



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

77874

C (45) Patenti on julkaistu
1.11.1989

(51) Kv.lk.⁴/Int.Cl.⁴ C 07 K 7/06

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	834083
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	08.11.83
(23) Alkuperä - Giltighetsdag	08.11.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	11.05.84
(44) Nähtäväksiapanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.01.89
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	10.11.82
Alankomaat-Nederländerna (NL) 8204346	
Toteennäytetty-Styrkt	

(71) Akzo N.V., Velperweg 76, Arnhem, Alankomaat-Nederländerna (NL)

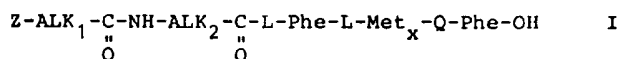
(72) Hendrik Marie Greven, Almen, Alankomaat-Nederländerna (NL)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av nya, terapeutiskt användbara peptider

(57) Tiivistelmä

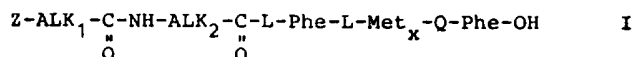
Keksinnön kohteena on polypeptidejä, erityisesti penta- ja heksapeptidejä, joita luonnehtii yleinen kaava I:



tai niiden funktionaalinen johdannainen, jossa kaavassa Z on vety tai NH₂, ALK₁ edustaa alkyleeni- tai alkylideeniryhmää, jossa on 1-6 hiiliatomia, ALK₂ on 1-6 hiiliatomia sisältävä alkylideeniryhmä, Met_x on aminohapporadikaali Met, Met(O) tai Met(O₂) ja Q edustaa aminohapporadikaalia Lys tai Arg, sillä ehdolla, että toinen aminohapporadikaaleista Q ja C-pääte-Phe on D-konfiguraatiossa ja toisella on L-konfiguraatio.

(57) Sammandrag

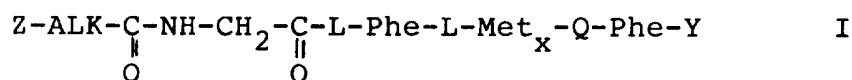
Uppfinningen avser polypeptider, speciellt penta- och hexapeptider som karakteriseras av den allmänna formeln I:



eller ett funktionellt derivat därav, där Z står för väte eller NH₂, ALK₁ representerar en alkyl- eller alkyliden-grupp med 1-6 kolatomer, ALK₂ representerar en alkyliden-grupp med 1-6 kolatomer, Met_x står för aminosyraradikalen Met, Met(O) eller Met(O₂) och Q representerar aminosyraradikalen Lys eller Arg, med det förbehållet, att en av aminosyraradikalerna Q och C-terminal-Phe är i D-konfigurationen och den andra har L-konfigurationen.

Menetelmä uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi

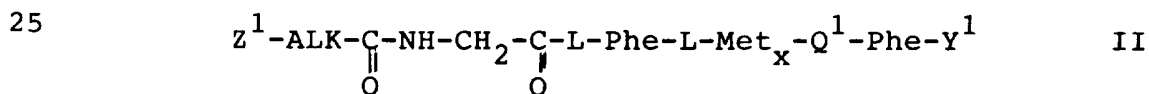
- 5 Keksinnön kohteena on menetelmä uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi, joilla on yleinen kaava I



- 10 jossa Z on vety tai amino,
 ALK on alkyleeni- tai alkylideeniryhmä, jossa on 1 tai 2 hiiliatomia,
 Met_x on aminohapporadikaali Met, Met(O) tai Met(O₂),
 Q on aminohapporadikaali Lys tai Arg, sillä ehdolla, että
 15 toinen aminohapporadikaaleista Q ja C-pääte-Phe on D-konfiguraatiossa ja toisella on L-konfiguraatio, ja
 Y on hydroksi tai amino, ja niiden happoadditiosuolojen valmistamiseksi.

- 20 Edullisia peptidejä ovat ne peptidit, joilla on yleinen kaava I, jossa Q on D-lys ja/tai jossa Z on amino ja ALK on metyleeniryhmä tai etylideeniryhmä.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle uusien kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi on tunnusomaista, että peptidistä, jolla on kaava II



- jossa ALK ja Met_x merkitsevät samaa kuin edellä,
 Z¹ merkitsee samaa kuin Z edellä tai Z¹ on aminoryhmä,
 30 joka on suojattu N-suojaryhmällä,
 Q¹ merkitsee samaa kuin Q edellä tai Q¹ merkitsee (ξ-ami-
 no)-suojustua lysyyliä tai (guanidyyli)-suojustua arginyyliä, sillä ehdolla, että toinen radikaaleista Q¹ ja C-pää-
 te-Phe on D-konfiguraatiossa ja toisella on L-konfiguraa-
 35 tio, ja

Y^1 merkitsee samaa kuin Y edellä tai Y^1 on suojattu hydr-
oksiryhmä tai hartsi, joka poistettaessa muodostaa osan,
joka on hydroksi tai amino, sillä ehdolla, että kun Y^1
merkitsee muuta kuin hartsia, ainakin yksi ryhmistä Z^1 ,
5 Q^1 ja Y^1 merkitsee suojaryhmää tai sisältää suojaryhmän,
poistetaan suojaryhmä tai -ryhmät ja/tai hartsi, ja halut-
taessa näin saatu peptidi muutetaan happoadditiosuolaksi
ja/tai hapetetaan vastaavaksi sulfoksidiksi tai sulfoniksi.

Yleisen kaavan II mukaiset peptidit ja peptidijoh-
10 dannaiset valmistetaan peptideille tavanomaisella tavalla.
Tavallisin menetelmä näiden peptidien valmistamiseksi on
liittää tarvittavat aminohapot kondensaatiolla, joko homo-
geenisessä faasissa tai ns. kiinteän faasin avulla.

Kondensaatio homogeenisessä faasissa voidaan toteut-
15 taa seuraavasti:

a) yhdisteen (aminohappo tai peptidi), jossa on
vapaa karboksyyliiryhmä ja suojattuja muita reaktiokykyisiä
ryhmiä, kondensaatiolla yhdisteen (aminohapon, peptidin
tai amiinin) kanssa, jossa on vapaa aminoryhmä ja suojat-
20 tuja muita reaktiivisia ryhmiä, kondensaatioaineen läsnä-
ollessa,

b) yhdisteen (aminohappo tai peptidi), jossa on ak-
tivoitu karboksyyliiryhmä ja, valinnaisesti, muita suojat-
tuja reaktiivisia ryhmiä, kondensaatiolla yhdisteen (ami-
25 nohapon, peptidin tai amiinin) kanssa, jossa on vapaa ami-
noryhmä ja, valinnaisesti, suojattuja muita reaktiivisia
ryhmiä, ja

c) yhdisteen (aminohappo tai peptidi), jossa on
vapaa karboksyyliiryhmä ja suojattuja muita reaktiivisia
30 ryhmiä, kondensaatiolla yhdisteen (aminohapon, peptidin
tai amiinin) kanssa, jossa on aktivoitu aminoryhmä ja,
valinnaisesti, suojattuja muita reaktiokykyisiä ryhmiä.

Karboksyyliiryhmän aktivointi voi mm. tapahtua muut-
tamalla karboksyyliiryhmä happohalogeniksi, atsidiksi, an-
35 hydridiksi, imidatsolidiksi tai aktivoiduksi esteriksi,

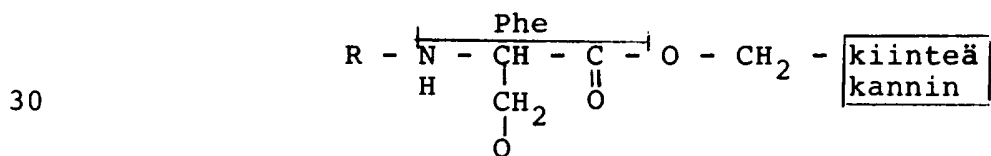
kuten N-hydroksi-sukkiini-imidiksi, N-hydroksi-bentstriatsoliksi tai p-bentstriatsoliksi tai p-nitrofenyyliesteriksi.

Aminoryhmä voidaan aktivoida muuttamalla se fosfiittiamidiksi tai käyttämällä "fosforatso"-menetelmää.

Tavallisimmat menetelmät edellä esitettyjä kondensaatioreaktioita varten ovat: karbodi-imidi-menetelmä, atsidimenetelmä, seka-anhydridimenetelmä sekä aktivoitujen estereiden menetelmä, kuten E. Schröder ja K. Lübke ovat kuvanneet julkaisussa "The Peptides", nide I, 1965 (Academic Press).

On kuitenkin myös mahdollista valmistaa kaavan II mukaisia yhdisteitä Merrifield'in "kiinteäfaasi"-menetelmällä, joka on selostettu julkaisussa J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) s. 2149. Valmistettavien peptidien aminohappojen liittäminen alkaa karboksi-päätepuolelta. Tätä varten tarvitaan kiinteä kannin, jossa on läsnä reaktiokykyisiä ryhmiä tai johon tällaisia ryhmiä voidaan kiinnittää. Tämä kannin voi olla, esimerkiksi, styreenin ja divinyylibentseenin kopolymeeri, jossa on reaktiivisia kloorimetyyliryhmiä tai polymeerikannin, joka on tehty reaktiiviseksi hydroksimetyyli- tai bentsyyliamiiniryhmillä.

Jos käytetään esimerkiksi kanninta, joka sisältää kloorimetyyliryhmiä, tapahtuu ensimmäinen α -aminosuojatun aminohapon sitominen kantimeen esterisidoksen kautta. Kaavan II mukaisen peptidin synteesissä tämä reaktio antaa siten:



jossa R on α -aminosuojaryhmä.

Ryhmän R poistamisen jälkeen jälkeentuleva α -aminosuojattu aminohappo (esimerkiksi lysiini, jonka ϵ -aminoryhmä on myös suojattu), voidaan liittää kondensaatio-

77874

reaktiolla ja α -aminoryhmän suojauksen purkamisen jälkeen seuraava aminohappo voidaan liittää mukaan jne.

Halutun aminohapposekvenssin synteesin jälkeen kaa-
van II mukainen peptidi vapautetaan kantajasta esimerkik-
si nestemäisen fluorivedyn, trimetaanisulfonihapon tai me-
taanisulfonihapon avulla, liuotettuna trifluorietikkahap-
poon. Peptidi voidaan poistaa kantajasta mm. pilkkomalla
ammoniakilla, jolloin saadaan peptidin amidi.

Reaktiokykyiset ryhmät, joiden ei tule osallistua
10 kondensaatioreaktioon, suojataan tehokkaasti, kuten todet-
tiin, ryhmillä, jotka voidaan jälleen hyvin helposti pois-
taa, esimerkiksi hydrolyysillä tai pelkistämällä. Siten
karboksyyli-ryhmä voidaan tehokkaasti suojata, esimerkiksi
esteröimällä metanolilla, etanolilla, tertiäärisellä buta-
15 nolilla, bentsyylialkoholilla tai p-nitrobentsyylialkoho-
lilla.

Ryhmät, jotka voivat tehokkaasti suojata aminoryh-
män, ovat tavallisesti happoryhmiä, esimerkiksi happoryh-
mä, joka on johdettu alifaattisesta, aromaattisesta, arali-
20 faattisesta tai heterosyklisestä karboksyylihaposta, kuten
etikkahaposta, bentsoehaposta tai pyridiinikarboksyyliha-
posta tai happoryhmä, joka on johdettu hiilihaposta, ku-
ten etoksikarbonyyli-, bentsyylioksikarbonyyli-, t-butok-
sikarbonyyli- tai p-metoksi-bentsyylioksikarbonyyli-ryhmä
25 tai happoryhmä, joka on johdettu sulfonihaposta, kuten
bentseenisulfonyyli- tai p-tolueenisulfonyyli-ryhmä, mutta
voidaan käyttää myös muita ryhmiä, kuten substituoituja
tai substituoimattomia aryyli- tai aralkyyli-ryhmiä, esi-
merkiksi bentsyyli- ja trifenyylimetyyli-ryhmiä tai ryhmiä,
30 kuten orto-nitrofenyylisulfonyyli ja 2-bentsoyyli-1-metyy-
livinyyli.

On suotavaa suojata myös lysiinin ϵ -aminoryhmä ja
arginiinin guanidiiniryhmä. Tavanomaisia suojaryhmiä täs-
sä yhteydessä ovat lysiinille tertiäärinen butoksikarbo-
nyyli-ryhmä tai tosyyliryhmä ja arginiinille nitro- tai
35 Mbs-ryhmä (4-metoksibentseenisulfonyyli).

Suojaryhmät poistetaan kaavan II mukaisista yhdisteistä tavanomaisia menetelmiä käyttäen riippuen kyseessä olevan ryhmän tyypistä, esimerkiksi trifluorietikkahapon avulla tai pelkistämällä lievästi, esimerkiksi vedyllä ja katalyytillä, kuten palladiumilla tai hydrobromidilla jääetikassa.

Kaavan I mukaisia peptidejä, joissa Met_x on happoradikaali $\text{Met}(\text{O})$, voidaan valmistaa vastaavista Met-peptideistä sinänsä tunnetulla lievällä hapetuksella, esimerkiksi laimealla vetyperoksidilla tai perhapolla. Tällainen hapettaminen antaa S- ja R-sulfoksidien seoksen, joka voidaan erottaa yksittäisiksi diastereoisomeereiksi sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi selektiivisesti kiteyttämällä. Käyttämällä metioniini-S- (tai R-) sulfoksidia kaavan II mukaisen peptidin synteesissä yksittäiset diastereoisomeerit voidaan saada myös suoraan.

Kaavan I mukaisia sulfonipeptidejä, joissa Met_x on happoradikaali $\text{Met}(\text{O}_2)$, voidaan valmistaa hapettamalla vastaava kaavan I mukainen Met-peptidi tai käyttämällä metioniini-sulfonia kaavan II mukaisen peptidin synteesissä.

Kaavan I mukaisen peptidi voidaan muuttaa happoadditiosuolaksi peptidin reaktiolla hapon, kuten kloorivetyhapon, hydrobromidin, fosforihapon, rikkihapon, etikkahapon, maleiinihapon, viinihapon, sitruunahapon, polyglutamiinihapon, karboksyylimetyyliselluloosan, jne. kanssa.

Amidit, joita ensisijaisesti käytetään, ovat substituoimattomia amideja.

Kuten jo edellä mainittiin, on kaavan I mukaisilla peptideillä jännitystä laukaiseva vaikutus, josta syystä ne ovat sopivia mm. jakomielitaudin hoitoon.

Kaavan I mukaisia peptidejä voidaan antaa ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti, kielenalaisesti, nenänsisäisesti, peräsuolen kautta tai suun kautta. Näistä ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti ja nenänsisäisesti antamista on pidettävä edullisina, koska tällaisilla antotavoilla peptidin imeytyminen on suurin. Peptidit sekoitetaan sen tähden edullisesti farmaseuttisesti hyväksyttävien apuaineiden kanssa, jotka tekevät peptidit sopiviksi ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai nenänsisäisesti annettaviksi, jolloin syntyy liuoksia, suspensioita (missä on sopivaa mikrokapseloinnin kautta), emulsioita ja suihkeita.

Sekoitetuina sopivien apuaineiden kanssa, näitä peptidejä voidaan käyttää myös muodossa, joka on sopiva suun kautta antamiseksi, kuten pillereinä, tabletteina ja rakeina. Näitä peptidejä voidaan antaa myös peräpuikon muodossa.

Keksinnön mukaisia peptidejä tai peptidijohdannaisia käytetään edullisesti 1 µg:n - 5 mg:n annoksissa/kg kehon painoa päivässä ruoansulatuskanavan ulkopuolista antamista varten. Suositeltu annos ihmisille annettavaksi on väliltä 0,3 - 30 mg, erityisesti väliltä 1 - 10 mg päivässä. Nenänsisäistä ja peräsuolensisäistä antamista varten annos on yleensä 10 - 100 kertaaisesti suurempi ja suun kautta antamista varten se on 100 - 1000 -kertaaisesti suurempi.

Seuraava on huomattava seuraavien esimerkkien suhteen.

I. Missä mitään optista konfiguraatiota ei ole mainittu, tarkoitetaan L-muotoa.

II. Seuraavia lyhennyksiä käytetään käytetyille suojaryhmille tai aktivoiville ryhmille:

Boc	=	tertiaarinen butoksikarbonyyli
tBu	=	tertiaarinen butyyli
Me	=	metyyli
ONp	=	p-nitrofenoksi
Z	=	bentsyylioksikarbonyyli
Fmoc	=	9-fluorenyylimetoksikarbonyyli
Ac	=	asetyyli

III. Seuraavia lyhennyksiä käytetään käytetyille liuottimille tai reagensseille:

- To = tolueeni
 EtOH = etanoli
 5 BuOH = butanoli
 Py = pyridiini
 HOAc = etikkahappo
 EtOAc = etyyliasettaatti
 tBuOH = tert-butanoli
 10 DMF = dimetyyliformamidi
 DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi
 DCU = disykloheksyyliurea
 TFA = trifluorietikkahappo
 Wa = vesi
 15 HOBt = N-hydroksibentstriatsoli

IV. Seuraavia lyhennyksiä käytetään aminohapporyhmille:

- Met = metionyyli
 Met(O) = metionyylin sulfoksidi
 20 Met(O₂) = metionyylin sulfoni
 Lys = lysyyli
 Gly = glysyli
 Phe = fenyyli-alanyli
 Arg = arginyyli
 25 Ala = alanyli
 β -Ala = β -alanyli
 Val = valyyli

Esimerkki 1

H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH:n synteesi

- 30 (1) Boc-Gly-Gly-Phe-Met-OH

Tämä peptidi saadaan, kuten julkaisussa Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 99, (1980), s. 63 on selostettu.

(2) H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH

- Suojattu dipeptidi Z-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu vapautettiin
 35 suojaryhmästä Z ennen liittämistä kohdassa 1(1) saatuun peptidiin. Tätä tarkoitusta varten dipeptidi liuotettiin DMF:ään, minkä jälkeen lisättiin Pd/C-katalyyttiä (vahvuus 10 %) ja H₂ johdettiin seoksen läpi kunnes CO₂:ta ei enää

vapautunut. Sen jälkeen katalyytti suodatettiin pois.

Kohdassa 1(1) saatu peptidi sekä myös 1,1 ekvivalenttia DCC ja 2 ekvivalenttia HOBt lisättiin täten suojauksesta purettuun peptidiin H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu, minkä jälkeen
5 reaktioseosta sekoitettiin kaksi tuntia 0°C:ssa ja sitten 12 tuntia huoneen lämpötilassa. DCU:n sakka suodatettiin sitten pois, suodos haihdutettiin ja jäännös kiteytettiin EtOH/EtOAc (1:2)-seoksesta. Tämän suojatun peptidin Rf To/EtOH:ssa (4:1) oli 0,73.

10 Tämä peptidi vapautettiin suojaryhmistä 90-%:isessa TFA:ssa plus anisolissa N₂-kaasuvirran alaisena, minkä jälkeen lisättiin eetteriä ja sakka suodatettiin pois ja liuotettiin uudelleen t-BuOH/Wa-seokseen (1:1). Ioninvaihtajaa asetaattimuodossa (LEWATIT®) lisättiin sen jälkeen ja seosta
15 sekoitettiin 40 minuuttia. Sen jälkeen ioninvaihtaja suodatettiin pois ja suodos puhdistettiin vastavirtajakamisella BuOH/HOAc/Wa (4:1:5)-seoksessa.

Rf BuOH/Py/HOAc/Wa (8:3:1:4) = 0,64.

Esimerkki 2

20 H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Arg-Phe-OH:n synteesi

(1) Boc-Gly-Gly-Phe-Met-OH

Tämä on jo selostettu esimerkissä 1(1).

(2) Z-D-Arg(NO₂)-Phe-OtBu

Ekvimolaariset määrät Z-D-Arg(NO₂)-OH ja H-Phe-OtBu
25 liuotettiin DMF:ään ja liitettiin lisäämällä DCC ja HOBt esimerkissä 1(2) kuvatuissa olosuhteissa. DCU suodatettiin pois ja suodoksen orgaanista EtOAc-kerrosta uutettiin peräkkäin hapolla, emäksellä ja vedellä, kuivattiin ja kiteytettiin EtOAc-heksaani-seoksesta. Peptidillä, joka sen jälkeen puhdistettiin SiO₂-pylvään avulla, Rf on 0,52 To/EtOH:ssa
30 (4:1).

(3) H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Arg-Phe-OH

Esimerkissä 2(2) saatu peptidi hydrattiin ja liitettiin kohdassa 2(1) saatuun peptidiin ja liitäntätuote vapautettiin sen jälkeen suojaryhmistä esimerkissä 1(2) kuvatulla tavalla.
35

Näin saatu heksapeptidi puhdistettiin SiO_2 -pylväällä BuOH/Py/HOAc/Wa (20:3:1:4)-seoksen avulla ja sen R_f -arvo on 0,46 BuOH/Py/HOAc/Wa (8:3:1:4)-seoksessa.

Esimerkki 3

5 H-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-D-Phe-OH:n synteesi

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

Tämä peptidi valmistettiin kytkemällä Z-Lys(Boc)-OH H-D-Phe-OtBu:n kanssa DCC/HOBt-seoksen läsnäollessa kohdassa 1 (2) kuvatulla tavalla ja kiteytettiin uudelleen eetteri/petrolieetteristä (1:3). R_f = 0,60 To/eetteri (4:1)-seoksessa.

(2) H-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-D-Phe-OH

Kohdan (1) mukaisesti saatu peptidi hydrattiin ja liitettiin Boc-Gly-Gly-Phe-Met-OH:hon, vapautettiin suojaryhmistä ja puhdistettiin, kuten esimerkissä 1 (2) selostettiin.

Näin saadun heksapeptidin R_f on 0,40 BuOH/PY/HOAc/Wa (8:3:1:4)-seoksessa.

Esimerkki 4

20 Seuraavat peptidit valmistetaan samalla tavalla, joka kuvattiin esimerkeissä 1 - 3:

H-Ala-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH, R_f = 0,48

H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-NH₂, R_f = 0,46

Ac-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH, R_f = 0,51

25 β -Ala-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH, R_f = 0,39.

R_f :t saatu BuOH/Py/HOAc/Wa (8:3:1:4)-seoksesta (SiO_2 :lla).

Esimerkki 5

H-Gly-Gly-Phe-Met(O)-D-Lys-Phe-OH:n synteesi

30 1,0 g (1,34 mmol) H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH liuotettiin 80 ml:aan etikkahappoa, minkä jälkeen lisättiin 10 ekvivalenttia (13,4 mmol) vetyperoksidia (30 %:n vahvuisena vesipitoisena liuoksena).

35 Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu n. 30 minuuttia huoneen lämpötilassa, lisättiin vasta valmistettua platinaa. Tämän platinakatalyytin valmistamiseksi suspendoitiin 5,4 g PtO_2 etikkahappoon ja vetyä ja typpeä johdettiin suspension läpi 30 minuutin ajan.

15 minuutin sekoittamisen jälkeen reaktioseos suodattettiin ja suodos haihdutettiin. Jäännös puhdistettiin vastavirtajakamisella BuOH/HOAc/Wa (4:1:5)-seoksessa. Saanto oli 600 mg. $R_f = 0,26$ 1-BuOH/Py/HOAc/Wa-seoksessa (8:3:1:4).

5 Esimerkki 6

H-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys-Phe-OH:n synteesi

1,0 g (1,34 mmol) H-Gly-Gly-Phe-Met(O_2)-D-Lys-Phe-OH liuotettiin 10 ml:aan Wa ja 0,14 ml:aan (70 %:n vahvuus) $HClO_4$. Lisättiin 2,2 ekvivalenttia vetyperoksidia ja 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu 10 n. kaksi päivää vetyperoksidiylimäärä hävitettiin lisäämällä NaHSO₃, minkä jälkeen pH asetettiin seitsemään ja liuos pakastekuivattiin.

15 Saatu peptidi puhdistettiin osittain vastavirtajakamisella 1-BuOH/HOAc/Wa-seoksessa (4:1:5).

800 mg näin saatua tuotetta puhdistettiin edelleen SiO₂-pylväässä käyttäen liikkuvana faasina 1-BuOH/Py/HOAc/Wa-seosta (8:3:1:4). $R_f = 0,33$ edellä mainitussa 1-BuOH/Py/HOAc/Wa-seoksessa.

20 Esimerkki 7

Seuraavat peptidit valmistettiin tavalla, joka vastaa esimerkeissä 5 ja 6 kuvattuja valmistustapoja:

Ac-Gly-Phe-Met(O)-D-Lys-Phe-OH, $R_f = 0,33$

H-Gly-Gly-Phe-Met(O_2)-Lys-D-Phe-OH, $R_f = 0,29$.

25 R_f :t saatu BuOH/Py/HOAc/Wa (8:3:1:4)-seoksessa (SiO₂:lla).

Esimerkki 8

H-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Phe-OH:n synteesi "kiinteä faasi" menetelmällä

(1) Hartsin valmistus jähmeää faasia varten

30 Lähtien styreenin ja 1 %:n divinyylibentseeniä kloorimetyloidusta kopolymeeristä valmistettiin vastaava p-hydroksibentsyylialkoholihartsin menetelmän mukaisesti, jonka on selostanut S.S. Wang (J. Amer. Chem. Soc. 95, (1973), s. 1328).

(2) Fmoc-Phe-[kiinteä kannin]

10,9 millimoolia Fmoc-Phe-OH liuotettuna 40 ml:aan DMF liitettiin 10 g:aan hartsia (7 mmol), joka oli valmistettu kohdan 8 (1) mukaisesti, 160 ml:ssa metyleenidikloridia Meienhofer'in et al. menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Int. J. Peptide Protein Res. 13(1979) ss. 35-42.

(3) Boc-Gly-Gly-Phe-Met-D-Lys(Boc)-Phe-[kiinteä kannin]

Lähtien Fmoc-Phe-[kiinteä kannin]:sta liitettiin mukaan peräkkäin suojatut aminohapot Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH ja Boc-Gly-OH. Suojaryhmien poistaminen ja liittäminen suoritettiin, kuten seuraavassa on selostettu viimeiselle liitännävaiheelle, nimittäin Boc-Gly-OH:n liitännälle H-Gly-Phe-Met-D-Lys(Boc)-Phe-[kiinteä kannin]:een.

10 g Fmoc-Gly-Phe-Met-D-Lys(Boc)-Phe-[kiinteä kannin] vapautettiin suojaavasta Fmoc-ryhmästä pesemällä peräkkäin kolme kertaa 60 ml:lla DMF, kahdesti 60 ml:lla 50-%:n vahvuista piperidiiniä DMF:ssa, kahdesti 60 ml:lla dioksaani/Wa (2:1) ja kuusi kertaa 60 ml:lla DMF.

6,6 millimoolia (3 ekvivalenttia) Boc-Gly-OH ja 3 ekvivalenttia DCC ja HOBt lisättiin tuotteeseen, josta suojaus oli purettu. Liitännäreaktion loputtua peptidi-hartsi pestiin peräkkäin 60 ml:lla EtOH ja 60 ml:lla DMF.

(4) Peptidin poistaminen kiinteästä kantimesta

11 g edellä kuvattua tuotetta pestiin 60 ml:lla metyleenidikloridia ja vietiin sitten 70 ml:aan TFA/metyleenidikloridia (1:1), johon oli lisätty 0,1 ml tioanisolia.

Kahden tunnin kuluttua jähmeä faasi suodatettiin pois ja pestiin 10 %:n vahvuisella HOAc:lla.

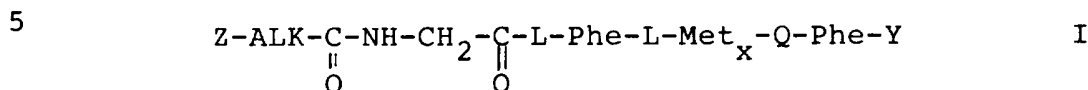
Suodos haihdutettiin kuiviin tyhjössä ja jäännös, liuotettuna 30 ml:aan tBuOH/H₂O, saatettiin sen jälkeen ioninvaihtajalla muuttumaan asetaattimuotoon.

Sen jälkeen seos suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin tyhjössä.

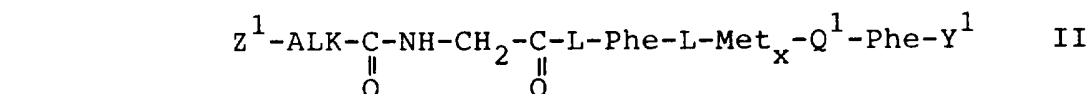
Jäännös puhdistettiin SiO₂-pylväässä käyttäen 1-BuOH/Py/HOAc/Wa-seosta (8:3:1:4). Saanto oli 0,27 g. Rf on 0,64 BuOH/Py/HOAc/Wa /8:3:1:4)-seoksessa (SiO₂:lla).

Patenttivaatimus

Menetelmä uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi, joilla on yleinen kaava I



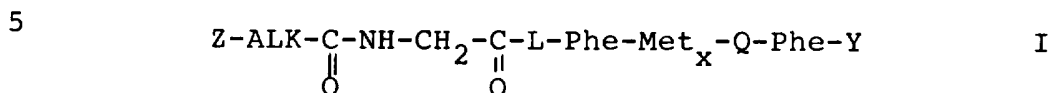
jossa Z on vety tai amino,
 ALK on alkyleeni- tai alkylideeniryhmä, jossa on 1 tai 2
 10 hiiliatomia,
 Met_x on aminohapporadikaali Met, Met(O) tai Met (O₂),
 Q on aminohapporadikaali Lys tai Arg, sillä ehdolla, että
 toinen aminohapporadikaaleista Q ja C-pääte-Phe on D-kon-
 figuraatiossa ja toisella on L-konfiguraatio, ja
 15 Y on hydroksi tai amino, ja niiden happoadditiosuolojen
 valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että peptidistä,
 jolla on kaava II



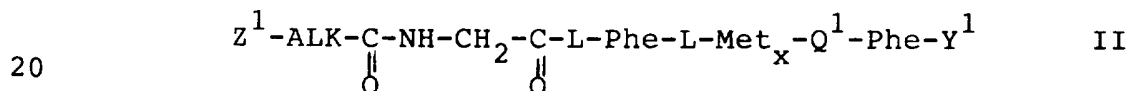
20 jossa ALK ja Met_x merkitsevät samaa kuin edellä,
 Z¹ merkitsee samaa kuin Z edellä tai Z¹ on aminoryhmä,
 joka on suojattu N-suojaryhmällä,
 Q¹ merkitsee samaa kuin Q edellä tai Q¹ merkitsee (ε-ami-
 25 no)-suojattu lysyyliä tai (guanidyyli)-suojattua arginyy-
 liä, sillä ehdolla, että toinen radikaaleista Q¹ ja C-pää-
 te-Phe on D-konfiguraatiossa ja toisella on L-konfiguraa-
 tio, ja
 Y¹ merkitsee samaa kuin Y edellä tai Y¹ on suojattu hydr-
 30 oksiryhmä tai hartsi, joka poistettaessa muodostaa osan,
 joka on hydroksi tai amino, sillä ehdolla, että kun Y¹
 merkitsee muuta kuin hartsia, ainakin yksi ryhmistä Z¹,
 Q¹ ja Y¹ merkitsee suojaryhmää tai sisältää suojaryhmän,
 poistetaan suojaryhmä tai -ryhmät ja/tai hartsi, ja halut-
 35 taessa näin saatu peptidi muutetaan happoadditiosuolaksi
 ja/tai hapetetaan vastaavaksi sulfoksidiksi tai sulfoniksi.

Patentkrav

Förfarande för framställning av nya, terapeutiskt användbara peptider med den allmänna formeln I



vari Z är väte eller amino,
ALK är en alkylen- eller alkylidengrupp med 1 eller 2 kol-
10 atomer,
Met_x är aminosyraradikalen Met, Met(O) eller Met(O₂),
Q är aminosyraradikalen Lys eller Arg, med det förbehållet
att en av aminosyraradikalerna Q och C-terminal-Phe är i
D-konfigurationen och den andra har L-konfigurationen, och
15 Y är hydroxi eller amino, samt syraadditionssalter därav,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man avlägsnar skydds-
gruppen eller -grupperna och/eller hartset av en peptid
med formeln II



vari ALK och Met_x betecknar samma som ovan,
Z¹ betecknar samma som Z ovan eller Z¹ är en aminogrupp
som skyddats med en N-skyddsgrupp,
25 Q¹ betecknar samma som Q ovan eller Q¹ betecknar en (ε-
amino)-skyddad lysyl eller en (guanidyl)-skyddad arginyl,
med det förbehållet att en av radikalerna Q¹ och C-termi-
nal-Phe är i D-konfigurationen och den andra har L-konfigu-
rationen, och
30 Y¹ betecknar samma som Y ovan eller Y¹ är en skyddad hydr-
oxigrupp eller ett harts som vid avlägsningen bildar en
del som är hydroxi eller amino, med det förbehållet, att
då Y¹ betecknar annat än harts, åtminstone en av grupper-
na Z¹, Q¹ och Y¹ betecknar skyddsgrupp eller innehåller en
35 skyddsgrupp, och ifall önskvärt, omvandlar den sålunda er-
hållna peptiden till ett syraadditionssalt och/eller oxi-
derar den till motsvarande sulfoxiden eller sulfonet.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-