

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 801344 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **801344**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **25.04.1980**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.04.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.10.1980**

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

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

26.04.1979 US 33641

19.11.1979 US 95744

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Ortho Pharmaceutical Corporation, U.S. Route 202, Raritan, NJ 08869-0602, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Heavner, George, 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 tetrapeptidin H-SAR-LYS-GLN-NH₂ valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av tetrapeptiden H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂.

Ortho Pharmaceutical Corporation, U.S. Route 202, Raritan, New Jersey, Yhdysvallat

Menetelmä tetrapeptidin H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av tetrapeptiden H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂

Keksinnön kohteena on menetelmä käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi ja erityisesti liuossynteesimenetelmä peptidin H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ ja sen valmistuksessa käytettävät yhdisteet.

FI-patenttihakemus 783769, jonka nimi on "Uusia tetrapeptidejä ja menetelmiä niiden valmistamiseksi" käsittelee uusia peptidejä, joilla on käyttöä immunologiassa ja kateenkorvan funktion korvaajina. Tämän yhdisteluokan eräällä edullisella edustajalla on kaava H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂. Tässä viitejulkaisussa tetrapeptidejä valmistettiin kiinteäfaasisynteesimenetelmällä, jota yleisesti nimitetään Merrifield-synteesiksi. Siinä esitettiin myös, että tämän tetrapeptidiyhdisteluokan valmistuksessa voidaan käyttää klassista menetelmää (so. liuossynteesimenetelmää). Viitejulkaisussa ei esitetty erikseen klassista menetelmää tai synteesiä.

Merrifield'in kiinteäfaasisynteesin ollessa sopiva menetelmä valmistettaessa pieniä määriä peptidejä laboratoriossa se on yleensä epäkäytännöllinen ja epätaloudellinen suurien määrien (esim.

yli 100 g:n määrien) valmistukseen, joiden valmistukseen liuos-
tekniikka on sopivampi. Liuossysteensitekniikka on lisäksi yleensä
huomattavasti halvempi kuin kiinteäfaasitekniikka, sillä siinä
tarvitaan pienempiä määriä reagensseja, ja joidenkin siinä tar-
vittavien reagenssien yksikköhinta on huomattavasti alhaisempi
kuin kiinteäfaasitekniikan reagenssien yksikköhinta. Polypeptidien
valmistuksessa liuossynteesitekniikalla on olemassa monia vaihto-
ehtoisia menetelmiä, joista hakija on keksinyt sopivan, erityisen
edullisen menetelmän halutun tetrapeptidiamidin valmistamiseksi
taloudellisesti.

Laajimmassa mielessä esillä olevan keksinnön kohteena on
menetelmä H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂:n valmistamiseksi seuraavilla
reaktiovaiheilla:

- a) muodostetaan fragmentti I, joka on Z-SAR- ϵ Z'-LYS-OH,
kuten jäljempänä kuvataan;
- b) muodostetaan fragmentti II, joka on H-SAR-GLN-NH₂,
kuten jäljempänä kuvataan;
- c) fragmentti I ja fragmentti II liitetään yhteen, jolloin
saadaan suojattu tetrapeptidi;
- d) suojattu tetrapeptidi puhdistetaan (valinnainen vaihe);
- e) suojaryhmät Z ja Z' poistetaan, ja
- f) saatu tetrapeptidi eristetään ja puhdistetaan.

Fragmentti I voidaan valmistaa seuraavilla vaiheilla:

- i) sarkosiinin α -aminoryhmä suojataan saattamalla sarko-
siini reagoimaan reagenssin kanssa, jolla siihen saadaan liitetyksi
suojaryhmä Z;
- ii) L-lysiinin ϵ -aminoryhmä suojataan saattamalla L-lysiini
reagoimaan reagenssin kanssa, jolla siihen saadaan liitetyksi suo-
jaryhmä Z' siten, että se erityisesti suojaa ϵ -aminoryhmän;
- iii) vaiheessa i) valmistettu suojattu sarkosiini aktivoi-
daan siten, että amiini pystyy nukleofiiliseen reaktioon karboksi-
ryhmän kanssa, jolloin muodostuu karboksiaktivoitu suojattu sarko-
siini, kuten jäljempänä kuvataan;
- iv) karboksiaktivoitu suojattu sarkosiini saatetaan reagoi-
maan vaiheessa ii) muodostetun ϵ -suojatun L-lysiinin kanssa, jol-
loin saadaan fragmentti I.

Fragmentti II voidaan valmistaa seuraavilla vaiheilla:

i) valmistetaan $Z''\text{-GLN-NH}_2$, jossa Z'' on L-glutamiiniamidin α -aminoryhmän suojaryhmä;

ii) suojaryhmä poistetaan edellä vaiheessa i) valmistetusta yhdisteestä edullisesti katalyyttisesti hydraamalla, jolloin saadaan suojaamaton L-glutamiiniamidi;

iii) suojaamaton L-glutamiiniamidi saatetaan reagoimaan edellisen kappaleen vaiheessa iii) valmistetun karboksiaktivoidun suojatun sarkosiinin kanssa, jolloin saadaan $Z\text{-SAR-GLN-NH}_2$; ja

iv) $Z\text{-SAR-GLN-NH}_2$:sta poistetaan suojaryhmä edullisesti katalyyttisesti hydraamalla, jolloin saadaan fragmentti II.

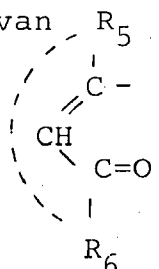
Suojaryhmät Z ja Z' voivat olla samoja tai erilaisia ryhmiä, joiden tulee olla pysyviä reaktiovaiheissa, joissa aminoryhmät liitetään ja silti helposti poistettavissa liittämisreaktioiden suorittamisen jälkeen olosuhteissa, joissa mikään peptidin amidisisokdista ei hajoa. Suojaryhmä Z'' voi olla sama tai erilainen kuin ryhmät Z ja Z' , ja sen tulee olla helposti poistettavissa olosuhteissa, joissa L-glutamiiniamidi ei hajoa, ja sen tulee olla pysyvä glutamiinin tai glutamiinihapon muodostusvaiheissa riippuen siitä, mitä reaktiotietä käytetään suojatun L-glutamiiniamidin valmistamiseen. Esimerkkejä sopivista aminosuojaryhmistä ovat:

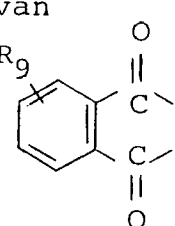
a) kaavan $R_1\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}$ mukaiset ryhmät, joissa R_1 on aryyli (kuten fenyyli, tolyyli tai ksyyli); adamantyyli; monosubstituoitu metyyli (kuten allyyli, β -syaanietyyli, fluorenyylimetyyli, bentsyyli tai bentsyyli, jonka fenyyllirenkaassa on 1-3 substituenttia seuraavista: halogeeni, nitro, alempialkyyli tai alempialkoksi); disubstituoitu metyyli (kuten di-isopropyylimetyyli, difenylimetyyli, sykloheksyyli, syklopentyyli tai vinyyli); trisubstituoitu metyyli (kuten tert.-butyyli, tert.-amyyli, dimetyylitrifluorimetyylimetyyli tai dimetyylibifenylimetyyli);

b) kaavan $R_2\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}$ mukaiset ryhmät, joissa R_2 on C_{2-4} -alempi-alkyyli, kuten etyyli, isopropyli, tert.-butyyli jne., tai C_{1-4} -alempialkyyli, jossa on 1-5 halogeeni substituenttia, kuten trifluorimetyyli, kloorimetyyli, pentakloorietyyli jne;

c) kaavan $R_3O-\overset{\overset{X}{\parallel}}{\underset{\underset{OR_4}{|}}{P}}-$ mukaiset ryhmät, joissa X on S tai

O, ja R_3 ja R_4 ovat kumpikin bentsyyli tai alempialkyyli;

d) kaavan  mukaiset ryhmät, joissa R_5 ja R_6 merkitsevät erikseen kumpikin alempialkyyliä tai yhdessä ryhmää $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{R}_7)(\text{R}_8)-\text{CH}_2-$, jossa R_7 ja R_8 merkitsevät kumpikin vetyä tai alempialkyyliä; ja

e) kaavan  mukaiset ryhmät, joissa R_9 on vety, metyyli, halogeeni tai nitro.

Aminosuojaryhmä e) on bidentaattinen (kaksi sidoskohtaa), ja sitä voidaan käyttää vain L-lysiinin δ -aminoryhmän ja L-glutamiinin α -aminoryhmän suojaamiseen, muttei sarkosiinin α -aminoryhmän suojaamiseen. α -aminoryhmän suojaryhmän on oltava monodentaattinen johtuen aminoryhmässä olevasta metyyliisubstituentista. Muita aminosuojaryhmiä voidaan käyttää kaikkiin aminohappoihin.

Tässä käytettynä ilmaisu "halogeeni" tarkoittaa fluoria, klooria, bromia ja jodia, edullisesti klooria tai bromia. Ilmaisuilla "alempialkyyli" ja "alempialkyyli" ja "alempialkoksi" tarkoitetaan tyydyttyneitä alifaattisia hiilivetyryhmiä, joissa on 1-6 hiiliatomia, kuten metyyliä, etyyliä, isopropyyliä, tert.-butyyliä, n-heksyyliä ja vastaavia alkoksiryhmiä, kuten metoksia, etoksia, isopropoksia, tert.-butoksia, n-heksoksia jne. Edullinen alempialkyyli on metyyli ja edullinen alempialkoksi on metoksi.

Näiden suojaryhmien liittämiseen käytetyistä reagenssista (jotka ovat tavallisesti vastaavia happoklorideja, vaikka myös muita johdannaisia voidaan käyttää) käytetään tässä joskus nimitystä "suojaryhmäreagenssi". Muita sopivia suojaryhmiä on esitetty esimerkiksi teoksessa "Protective Groups in Organic Chemistry",

J.F.W. McOmie, Plenum Press, N.Y., 1973.

Z ja Z' ovat edullisesti samoja ryhmiä ja varsinkin bent-syylioksidikarbonyyli- (CBZ) tai trifluoriasetyyli- (TFA) ryhmiä. Eräässä edullisessa toteutusmuodossa kaikki kolme ryhmää Z, Z' ja Z'' ovat samoja ryhmiä ja ovat joko CBZ tai TFA.

Edellä kuvatun karboksiaktivoitun suojatun sarkosiinin valmistuksessa voidaan käyttää monia erilaisai reagensseja.

Karboksiaktivoitu suojattu sarjosiini voi olla tyypiltään esimerkiksi reaktiivinen esteri. Esimerkkejä reagenssista, joita voidaan käyttää sopivien sarkosiinien aktiivisten esterien valmistukseen, ovat fenoli; fenoli, jonka fenyylirengas on substituoitu 1-5 seuraavista substituentteista: halogeeni (esim. kloori tai fluori), nitro, syaani ja metoksi; tiofenyyli; N-hydroksiftaaliimidi; N-hydroksisukkinimidi; N-hydroksiglutarimidi; N-hydroksibentsamidi, 1-hydroksibentsotriatsoli jne. Muita sopivia reagensseja on esitetty esimerkiksi edellä mainitussa teoksessa "Protective Groups in Organic Chemistry", J.F.W. McOmie. Jäljempänä esitetyissä esimerkeissä on käytetty N-hydroksisukkinimidiä.

Alalla tunnetaan myös muita aktivointimenetelmiä; voidaan käyttää esimerkiksi seka-anhydridejä tai symmetrisiä anhydridejä, happoklorideja, atsideja jne. Näitä menetelmiä on kuvattu esimerkiksi teoksessa Bodanszky et al., "Peptide Synthesis", 2. painos, 1976, s. 85-128.

Fragmentin II valmistuksen vaiheissa iii) ja iv) voidaan karboksiaktivoitun sarkosiinin sijasta käyttää sarkosiinin N-karboksianhydridiä, N-karboksianhydridien valmistusta on yleisesti kuvattu edellä mainitun Bodanszky'n et al. teoksen sivulta 97 alkaen. Fragmentin II valmistukseen käytetään edullisesti tätä syklistä sarkosiinianhydridiä, jolloin sen luonteesta johtuen sarkosiinin aminoryhmä ei tarvitse suoja-ryhmää. Tällöin suojaryhmän poistoa, so. vaihetta iv) ei tarvita. Tätä vaihtoehtoista menetelmävaihetta voidaan kuvata seuraavasti:

iii) suojaamaton L-glutamiini saatetaan reagoimaan sarkosiini-N-karboksianhydridin kanssa, jolloin saadaan fragmentti II.

Vaikka suojatun tetrapeptidin ja välituotteen Z''-GLN-NH₂ suojaryhmät poistetaan edullisesti katalyyttisesti hydraamalla, niin myös muita tunnettuja menetelmiä voidaan käyttää. Tällaisia

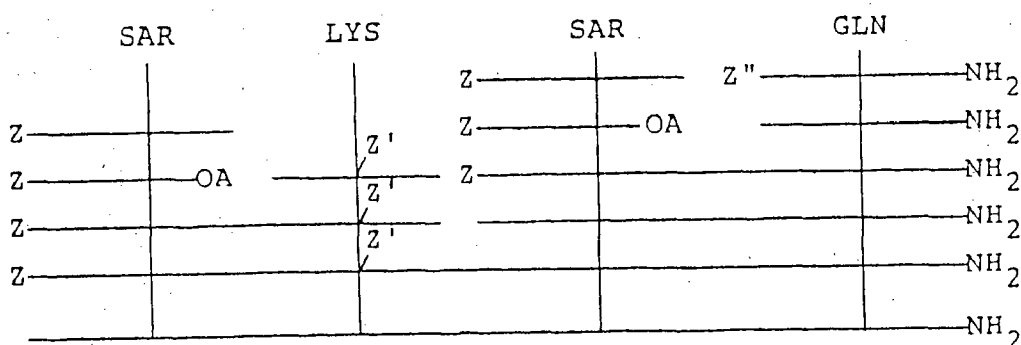
menetelmiä on kuvattu esimerkiksi edellä mainitun Bodansky'n et al. teoksen sivuilla 18-84 sekä edellä mainitussa McOmie'n teoksessa. Esimerkkeinä tällaisista menetelmistä voidaan mainita käsittely trifluorietikkahapolla tai muulla heikolla hapolla, pelkistys sinkillä 50-%:isen vesi-etikkahapon läsnäollessa, käsittely kloorivetyhapolla tai muulla vahvalla hapolla sekä käsittely vahvalla tai heikolla emäksellä, jolloin menetelmän valinta riippuu poistettavan ryhmän tai poistettavien ryhmien ja muiden reaktiivisten ryhmien laadusta.

Esillä olevan keksinnön mukainen tuote voidaan puhdistaa joko suojattuna tetrapeptidinä tai suojaryhmien poistamisen jälkeen. On havaittu, että suojattu tetrapeptidi (CBZ-suojaryhmät) voidaan sopivasti kiteyttää etyyliasetaat-metanoli-seoksesta. Todennäköisesti myös muita liuotinsysteemejä voidaan käyttää.

Kun liuosmenetelmällä syntetisoitujen peptidien puhdistukseen tarvitaan tyypillisesti monimutkaisia puhdistusohjelmia peräkkäisine eluointi- ja kiteytysvaiheineen, niin yllättäen on osoittautunut, että esillä olevan keksinnön mukaisesti syntetisoitu tetrapeptidi voidaan helposti puhdistaa yhdellä ainoalla eluoinnilla silikaageelipylväässä käyttämällä eluenttina alifaattisen alkoholin, alemmanalkaanihapon ja veden seosta. Alifaattinen alkoholi voi olla esimerkiksi isobutanoli, n-butanoli, isopropanoli, amyylialkoholi, isoamyylialkoholi tms., ja alempialkaanihappo voi olla muurahaihappo, etikkahappo, propionihappo tms. Sopiva eluenttiseos, jolla saadaan hyviä tuloksia, on esimerkiksi n-butanoli-etikkahappo-vesiseos suhteessa 10:2:5.

Keksinnön kohteena ovat myös sellaiset yhdisteet, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamiseen, joihin yhdisteisiin kuuluvat edellä mainitut fragmentit I ja II ja suojattu tetrapeptisi sekä näiden fragmenttien valmistuksessa käytettävät välituotteet.

Laajimmassa mielessä keksinnön mukaista menetelmää voidaan esittää kuvion 1 diagrammilla:

Fragmentti IFragmentti II

Edellä olevassa kuvioissa Z, Z' ja Z'' ovat edellä mainittuja suojaryhmiä. Sarkosiinin karboksiaktivointia kuvataan kirjainyhdistelmällä OA.

Viitaten edellä olevaan kuvioon 1 fragmentin I valmistus tapahtuu yleisesti seuraavasti: Sarkosiinin aminoryhmän suojaamiseksi muodostetaan sarkosiinin vesiliukoinen emäsadditiosuola, joka liuotetaan veteen. Emäsadditiosuola valmistetaan sopivasti liuottamalla sarkosiini natriumhydroksidiliuokseen, jossa natriumhydroksidia on jonkin verran yli ekvivalenttisen määrän. Tähän liuokseen lisätään sitten samanaikaisesti hieman ylimäärin reagenssia, jolla suojaryhmä liitetään (esim. vastaavaa happokloridia, kuten bentsyylioksikarbonyylikloridia) ja emäsluosta (esim. natriumhydroksidiliuosta), joka reagoi reaktiossa muodostuneen hapon (esim. HCl) kanssa. Suojaryhmän liittämiseen käytetty reagenssi voi olla liuoksena tai sellaisenaan ja on edullisesti happokloridi. Reaktion päätyttyä suojaryhmän liittämiseen käytetyn reagenssin ylimäärä poistetaan (esim. uuttamalla dietyylieetterillä tai muulla veden kanssa sekoittumattomalla liuottimella), minkä jälkeen suojattu sarkosiini eristetään reagoimattomasta sarkosiinista käsittelemällä hapolla (esim. kloorivetyhapolla). Happokäsittelyssä suojaamattoman sarkosiinin emäsadditiosuola muuttuu suojaamattoman sarkosiinin happoadditiosuolaksi, joka on vesiliukoinen. Happokäsittelyssä suojatun sarkosiinin emäsadditiosuola muuttuu kuitenkin vain suojatuksi sarkosiiniksi, koska suojatun aminoryhmän johdosta

ei voi muodostua happoadditiosuolaa. Tämä suojattu sarkosiini voidaan veteen liukenemattomana helposti erottaa suojaamattoman sarkosiinin suolasta esimerkiksi uuttamalla veden kanssa sekoittumattomalla orgaanisilla liuottimella, kuten edellä kuvattiin. Tässä käytettynä ilmaisu "veden kanssa sekoittumaton orgaaninen liuotin" käsittää kaikki tavalliset laboratorioissa käytetyt orgaaniset liuottimet, jotka eivät sekoitu veteen, kuten esimerkiksi dietyylieetterin, etyyliasetaatin, bentseenin, tolueenin, ksyleenin ym. Edullinen suojattu sarkosiini, N-bentsyylioksikarbonyylisarkosiini on tunnettu yhdiste. Sen valmistusmenetelmän ovat kuvanneet R.S. Tipton ja B.A. Pawson, J. Org. Chem. , 26, 4698 (1961) ja yhdistettä on kaupallisesti saatavana firmasta Bachem, Inc. Torrance, CA.

Tämän suojatun sarkosiinin kondensoimiseksi suojatun L-lysiinimolekyylin kanssa fragmentin I muodostamiseksi aminosuojattu sarkosiini on tavallisesti ensin aktivoitava tavalla, joka edistää sidoksen muodostumista. Edullinen aktivointimenetelmä on aktiivisen esterin muodostaminen, mutta myös muita alalla tunnettuja aktivointimenetelmiä, kuten seka- tai symmetrisen anhydridin, atsidin tai happokloridin muodostamista voidaan käyttää. Jos N^ε-suojatun L-lysiinin karboksyyliipääte on suojattu ryhmällä, joka voidaan poistaa sarkosiinin suojaryhmän (Z) läsnäollessa ilman, että Z tai L-lysiinin N^ε-suojaryhmä (Z') poistuu, voidaan näin suojatut sarkosiini ja L-lysiini liittää yhteen ilman etukäteen suoritettua sarkosiinin aktivointia.

Voidaan käyttää mitä tahansa sarkosiinin suojattua esterinä, edullinen aktiivinen esteri on kuitenkin hydroksisukkinimidin kanssa muodostettu esteri. Suojatun sarkosiinin aktiivinen esteri valmistetaan saattamalla suojatun sarkosiinin ja aktiivisen esterireagenssin ekvivalenttiset määrät reagoimaan sopivassa orgaanisessa liuottimen liuoksessa, kuten tetrahydrofuraanissa, dioksaanissa, dimetyyliformamidissa, pyridiinissä ym. Tähän liuokseen lisätään sitten ekvivalenttinen määrä kytkentäainetta, tavallisesti disykloheksyylikarbodi-imidiä. Myös muut kytkentäaineet ovat sopivia käytettäväksi, disykloheksyylikarbodi-imidi on kuitenkin erityisen sopiva, koska kytkentäreaktion sivutuote liukenee huonosti käytettyihin liuottimiin ja on siten helposti poitettavissa suodattamalla, jolloin kytketty tuote jää liuokseen.

L-lyysiini, jonka ϵ -aminoryhmä on suojattu, on kaupallisesti saatavana oleva tuote (esim. firmasta Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) tai se voidaan valmistaa käyttämällä edellä esitetyt kriteerit täyttävää suojaryhmää (Z').

Fragmentin I valmistuksen viimeisessä valmistusvaiheessa jonkin verran ylimäärin käytetty suojattu L-lyysiini saatetaan reagoimaan suojatun sarkosiinin aktiiviesterin kanssa, jolloin reaktiossa on läsnä kaksi ekvivalenttia suolaa muodostavaa ainetta, kuten orgaanista tertiääristä amiinia. Voidaan käyttää mitä tahansa orgaanista tertiääristä amiinia, edullisimmin käytetään kuitenkin trietyyliamiinia. Liuottimena on sopivasti sellainen orgaaninen liuotin, joita edellä käsiteltiin. Vaikka yksi ekvivalentti suolan muodostavaa tertiääristä amiinia suojaa ϵ -amino suojatun L-lyysiinin karboksyyliiryhmän, voidaan myös käyttää muita karboksyyliiryhmän suojaryhmiä edellä mainitun yhden ekvivalentin sijasta. Reagoimattomat aminohapot poistetaan käsittelemällä reaktioseosta hapolla (esim. kloorivetyhapolla) ja erottamalla ne uuttamalla veden kanssa sekoittumattomalla orgaanisella liuottimella, kuten edellä kuvattiin.

Esimerkkejä sopivista karboksyyliisuojaaryhmistä ovat bentsyyli ja bentsyyli, jonka fenyyliiryhmä on substituoitu 1-3 halogeenilla (esim. kloori tai bromi), nitro-, alempialkoksi- (esim. metoksi) tai alempialkyyliiryhmällä (esim. metyyli). Edellä mainitussa McOmie'm teoksessa on esitetty lisää näitä ryhmiä.

Fragmentin II valmistus alkaa syntetisoimalla suojattu L-glutamiiniamidi, joka voidaan valmistaa usealla eri tavalla käyttäen lähtöaineena joko L-glutamiinia tai L-glutamiinihappoa. Edullisessa menetelmässä esteröidään L-glutamiinihapon molemmat karboksyyliiryhmät alemmalla alkanolilla, ja yhdistettä käsitellään sitten aminoryhmän suojaamiseen käytetyllä reagenssilla edellä kuvatulla tavalla L-glutamiinihappodiesterin α -aminoryhmän suojaamiseksi. Saattamalla saatu suojattu L-glutamiinihappodiesteri reagoimaan ammoniakin kanssa saadaan suojattu L-glutamiiniamidi. Tämä menetelmä on kuvattu julkaisussa J. Biol. Chem., 165, 333 (1946). Tämän menetelmän muunnoksessa L-glutamiinihapon α -aminoryhmä voidaan suojata ennen esteröintiä. Eräissä vaihtoehtoisissa,

uudessa menetelmässä L-glutamiinin α -aminoryhmä suojataan ensin edellä kuvatulla tavalla. Suojattu L-glutamiini muutetaan sitten suojatuksi L-glutamiiniamidiksi esimerkiksi muodostamalla aktiivinen esteri ja käsittelemällä sitä sitten ammoniakilla alemmassa alkanolissa (esim. metanolissa).

Suojatun L-glutamiiniamidin muodostamisen jälkeen α -aminoryhmän suojaryhmä poistetaan ja suojaamaton L-glutamiiniamidi saatetaan reagoimaan α -aminosuojatun sarkosiinin kanssa, joka on aktivoitu edellä kuvatulla tavalla (esim. muuttamalla aktiiviseksi esteriksi). L-glutamiiniamidin suojaryhmän poistaminen suoritetaan edullisesti pelkistämällä vedyn kanssa Pd/C-katalyysaattorin läsnäollessa sopivassa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidissa, etikkahapossa, alemmassa alkanolissa (esim. metanolissa) tms. Saadun ilman suojaryhmää olevan L-glutamiiniamidin reaktio suojatun sarkosiinin aktiivisen esterin kanssa suoritetaan sopivasti myös samassa liuottimessa, edullisesti metanolissa. Käyttämällä tätä suojaryhmän poistamismenetelmää ja liuotinta saadaan erityisiä etuja, sillä sekä suojattu L-glutamiiniamidi että saatu suojattu sarkosiini-L-glutamiiniamidi ovat liukenemattomia metanoliin, kun taas suojaryhmää vailla oleva L-glutamiiniamidi liukenee hyvin metanoliin. Reagoimaton L-glutamiiniamidi, jossa ei ole suojaryhmää, voidaan helposti erottaa suodattamalla reaktiotuotteesta, joten tässä vaiheessa saanto on sangen hyvä.

Suojaryhmä poistetaan tästä suojatusta dipeptidistä sopivasti hydraamalla Pd/C-katalyysaattorin läsnäollessa sopivassa pelkistysliuottimessa (edullisesti dimetyyliformamidissa), jolloin saadaan fragmenttia II.

Fragmentti I ja II liitetään yhteen suojatuksi tetrapeptidiksi, Z-SAR- ϵ -Z'-LYS-SAR-GLN-NH₂ saattamalla niiden ekvivalenttiset määrät reagoimaan sopivassa aproottisessa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidissa kytkentäaineen, kuten disykloheksyylikarbodiimidin läsnäollessa, jota käytetään jonkin verran ylimäärin. On myös edullista suorittaa tämä reaktio sellaisen aineen läsnäollessa, joka minimoi rasemaatin muodostumista fragmentti I:n L-lysiini-osan karboksyyli-ryhmän viereisen hiilen suhteen ja lisää reaktionopeutta, kuten l-hydroksibentsotriatsolin läsnäollessa. Saadun

tetrapeptidiamidin jäljellä olevat suojaryhmät poistetaan sitten edullisesti hydraamalla Pd/C-katalysaattorin läsnäollessa sopivassa pelkistysliuottimessa (edullisesti vesipitoisessa etikkahapossa), kuten edellä kuvattiin. Vedyn paineen ei tarvitse ylittää normaalia ilmakehän painetta, vaikkakin korotettu paine on edullinen, koska se nopeuttaa pelkistysreaktiota. Epäpuhtaan tuotteen eristäminen ja puhdistaminen voidaan suorittaa yhdistetyllä kiteytys- ja ioninvaihtokromatografiamenetelmällä (edullisesti käyttämällä eluenttina ammoniumasettaattia, pH 5) ja identifioimalla ohutkerroskromatografialla kunkin fraktion aineet. Vaikka seuraavissa esimerkeissä esitetään useita eristys- ja puhdistusmenetelmiä, on selvää, että myös muita menetelmiä voidaan käyttää.

Edellä valmistettu suojattu tetrapeptidi voidaan haluttaessa puhdistaa ennen pelkistysvaihetta. Tällöin puhdistus voidaan suorittaa poistamalla liuotin suojatun tetrapeptidin liuoksesta, liuottamalla jäännös dikloorimetaaniin, suodattamalla liuos ja haihduttamalla suodos. Uuttamalla haihdutusjäännös kuumalla etyyliasetaatilla saadaan puhdas suojattu tetrapeptidi, joka voidaan pelkistää ja edelleen puhdistaa edellä kuvatulla tavalla. Vaihtoehtoisesti epäpuhtas suojattu tetrapeptidi voidaan puhdistaa kiteyttämällä uudelleen sopivasta liuotinsysteemistä (esim. etyyliasetaatii-metanoliseoksesta 10:1).

Menetelmän edullista toteutusmuotoa kuvataan seuraavassa kuviossa 2:

<u>Fragmentti I</u>			<u>Fragmentti II</u>		
SAR		LYS	SAR	GLN	
CBZ			CBZ	CBZ	NH ₂
			HOSu; DCC	H ₂ ; Pd/C	
CBZ		CBZ	CBZ	OSu	NH ₂
CBZ	HOSu; DCC		CBZ		NH ₂
	OSu	CBZ		H ₂ ; Pd/C	NH ₂
CBZ		CBZ			NH ₂
CBZ		CBZ	HOBT; DCC		NH ₂
		H ₂ ; Pd/C			NH ₂

Edellä olevassa kuviossa 2 lyhenteillä on seuraavat merkitykset:

CBZ: bentsyylioksikarbonyyli
 DCC: disykloheksyylikarbodi-imidi
 HOSu: hydroksisukkinimidi
 OSu: oksisukkinimidi
 Pd/C: palladium-hiili
 H₂: vety
 HOBT: 1-hydroksibentsotriatsoli

Tämä edullinen toteutus kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavissa, esillä olevaa keksintöä valaisevissa esimerkeissä.

Esimerkki 1

Fragmentti I:n valmistus: CBZ-SAR- ϵ -CBZ-LYS-OH

A. N-fenyylimetoksikarbonyylisarkosiinin (CBZ-SAR-OH) synteesi

Tämä yhdiste valmistettiin menetelmällä, jonka ovat kuvanneet R.S. Tipton ja B.A. Pawson (J. Org. Chem., 26, 4648, 1961). Sarkosiini (8,90 g, 1,0 mol) liuotettiin 500 ml:aan 2-n natriumhydroksidia, joka oli jäädytetty jäähäuteessa. Liuokseen lisättiin samanaikaisesti voimakkaasti sekoittaen 550 ml 2-n natriumhydroksidia ja bentsyyliklooriformiaattia (196 g 95-%:ista, 1,095 mol) tunnin kuluessa. Saatua seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa noin 18 tuntia, sitten se uutettiin kolme kertaa 250 ml:lla dietyyli-eetteriä. Vesifaasiin lisättiin etyyliasetaattia (500 ml) ja sitten varovasti 200 ml väkevää kloorivetyhappoa. Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin kahdella 500 ml:n annoksella vettä ja sitten 300 ml:lla kyllästettyä natriumkloridiliuosta ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla. Haihduttamalla magnesiumsulfaatin poissuodattamisen jälkeen liuotin alennetussa paineessa saatiin 213 g (95 %) öljymäistä N-fenyylimetoksikarbonyylisarkosiinia, joka identifioitiin NMR-spektrillä. Sitä käytettiin sellaisenaan puhdistamatta seuraaviin reaktioihin.

NMR: (CDCl₃) δ : 3,02 (s, 3H, -N-CH₃), 4,05 (leveä, 2H, -N-CH₂), 5,15 (s, 2H, bentsyyli), 7,35 (s. 5H, aromaattinen), 10,4 (s, 1H, happo).

B. N-fenyylimetoksikarbonyylisarkosiinin N-hydroksisukkinimidiesterin (CBZ-SAR-OSu) synteesi

Esimerkissä 1A valmistettua N-fenyylimetoksikarbonyyli-sarkosiinia (146 g, 0,6547 mol) ja N-hydroksisukkinimidia (77,6 g 97-%:ista, 0,6547 mol) liuotettiin 1500 ml:aan jäähauteessa jäähdytettyä tetrahydrofuraania. Liuokseen lisättiin nopeasti sekoittaen ja jäähdyttäen disykloheksyylikarbodi-imidin (134,9 g, 0,6547 mol) liuos 500 ml:ssa kuivaa tetrahydrofuraania. Saatua liuosta sekoitettiin noin 18 tuntia huoneen lämpötilassa. Kiinteä aine suodatettiin, ja suodos haihdutettiin alennetussa paineessa, saatu öljy kiteytettiin 2 litrasta absoluuttista etanolia, jolloin saatiin valkeana kiinteänä aineena 160 g (76,3 %) N-fenyylimetoksikarbonyylisarkosiini-N-hydroksisukkinimidiesteriä, sp. 69-78°C. NMR (CDCl₃) : 2,7 (s. 4H, -CH₂-CH₂-), 2,06 (s. 3H, -N-CH₃), 4,3 (s. 2H, -N-CH₂), 5,08 (s. 2H, bentsyyli), 7,3 (s. 5H, aromaattinen); IR (KBr): 2940-3070 cm⁻¹ (alifaattinen ja aromaattinen C-H), 1830 cm⁻¹ (imidi);

Analyysi, laskettu kaavalle C₁₅H₁₀N₂O₆: C 56,25 H 5,03 N 8,75
Saatu: C 55,93 H 5,06 N 8,85.

C. N-fenyylimetoksikarbonyyli-sarkosyyli-N^ε-fenyylimetoksikarbonyyli-L-lysiinin (CBZ-SAR-ε-CBZ-LYS-OH) synteesi

Esimerkissä 1B valmistettua N-fenyylimetoksikarbonyylisarkosiini-N-hydroksisukkinimidiesteriä (25 g, 0,0744 mol), N^ε-fenyylimetoksikarbonyyli-L-lysiiniä (ostettu firmasta Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) (22 g, 0,0786 mol) ja trietyyliamiinia (22 ml, 16 g, 0,158 mol) lisättiin 450 ml:aan kuivaa tetrahydrofuraania ja seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa, ja jäännös jaettiin etyyliasetaatin (500 ml) ja 2-n kloorivetyhapon (400 ml) kesken. Vesikerros erotettiin ja uutettiin 100 ml:lla etyyliasetaattia. Yhdistetyt etyyliasetaattifraktiot pestiin sitten kahdella 200 ml:n annoksella 2-N kloorivetyhappoa, 200 ml:lla vettä ja kahdella 2-0 ml:n annoksella kyllästettyä natriumkloridiliuosta, ja kuivatettiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla. Magnesiumsulfaatin poissuodattamisen jälkeen liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa, ja jäännöstä trituroitiin 900 ml:ssa asetoni-heksaaniseosta (1:3),

jolloin saatiin 29,9 g (82,8 %) valkeata kiinteätä N-fenyyylimetoksikarbonyylisarkosyyli-N^ε-fenyyylimetoksikarbonyyli-L-lysiiniä. Trituroinnin sijasta tuotteen puhdistaminen voitiin suorittaa kiteyttämällä 500 ml:sta tolueenia.

NMR (TFA) : 1,3-2,2 (m, 6H, lysiinin C-CH₂-CH₂-CH₂-C), 3,08 (s+m, 5H, lysiinin -N-CH₂ ja sarkosiinin CH₃-N-), 4,25 (s, 2H, -N-CH₂-C-), 4,75 (m, 1H, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-N-CH}_2\text{-C-} \end{array}$), 5,2 (s, 4H, bentsyyli), 7,3

(s+m, 12H, aromaattinen + -N-H); IR (KBr): 3330 cm⁻¹ (amidi N-H), 1650-1750 cm⁻¹, amidi (hapon ja uretaanin C=O); $[\alpha]_D^{19,9} = 2^\circ$ (c = 1,00, HOAc).

Analyysi, laskettu kaavalle C₂₅H₃₁N₃O₇ : C 61,84 H 6,44 N 8,65
saatu : C 61,03 H 6,47 N 8,61.

Esimerkki 2

Fragmentti II:n valmistus: H-SAR-GLN-NH₂

A. N-fenyyylimetoksikarbonyyli-L-glutamiiniamidin (CBZ-GLN-NH₂) synteesi

L-glutamiinihappoa (44 g, 0,3 mol) suspensioitiin 250 ml:aan absoluuttista metanolia, ja suspensiota kuumennettiin palautusjäähdyttämällä 0,5 tuntia samalla johtaen siihen kuivaa HCl-kaasua, jolloin saatiin kirkas liuos. Kuumennusta palautusjäähdyttämällä jatkettiin vielä noin 18 tuntia, sitten liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännökseen lisättiin 200 ml vettä ja 300 ml kloroformia, ja seosta sekoitettiin voimakkaasti huoneen lämpötilassa samalla lisäten 5 g magnesiumoksidia ja 18 g bentsyliklooriformiaattia, ja sekoitusta jatkettiin vielä 10 minuuttia. Aina 10 minuutin väliajoin lisättiin vielä kolme eri kertaa magnesiumoksidia ja bentsyliklooriformiaattia, joiden kokonaismäärät olivat: edellisen 20 g (0,496 mol) ja jälkimmäisen 72 g (0,423 mol). Viimeisen lisäyksen jälkeen reaktioseosta sekoitettiin 15 minuuttia 10 minuutin sijasta. Orgaaninen kerros erotettiin ja pestiin kahdella 200 ml:n annoksella vettä, kahdella 200 ml:n annoksella 0,5-n kloorivetyhappoa, kahdella 200 ml:n annoksella vettä, kahdella 200 ml:n annoksella 0,5-n natriumhydroksidia ja kahdella 200 ml:n annoksella vettä ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla.

Magnesiumsulfaatti suodatettiin, ja liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännöksenä saatu öljy liuotettiin ammoniakilla kyllästettyyn metanoliin (500 ml), ja liuos sai seistä huoneen lämpötilassa 6 vrk. Saatu kiinteä aine suodatettiin ja kiteytettiin EtOH:sta, jolloin saatiin valkeata kiinteätä ainetta (19,35 g, 23 %), sp. 189-195°C.

NMR ($\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ : 4,3 (m, 1H, metyyli), 5,1 (s, 2H, bentsyyli), 7,3 (s, 5H, aromaattinen);

IR (KBr): 3440 cm^{-1} , 3320 cm^{-1} ja 3200 cm^{-1} (amidin ja uretaanin N-H), 1650 cm^{-1} (amidi), 1540 cm^{-1} (amidi).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22,4} = +6^\circ$ (c = 2,012, DMF),

Analyysi, laskettu kaavalle $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$: C 55,91 H 6,14 N 15,04
saatu : C 56,76 H 6,24 N 14,88.

Vaihtoehtoinen menetelmä CBZ-GLN-NH₂:n valmistamiseksi

1) Bentsyylioksikarbonyyli-L-glutamiinin (8,41 g, 30 mmol) ja hydroksisukkinimidin (3,45 g, 30 mmol) jäähdytettyyn liuokseen 100 ml:ssa tetrahydrofuraania lisättiin sekoittaen 6,18 g (30 mmol) disykloheksyylikarbodi-imidiä. Seosta sekoitettiin sitten 18 tuntia ja sen annettiin lämmetä huoneen lämpötilaan. Liuos suodatettiin, suodos haihdutettiin kuiviin ja jäännös kiteytettiin etyyliasetaattista. Saatu kiinteä aine liuotettiin sitten kuumentaen 75 ml:aan ammoniakilla kyllästettyä metanolia, ja liuoksen annettiin seistä huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Kiinteä aine suodatettiin, pestiin kylmällä metanolilla ja kiteytettiin kahdesti 95-%:isesta etanolista, jolloin saatiin 1,8 g kiinteätä ainetta, sp. 191,5-195,5°C. Tuote identifioitiin ja sen puhtaus todettiin NMR-spektrin, IR-spektrin, optisen kiertokyvyn ja alkuaineanalyysin avulla.

2) L-glutamiinihapon (220 g, 1,495 mol) suspensiota 1250 ml:ssa absoluuttista metanolia kuumennettiin palautusjäähdyttäen samalla johtaen siihen HCl-kaasua 7 tunnin ajan, jolloin saatiin kirkas liuos. Liuosta kuumennettiin palautusjäähdyttäen vielä 18 tuntia, sitten se haihdutettiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin L-glutamiinihapon hydrokloridisuola. Hydrokloridisuola liuotettiin 1 litraan deionoitua vettä ja liuokseen lisättiin 1,5 litraa kloroformia. Sitten lisättiin sekoittaen 1,25 tunnin aikana 360 g (2,11 mol) bentsyylioksikarbonyylikloridia ja 120 g (3 mol) magnesiumoksidia), ja sekoitusta jatkettiin vielä 0,5 tun-

tia. Seos suodatettiin liukenemattoman magnesiumoksidin poistamiseksi, ja suodoksen orgaaninen kerros erotettiin. Orgaaninen kerros pestiin kahdesti 1,0 litralla deionoitua vettä, kahdesti 1,0 litralla 0,5-n NaOH-vesiliuosta ja lopuksi 4 kertaa 1,0 litralla deionoitua vettä. Pesty orgaaninen kerros kuivattiin magnesiumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 500 g raakatuotetta. Se liuotettiin metanolin (2,0 l) ja ammoniumhydroksidin (500 ml) seokseen, ja liuos sai seistä huoneen lämpötilassa 10 vrk ja sitten jäädytettynä 3 vrk. Saatu kiinteä aine suodatettiin, pestiin metanolilla, kuivattiin tyhjiössä ja kietytettiin uudelleen 15 litrasta isopropanolia, jolloin saatiin 198 g puhdasta tuotetta. Se identifioitiin ja sen puhtaus todettiin NMR-spektrin, IR-spektrin, optisen kiertokyvyn ja alkuaineanalyysin avulla.

B. N-fenyyliimetoksikarbonyylisarkosyyli-L-glutamiiniamidin (CBZ-SAR-GLN-NH₂) synteesi

Esimerkissä 2A valmistettua N-fenyyliimetoksikarbonyyli-L-glutamiiniamidia (13,6 g, 0,0473 mol) suspendoitiin 300 ml:aan metanolia. Suspensioon lisättiin Pd/C-katalysaattoria (10-%:ista, 1,1 g) ja sitä ravisteltiin 310 kPa:n H₂-paineessa. 0,5 tunnin ravistelun jälkeen H₂-paine oli laskenut 31 kPa:iin, joka vastaa noin 0,05 mol sitoutunutta vetyä. Katalysaattori suodatettiin ja pestiin 50 ml:lla metanolia. Yhdistettyihin metanoliliuoksiin lisättiin esimerkissä 1B valmistettua N-fenyyliimetoksikarbonyylisarkosiini-N-hydroksisukkinimidiesteriä (19,36 g, 0,0605 mol), ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Kiinteä aine suodatettiin, pestiin metanolilla ja kuivattiin, jolloin saatiin 14,9 g (90 %) N-fenyyliimetoksikarbonyylisarkosyyli-L-glutamiiniamidia, sp. 186-196°C.

NMR (CD₃CO₂D) δ : 2,3 (m. glutamiinin 1H, -CH₂-CH₂), 3,0 (s. 3H,

-N-CH₃), 4,1 (s. 2H, -N-CH₂-C(=O)-), 4,6 (m, 1H, -N-CH₂-C-), 5,15 (s, 2H, bentsyyli), 7,7 (s, 5H, aromaattinen);

IR (KBr): 3410 cm⁻¹, 3290 cm⁻¹ ja 3220 cm⁻¹ (amidin ja uretaanin -N-H), 1700 cm⁻¹ (uretaanin karbonyyli), 1650 cm⁻¹ ja 1625 cm⁻¹ (amidikarbonyylit);

$[\alpha]_D^{22,6} = +23,3^\circ$ (c = 1,032, DMF).

Analyysi laskettu kaavalle $C_{10}H_{22}N_4O_5$: C 54,85 H 6,33 N 15,99
 saatu : C 54,62 H 6,23 N 15,56.

C. Sarkosyyli-L-lysyylisarkosyyli-L-glutamiiniamidin
 (H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂) synteesi

Esimerkissä 2B valmistettua N-fenyyli-metoksykarbonyylisarkosyyli-L-glutamiiniamidia (17,4 g, 0,0497 mol) suspendoitiin 370 ml:aan dimetyyli-formamidia, suspensioon lisättiin 2 g 10-%:ista Pd/C-katalysaattoria ja siihen johdettiin vetyä 6 tunnin ajan. Katalysaattori suodatettiin ja suodokseen lisättiin 1-hydroksibentsotriatsolia (13,4 g, 0,1 mol) ja esimerkissä 1D valmistettua N-fenyyli-metoksykarbonyylisarkosyyli-N^ε-fenyyli-metoksykarbonyyli-L-lysiiniä (24 g, 0,0497 mol), ja saatua liuosta jäähdytettiin jäähauteessa. Sitten lisättiin disykloheksyylikarbodi-imidiä (10,24 g, 0,0505 mol) ja seosta sekoitettiin yön yli jäähdyttämättä, jolloin sen lämpötila vähitellen kohosi huoneen lämpötilaan.

Suspensio suodatettiin ja suodos haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännös liuotettiin metyleenikloridiin, liuos jäähdytettiin -20°C:een. se sai seistä jäähdytettynä 18 tuntia, se suodatettiin, ja suodos haihdutettiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin aminosuojattu tetrapeptidiamidi.

Saatu yhdiste liuotettiin 300 ml:aan 50-%:ista etikkahapon vesiseosta ja hydrattiin 276 kPa:n vedyn paineessa Pd/C-katalysaattorin (2,5 g 10-%:ista) läsnäollessa, kunnes vedyn paine oli noin 41 kPa. Katalysaattori suodatettiin, suodos lyofilisoitiin, jolloin saatiin raakatuotetta, joka puhdistettiin seuraavasti:

Raakatuote kromatografoitiin 0,5-m ammoniumasetaatilla (pH 5,50) pakattua SP-C-25 hartsia sisältävällä kolonnilla (5 x 80 cm) (tyhjä tilavuus 560 ml) ja eluoiitiin 0,5-m ammoniumasetaatilla (pH 6,50) ja 0,8-m ammoniumasetaatilla (pH 6,50) (2 l) lineaarisella gradientilla. Virtausnopeus oli 150 ml/tunti, ja kerättiin 15 ml:n fraktioita. Fraktiot 160-200 yhdistettiin ja lyofilisoitiin, saatu tuote kromatografoitiin uudelleen samoissa olosuhteissa, ja saadut fraktiot 81-320 yhdistettiin ja lyofilisoitiin.

Saatu tuote kromatografoitiin partitiokolonnissa, joka sisälsi hienoa G-25 hartsia n-butanolin, etikkahapon ja veden 4:1:5-seoksen alemmassa faasissa, ja eluoiitiin tämän seoksen ylemmällä

faasilla. Kolonnin koko oli 5 x 85 cm, virtausnopeus oli 100 ml/tunti ja fraktiot olivat 20 ml. Fraktiot 51-240, 241-340 ja 341-520 yhdistettiin erikseen ja haihdutettiin, jolloin saatiin vastaavat haihdutusjäännökset, 4 g, 5,4 g ja 3,8 g. Jokainen näistä kromatografoitiin uudelleen erikseen edellä kuvatussa partitiokolonnissa, ja saaduista fraktioista määritettiin tuotetta sisältävät fraktiot ohutkerroskromatografialla (TLC) silikageelilevyillä liuotinsytemillä n-butanoli/etikkahappo/vesi/pyridiini (4:2:3:1). Ne kunkin kolmen tuotteen fraktiot (noin 340-420), jotka sisälsivät puhdasta tuotetta, yhdistettiin ja haihdutettiin.

Saatu haihdutusjäännös liuotettiin 500 ml:aan HCl-kyllästettyä absoluuttista etanolia, liuokseen lisättiin 500 ml vedetöntä eetteriä. Kiinteä aine suodatettiin, pestiin eetterillä ja kuivattiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin 7,8 g valkeata kiinteätä sarkosyyli-L-lysyylisarkosyyli-L-glutamiiniamididihydrokloridia.

TLC (silikageelilevyt):

<u>Liuotin</u>		R_f
N-butanoli/HOAc/H ₂ O/pyridiini	4/2/3/1	0,48
CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (väkevä)	30/25/10	0,42
N-butanoli/HOAc/H ₂ O/pyridiini	15/3/12/10	0,27
N-butanoli/NOAc/EtOAc/H ₂ O	1/1/1/1	0,12
N-butanoli/HOAc/H ₂ O (ylempi)	4/1/5	0,02

Aminohappoanalyysi: SAR (2,19), GLU (1,03), LYS (1,00) $\pm$, NH₃ (2,01, 80,4 % peptidiä.

Analyysi: Cl⁻ : 14,89 %, H₂O: 4,92 %

$[\alpha]_D^{22,4} = -14,8^\circ$ (c = 0,2022, 0,1-n HCl).

Vaihtoehtoisesti puhdistus suoritettiin käyttäen korkeasuorituskykyistä käänteisfaasi nestekromatografiaa ja alkyyilisilaa-nisubstraattia. Yksinkertaisimmassa puhdistusmenetelmässä kromatografoitiin silikageelillä käyttäen eluenttina edellä kuvattua alifaattista alkoholia, alempaa alkaanihappoa (myös muurahaishappo tulee kysymykseen) ja vettä sisältävää liuotinseosta. Edullinen seos oli n-butanoli/etikkahappo/vesi (10:2:5), jolla puhdistettiin

10 g epäpuhdasta tetrapeptidiä 100 g:n kolonnissa Malenkrodt Silicar CC7-silikageelillä. Koottiin 15 ml:n fraktioita. Fraktiot 50-95 sisälsivät puhdasta tetrapeptidiä, mikä todettiin TLC:llä silikageelilevyillä käyttäen kloroformi/metanoli/ammoniumhydroksidielenttia 30:25:10 ja kehittämiseen ninhydriiniä.

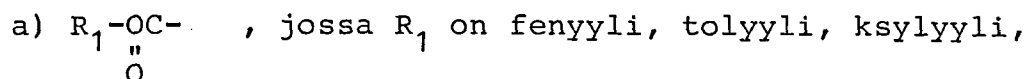
Tetrapeptidi voidaan saada puhtaana kiteyttämällä suojattu tetrapeptidi ennen suojaryhmien poistamista. 28 g:n näyte epäpuhdasta suojattua tetrapeptidiä puhdistettiin kiteyttämällä etyyliasetaatin (600 ml) ja metanolin (70 ml) seoksesta. Tuote oli olennaisesti puhdasta TLC:n (kloroformi/metanoli, 9:1, $R_f = 0,72$) ja alkuaineanalyysin mukaan. NMR-spektri vastasi odotettua rakennetta.

Esimerkki 3

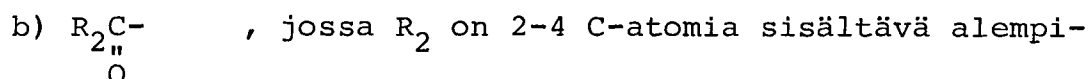
Esimerkissä 2C valmistettua tetrapeptidiamidia H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ kokeiltiin FI-patenttihakemuksen no. 783760 esimerkissä 2 kuvatussa induktiokokeessa hiirillä. Tällä esimerkeissä 1 ja 2 valmistetulla tetrapeptidiamidilla oli sama aktiviteetti kuin edellä mainitussa patenttihakemuksessa Merrifield-kiinteä-faasisynteesillä valmistetulla tetrapeptidiamidilla.

Patenttivaatimukset

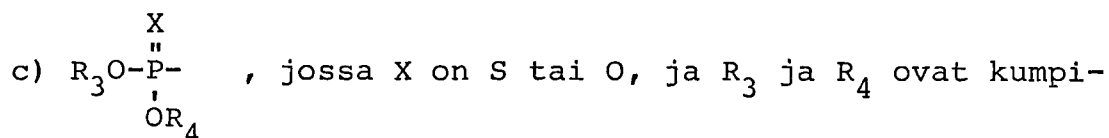
1. Kaavan H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ mukaisen tetrapeptidin valmistuksessa välituotteena käyttökelpoinen, kaavan Z-SAR- ξ -Z'-LYS-OH mukainen dipeptidi, t u n n e t t u siitä, että Z ja Z' valitaan kumpikin erikseen seuraavista:



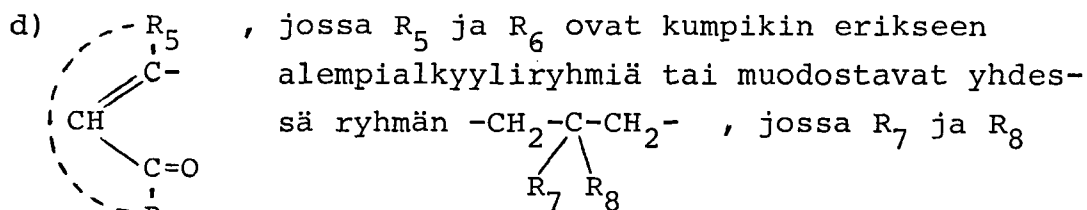
adamantyyli, allyyli, β -syaanietyyli, fluorenyylimetyyli, bentsyyli, substituoitu bentsyyli, jonka fenyyliarenkaassa on 1-3 halogeeni-, nitro-, alempialkyyli- tai alempialkoksisisubstituenttia, di-isopropyylimetyyli, difenylimetyyli, sykloheksyyli, syklopentyyli, vinyyli, tert.-butyyli, tert.-amyyli, dime-tyylitrifluorimetyylimetyyli tai dimetyylibifenylimetyyli,



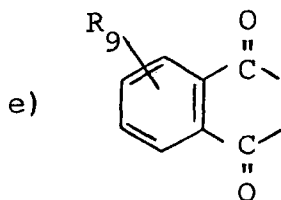
alkyyli tai 1-4 C-atomia sisältävä alempialkyyli, jossa on substituuttina 1-5 halogeenia,



kin bentsyyli- tai alempialkyyli-ryhmiä.



ovat kumpikin erikseen vetyjä tai alempialkyyli-ryhmiä, ja

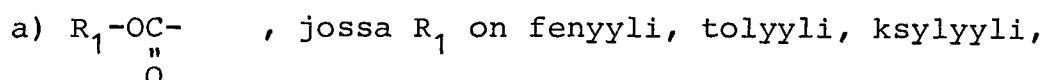


jossa R₉ on vety, metyyli, halogeeni tai nitro, edellyttäen, että Z on monodentaattinen.

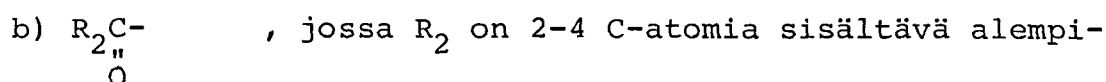
2. Kaavan H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ mukaisen tetrapeptidin valmistuksessa välituotteena käyttökelpoinen, kaavan

H-SAR-GLN-NH₂ mukainen dipeptidi.

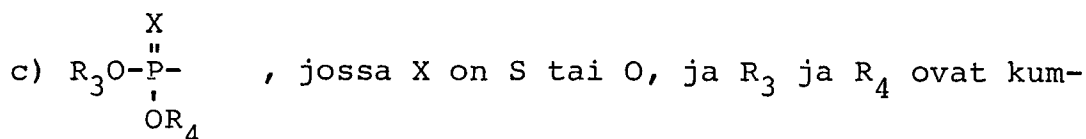
3. Kaavan H-SAR-LYS-SAR-GLN-NH₂ mukaisen tetrapeptidin valmistuksessa välituotteena käyttökelpoinen, kaavan Z-SAR- ξ -Z'-LYS-SAR-GLN-NH₂ mukainen suojattu tetrapeptidi, t u n n e t t u siitä, että Z ja Z' valitaan kumpikin erikseen seuraavasti:



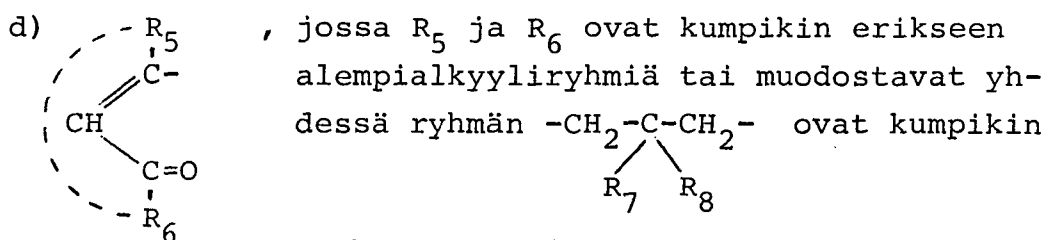
adamantyyli, allyyli, β -syaanietyyli, fluorenyylimetyyli, bentsyyli, substituoitu bentsyyli, jonka fenyyliarenkaassa on 1-3 halogeeni-, nitro-, alempialkyyli- tai alempialkoksisubstituenttia, di-isopropyylimetyyli, difenylimetyyli, sykloheksyyli, syklopentyyli, vinyyli, tert.-butyyli, tert.-amyyli, dimetyyli-trifluorimetyylimetyyli tai dimetyylibifenylimetyyli.



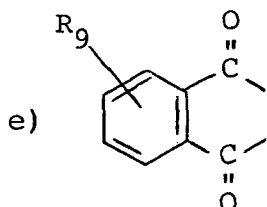
alkyyli tai 1-4 C-atomia sisältävä alempialkyyli, jossa on substituenttina 1-5 halogeenia,



pikin bentsyyli- tai alempialkyyli-ryhmiä.

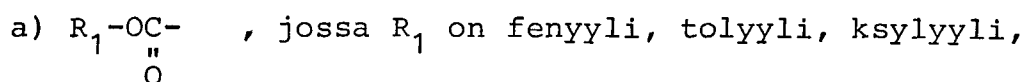


erikseen vetyjä tai alempialkyyli-ryhmiä, ja

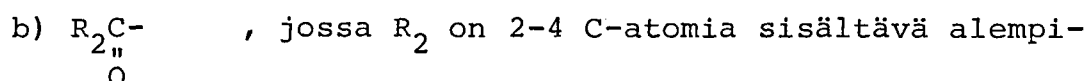


, jossa R⁹ on vety, metyyli, halogeeni tai nitro, edellyttäen, että Z on monodentaattinen.

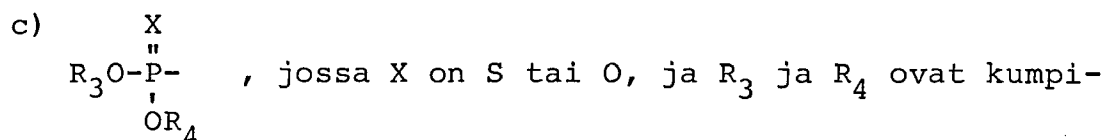
4. Menetelmä kaavan Z-SAR- ξ -Z'-LYS-SAR-GLN-NH₂ mukaisen suojatun tetrapeptidin valmistamiseksi, jolloin Z ja Z' valitaan kumpikin seuraavista:



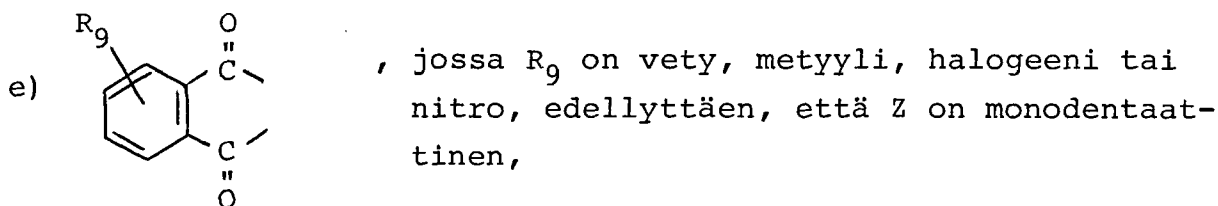
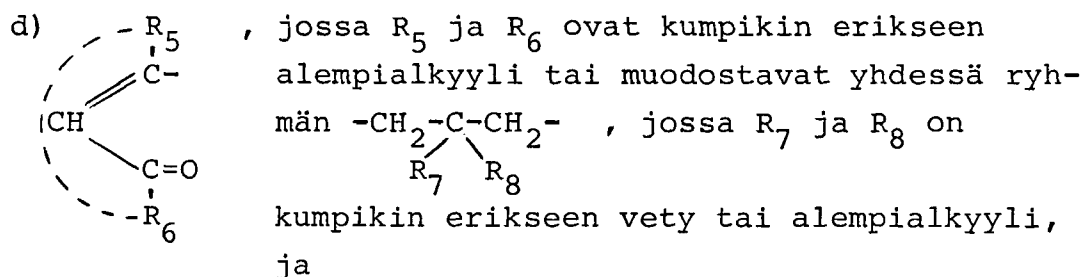
adamantyyli, allyyli, β -syaanietyyli, fluorenyylimetyyli, bentsyyli, substituoitu bentsyyli, jonka fenyyliarenkaassa on 1-3 halogeeni-, nitro-, alempialkyyli- tai alempialkoksisubstituenttia, di-isopropyylimetyyli, difenylimetyyli, sykloheksyyli, syklopentyyli, vinyyli, tert.-butyyli, tert.-amyyli, dimetyylitrifluorimetyylimetyyli tai dimetyylibifenylimetyyli,



alkyyli tai 1-4 C-atomia sisältävä alempialkyyli, jossa on substituenttina 1-5 halogeenia,



kin bentsyyli tai alempialkyyli,



t u n n e t t u siitä, että

a) valmistetaan fragmentti I, joka on Z-SAR- ϵ -Z'-LYS-OH,

i) suojaamalla sarkosiinin aminoryhmä reaktiossa yhdisteen, kuten happokloridin kanssa, jolla siihen saadaan liitettyksi suojaryhmä Z,

ii) aktivoimalla vaiheessa i) valmistettu suojattu sarkosiini siten, että amiini pystyy nukleofiiliseen reaktioon karboksiryhmän kanssa, jolloin muodostuu karboksiaktivoitu suojattu sarkosiini, ja

iii) saattamalla karboksiaktivoitu suojattu sarkosiini reagoimaan Z'-suojarahmällä ϵ -suojatun L-lysiinin kanssa, jolloin saadaan fragmentti I,

b) valmistetaan fragmentti II, joka on H-SAR-GLN-NH₂,

i) valmistamalla Z"-GLN-NH₂, jossa Z" tarkoittaa samaa kuin Z ja Z',

ii) poistamalla suojarahmä Z"-GLN-NH₂:sta, jolloin saadaan suojaamaton L-glutamiiniamidi,

iii) saattamalla suojaamaton L-glutamiiniamidi reagoimaan vaiheessa a) ii) valmistetun karboksiaktivoidun sarkosiinin kanssa, jolloin saadaan Z-SAR-GLN-NH₂, ja

iv) poistamalla suojarahmä Z-SAR-GLN-NH₂:sta, jolloin saadaan fragmentti II,

c) fragmentti I ja fragmentti II yhdistetään suojatuksi tetrapeptidiksi, Z-SAR- ϵ -Z'-LYS-SAR-GLN-NH₂.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n - n e t t u siitä, että

a) valmistetaan fragmentti I, joka on CBZ-SAR- ϵ -CBZ-LYS-OH,

i) esteröimällä CBZ-SAR-OH reaktiossa ekvivalenttisen määrän kanssa N-hydroksisukkinimidia disykloheksyylikarbodiimidin läsnäollessa, jolloin saadaan CBZ-SAR-OSu, ja

ii) saattamalla lievässä mooliylimääränä käytetty CBZ^ε-LYS-OH reagoimaan CBZ-SAR-OSu:n kanssa tietyyliamiinin läsnäollessa, jota käytetään 2 ekvivalenttia, jolloin saadaan CBZ-SAR- ϵ -CBZ-LYS-OH (fragmentti I),

b) valmistetaan fragmentti II, joka on H-SAR-GLN-NH₂

i) valmistamalla CBZ-GLN-NH₂,

ii) poistamalla bentsyylioksikarbonyyliryhmä katalyyttisesti hydraamalla, jolloin saadaan H-GLN-NH₂,

iii) saattamalla GLN-NH₂ reagoimaan mooliylimääränä käytetyn CBZ-SAR-OSu:n kanssa, jolloin saadaan CBZ-SAR-GLN-NH₂, ja

iv) poistamalla bentsyylioksikarbonyyliryhmä katalyyttisesti hydraamalla, jolloin saadaan H-SAR-GLN-NH₂, (fragmentti II),

c) fragmentti I karboksyyliopääteryhmä ja fragmentin II aminopääteryhmä liitetään yhteen sekoittamalla kumpaakin fragmenttia ekvivalenttiset määrät 1-hydroksibentsotriatsolin ja

disykloheksyylikarbodi-imidin läsnäollessa, jolloin viimeksi-mainittu käytetään lievänä mooliylimääränä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vaiheessa b) i) valmistetaan CBZ-GLN-NH_2

a) saattamalla L-glutamiini reagoimaan bentsyylioksikarbonyylikloridin kanssa, jolloin saadaan CBZ-GLN ,

b) saattamalla CBZ-GLN reagoimaan hydroksisukkinimidin kanssa, jolloin saadaan CBZ-GLN-OSu , ja

c) käsittelemällä CBZ-GLN-OSu :a ammoniakilla alemmassa alkanolissa, jolloin saadaan CBZ-GLN-NH_2 .

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansöknings

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:FI P 62823, 63018, 64139, 64349, 64575
(C07C 103/52)

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

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

EP _____

WO _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Aja Levas
Allekirjoitus