (A) ja bentseeni/asetoni/etikka-happoa suhteessa 100:50:3 (B) käytettiin kehitysliuottimina ja täplät havaittiin UV-absorbanssilla ja/tai ninhydiiniireaktiolla. Molekyyli-ionimassat (M+H)⁺ mi-tattiin käyttäen MS-BC-1-merkkistä lentoaikamassaspektrometria, jossa käy-tettiin Cf²⁵²-säteilyllä joudutettua desorptiota (Electron SPA, Sumy, Ukraina).

Taulukko 2

N_α-Nsc-aminohappojen ominaisuudet

Kirjaus	Yhdiste	Menetelmä	[α] _D ²⁵ (cf, DMF)	sp., °C	Rf(A)	Rf(B)	Molekyyli-ioni (M+H) ⁺	
							Laskettu	Kokeellinen
1	2	3	4	5	6	7	8	9
I - 1	Nsc-Gly-OH	2	-	152-154	0,40	0,21	333,30	333,4
I - 2	Nsc-Ala-OH	2	-25,6°	134-136	0,53	0,35	347,32	347,4
I - 3	Nsc-Val-OH	2	-12,0°	72-74	0,62	0,50	375,38	375,4
I - 4	Nsc-Ile-OH	2	-13,0°	120-121	0,62	0,52	389,41	389,6
I - 5	Nsc-Leu-OH	2	-33,0°	160-162	0,68	0,42	389,41	389,7
I - 6	Nsc-Ser(tBu)-OH	3	+3,3°	109-111	0,68	0,46	419,43	418,9
I - 7	Nsc-Thr(tBu)-OH	3	-9,0°	64-66	0,68	0,50	433,46	433,2
I - 8	Nsc-Met-OH	2	-28,7°	88-90	0,65	0,37	407,47	406,9
I - 9	Nsc-Phe-OH	2	-23,0°	160-163	0,66	0,40	423,42	423,3
I - 10	Nsc-Asn-OH	1	-1,3°	205-207	0,05	0,05	390,35	390,2
I - 11	Nsc-Gln-OH	1	-9,7°	192-194	0,10	0,05	404,38	404,3
I - 12	Nsc-Asp(OtBu)-OH	3	-12,7°	72-75	0,64	0,38	447,44	447,2

I - 13	Nsc- Gln(OtBu)- OH	3	-17,0°	94-96	0,67	0,38	461,47	461,4
I - 14	Nsc- Lys(Boc)-OH	3	-11,8°	110-112	0,62	0,35	504,54	505,9
I - 15	Nsc- Tyr(tBu)-OH	3	-6,3°	82-84	0,68	0,44	495,53	495,2
I - 16	Nsc-Trp-OH	3	-14,7°	188-190	0,53	0,33	462,46	461,7
I - 17	Nsc- Cys(Trt)-OH	3	+22,3°	108-110	0,75	0,52	621,71	619,3
I - 18	Nsc-His(Trt)- OH	3	+5,0°	112-115	0,42	0,1	655,71	656,8
I - 19	Nsc- Arg(Mts)-OH	3	-4,0°	115-120	0,25	0,05	615,68	614,4
I - 20	Nsc- Asn(Xan)- OH	4	+2,7°	198-200	0,43	0,25	570,56	568,8
I - 21	Nsc- Gln(Xan)- OH	4	-13,7°	155-158	0,58	0,23	584,58	582,9
I - 22	Nsc- Gys(Acm)- OH	2	-31,0°	124-126	0,17	0,05	450,47	451,2
I - 23	Nsc-Pro-OH	2	-31,5°	115-117	0,53	0,37	371,35	371,3

Esimerkki 6**Dodekapeptidin kiinteän faasin synteesi Ala-Ser-Seh-Thr-Ile-Ile-Lys-Phe-Gly-Ile-Asp-Lys****a) Kiinnitysryhmän liittäminen polymeerikantoaineeseen**

- 5 250 mg:aan aminometyloidun styreenin 1 %:n divinyylibentseeniä sisältävää kopolymeeriä (1,0 m ekviv. NH₂/g) 3 ml:ssa DMF:a lisättiin 0,75 mmol 2,4,5-trikloorifenyyl-4-hydroksimetyylifenoksi-
propionaattia ja 0,75 mmol 1-hydroksibentsotriatsolia ja suspensiota ravisteltiin 24 h huoneenlämpötilassa. Polymeeri suodatettiin pois, pestiin DMF:lla, etanolilla, eetterillä ja lopuksi
10 heksaanilla ja kuivattiin alipaineessa fosforipentoksidilla 24 h.

a) Nsc-Lys(Boc)-OH-yhdisteen kiinnittäminen kiinnitysryhmään

- Saatua polymeeriä paisutettiin 4 ml:ssa 1,2-dikloorietaani/N-metyyli-
pyrrolidiiniseosta (3:1), minkä jälkeen lisättiin 0,75 mmol Nsc-Lys(Boc)-OH:a
(I-14), 0,1 mmol 4-dimetyyliaminopyridiiniä ja 0,75 mmol disykloheksyylikarbo-
15 di-imidiä. Suspensiota ravisteltiin 24 h huoneenlämpötilassa. Polymeeri suoda-
tettiin pois, pestiin perusteellisesti kloroformilla, kloroformi/metanoliseoksella
(1:1), etanolilla, eetterillä ja lopuksi heksaanilla ja kuivattiin, jolloin saatiin 400
mg Nsc-Lys(Boc)polymeeriä.

c) Peptidin kokoonpano

- 20 Nsc-Lys(Boc)polymeeriä (200 mg) asetettiin 10 ml:n polypropeenikäsiruiskuun, joka oli varustettu pohjalla olevalla polypropeenisintterillä. Käsiruiskussa oleva polymeeri pestiin DMF:lla ja synteesin muut kiertojaksot suoritettiin seuraavan toimintaohjeen mukaisesti:

1. Esipesu: 33 % piperidiini/DMF, 4 ml; 0,5 min
- 25 2. Suojauksen poisto: 33 % piperidiini/DMF, 4ml; 15 min
3. Pesu: DMF, 6 x (4 ml; 1 min)
4. Asylointi: N α -Nsc-aminohappo I, 0,5 mmol; bentsotriatsolyyli-1-
oksi(trisdimetyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaatti, 0,5 mmol; 1-hydroksi-
bentsotriatsoli, 0,5 mmol; N-metyylimorfoliini, 0,75 mmol; DMF, 2 ml; 60 min
30 (90 min Nsc-Ile-OH-yhdisteelle).
5. Pesu: DMF, 5 x (4 ml, 1 min).

N α -Nsc-aminohapot syötettiin synteesin kiertojaksoihin seuraavassa järjestyksessä. Nsc-Asp(OtBu)-OH, Nsc-Ile-OH, Nsc-Gly-OH, Nsc-Phe-OH,

Nsc-Lys(Boc)-OH, Nsc-Ile-OH, Nsc-Ile-OH, Nsc-Thr(tBu)-OH, Nsc-Ser(tBu)-OH, Nsc-Ser(tBu)-OH, Nsc-Ala-OH.

- 5 Tavoiteaminohapposekvenssin kokoonpanon jälkeen peptidyyli-polymeeriä käsiteltiin 33 % piperidiiniä sisältävällä DMF-liuoksella (4 ml) 20 minuutin ajan, minkä jälkeen se pestiin DMF:lla, dikloorimetaanilla, etanolilla, eetterillä ja lopuksi heksaanilla.

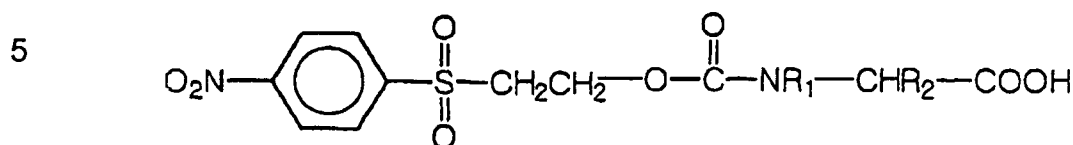
d) Suojauksen poisto ja puhdistus

- 10 Peptidyyli-polymeeriä ravisteltiin yhdessä 5 ml:n kanssa trifluorietikkahapon 50-%:ista 1,2-dikloorietaaniliuosta 60 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Polymeeri suodatettiin pois, pestiin 5 ml:lla trifluorietikkahapon 50-%:ista 1,2-dikloorietaaniliuosta ja yhdistetyt pesuliuokset laimennettiin 100 ml:lla jääkylmää vedetöntä eetteriä. Sakka suodatettiin pois, pestiin eetterillä ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin 170 mg epäpuhdasta dodekapeptidiä (puhtaus 70 % analyttisellä käänteisfaasisella korkean suorituskyvyn nestekromatografialla).

- 20 Epäpuhdas dodekapeptidi liuotettiin 3 ml:aan etikkahapon 1 M vesiliuosta ja se kromatografoitiin 1,5 x 70 cm:n kolonnilla, joka oli täytetty TSK-HW-40F-hartsilla (Merck, Darmstadt, Saksa), tasapainotettiin ja eluoitiin samalla puskurilla. Puhdasta peptidiä sisältävät jakeet kerättiin yhteen ja lyofilioitiin. Tavoitedodekapeptidin lopullinen saanto oli 104 mg (41 %), puhtaus yli 95 % arvioituna analyttisellä käänteisfaasisella korkean suorituskyvyn nestekromatografialla. Aminohappokoostumus (6 N HCl-hydrolyysin, 110 °C, 24 ja 48 h jälkeen): Asp 1,02(1); Ser 1,84(2); Thr 0,93(1); Glu 0,94(1); Gly 1,03(1); Ala 1,00(1); Ile 2,78(3); Lys 2,04(2).

Patenttivaatimukset

1. N_{α} -2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliaminohappoja, **tunnettu** siitä, että niillä on yleinen kaava:



jossa R_1 esittää vetyatomia ja R_2 esittää isopropyyli-, 2-metyylipropyyli-, 2-metyylitioetyyli-, bentsyyli-, karboksamidometyyli-, 2-karboksamidoetyyli-, 4-tert.-butoksibentsyyli-, indolyyli-3-metyyli-, S-(trifenyylimetyyli)tiometyyli-, 1-(trifenyylimetyyli)imidatsolyyli-4-metyyli-, 3-(N-mesityleenisulfonyyli)guanidiinipropyli-, N-ksantyylikarboksamidometyyli-, 2-(N-ksantyylikarboksamido)etyyli- tai S-(asetamidometyyli)tiometyyliryhmää; tai R_1 ja R_2 yhdessä esittävät propyleeniradikaalia.

15 2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että annetaan aminohapon, jolla on yleinen kaava



20 jossa R_1 ja R_2 esittävät patenttivaatimuksen 1 mukaisia radikaaleja, reagoida 2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliklooriformaatin kanssa veden ja orgaanisen liuottimen seoksessa emäksen läsnä ollessa.

25 3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että

a) konvertoidaan aminohappo, jolla on yleinen kaava:



30 jossa R_1 ja R_2 esittävät patenttivaatimuksen 1 mukaisia radikaaleja, O,N-trimetyylisilyloiduiksi johdannaisiksi;

b) annetaan mainittujen O,N-trimetyylisilyloitujen johdannaisten reagoida 2-(4-nitrofenyylisulfonyyli)etoksikarbonyyliklooriformaatin kanssa ap-roottisessa liuottimessa emäksen läsnä ollessa, mitä seuraa hydrolyysi.

35 4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, joissa R_1 esittää vetyatomia ja R_2 esittää N-ksantyylikarboksami-

dometyyli- tai 2-(N-ksantyylikarboksamido)etyyliryhmää, **tunnettu** siitä, että annetaan patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden, joissa R_1 esittää vetyatomia ja R_2 esittää karboksamidometyyli- tai 2-(karboksamido)etyyliryhmää, reagoida ksanthydrolin kanssa orgaanisessa liuottimessa hapon läsnä
5 ollessa.

5. Menetelmä peptidien valmistamiseksi lisäämällä peräkkäin suojattuja aminohappomonomeereja liukenemattomaan polymeeriseen tukiaineeseen kiinnitettyyn kasvavaan peptidiketjuun, jotka suojatut aminohappomonomeerit ovat patenttivaatimuksen 1 mukaisia yhdisteitä, **tunnettu** siitä, että:

10 a) liitetään C-päätesuojattu monomeeri mainittuun polymeeriseen tukiaineeseen sidotun kiinnitysryhmän amino- tai hydroksyylifunktioon mainitun suojatun monomeerin vapaan karboksyyli- tai hydroksyyli-ryhmän välityksellä suojatun aminoasyyli-polymeerin aikaansaamiseksi,

b) poistetaan mainitusta suojatusta aminoasyyli-polymeeristä suo-
15 jaus käsittelemällä emäksisellä reagenssilla aminoasyyli-polymeerin aikaansaamiseksi, jossa on vapaa α -aminoryhmä;

c) liitetään seuraava suojattu aminohappomonomeeri mainitun aminoasyyli-polymeerin vapaaseen α -aminoryhmään suojatun peptidyyli-polymeerin aikaansaamiseksi,

20 d) toistetaan vaiheita b) ja c), kunnes viimeinen suojattu aminohappomonomeeri on liitetty, minkä jälkeen suoritetaan vaihe b).

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu emäksinen reagenssi on tyypimäs, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat ammoniakki, morfoliini, piperidiini, piperatsiini, dietyyliamiini, 1,8-
25 diatsabisyklo[5,4,0]undek-7-eeni, 1,1,3,3-tetrametyyliguadiniini ja niiden liuokset aproottisissa orgaanisissa liuottimissa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu tyypimäs on piperidiini ja orgaaninen liuotin on dimetyyliformamidi.