

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 971412 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **971412**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07K 5/06
A61K 38/05**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **05.10.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.04.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.04.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **05.10.1995** PCT/GB1995/002362
Internationell ansökan - International
application

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

05.10.1994 GB 9420057 10.03.1995 GB 9504907
10.05.1995 GB 9509431

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Darwin Discovery Limited, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Montana, John, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)
2 • Baxter, Andrew Douglas, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)
3 • Owen, David Alan, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)
4 • Watson, Robert John, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)
5 • Phillipson, Neil, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Peptididyyliyhdisteet ja niiden terapeuttinen käyttö metalloproteaasien estäjinä

Peptidylföreningar och deras terapeutisk användning som inhibitorer av metalloproteas

Peptidyyliyhdisteet ja niiden terapeuttinen käyttö metalloproteasaasien estäjinä

Keksinnön ala

5 Tämä keksintö koskee uutta peptidyylijohdannaisten luokkaa, menetelmiä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä lääketieteessä.

Keksinnön taustaa

10 Normaaleissa kudoksissa sellulaarista sidekudoksen synteesiä tasapainottaa ekstrasellulaarisen matriisin hajoaminen, jolloin nämä kaksi vastakkaista vaikutusta esiintyvät dynaamisessa tasapainotilassa. Matriisin hajoamisen saa aikaan paikalla olevista sidekudossoluista ja hyökkäävistä tulehdussoluista vapautuvien proteinaasien toiminta ja se johtuu osittain vähintään kolmen metalloproteinaasien ryhmän aktiivisuudesta. Nämä ovat kollageenaasit (interstitiaalin kollageenaasi, MMP-1; PMN-kollageenaasi, MMP-8, kollageenaasi-3, MMP13), gelatinaasit (gelatinaasi A, MMP-2, 72 kDa:n gelatinaasi, tyyppin IV kollageenaasi; gelatinaasi B, MMP-9, 92 kDa:n gelatinaasi, tyyppin IV kollageenaasi) ja stromelysiinit (proteoglykanaasi, MMP-3, stromelysiini-1, transiini; stromelysiini-2, MMP: 10; stromelysiini-3, MMP:11). Normaalisti näitä katabolisia entsyymejä säännöstellään tiukasti niiden synteessin ja erittymisen tasolla ja myös niiden ekstrasellulaarisen aktiivisuuden tasolla, jälkimmäistä spesifisten estäjien, kuten TIMP:n (metalloproteinaasin kudosestäjiä) vaikutuksesta TIMP:n muodostaessa inaktiivisia komplekseja metalloproteinaasien kanssa, ja yleisempien proteinaasiestäjien, kuten α_2 -makroglobuliinien, vaikutuksesta.

30 Kiihtynyt, kontrolloimaton sidekudosten hajoaminen metalloproteinaasin katalysoiman ekstrasellulaarisen matriisin resorptioon johdosta on ominaista monille patologisille tiloille, kuten nivelreumalle, nivelrikolle, septiselle nivel tulehdukselle, sarveiskalvon haavaumalle, epi-

dermin haavaumalle ja mahahaavalle; kasvaimen etäpesäkkeen muodostumiselle tai invaasiolle; hampaan vieruskudoksen taudille, valkuaisvirtsaaisuudelle, ateroskleroottisen plakin hajoamiseen liittyvälle sepelvaltimotukokselle ja luusairaudelle. Tässä vaaditut estäjät voivat myös olla hyödyllisiä pysyvään invaliditeettiin mahdollisesti johtavan traumaattisen vamman jälkeen ilmenevien patologisten tuskatilojen (squalae) estämiseksi. Näillä yhdisteillä voi olla myös käyttöä raskauden ehkäisykeinona, jolloin ne estävät ovulaation tai implantaation. Voidaan odottaa, että tällaisten tautien patogeneesiä voidaan todennäköisesti muuntaa hyödyllisellä tavalla antamalla potilaalle metalloproteinaasin estäjiä ja lukuisia yhdisteitä on ehdotettu tähän tarkoitukseen [yleistä katsausta varten katso julkaisu R. C. Wahl et al., Ann. Rep. Med. Chem., 25: 175 - 184, Academic Press Inc., San Diego (1990)].

On kuvattu joukko pienten peptidien kaltaisia yhdisteitä, jotka estävät metalloproteinaaseja. Ehkä merkittävimmät niistä ovat yhdisteitä, jotka liittyvät angiotensiinikonvertaasiin (ACE), jolloin tällaiset aineet salpaavat dekaeptidiangiotensiini I:n muuttumisen angiotensiini II:ksi, tehokkaaksi painetta kohottavaksi aineeksi. Tämän tyyppiset yhdisteet on kuvattu EP-hakemusjulkaisussa 0 012 401. Myös asiaan läheisesti liittyvät merkaptamidipeptidyylijohdannaiset ovat osoittaneet ACE-estäjäaktiivisuutta in vitro ja in vivo [H. N. Weller et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 125 (1):82 - 89 (1984)].

TNF α on sytokiini, joka tuotetaan alunperin soluun liittyneenä 28 kD:n prekursorina. Se vapautuu aktiivisena 17 kD:n muotona [D.-M. Jue et al., Biochemistry, 29:8371 - 8377 (1990)], joka voi välittää suuren määrän haitallisia vaikutuksia in vivo. Kun sitä annetaan eläimille tai ihmiselle, se aiheuttaa tulehdusta, kuumetta, kardiovaskulaarisia vaikutuksia, verenvuotoa, koagulaatiota ja akuutin vaiheen vasteita, jotka ovat samanlaisia kuin mitä on ha-

vaittu akuuttien infektioiden ja shokkitilojen aikana. Krooninen käyttö voi aiheuttaa kakeksiaa ja anoreksiaa. Liiallisen TNF α :n kerääntyminen voi olla tappavaa. Eläinmallikokeista on saatu merkittäviä todisteita siitä, että

5 TNF α :n vaikutusten salpaaminen spesifisillä vasta-aineilla voi olla hyödyllistä akuuteissa infektioiden, shokkitiloissa, siirrännäisen ja isännän välisissä reaktioissa ja autoimmuunitaudissa. TNF α on myös joidenkin myeloomien ja lymfoomien autokriininen kasvutekijä ja se voi toimia normaal

10 maalin hematopoiesin estämiseksi näitä kasvaimia sairastavilla potilailla.

Sen vuoksi TNF α :n tuotannon tai toiminnan estämisen ennustetaan olevan tehokas hoidollinen menettely monien tulehdustautien, infektiotautien, immunologisten tai pahanlaatuisten tautien hoitamiseksi. Näihin tauteihin sisältyvät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, septinen shokki, hemodynaaminen shokki ja sepsisoireyhtymä [Mathison et al., J. Clin. Invest., 81:1925 - 1937 (1988); Miethke et al., J. Exp. Med., 175:91 - 98 (1992)], iskemian jälkeinen

15 reperfuusiovamman, malaria [Grau et al., Immunol. Rev., 112:49 - 70, (1989)]; mykobakteeri-infektio [Barnes et al., Infect. Imm., 60:1441 - 1446 (1992)], aivokalvontulehdus, proriasis, kongestiivinen sydämen vajaatoiminta, fibroottinen tauti, kakeksia, siirrännäisen hyljintä, syöpä,

20 autoimmuunitauti, nivelreuma, multippeliskleroosi, säteilysvamma, toksisuus immuunivastetta heikentävien monoklonaalisten vasta-aineiden, kuten OKT3:n tai CAMPATH-1:n, käytön jälkeen ja hyperoksinen (hyperoxic) keuhkorakkulavamma.

Tämänhetkiset kliiniset anti-TNF α -hoidot käsittävät kortikosteroidien, kuten deksametasonin, käytön ja sytokiinin geenin transkription ei-spesifisten estäjien, syklosporiini-A:n tai FK506:n käytön. Fosfodiesterasiestäjien, kuten pentoksifylliinin, on osoitettu olevan TNF α -geenin

30 transkription spesifisempiä estäjiä [Endres, S.,

35

Immunol., 72:56 - 60 (1991); Schandene et al., Immunol., 76:30 - 34 (1992); Alegre ML. et al., Transplantation 52: 674 - 679 (1991); Bianco et al., Blood, 78:1205 - 1221 (1991)]. Talidomidin on myös osoitettu estävän leukosyytien TNF α -tuotantoa [Sampajo et al., J. Exp. Med., 173: 699 - 703 (1991)]. Kokeellisissa puitteissa monoklonaalisten anti-TNF α -vasta-aineiden, liukoisten TNF-reseptoreiden ja liukoisten TNF-reseptori/immunoadhesiinien on osoitettu estävän spesifisesti TNF α :n toiminnan vaikutuksia [Bagby et al., J. Infect. Dis., 163:83 - 88 (1991); Charpentier et al., Presse-med., 20:2009 - 2011 (1991); Silva et al., J. Infect. Dis., 162:421 - 427 (1990); Franks et al., Infect. Immun., 59:2609 - 2614 (1991); Tracey et al., Nature 330:662 - 664 (1987); Fischer et al., PNAS USA, painossa (1992); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol., 21: 2883 - 2886 (1991); Ashkenazi et al., PNAS USA 88:10535 - 10539 (1991)].

Äskettäin on osoitettu, että kaksi peptidiä, TNF α ja TNF β , välittää TNF:n vaikutuksia. Vaikka näillä peptideillä on vain 30 %:n homologia toistensa kanssa, ne aktivoivat samat reseptorit ja ne ovat välittömästi vierekkäisten geenien koodaamia. Näin ollen tässä käytettynä termi tuumorinekroositekijä eli TNF tarkoittaa tuumorinekroositekijä- α :aa ja peptidejä, joilla on suuri sekvenssihomologian aste TNF α :n kanssa tai oleellisesti samanlaiset fysiologiset vaikutukset sen kanssa, esimerkkinä TNF β . Yksi tämän keksinnön kohteista on sellaisten yhdisteiden tuottaminen, jotka estävät oleellisesti TNF:n vapautumisen soluista ja näin ollen mainittuja yhdisteitä voidaan käyttää TNF:n välittämien sairauksien hoidossa. Tällaisiin käyttökohteisiin sisältyy, rajoittumatta kuitenkaan siihen, tulehduksen, kuumeen, kardiovaskulaaristen vaikutusten, verenvuodon, koagulaation ja akuutin vaiheen vasteen, kakeksian ja anoreksian, akuuttien infektioiden, shokki-

tilojen, siirrännäisen ja isännän välisten reaktioiden ja autoimmuunitaudin hoito.

On osoitettu, että yhdisteet, joilla on ominaisuus estää sidekudoksen hajoamisessa osallisina olevien metalloproteinaasien, kuten kollagenaasin, stromelysiinin ja gelatinaasin, toiminta, estävät TNF:n vapautumisen sekä in vitro että in vivo [AJH Gearing et al., Nature, 370:555 - 557 (1994); GM McGeehan et al., Nature, 370:558 - 561 (1994); MJ Crimmin et al., WO93/20047]. Kaikki nämä raportoidut estäjät sisältävät hydroksamidihapon sinkkiä sitovan ryhmän.

Näin ollen tämän keksinnön muu kohde on sellaisten yhdisteiden tuottaminen, jotka TNF:n vapautumisen estämisen lisäksi estävät myös MMP-entsyymien toimintaa ja siten mainittuja yhdisteitä voidaan käyttää TNF:n ja/MMP-entsyymien välittämiä sairauksia sairastavien potilaiden hoidossa.

Kuten alan ammattimiehet ymmärtävät, merkittävä homologiaosuus ihmisen fibroblastikollagenaasin, stromelysiinin ja gelatinaasin välillä johtaa mahdollisuuteen, että yhdiste, joka estää yhtä entsyymiä, voi estää jossakin määrin niitä kaikkia.

Kollagenaasia estäviin yhdisteisiin, joilla on rakenteellisia osuuksia, jotka ovat samanlaisia kuin tämän keksinnön yhdisteillä, sisältyvät yhdisteet, jotka sisältyvät US-patenttijulkaisu 4 511 504, julkaistu 16. huhtikuuta, 1985; US-patenttijulkaisu 4 568 666, julkaistu 4. helmikuuta, 1986.

Rakenteeltaan läheiset yhdisteet, joiden väitetään estävän stromelysiiniä (proteoglykanaasi), sisältyvät US-patenttijulkaisuun 4 771 037, julkaistu 13. syyskuuta, 1988.

Patentin hakijat uskovat, että stromelysiini- ja kollagenaasiestäjillä on käyttöä septiseen niveltulehduksen liittyvän nivelen rustovaurion hoidossa. Nivelten bak-

teeri-infektiot voivat herättää tulehduksellisen vasteen, joka voi sitten säilyä kauemmin kuin mitä on tarpeen infektiivisen aineen poistamiseksi johtaen rakenteellisten aineosien pysyvään vaurioon. Bakteeriaineita on käytetty eläinmalleissa niveltulehdusvasteen herättämiseksi, jolla on proteolyyttisten toimintojen ilmenemistapa. Katso julkaisut J. P. Case et al., J. Clin. Invest., 84:1731 - 1740 (1989); R. J. Williams et al., Arth. Rheum., 33:533 - 541 (1990).

10 Patentin hakijat uskovat myös, että stromelysiinin, kollagenaasin ja gelatinaasin estäjät ovat käyttökelpoisia kasvaimen etäpesäkkeiden muodostumisen hillitsemisessä mahdollisesti yhdistelmässä nykyisen kemoterapian ja/tai sädehoidon kanssa. Katso julkaisut L. M. Matrisian et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:9413 - 9417 (1986); S. M. Wilhelm et al., Ibid., 84:6725 - 6729 (1987); Z. Werb et al., J. Cell Biol., 109:872 - 889 (1989); L. A. Liotta et al., Lab. Invest., 49:636 - 649 (1983); R. Reich et al., teoksessa Metastasis; Ciba Foundation Symposium, Wiley, 20 Chicester, sivut 193 - 210, 1988.

Erittäyneillä proteinaaseilla, kuten stromelysiinillä, kollagenaasilla ja gelatinaasilla on tärkeä osuus prosesseissa, jotka koskevat solujen liikkumista metastaatin kasvaimen invaasion aikana. On myös todisteita siitä, että matriisin metalloproteinaasit yli-ilmentyvät tietyissä metastaatissa kasvainsolulinjoissa. Tässä yhteydessä entsyymi toimii tunkeutuakseen alla oleviin tyvikalvoihin ja sallii kasvainsolun karkaamisen primaarisen kasvaimen muodostuspaikasta ja pääsyn verenkiertoon. Tartuttuaan verisuonen seinämiin kasvainsolut käyttävät näitä samoja metalloproteinaaseja tunkeutuakseen allaolevien tyvikalvojen läpi ja muihin kudoksiin johtaen näin kasvaimen etäpesäkkeen muodostumiseen. Tämän prosessin estäminen estäisi etäpesäkkeen muodostumisen ja parantaisi nykyisten kemoterapialääkkeiden ja/tai säteilyhoitojen tehokkuutta.

Nämä estäjät olisivat myös hyödyllisiä hampaan vieruskudokseen liittyvien tautien, kuten ientulehduksen, hillitsemiseksi. Sekä kollagenaasin että stromelysiinin toimintoja on eristetty fibroblasteista, jotka ovat peräisin tulehtuneista ikenistä [V. J. Uitto et al., J. Periodontal Res., 16:417 - 424 (1981)]. Entsyymipitoisuudet ovat korreloineet ientaudin ankaruuden kanssa; C. M. Overall et al., J. Periodontal Res., 22:81 - 88 (1987).

Proteolyttisiä prosesseja on havaittu myös emäksen aiheuttamien palovammojen jälkeen sarveiskalvon haavaumas-
 10 sa [S. I. Brown et al., Arch. Ophthalmol., 81:370 - 373 (1969)]. Merkaptoa sisältävät peptidit estävät todellakin kollagenaasia, joka on eristetty kaniinin emäksen polttamasta sarveiskalvosta [F. R. Burns et al., Invest. Ophthalmol,
 15 30:1569 - 1575 (1989)]. Emäksen polttamien silmien hoito tai infektion aiheuttaman sarveiskalvon haavauman omaavien silmien hoito näiden metalloendoproteinaasien estäjillä yhdistelmässä natriumsitraatin tai natriumaskorbaatin ja/tai antimikrobisten aineiden kanssa voi olla
 20 tehokasta sarveiskalvon etenevän hajoamisen estämiseksi.

Stromelysiini on osallisena munuaisen munuaiskeräsen tyvikalvon (GBM) rakenneosien hajoamisessa, jolloin munuaiskeräsen tyvikalvon tärkein tehtävä on plasman proteiinien pääsyn rajoittaminen virtsaan [W. H. Baricos et al., Biochem. J., 254:609 - 612 (1989)]. Valkuaisvirtsaus, munuaiskeräsen taudin tulos, tarkoittaa liian suurta määrää proteiinia virtsassa, minkä on aiheuttanut munuaiskeräsen tyvikalvon (GBM) lisääntynyt plasman proteiinien läpäisyvyys. GBM:n läpäisyvyyden lisääntymisen pohjalla
 25 30 olevat syyt ovat tuntemattomia, mutta proteinaaseilla, mukaan luettuna stromelysiinillä, voi olla tärkeä osuus munuaiskeräsen taudeissa. Tämän entsyymin estäminen voi lievittää munuaisen toimintahäiriöön liittyvää valkuaisvirtsausuutta.

On ehdotettu, että stromelysiinin aktiivisuuden estäminen voi estää sepelvaltimotukokseen johtavaa ateroskleroottisten plakkien rikkoutumista. Ateroskleroottisten plakkien repeytyminen tai rikkoutuminen on yleisin tapahtuma, joka aloittaa sepelvaltimotukoksen. Plakin halkeilemisen syyksi on ehdotettu näitä plakkeja ympäröivän sidekudosmatriisin epävakautta ja hajoamista tiikkuvien tulehdussolujen vapauttamien proteolyyttisten entsyymien tai sytokiinien vaikutuksesta. Näiden plakkien repeäminen voi aiheuttaa akuutin trombolyyttisen tapahtuman veren virratessa nopeasti ulos verisuonesta. On havaittu, että suuria määriä stromelysiini-RNA-lähetäiä on sijoittunut yksittäisiin soluihin ateroskleroottisissa plakeissa, jotka on poistettu sydämensiirtopotilailta leikkauksen yhteydessä [A. M. Henney et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 88: 8154 - 8158 (1991)]. Stromelysiinin estäminen näiden yhdisteiden avulla voi auttaa ateroskleroottisia plakkeja stabiloivan sidekudosmatriisin hajoamisen estämisessä tai pitkittämisessä estäen näin tapahtumia, jotka johtavat akuuttiin sepelvaltimotukokseen.

Uskotaan myös, että stromelysiinin ja kollagenaasin spesifiset estäjät olisivat käyttökelpoisia raskautta ehkäisevinä aineina. On todisteita siitä, että metalloproteinaasien, mukaan luettuna stromelysiinin ja kollagenaasin, ilmentyminen havaitaan hedelmöittymättömissä munasoluissa ja tsygooteissa ja myöhemmissä pilkkoutumisvaiheissa ja se lisääntyy sikiön kehityksen blastokystivaiheessa ja endodermin erilaistumisessa [C. A. Brenner et al., Genes & Develop., 3:848 - 859, (1989)]. Yhdenmukaisesti kasvaimen invaasion kanssa blastokysti voi ilmentää metalloproteinaaseja tunkeutuakseen kohdun seinämän ekstrasellulaariseen matriisiin implantaation aikana. Stromelysiinin ja kollagenaasin estäminen näiden varhaisten kehitysprosessien aikana estäisi luultavasti normaalin alkion kehittymisen ja/tai kiinnittymisen kohdussa. Tällainen väliin-

tulo muodostaisi uuden ehkäisymenetelmän. Lisäksi on todisteita siitä, että kollageenaasi on tärkeä ovulaatioprosesseissa. Tässä esimerkissä munasolun täytyy tunkeutua follikkelin apikaalisen alueen päällä olevan kollageenipeitteen läpi päästäkseen ulos. Kollageenaasi on havaittu tämän prosessin aikana ja estäjän on osoitettu olevan tehokas ovulaation estämiseksi [J. F. Woessner et al., *Steroids*, 54:491 - 499 (1989)]. Stromelysiinin aktiivisuudella voi myös olla osuutta ovulaation aikana [C. K. L. Too et al., *Endocrin.*, 115:1043 - 1050 (1984)].

Kollagenolyttinen aktiivisuus ja stromelysiiniaktiivisuus on myös havaittu epidermolysis bullosa dystrophicassa [A. Kronberger et al., *J. Invest. Dermatol.*, 79:208 - 211 (1982); D. Sawamura et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184:1003 - 1008 (1991)]. Metalloendoproteinaasien estäminen rajoittaisi ihon sidekudoskomponenttien nopeata hajoamista.

Ekstrasellulaarisen matriisin muodostavien rakenneaineosien lisäksi stromelysiini voi hajottaa muita in vivo substraatteja, mukaan luettuna estäjät, α_1 -proteinaasiestäjä, ja näin ollen se voi vaikuttaa muiden proteinaasien, kuten elastaasin, toimintoihin [P. G. Winyard et al., *FEBS Letts.*, 279, 1:91 - 94 (1991)]. Matriisin metalloendoproteinaasien estäminen voi tehostaa näiden endogeenisten estäjien antiproteinaasiaktiivisuutta.

Viime aikaisista julkaisuista on ilmeistä, että on identifioitu useita uusia MMP-ryhmän enstyyimejä, joista jotkut voivat olla tärkeitä taudissa. Kollageenaasi 3:lla, rintasyöpäsoluille uniikilla entsyymillä, voi olla käyttöä rintasyövässä [JMP Freije et al., *J. Biol. Chem.*, 269(24): 16766 - 16773 (1994)], kun taas MT-MMP:n, toisen MMP-ryhmän jäsenen, on osoitettu olevan avainentsyymi gelatinaasi A:n aktivoitumisessa [H. Sato et al., *Nature*, 370:61 - 65 (1994)]. Gelatinaasi A on tärkeä entsyymi kas-

vainten kasvussa ja etäpesäkkeen muodostuksessa (kuten edellä on määritelty).

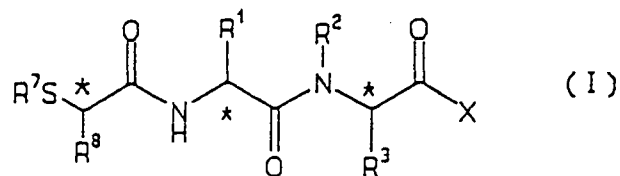
On osoitettu, että β -amyloidiprekursoriproteiinin (APP) hajoaminen tuottaa amyloidiplakkeja, jotka ovat tärkein Alzheimerin tautia (AD) sairastavilla potilailla havaittujen seniilisyönteeseen liittyvien plakkien aineosa. Kahdessa hiljaittain ilmestyneessä julkaisussa on identifioitu metalloproteinaasientsyymit, jotka pilkkovat APP:n amyloidiplakiksi [CR. Abraham et al., Biochemistry, 33:192 - 199 (1994); G. Huber et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 201 (1):45 - 53 (1994)].

Kuten alan ammattimiehet ymmärtävät, merkittävä homologiaosuus näiden uusien entsyymien ja muiden MPP-jäsenten välillä johtaa mahdollisuuteen, että yhdiste, joka estää yhtä entsyymiä, voi estää jossakin määrin näitä uusia entsyymejä. Näin ollen tämän keksinnön piiriin sisältyvät estäjät voivat olla hyödyllisiä taudeissa, joissa nämä uudet entsyymit ovat osallisina.

Yhteenveto keksinnöstä

Keksintö sisältää uudet merkaptoalkyylipeptidyyliyhdisteet, joilla on kaava (1) ja jotka ovat matriisin metalloproteinaasien ja/tai TNF α :n välittämien tautien, mukaan luettuna rappeumatautien (kuten edellä on määritelty) ja tiettyjen syöpien, hyödyllisiä estäjiä.

Keksinnön ensimmäisen näkökohdan mukaisesti on tuotettu yhdiste, jolla on yleinen kaava (I):



jossa

R^1 on C_{1-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli, $-\text{C}_{1-6}$ -alkyyliaryyli, arylyli, $-\text{C}_{1-6}$ -alkyyliheteroaryyli, heteroaryyli tai -

C_{1-6} -alkyyli- AR^9 , jossa A on O, NR^9 tai $S(O)_m$, jolloin m on 0 - 2 ja R^9 on H, C_{1-4} -alkyyli, aryyli, heteroaryyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli tai $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli; jos A = NR^9 , R^9 -ryhmät voivat olla samoja tai erilaisia;

5 R^2 on H tai C_{1-6} -alkyyli;

R^3 on $[Alk]_nR^6$, jossa Alk on C_{1-6} -alkyyli tai C_{2-6} -alkenyli ja n on nolla tai 1;

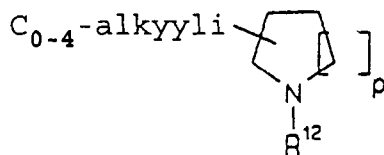
X on NR^4R^5 , jossa joko R^4 on vety tai C_{1-6} -alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu aminolla (NH_2), aryyllillä, aryyliaminolla, suojatulla aminolla, di(C_{1-6} -alkyyli)-aminolla, mono(C_{1-6} -alkyyli)aminolla, CO_2H -ryhmällä, suojatulla karboksyyllillä, karbamoyylillä, mono(C_{1-6} -alkyyli)-karbamoyylillä tai di(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyylillä, ja R^5 on vety tai C_{1-6} -alkyyli; tai NR^4R^5 muodostaa renkaan, kuten

10 pyrrolidinon, piperidinon tai morfolinon;

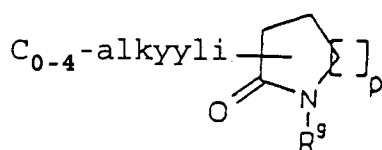
15 R^7 on vety tai $R^{10}CO$, jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli, syklo- (C_{3-6}) -alkyyli, $-C_{1-4}$ -alkyyllisyklo- (C_{3-6}) -alkyyli, C_{2-6} -alkenyli, $-C_{2-6}$ -alkenyliaryyli, aryyli tai heteroaryyli;

20 R^8 on aryyli (substituoitu R^{11} -ryhmällä), heteroaryyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä), C_{1-4} -alkyyli- R^{11} , $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli (substituoitu R^{11} -ryhmällä), $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä), syklo- (C_{3-6}) -alkyyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä), syklo- (C_{3-6}) -alkenyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä), $-C_{1-4}$ -alkyyllisyklo- (C_{3-6}) -alkyyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä) tai mikä tahansa seuraavista kolmesta ryhmästä

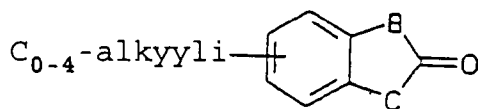
25



tai



5



10

jolloin p on 1 tai 2 ja B ja C on valittu toisistaan riippumatta O-atomista, S-atomista, $\text{C}(\text{R}^9)_2$ -ryhmästä ja NR^9 -ryhmästä;

R^6 on AR^9 , syklo- (C_{3-6}) -alkyyli, syklo- (C_{3-6}) -alkenylyli, C_{1-6} -alkyyli, $-\text{C}_{1-6}$ -alkoksiaryyli, bentsyylioksiaryyli, aryyli, heteroaryyli, $-\text{C}_{1-3}$ -alkyyliheteroaryyli, $-\text{C}_{1-3}$ -alkyyliaryyli, $-\text{C}_{1-6}$ -alkyyli- COOR^9 , $-\text{C}_{1-6}$ -alkyyli- NHR , CONHR , NHCO_2R , NHSO_2R tai NHCOR , jolloin R on kuten ryhmän R^{10} yhteydessä on määritelty;

R^{11} on SO_2R^{13} , SR^7 , SR^9 , COR^{13} , $\text{N}(\text{R}^9)_2$, NR^9R^{12} , OR^9 , sukkinimido tai ftaali-imido;

R^{12} on H tai COR^9 , CO_2R^9 (jossa R^9 ei ole H), CONHR^9 tai SO_2R^9 (jossa R^9 ei ole H); ja

R^{13} on OH, OC_{1-4} -alkyyli, O-C_{1-4} -alkyyliaryyli, $\text{N}(\text{R}^9)_2$ (jossa R^9 -ryhmät ovat samoja tai erilaisia), C_{1-4} -alkyyli, aryyli, heteroaryyli, $-\text{C}_{1-4}$ -alkyyliaryyli tai $-\text{C}_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli;

jolloin yhdiste on ei-suolan, suolan, solvaatin tai hydraatin muodossa.

Keksinnön edullisiin yhdisteisiin sisältyvät yhdisteet, joilla itsenäisesti tai missä tahansa yhdistelmässä:

R^1 on C_{1-6} -alkyyli tai C_{1-4} -alkyyli- AR^9 , jossa A on $S(O)_m$, NR^9 tai O ja $m = 0, 1$ tai 2 ja R^9 on H, C_{1-4} -alkyyli tai aryyli;

R^2 on H tai C_{1-4} -alkyyli;

5 R^3 on $[Alk]_nR^6$, jossa $n = 0$ tai 1 , Alk on C_{1-4} -alkyyli ja R^6 on C_{1-4} -alkyyli, C_{1-3} -alkyyliaryyli, C_{1-3} -alkyyliheteroaryyli tai AR^9 ;

R^4 on H;

R^5 on H tai C_{1-6} -alkyyli;

10 NR^4R^5 voi muodostaa 5 - 7-jäsenisen renkaan, kuten pyrrolidiinin, piperidiinin tai morfoliinin;

R^7 on H tai $R^{10}CO$, jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli;

R^8 on C_{1-4} -alkyyli- R^{11} , C_{1-4} -alkenyli- R^{11} , syklo- (C_{3-6}) -alkyyli- R^{11} ;

15 R^{11} on COR^{13} , NR^9R^{12} , $N(R^9)_2$, sukkinimido tai ftaaliimido;

R^{12} on COR^9 , CO_2R^9 (edellyttäen, että R^9 ei ole H) tai SO_2R^9 (edellyttäen, että R^9 ei ole H); ja

R^{13} on OH, OC_{1-4} -alkyyli tai $N(R^9)_2$.

20 Keksinnön yhdisteiden IC_{50} -arvot ovat alle 50 mM MMP-entsyymejä vastaan ja/tai alle 50 mM TNF:n estämisen kokonaisten solujen määrityksessä.

On ymmärrettävä, että keksinnön mukaiset yhdisteet voivat sisältää yhden tai useampia asymmetrisesti substituoituja hiiliatomeja, esimerkkinä hiiliatomit, jotka on merkitty tähdellä kaavassa (1). Yhden tai useamman tällaisen asymmetrisen keskuksen läsnäolo kaavan (1) mukaisessa yhdisteessä voi saada aikaan stereoisomeereja ja kaikissa tapauksissa keksinnön ymmärretään ulottuvan kaikkiin tällaisiin stereoisomeereihin, mukaan luettuna enantiomeerit, diastereomeerit ja seokset, mukaan luettuna niiden raseemiset seokset.

25

30

Tässä esitetyissä kaavoissa viivaa ~ käytetään mahdollisessa epäsymmetrisessä keskuksessa edustamaan R- ja

S-konfiguraatioiden mahdollisuutta, merkkiä < ja pilkkuviivaa käytetään edustamaan ainutlaatuista konfiguraatiota epäsymmetrisessä keskuksessa.

5 Tässä patenttiselityksessä käytettynä, yksin tai yhdistelmässä, termi "C₁₋₆-alkyyli" viittaa suoraketjuiseen tai haaroittuneeseen alkyyliosuuteen, jolla on 1 - 6 hiiliatomia, mukaan luettuna esimerkiksi metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, t-butyli, pentyyli, heksyyli ja vastaavat.

10 Termi "C₁₋₄-alkyyli" viittaa suoraketjuiseen tai haaroittuneeseen alkyyliosuuteen, jolla on 1 - 4 hiiliatomia, mukaan luettuna esimerkiksi metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, t-butyli ja vastaavat.

15 Termi "C₂₋₆-alkenylyli" viittaa suoraketjuiseen tai haaroittuneeseen alkyyliosuuteen, jolla on 2 - 6 hiiliatomia ja lisäksi yksi kaksoissidos ja joko E- tai Z-stereokemia, mikäli käyttökelpoista. Tämä termi sisältää esimerkiksi vinyylin, 1-propenyylin, 1- ja 2-butenyylin, 2-metyyli-2-propenyylin jne.

20 Termi "syklo-(C₃₋₆)-alkyyli" viittaa tyydyttyneeseen alisykliseen osuuteen, jolla on 3 - 6 hiiliatomia ja joka käsittää esimerkiksi syklopropyylin, syklobutylin, syklopentylin, sykloheksyylin ja vastaavat.

25 Termi "syklo-(C₃₋₆)-alkenylyli" viittaa alisykliseen osuuteen, jolla on 3 - 6 hiiliatomia ja lisäksi yksi kaksoissidos. Tämä termi sisältää esimerkiksi syklopentenylin tai sykloheksenylin.

30 Termi "aryyli" tarkoittaa mahdollisesti substituotua fenyylitai naftyyli- tai naftyyli-ryhmää, jolloin substituentti (substituentit) on valittu esimerkiksi halogeenista, trifluorimetyylistä, C₁₋₆-alkyylistä, alkoksista, fenyylistä ja vastaavasta. Termi "halogeeni" tarkoittaa fluoria, klooria, bromia tai jodia.

35 Termit "suojattu amino" ja "suojattu karboksi" tarkoittavat amino- ja karboksiryhmiä, jotka on suojattu alan

ammattimiesten tuntemalla tavalla. Esimerkiksi aminoryhmä voidaan suojata bentsyylioksidikarbonyylillä, tert-butoksidikarbonyylillä, asetyyllillä tai vastaavilla ryhmillä, tai ftaali-imidon tai vastaavan ryhmän muodossa. Karboksyyli-

5 ryhmä voidaan suojata helposti lohkaistavan esterin muodossa, kuten metyyli-, etyyli-, bentsyyli- tai tert-butyyliesterin muodossa.

Termi "alkoksi" viittaa suoraketjuiseen tai haaraketjuiseen alkoksiryhmään, joka sisältää enimmillään 6

10 hiiliatomia, kuten metoksiin, etoksiin, propoksiin, isopropoksiin, butoksiin, tert-butoksiin ja vastaavaan.

Termi "C₀₋₄-alkyyli" viittaa sidokseen tai suoraketjuiseen tai haaraketjuiseen alkyylisuuteen, jolla on enintään neljä hiiliatomia, mukaan luettuna esimerkiksi

15 metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli ja vastaavat.

Termi "heteroaryyli" viittaa aromaattisiin rengasjärjestelmiin, joilla on 5 - 10 atomia, joista vähintään yksi atomi on valittu ryhmästä O, N tai S.

Kaavan (I) mukaisten yhdisteiden suoloihin sisältyvät farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, esimerkiksi

20 happoadditiosuolat, jotka on johdettu epäorgaanisista tai orgaanisista hapoista, kuten hydrokloridit, hydrobromidit, p-tolueenisulfonaatit, fosfaatit, sulfaatit, perklooraatit, asetaatit, trifluoriasetaatit, propionaatit, sitraatit, malonaatit, sukkiinaatit, laktaatit, oksalaatit, tartraatit

25 ja bentsoaatit.

Suoloja voidaan muodostaa myös emästen kanssa. Tällaisiin suoloihin sisältyvät suolat, jotka on johdettu epäorgaanisista tai orgaanisista emäksistä, esimerkiksi

30 alkalimetallisuolat, kuten magnesium- tai kalsiumsuolat, ja orgaaniset amiinisuolat, kuten morfoliini-, piperidini-, dimetyyliamiini- tai dietyyliamiinisuolat.

Kun "suojattu karboksi" -ryhmä keksinnön yhdisteissä on esteröity karboksyyli-ryhmä, se voi olla aineenvaihdunnallisesti labiili esteri, jolla on kaava CO₂R¹⁴, jossa

35

R¹⁴ voi olla etyyli-, bentsyyli-, fenetyyli-, fenyylipropyyli-, α - tai β -naftyyli-, 2,4-dimetyylifenyyli-, 4-tert-butyylifenyli-, 2,2,2-trifluorietyyli-, 1-(bentsyylioksi)bentsyyli-, 1-(bentsyylioksi)etyyli-, 2-metyyli-1-propionyylioksipropyyli-, 2,4,6-trimetyylibentsyylioksimetyyli- tai pivaloyylioksimetyyliryhmä.

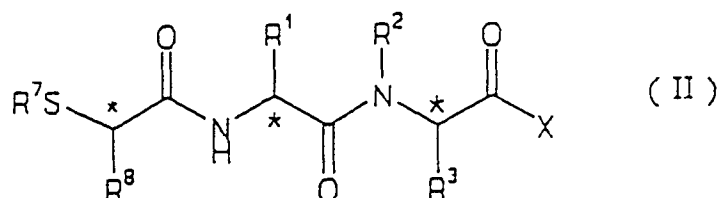
Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa käyttämällä mitä tahansa sopivaa alalla tunnettua menetelmää ja/tai seuraavia menetelmiä, jotka sinänsä muodostavat osan keksintöä.

Keksinnön toisen näkökohdan mukaisesti on tuotettu menetelmä edellä määritellyn yleisen kaavan (I) mukaisen yhdisteen valmistamiseksi. On ymmärrettävä, että kun edellytetään tiettyä kaavan (I) mukaista stereoisomeeria, tässä kuvattuja synteettisiä menetelmiä voidaan käyttää lähtien sopivasta homokiraalisesta lähtöaineesta ja/tai isomeerit voidaan erottaa seoksista käyttäen tavanomaista erotustekniikkaa (esim. HPLC:tä).

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa käyttämällä seuraavaa menetelmää. Jäljempänä selostuksessa ja kaavoissa ryhmät R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, A, B, C ja X ovat kuten edellä on määriteltä, ellei toisin mainita. On ymmärrettävä, että funktionaalisten ryhmien, kuten amino-, hydroksyyli- tai karboksyyli-ryhmien, jotka ovat läsnä seuraavassa kuvatuissa erilaisissa yhdisteissä ja jotka halutaan säilyttää, on ehkä oltava suojatussa muodossa ennen kuin mitään reaktiota aloitetaan. Tällaisissa tapauksissa suojaryhmän poistaminen voi olla viimeinen vaihe nimenomaisessa reaktiossa. Sopivat suojaryhmät tällaisen funktionaalisuuden suojaamiseksi ovat selviä alan ammattimiehille. Erityisiä yksityiskohtia varten katso julkaisu "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley Interscience, T. W. Greene, PGM Wuts. Näin ollen menetelmä yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi käsittää vaiheet, joissa:

poistetaan suojaus (esimerkiksi hydrolyysin avulla yhdisteestä, jolla on yleinen kaava (II))

5



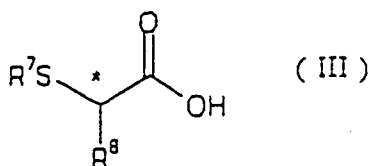
10

jossa R^7 esittää sopivaa suojaryhmää (esim. tert-butyyliä tai asetaattia). On ymmärrettävää, että kun edellytetään tiettyä kaavan (I) mukaista stereoisomeeria, tämä voidaan saada käyttämällä tavanomaista erotustekniikkaa, kuten suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa. Haluttaessa voidaan kuitenkin käyttää tarkoituksenmukaisia homokiraalisia lähtöaineita kytkentäreaktiossa kaavan (I) mukaisen määrätyn stereoisomeerin saamiseksi. Tästä esitetään esimerkki seuraavassa.

15

20

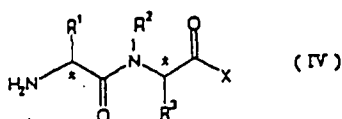
Yleisen kaavan (II) mukaisia välituotteita voidaan valmistaa kytkemällä happo, jolla on kaava (III)



25

jossa R^7 ja R^8 ovat kuten edellä on määritelty, tai sen aktiivinen johdannainen amiiniin, jolla on kaava (IV)

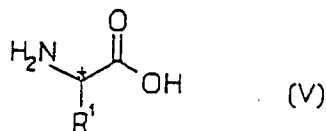
30



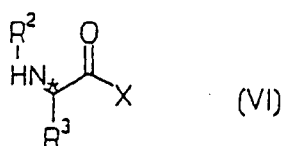
Kaavan (III) mukaisten happojen aktiivisiin johdannaisiin sisältyvät esimerkiksi happoanhydridit tai happohalidit, kuten happokloridit.

Kytkentäreaktio voidaan toteuttaa käyttäen tämän tyyppisten aminointireaktioiden standardimaisia olosuhteita. Näin ollen reaktio voidaan toteuttaa liuottimessa, esimerkiksi inertissä orgaanisessa liuottimessa, kuten eetterissä, esim. sykklisessä eetterissä, kuten tetrahydrofuraanissa, amidissa, esimerkiksi substituoidussa amidissa, kuten dimetyyliformamidissa, tai halogenoidussa hiilivedyissä, kuten dikloorimetaanissa, matalassa lämpötilassa, joka on esim. $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$:sta ympäröivään lämpötilaan, kuten $-20 - 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, mahdollisesti emäksen läsnäollessa, esimerkiksi orgaanisen emäksen, kuten amiinin, esimerkiksi trietyyliamiinin, tai sykklisen amiinin, kuten N-metyylimorfoliinin, läsnäollessa. Käytettäessä kaavan (III) mukaista happoa reaktio voidaan toteuttaa lisäksi kondensaatioaineen, esimerkiksi di-imidin, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodiimidin, läsnäollessa, edullisesti triatsolin, kuten 1-hydroksibentsotriatsolin, läsnäollessa. Vaihtoehtoisesti happo voidaan saattaa reagoimaan kloroformaatin, esimerkiksi etyylikloroformaatin, kanssa ennen reaktiota kaavan (IV) mukaisen amiinin kanssa.

Yleisen kaavan (IV) mukainen amiini voidaan valmistaa kytkemällä happo, jolla on kaava (V)



tai sen aktiivinen johdannainen amiiniin, jolla on kaava (VI)

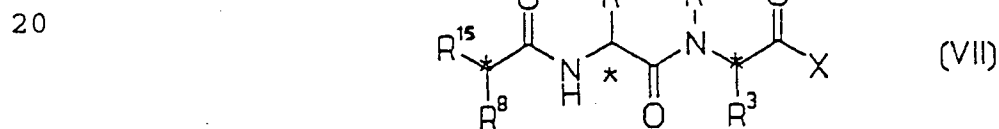


ja sen jälkeen poistamalla kaikki suojaryhmät.

Kaavan (V) mukaisten happojen aktiivisiin johdannaisiin sisältyvät esimerkiksi happoanhydridit tai happohalidit, kuten aikaisemmin kuvatut happokloridit.

5 Yleisten kaavojen (V) ja (VI) mukaisia aminohappoja ja niiden johdannaisia voidaan saada kiraalisessa tai ra-
seemisessa muodossa. Kiraalisessa muodossa ne tuottavat
asymmetrisiä rakenneosia yleisen kaavan (1) mukaisten yh-
disteiden kiraalista synteisiä varten. Monia näistä joh-
10 dannaisista voidaan saada helposti kaupallisesti saatavis-
sa olevista lähtöaineista käyttäen alan ammattimiesten
tuntevia menetelmiä (katso julkaisut "The Practice of Pep-
tide Synthesis", M. Bodanszk et al., Springer Verlag, New
York, 1984, P. L. Durette, W092/21 360).

15 Tämän keksinnön muuna lisäyksenä yleisen kaavan
(II) mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa substituomalla
nukleofiilisesti yhdisteet, joilla on yleinen kaava (VII)



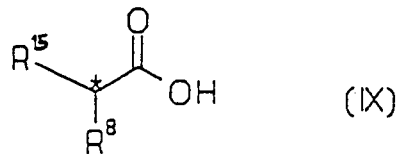
jossa R¹⁵ esittää sopivaa poistuvaa ryhmää (esim.
25 halogeenia, kuten bromidia, tai alkyylisulfonaattiesteriä,
kuten metaanisulfonaattia), tiolilla, jolla on yleinen
kaava (VIII)



30 jossa R⁷ esittää sopivaa suojaryhmää (esim. tert-
butyyliä tai asetaattia), käyttäen standardiolosuhteita,
jotka ovat alan ammattimiesten tuntevia, kuten esimerkkinä
on esitetty julkaisussa W090/05 719. Yleisen kaavan (VIII)
35 mukaisia tioleja voidaan saada kaupallisesti saatavissa

olevista lähtöaineista käyttäen alan ammattimiesten tunte-
mia menetelmiä. Monet yleisen kaavan (VIII) mukaiset tio-
lit ovat myös kaupallisesti saatavissa.

Yleisen kaavan (VII) mukaisia yhdisteitä voidaan
5 valmistaa kytkemällä happo, jolla on yleinen kaava (IX)



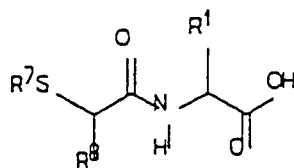
10

jossa R^{15} ja R^8 ovat kuten edellä on määritelty (tai
niiden sopivasti suojattuja muunnelmia), tai sen aktiivi-
nen johdannainen kaavan (IV) mukaiseen amiiniin käyttäen
15 samanlaisia kytkentäolosuhteita kuin edellä on kuvattu
kaavan (II) mukaisten yhdisteiden valmistuksen yhteydessä.
Kaavojen (III) ja (IX) mukaisen rakenteen omaavia karboks-
yylihappoja voidaan saada kiraalisessa tai raseemisessa
muodossa. Monet näistä johdannaisista ovat helposti saata-
vissa kaupallisista lähtöaineista käyttäen alan ammatti-
miesten tuntemia menetelmiä (katso julkaisu WO90/05 719).

20

Tämän keksinnön muuna lisäyksenä yleisen kaavan
(II) mukaisia välituotteita voidaan valmistaa kytkemällä
happo, jolla on kaava (X)

25



30

jossa R^1 , R^7 ja R^8 ovat kuten edellä on määritelty,
tai sen aktiivinen johdannainen kaavan (VI) mukaiseen
amiiniin käyttämällä edellä kuvattua menetelmää.

Yleisen kaavan (X) mukaisia happoja voidaan vuoros-
35 taan valmistaa kytkemällä kaavan (III) mukainen happo tai

sen aktiivinen johdannainen amiiniin, jolla on kaava (VI), jossa X = OH tai sen sopivasti suojattu johdannainen, ja poistamalla sen jälkeen mitkä tahansa suojaryhmät.

5 Kaavan (V) mukaisten happojen aktiivisiin johdannaisiin sisältyvät esimerkiksi happoanhydridit tai happohalidit, kuten aikaisemmin kuvatut happokloridit.

10 Kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan myös valmistaa kaavan (I) mukaisten muiden yhdisteiden interkonversion avulla. Näin ollen yhdiste, jolla on kaava (I), jossa R^1 on C_{1-6} -alkyyli-ryhmä, voidaan valmistaa hydraamalla (käyttäen palladiumia hiilellä sopivassa liuottimessa, kuten alkoholissa, esim. etanolissa) yhdiste, jolla on kaava (I), jossa R^1 on C_{2-6} -alkenyli-ryhmä. Muuna esimerkkinä yhdiste, jolla on kaava (I), jossa R^7 on ryhmä $R^{10}CO$,
15 voidaan valmistaa asyloimalla (käyttäen sopivaa happokloridia $R^{10}COCl$ emäksen, kuten trietyyliamiinin, läsnäollessa sopivassa liuottimessa, kuten klooratussa liuottimessa, esim. dikloorimetaanissa) yhdiste, jolla on kaava (I), jossa R^7 on H.

20 Saatujen lopputuotteiden tai välituotteiden mitkä tahansa seokset voidaan erottaa ainesosien fysikaalis-keemiallisten erojen perusteella tunnetulla tavalla puhtaiksi lopputuotteiksi tai välituotteiksi esim. käyttämällä kromatografiaa, tislausta, jakokiteyttämistä tai muodostamalla suola, mikäli tarkoituksenmukaista ja mahdollista kysymyksessä olevissa olosuhteissa.

30 Keksinnön mukaiset yhdisteet osoittavat in vitro estävää aktiivisuutta, mitä tulee stromelysiiniin, kollageenaasiin ja gelatinaasiin. Keksinnön mukaiset yhdisteet osoittavat myös in vitro TNF α :n vapautumisen estämistä. Yhdisteiden aktiivisuus ja valikoivuus voidaan määrittää käyttämällä sopivaa entsyymin estämiskoetta, jollainen on kuvattu esimerkiksi jäljempänä esimerkissä A.

35 Tämä keksintö koskee myös menetelmää potilaiden (mukaan luettuna ihminen ja/tai nisäkäseläimet, joita kas-

vatetaan meijeri-, liha- tai turkisteollisuutta varten tai lemmikkieläiminä) hoitamiseksi, jotka kärsivät sairauksista tai taudeista, jotka voidaan lukea matriisin metalloproteinaasien ja/tai TNF α :n syyksi, kuten edellä on kuvattu, ja tarkemmin sanottuna keksintö koskee hoitomenetelmää, joka käsittää kaavan (I) mukaisten matriisin metalloproteinaasien estäjien antamisen potilaalle aktiivisina aineosina.

Näin ollen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää mm. nivelrikon ja nivelreuman hoidossa ja taudeissa ja oireissa, jotka johtuvat näiden matriisin metalloproteinaasien liiallisesta ilmentymisestä, kuten on havaittu tietyissä metastaattisissa kasvainsolulinjoissa.

Kuten edellä on mainittu, kaavan (I) mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia ihmis- ja eläinlääketieteessä, koska ne ovat aktiivisia TNF α :n ja MMP-entsyymien estäjinä. Näin ollen muun näkökohdan mukaisesti tämä keksintö koskee:

menetelmää TNF α :n ja/tai MMP-entsyymien välittämien tautien tai sairauksien hoitamiseksi (hoitamisella tarkoitetaan hoitoa tai ennalta ehkäisyä) nisäkkäillä, erityisesti ihmisellä, jolloin menetelmässä nisäkkäälle annetaan tehokas määrä edellä esitetyn kaavan (I) mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa; ja

kaavan (I) mukaisen yhdisteen käyttöä ihmis- tai eläinlääketieteessä, erityisesti TNF α :n ja/tai MMP-entsyymien välittämien tautien tai sairauksien hoidossa (jolla tarkoitetaan hoitoa tai ennaltaehkäisyä); ja

kaavan (I) mukaisen yhdisteen käyttöä lääkkeen valmistamiseksi TNF α :n ja/tai MMP-entsyymien välittämien tautien tai sairauksien hoitamiseksi (jolloin hoitamisella tarkoitetaan hoitoa tai ennaltaehkäisyä).

Tauteihin tai sairauksiin, joihin on edellä viitattu, sisältyvät tulehdus, kuume, kardiovaskulaariset vaikutukset, verenvuoto, koagulaatio ja akuutin vaiheen vas-

te, kakeksia ja anoreksia, akuutit infektiot, shokkitilat, siirrännäisen ja isännän väliset reaktiot ja autoimmuunitaluti; ja kudoksen hajoamiseen liittyvät taudit ja sairaudet, kuten luun resorptio, tulehdustaudit, ihosairaudet, kasvaimen kasvu, sekundaaristen kasvainten etäpesäkkeiden angiogeneesi ja invaasio, erityisesti nivelreuma, nivelrikko, hampaanvierustulehdus, ientulehdus, sarveiskalvon haavauma, kasvaimen kasvu, sekundaaristen etäpesäkkeiden angiogeneesi ja invaasio.

10 Nivelreuman ja nivelrikon hoitamiseksi ja taudeissa ja indikaatioissa, jotka johtuvat matriisin metalloproteinaasien liiallisesta ilmentymisestä, kuten on havaittu tietyissä metastaattisissa kasvainsolulinjoissa, tai muissa taudeissa, jotka ovat matriisin metalloproteinaasien tai lisääntyneen TNF α :n tuotannon välittämiä, kaavan (I) mukaiset yhdisteet voidaan antaa potilaalle suun kautta, paikallisesti, parenteraalisesti, inhalaatiosuihkeena tai peräsuolen kautta annosyksikkövalmisteissa, jotka sisältävät myrkyttömiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia, adjuvantteja ja vehikkeleitä. Tässä käytettynä termi parenteraalinen sisältää ihonalaiset ruiskeet ja laskimonsisäisen, lihaksensisäisen, rintalastan sisäisen ruiske- tai infuusiotekniikan. Lämminveristen eläinten, kuten hiirten, rottien, hevosten, nautakarjan, lampaiden, koirien, kissojen jne hoidon lisäksi keksinnön yhdisteet ovat tehokkaita ihmisen hoidossa.

Aktiivisen aineen sisältävä farmaseuttinen koostumus voi olla muodossa, joka on sopiva käytettäväksi suun kautta esimerkiksi, tabletteina, suussa liukenevina tabletteina, pastilleina, vesipitoisina tai öljyisinä suspensioina, dispergoitavina jauheina tai rakeina, emulsioina, kovina tai pehmeinä kapseleina tai siirappeina tai eliksiireinä. Suun kautta käytettäväksi tarkoitettuja koostumuksia voidaan valmistaa minkä tahansa alalla tunnetun menetelmän mukaisesti farmaseuttisten koostumusten valmis-

tamiseksi ja tällaiset koostumukset voivat sisältää yhden tai useampia aineita, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu makeuttamisaineista, makuaineista, väriaineista ja säilöntäaineista farmaseuttisesti tyylikkaiden ja mait-
 5 tavien valmisteiden tuottamiseksi. Tabletit sisältävät aktiivisen aineen seoksessa myrkyttömien farmaseuttisesti hyväksyttävien täyteaineiden kanssa, jotka ovat sopivia tablettien valmistamiseksi. Nämä täyteaineet voivat olla esimerkiksi inerttejä laimennusaineita, esimerkkinä kalsi-
 10 umkarbonaatti, natriumkarbonaatti, laktoosi, kalsiumfosfaatti tai natriumfosfaatti; rakeistus- ja hajotusaineita, esimerkkinä maissitärkkelys tai algiinihappo; sideaineita, esimerkkinä tärkkelys, gelatiini tai arabikumi; ja voiteluaineita, esimerkkinä magnesiumstearaatti, steariinihappo tai talkki. Tabletit voivat olla päällystämättö-
 15 miä tai ne voi olla päällystetty tunnetun tekniikan avulla tabletin hajoamisen ja lääkkeen imeytymisen viivyttämiseksi ruuansulatuskanavassa ja näin ollen pitkäaikaisen vaikutuksen tuottamiseksi. Esimerkiksi voidaan käyttää hidastavaa materiaalia, kuten glyseryylimonostearaattia tai glyseryylidistearaattia. Ne voivat myös olla päällystetty käyttäen tekniikkaa, joka on kuvattu US-patenteissa
 20 4 256 108; 4 166 452 ja 4 265 874, osmoottisten hoidollisten tablettien muodostamiseksi lääkkeen kontrolloitua vapautumista varten.

Suun kautta käytettäväksi tarkoitetut valmisteet voidaan myös tuottaa kovagelatiinikapseleina, joissa aktiivinen aine on sekoitettu inertin kiinteän laimennusaineen, esimerkiksi kalsiumkarbonaatin, kalsiumfosfaatin tai kaoliinin, kanssa, tai pehmeägelatiinikapseleina, joissa aktiivinen aine on sekoitettu veden tai öljyväliaineen, esimerkiksi maapähkinäöljyn, nestemäisen paraffiinin tai oliiviöljyn, kanssa.

Vesipitoiset suspensiot sisältävät aktiiviset aineet seoksessa täyteaineiden kanssa, jotka ovat sopivia

vesipitoisten suspensioiden valmistusta varten. Tällaisia täyteaineita ovat suspendoimisaineet, esimerkiksi natriumkarboksimeetyyliselluloosa, metyyyliselluloosa, hydroksipropyylimetyyliselluloosa, natriumalginaatti, polyvinyylipyrrolidoni, traganttikumi ja arabikumi; dispergoimis- tai kostutusaineet voivat olla luonnossa esiintyvä fosfatidi, esim. lesitiini, tai alkyleenioksidin ja rasvahappojen kondensaatiotuotteita, esim. polyoksieteenistearaatti, tai eteenioksidin ja pitkäketjuisten alifaattisten alkoholien kondensaatiotuotteita, esim. heptadekaeteenioksisetanoli, tai eteenioksidin ja rasvahapoista ja heksitolista johdettujen osittaisten estereiden kondensaatiotuotteita, kuten polyoksieteeni rasvahapoista ja heksitolianhydrideistä johtettujen osittaisten estereiden kanssa, esimerkiksi polyoksieteenisorbitaanimonooleaatit. Vesipitoiset suspensiot voivat sisältää myös yhden tai useampia säilöntäaineita, esimerkkinä etyyli- tai n-propyyli- tai p-hydroksibentsoaatti, yhden tai useampia väriaineita, yhden tai useampia makuaineita ja yhden tai useampia makeutusaineita, esimerkkinä sakkaroosi tai sakkariini.

Öljyiset suspensiot voidaan formuloida suspendoimalla aktiivinen aine kasviöljyyn, esimerkiksi maapähkinäöljyyn, oliiviöljyyn, seesamiöljyyn tai kookospähkinäöljyyn, tai kivennäisöljyyn, kuten nestemäiseen paraffiiniin. Öljyiset suspensiot voivat sisältää sakeuttamisaineen, esimerkkinä mehiläisvaha, kova paraffiini tai setyylialkoholi. Makeuttamisaineita, jollaiset on esitetty esimerkiksi edellä, ja makuaineita voidaan lisätä maittavan suun kautta otettavan valmisteen tuottamiseksi. Nämä koostumukset voidaan säilöä lisäämällä niihin hapettumisenestoainetta, kuten askorbiinihappoa.

Dispergoitavat jauheet ja rakeet, jotka ovat sopivia vesipitoisen suspension valmistamiseksi lisäämällä vettä, tuottavat aktiivisen aineen seoksessa dispergoimis- tai kostutusaineen, suspendoimisaineen ja yhden tai use-

amman säilöntäaineen kanssa. Sopivat dispergoimis- tai kostutusaineet ja suspendoimisaineet on esitetty esimerkiksi, läsnä voi olla myös esimerkiksi makeutusaineita, makuaineita ja väriaineita.

5 Keksinnön farmaseuttiset koostumukset voivat olla myös öljy-veteen-emulsioiden muodossa. Öljyfaasi voi olla kasviöljy, esimerkiksi oliiviöljy tai maapähkinäöljy, tai kivennäisöljy, esimerkiksi nestemäinen paraffiini tai näiden seos. Sopivia emulgointiaineita voivat olla luonnossa esiintyvät kumit, esimerkiksi arabikumi tai traganttikumi, 10 luonnossa esiintyvät fosfatidit, esimerkiksi soijapapu, lesitiini ja esterit tai rasvahapoista ja heksitolianhydrideistä johdetut osittaiset esterit, esimerkiksi sorbitaanimono-oleaatti ja mainittujen osittaisten estereiden 15 kondensaatiotuotteet eteenioksidin kanssa, esimerkiksi polyoksieteenisorbitaanimono-oleaatti. Emulsiot voivat sisältää myös makeutus- ja makuaineita.

Siirapit ja eliksiirit voidaan myös formuloida makeutusaineiden, esimerkiksi glyserolin, propeeniglykolin, 20 sorbitolin tai sakkaroosin, kanssa. Tällaiset valmisteet voivat sisältää myös ärsytystä lievittävän lääkkeen, säilöntäaineen ja makuaineita ja väriaineita. Farmaseuttiset koostumukset voivat olla steriilin ruiskutettavan vesipitoisen tai öljyisen suspension muodossa. Tämä suspensio 25 voidaan formuloida tunnetulla tavalla käyttäen sopivia dispergoimisaineita tai kostutusaineita ja suspendoimisaineita, jotka on mainittu edellä. Steriili ruiskeena annettava valmiste voi myös olla steriilissä ruiskutettavassa liuoksessa tai suspensiossa myrkyttömässä parenteraalisesti hyväksyttävässä laimennusaineessa tai liuottimessa, 30 esimerkiksi liuoksena 1,3-butaanidiolissa. Hyväksyttäviä vehikkeleitä ja liuottimia, joita voidaan käyttää, ovat vesi, Ringerin liuos ja isotooninen natriumkloridiliuos. Lisäksi steriilejä rasvaöljyjä käytetään tarkoituksenmu- 35 kaisesti liuottimena tai suspendoimisväliaineena. Tätä

tarkoitusta varten voidaan käyttää mitä tahansa mietoa rasvaöljyä, mukaan luettuna synteettiset mono- tai diglyseridit. Lisäksi rasvahapoilla, kuten öljyhapolla, on käyttöä ruiskutettavien aineiden valmistuksessa.

5 Kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan antaa potilaalle myös peräpuikkojen muodossa lääkkeen antamiseksi peräsuolen kautta. Nämä koostumukset voidaan valmistaa sekoittamalla lääke sopivan ärsyttämättömän täyteaineen kanssa, joka on kiinteä tavallisissa lämpötiloissa, mutta
10 nestemäinen peräsuolen lämpötilassa ja sulaa siten peräsuolella lääkkeen vapauttamiseksi. Tällaisia aineita ovat kaakaovoi ja polyeteeniglykolit.

Paikallista käyttöä varten käytetään emulsiovoiteita, voiteita, hyytelöitä, liuoksia tai suspensioita jne,
15 jotka sisältävät kaavan (I) mukaisia yhdisteitä. (Tämän sovellutuksen tarkoituksia varten paikallinen käyttö sisältää suuvedet ja kurlausvedet).

Annostukset, jotka ovat suuruusluokaltaan noin 0,05 - 140 mg/potilaan ruumiinpaino-kg/päivä, ovat käyttökelpoisia edellä mainittujen sairauksien hoidossa (noin
20 2,5 - 7 g/potilas/päivä). Esimerkiksi tulehdusta voidaan hoitaa tehokkaasti antamalla potilaalle noin 0,01 - 50 mg yhdistettä/ruumiinpaino-kg/päivä (noin 0,5 mg - 3,5 g/potilas/päivä).

25 Aktiivisen aineen määrä, joka voidaan yhdistää kantaja-aineiden kanssa yhden annostusmuodon tuottamiseksi, vaihtelee riippuen hoidettavasta isännästä ja nimenomaisesti lääkkeen antotavasta. Esimerkiksi valmistuksessa, joka on tarkoitettu ihmiselle suun kautta otettavaksi, aktiivisen aineen määrä voi vaihdella välillä noin 5 - 95 prosenttia koko koostumuksesta. Annosyksikkömuodot sisältävät yleensä noin 1 - 500 mg aktiivista ainetta.
30

On kuitenkin ymmärrettävää, että tietty annostaso tietylle potilaalle riippuu erilaisista tekijöistä, mukaan
35 luettuna käytetyn nimenomaisen yhdisteen aktiivisuus, po-

tilaan ikä, ruumiinpaino, yleinen terveys, sukupuoli, ruokavalio, lääkkeen ottoaika, lääkkeen antotapa, erittymisen määrä, lääkeyhdistelmä ja nimenomaisen hoidettavan taudin vakavuus.

5 Seuraavat esimerkit 1 - 79 kuvaavat keksintöä ja keksinnön yhdisteiden valmistusta (tuoreiden välituotteiden kautta, mikäli tarkoituksenmukaista). Esimerkit 1 - G kuvaavat koemenetelmiä. Esimerkeissä käytetään seuraavia lyhenteitä:

10 RT = huoneenlämpötila;
 DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi;
 EDC = 1-(3-dimetyyliaminopropyli)-3-etyylikarbodi-imidihydrokloridi;
 TNF α = tuumorinekroositekijä- α ;
 15 LPS = lipopolysakkaridi
 ELISA = entsyymi-immunologinen määrittäminen.

Välituote 1

(RS)-2-bromi-4-metoksikarbonylibutaanihappo

20 Liuosta, jossa oli d-metyyli-D,L-glutamiinihappoa (6,0 g) [valmistus julkaisun Hanby et al., J. Chem. Soc., 51:3239 (1950) mukaan] ja kaliumbromidia (15,5 g) rikkihapon vesiliuoksessa (1,25 M, 100 ml), käsiteltiin 0 °C:n lämpötilassa annoksittain natriumnitriitillä (4,0 g) yhden tunnin ajan. Liuoksen annettiin lämmentä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin 2 tunnin ajan, sitten se uutettiin etyyliasetaatilla (2 x 100 ml). Yhdistetyt uutteen kuivatettiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin 25 otsikon yhdiste värittömänä öljynä (4,5 g).

TLC: R_f 0,14 (25-%:inen EtOAc-heksaanit).

30 Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 2

(RS)-2-bromi-5-metoksikarbonylipentaanihappo

(RS)-2-amino-5-metoksikarbonylipentaanihaposta (1,8 g) [valmistus perustuu esteröintimenetelmään, joka on

kuvattu lähteessä Hanby et al., J. Chem. Soc., 51:3239 (1950)] vaaleanruskeana öljynä (1,95 g).

TLC: R_f 0,30 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 3

5 **(RS)-2-bromi-6-metoksikarbonyyliheksaanihappo**

(RS)-2-amino-6-metoksikarbonyyliheksaanihaposta (3,93 g) [valmistus perustuu esteröintimenetelmään, joka on kuvattu lähteessä Hanby et al., J. Chem. Soc., 51:3239 (1950)] värittömänä öljynä (4,39 g).

10 TLC: R_f 0,26 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 4

**(RS)-2-asetyylimerkpto-3-metoksikarbonyylipropio-
nihappo**

15 Kaliumtioliasetaatin (1,48 g) liuos metanolissa (2 ml) lisättiin monometyylimaleaatin (1,64 g) [valmistettu menetelmän mukaan, joka on esitetty esimerkkinä lähteessä J. Am. Chem. Soc., 108:3 (1986)] liuokseen ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin poistettiin haihduttamalla ja jäännös jaettiin veden (30 ml) ja dikloorimetaanin (30 ml) kesken ja vesipitoinen kerros 20 tehtiin sitten happamaksi pH-arvoon 3 lisäämällä 2 N suolahapon vesiliuosta. Kerrokset erotettiin ja vesipitoinen kerros uutettiin dikloorimetaanilla (2 x 30 ml). Yhdistetyt orgaaniset uutteen kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin ruskea öljy. Puhdistaminen 25 flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 10-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen värittömänä öljynä (0,48 g).

TLC: R_f 0,30 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

30 **Välituote 5**

**(RS)-2-asetyylimerkpto-4-metoksikarbonyyllibutaani-
happo**

35 Kaliumtioliasetaattia (2,0 g) lisättiin välituotteen 1 (3,0 g) liuokseen etanolissa (30 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuos haihdutet-

tiin tyhjössä ja jäännös jaettiin etyyliasetaatin (30 ml) ja veden (30 ml) kesken. Orgaaninen kerros pestiin sitten kyllästetyllä suolaliuoksella (30 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin otsikon yhdiste

5

värittömänä öljynä (1,83 g).

TLC: R_f 0,46 (EtOAc).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 6

(RS)-2-asetyylimerkapto-5-metoksikarbonylipentaa-
nihappo

10

Välituotteesta 2 (1,89 g) keltaisena öljynä (0,87 g).

TLC: R_f 0,30 (5-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 7

(RS)-2-asetyylimerkapto-5-metoksikarbonyliheksaa-
nihappo

15

Välituotteesta 3 (4,3 g) keltaisena öljynä (2,78 g).

TLC: R_f 0,23 (5-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 8

(RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,4-dibromibutyraatti

20

Bromia (31,3 ml, 0,54 mol) lisättiin tiipoittain 4 tunnin kuluessa 100 °C:n lämpötilassa puhtaaseen sekoitettavaan 4-bromibutyryylikloridiin (100 g, 0,54 mol). Saatu happokloridi jäähdytettiin, sitten se lisättiin tiipoittain 0 °C:n lämpötilassa sekoitettavaan liuokseen, jossa oli tert-butanolia (240 ml) ja trietyyliamiinia (64 ml, 0,461 mol) vedettömässä dikloorimetaanissa (600 ml). Lisättiin 2 M suolahappoa ja kerroset erotettiin. Orgaaninen osuus pestiin sitten peräjälkeen 10-%:isella natriummeta-

25

30

bisulfiittiliuoksella (2 x 500 ml), vedellä (500 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (500 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (120 g, 86 %) ruskeana nesteenä.

$^1\text{H-NMR}$ ((250 MHz, CDCl_3), referenssi TMS): 1,50 (9H, s), 2,45 (2H, q), 3,55 (2H, t) ja 4,40 (1H, dd).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 9

5 (RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,5-dibromipentanoaatti
5-bromivaleryylikloridista (75 g, 0,37 mol) ruskeana öljynä (81 g, 68 %).

$^1\text{H-NMR}$ ((250 MHz, CDCl_3), referenssi TMS): 1,50 (9H, s), 1,8 - 2,3 (4H, m), 3,45 (2H, t) ja 4,18 (1H, dd).

10 **Välituote 10**

(RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,6-dibromiheksanoaatti
6-bromiheksanoyylikloridista (100 g, 0,47 mol) ruskeana öljynä (133 g, 87 %).

15 $^1\text{H-NMR}$ ((250 MHz, CDCl_3), referenssi TMS): 1,50 (9H, s), 1,6 - 2,1 (6H, m), 3,4 (2H, t) ja 4,1 (1H, dd).

Välituote 11

(RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,4-bis-(asetyylimerkapto)butyraatti

20 Kaliumtioliasetaattia (1,51 g, 13,2 mmol) lisättiin välituotteen 8 (2 g, 6,6 mmol) sekoitettavaan liuokseen metanolissa (25 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Seos laimennettiin dikloorimetaanilla (100 ml), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (2 x 50 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä keltaiseksi öljyksi. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 30-%:isella dikloorimetaanilla heksaanissa) tuotti otsikon yhdisteen (1,1 g, 57 %) värittömänä öljynä.

TLC: R_f 0,57 (CH_2Cl_2).

30 Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 12

(RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,5-bis-(asetyylimerkapto)pentanoaatti

35 Välituotteesta 9 (2 g, 6,32 mmol) värittömänä öljynä (1,12 g, 57 %).

TLC: R_f 0,57 (CH_2Cl_2).

Välituote 13

(RS)-(1,1-dimetyylietyyli)-2,5-bis-(asetyylimerkapto)heksanoaatti

5 Välituotteesta 10 (2 g, 6,32 mmol) värittömänä öljynä (1,09 g, 57 %).

TLC: R_f 0,57 (CH_2Cl_2).

Välituote 14

(RS)-2,3-bis-(asetyylimerkapto)propionihappo

10 Tiolietikkahapon (1,12 g) liuos 1 N kaliumhydroksidin vesiliuoksessa (14,7 ml) lisättiin tipoitain 2,3-dibromipropionihapon (1,71 g) liuokseen 1 N kaliumhydroksidin vesiliuoksessa (7,35 ml) ja seosta sekoitettiin 5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Seoksen pH säädettiin arvoon
15 8 - 9 lisäämällä vielä 1 N kaliumhydroksidin vesiliuosta ja seosta sekoitettiin edelleen 2 tunnin ajan, sitten se tehtiin happamaksi pH-arvoon 1 - 2 lisäämällä väkevää suolahappoa ja uutettiin sitten etyyliasetaatilla (2 x 25 ml). Yhdistetyt uutteen kuivatettiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin, jolloin saatiin keltainen öljy. Kahdesta reaktiosta saadut tuotteet yhdistettiin ja puhdistettiin flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 4-%:isella etikkahapolla toluenissa), jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä öljynä (0,422 g).

20
25 TLC: R_f 0,15 (5-%:inen AcOH-tolueneeni).

Välituote 15

(RS)-2,4-bis-(asetyylimerkapto)voihappo

30 Välituotteen 11 (1,1 g, 3,7 mmol) liuos dikloorimeetaanissa (50 ml) käsiteltiin trifluorietikkahapolla (2,9 ml, 37 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Lisättiin vettä (50 ml) ja seos uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 40 ml). Yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin sitten vedellä (50 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (50 ml), kuivatettiin (MgSO_4) ja haihdutettiin

tyhjöissä, jolloin saatiin tuote (870 mg, 98 %) vaaleankeltaisena öljynä.

TLC: R_f 0,12 (25-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

5

Välituote 16

(RS)-2,5-bis-(asetyylimerkapto)pentaanihappo

Välituotteesta 12 (1,1 g, 3,6 mmol) vaaleankeltaisena öljynä (906 mg, 100 %).

TLC: R_f 0,12 (25-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

10

Välituote 17

(RS)-2,6-bis-(asetyylimerkapto)heksaanihappo

Välituotteesta 13 (1,1 g, 3,6 mmol) vaaleankeltaisena öljynä (895 mg, 98 %).

TLC: R_f 0,12 (25-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

15

Välituote 18

4-ftaali-imidobutaanihappo

N-karboetoksiftaali-imidi (10,96 g) lisättiin yhtenä annoksena voimakkaasti sekoitettavaan liuokseen, jossa oli 4-aminobutaanihappoa (5,16 g) ja natriumkarbonaattia (5,35 g) vedessä (150 ml) huoneenlämpötilassa. Seosta sekoitettiin, kunnes oleellisesti kaikki kiinteä materiaali oli liuennut (30 ml), sitten se suodatettiin. Suodos tehtiin happamaksi pH-arvoon 1 lisäämällä 6 N suolahapon vesiliuosta (noin 22 ml) ja valkoinen sakka kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin perusteellisesti vedellä (150 ml). Kiinteä aine kuivattiin ilmassa, sitten tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä kiinteänä aineena (7,35 g).

20

25

30

¹H-NMR ((250 MHz, CDCl₃), referenssi TMS): d 2,03 (2H, pent.) 2,42 (2H, t), 3,78 (2H, t), 7,65 - 7,77 (2H, m), 7,81 - 7,90 (2H, m).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 19**5-ftaali-imidopentaanihappo**

5-aminopentaanihaposta (5,0 g) värittömänä kiinteänä aineena (6,8 g).

5 $^1\text{H-NMR}$ ((250 MHz, CDCl_3), referenssi TMS): d 1,6 - 1,8 (4H, m), 2,20 (2H, t), 3,85 (2H, t), 7,70 - 7,75 (2H, m), 7,85 - 7,95 (2H, m), 10,2 (1H, br s).

Välituote 20**6-ftaali-imidoheksaanihappo**

10 6-aminoheksaanihaposta (5,0 g) värittömänä kiinteänä aineena (5,8 g).

$^1\text{H-NMR}$ ((60 MHz, CDCl_3), referenssi TMS): d 1,5 - 2,4 (6H, m), 2,3 (2H, t), 3,80 (2H, t), 7,8 - 8,1 (4H, m), 10,4 (1H, br s).

15 **Välituote 21**

2-(3-ftaali-imidofenyyli)etikkahappo

2-(3-aminofenyyli)etikkahaposta (3,0 g) kellertävänä kiinteänä aineena (4,0 g, 72 %).

20 TLC: R_f 0,36 (7,5-%:inen MeOH-0,5-%:inen AcOH- CH_2Cl_2).

Välituote 22**cis-3-aminosyklopent-4,5-eenikarboksyylihappo**

Raseemisen laktaamin (50 g, 0,458 mol) liuosta 2 N suolahapossa (1 000 ml) kuumennettiin palautusjäähdyttäen 1 tunnin ajan. Seos haihdutettiin tyhjöissä ja jäännös kiteytettiin asetonista, jolloin saatiin otsikon yhdisteen hydrokloridisuola (73 g, 97 %) valkoisena kiinteänä aineena. Tämä hydrokloridisuola (20 g, 0,122 mol) liuotettiin veteen (300 ml) ja sekoitettu liuosta käsiteltiin amberliitti-ioninvaihtohartsilla (IRA-67), kunnes saavutettiin pH-arvo 7. Sitten hartsi poistettiin suodattamalla, liuotin poistettiin tyhjöissä ja jäännös kiteytettiin asetonista, jolloin saatiin otsikon yhdiste (13,7 g, 88 %) valkoisena kiinteänä aineena.

Välituote 23**cis-3-ftaali-imidosyklopent-4,5-eenikarboksyylihappo**

5 Välituotteen 22 hydrokloridista (22,3 g, 0,136 mol) valkoisena kiinteänä aineena (13,7 g, 39 %).

TLC: R_f 0,37 (1-%:inen AcOH-5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 24**trans-metyyli-3-ftaali-imidosyklopent-4,5-eenikarboksyylaatti**

10 Välituote 23 (23,2 g, 0,183 mol) ja ftaalihappon-
hydridi (27,03 g, 0,183 mol) jauhettiin yhdessä ja sula-
tettiin 190 °C:n lämpötilassa typen alla sekoittaen. Seok-
sen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja jäännös käsi-
teltiin etyyliasetaatilla (120 ml). Lisättiin aktiivihiihl-
15 tä (1,0 g) ja seosta kuumennettiin palautusjäähdyttäen 30
minuutin ajan, se suodatettiin seliitin läpi ja suodos
haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin ftaali-imidohappo-
välituote, cis/trans-isomeerien 1:1 -seos, vaaleankeltaisena
kiinteänä aineena (45,7 g, 97 %).

20 Tämän hapon liuos metanolissa (300 ml) käsiteltiin
väkevällä suolahapolla (0,5 ml) ja seosta kuumennettiin
palautusjäähdyttäen 30 minuutin ajan, sen annettiin jääh-
tyä huoneenlämpötilaan ja liuotin haihdutettiin tyhjöissä.
Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (400 ml) ja liuos
25 pestiin 8-%:isella natriumbikarbonaattiliuoksella (2 x
100 ml), vedellä (100 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella
(100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä,
jolloin saatiin ftaali-imidoesterei cis/trans-isomeerien
1:1-seoksena. Erottaminen flash-pylväskromatografian avul-
30 la (eluoiden 60-%:isella eetterillä pentaanissa) tuotti
otsikon yhdisteen (9,72 g, 20 %) valkoisena kiinteänä ai-
neena.

TLC: R_f 0,46 (40-%:inen pentaani-eetteri).

Välituote 25**trans-3-ftaali-imidosyklopent-4,5-äänikarboksyyliahappo**

Välituotteen 24 (9,72 g, 35,8 mmol) liuosta 0,5 N
 5 suolahpon (100 ml) ja jääetikan (100 ml) seoksessa kuumentettiin palautusjäähdyttämällä 30 minuutin ajan. Seos laimennettiin vedellä (200 ml) ja uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 100 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin raaka tuote, joka kiteytettiin eetteristä (7,56 g, 82 %) valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,48 (1-%:inen AcOH-5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 26**cis-3-ftaali-imidosyklopentaanikarboksyyliahappo**

Välituotetta 23 (15,1 g, 58,7 mmol) hydrattiin huoneenlämpötilassa ja ilmakedän paineessa 5-%:isella palladium-hiilellä-katalyytillä (2 g) etyyliasetaatissa (700 ml) yön yli. Katalyytti poistettiin suodattamalla
 20 seliitin läpi ja suodos haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (15 g, 98 %) valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,37 (1-%:inen AcOH-5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 27**trans-3-ftaali-imidosyklopentaanikarboksyyliahappo**

Välituotteesta 25 (7,55 g, 29,3 mmol) valkoisena
 kiinteänä aineena (7,04 g, 93 %).

TLC: R_f 0,47 (1-%:inen AcOH-5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 28**cis-(1,1-dimetyylietyyli)-3-ftaali-imidosyklopentyyliasetaat**

Välituotteen 26 (5,09 g, 19,6 mmol) liuos kuivassa dikloorimetaanissa (60 ml) käsiteltiin oksalyylikloridilla
 35 (3,4 ml, 39,3 mmol), sitten dimetyyliformamidilla (1 tip-

pa). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan, sitten liuotin haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin happokloridivälituote.

Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (30 ml),
 5 sitten liuos käsiteltiin diatsometaanin liuksella eetterissä (200 ml, noin 80 mmol) 0 °C:n lämpötilassa. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli, sitten se haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin diatsoketoni keltaisena kiinteänä aineena. Diatsoketoni liuotettiin tert-butanoliiin (100 ml) ja liuosta kuumennettiin palautusjäähdyttämällä, kun siihen lisättiin hopeabentsoaatin (438 mg, 1,9 mol) liuos trietyyliamiinissa (5 ml) pieninä annoksina 2 tunnin kuluessa. Seosta kuumennettiin palautusjäähdyttämällä vielä yhden tunnin ajan, sitten se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, suodatettiin seliitin läpi ja suodos haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine. Jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (75 ml) ja liuos pestiin peräjälkeen 8-%:isella natriumbikarbonaattiliuksella (50 ml), vedellä (50 ml) ja kyllästetyllä suolaliuksella, kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin raaka tuote. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 50-%:isella eetterillä pentaanissa) tuotti otsikon yhdisteen (3,8 g, 60 %) valkoisena kiinteänä aineena.

25 TLC: R_f 0,52 (50-%:inen pentaani eetterissä).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 29

trans-(1,1-dimetyylietyyli)-3-ftaali-imidosyklopen-tyyliasettaatti

30 Välituotteesta 27 (1,41 g, 5,44 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,22 g, 70 %).

TLC: R_f 0,58 (50-%:inen pentaani eetterissä).

Välituote 30**cis-3-ftaali-imidosyklopentyylietikkahappo**

Välituotteen 28 (1,78 g, 5,4 mmol) liuos dikloorimetaanissa (20 ml) käsiteltiin trifluorietikkahapolla (2,1 ml, 27 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin ja ylimääräinen trifluorietikkahappo poistettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (1,41 g, 96 %) valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,32 (30-%:inen pentaani eetterissä).

10 Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 31**trans-3-ftaali-imidosyklopentyylietikkahappo**

Välituotteesta 29 (1,18 g, 3,58 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (842 mg, 86 %).

15 TLC: R_f 0,41 (30-%:inen pentaani eetterissä).

Välituote 32**(RS)-2-bromi-5-ftaali-imidopentaanihappo**

Välituotetta 19 (5,0 g, 20,2 mmol) ja tionyylikloridia (10 ml) kuumennettiin yhdessä 65 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan. Lisättiin N-bromisukkinimidiä (5,4 g) ja vielä tionyylikloridia sekä 48-%:ista HBr:n vesiliuosta (1 tippa). Liuosta kuumennettiin 60 °C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan, sitten 70 °C:n lämpötilassa 2 tuntia 15 minuuttia. Lisättiin vielä N-bromisukkinimidiä (850 mg) ja seosta kuumennettiin 70 °C:n lämpötilassa kahden tunnin ajan. Ylimääräinen tionyylikloridi poistettiin haihduttamalla alennetussa paineessa ja öljyinen jäännös laimennettiin kuivalla tetrahydrofuraanilla (200 ml) ja vedellä (200 ml). Seos käsiteltiin sitten varovasti kiinteällä natriumbikarbonaatilla pH-arvoon 7 - 8, sitten sitä sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Ylimääräinen tetrahydrofuraani poistettiin tyhjöissä ja jäännös pestiin dikloorimetaanilla (3 x 300 ml). Vesipitoinen osuus tehtiin sitten varovasti happamaksi pH-arvoon 1 käyttäen 6 M suolahappoa ja uutettiin dikloorimetaanilla (4 x 200 ml).

Yhdistetyt uutteen pestiin sitten vedellä (2 x 400 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (400 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote (4,7 g, 71 %) kellertävän ruskeana kiinteänä aineena.

5 TLC: R_f 0,47 (EtOAc).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 33

(RS)-2-bromi-2-(3-ftaali-imidofenyyli)etikkahappo

10 Välituotteesta 21 värittömänä kiinteänä aineena (588 mg, 75 %).

TLC: R_f 0,19 (5-%:inen MeOH-0,1-%:inen AcOH- CH_2Cl_2).

Välituote 34

cis-a-bromi-3-ftaali-imidosyklopentylietikkahappo

15 Välituotteesta 30 (1,41 g, 5,16 mmol) ruskeankeltaisena vaahtona (1,59 g, 87 %).

TLC: R_f 0,46 (2-%:inen MeOH-eetteri).

Välituote 35

trans-a-bromi-3-ftaali-imidosyklopentylietikkahappo

20 Välituotteesta 31 (815 mg, 2,98 mmol) kellanruskeana vaahtona (805 mg, 77 %).

TLC: R_f 0,48 (2-%:inen MeOH-eetteri).

Välituote 36

(RS)-2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentaanihappo

25 Välituotteen 33 (3,0 g, 9,2 mmol) liuos metanolissa (30 ml) käsiteltiin kaliumtioliasetaatilla (1,05 g, 9,2 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Seos haihdutettiin tyhjöissä, jäännös liuotettiin dikloori-metaaniin (100 ml), sitten liuos pestiin vedellä (2 x 30
30 50 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote (2,4 g, 81 %) vaaleankeltaisena vaahtona.

TLC: R_f 0,43 (EtOAc).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 37

**(RS)-2-asetyylimerkaptto-2-(3-ftaali-imido)fenyyli-
etikkahappo**

Välituotteesta 33 värittömänä kiinteänä aineena
5 (722 mg, 100 %).

TLC: R_f 0,15 (5-%:inen MeOH-0,1-%:inen AcOH-CH₂Cl₂).

Välituote 38

**cis-a-(asetyylimerkaptto)-3-ftaali-imidosyklopenty-
lietikkahappo**

10 Välituotteesta 34 (2,01 g, 5,71 mmol) ruskeana
vaahtona (1,44 g, 73 %).

TLC: R_f 0,42 (eetteri).

Välituote 39

**trans-a-(asetyylimerkaptto)-3-ftaali-imidosyklopen-
tyylietikkahappo**

15 Välituotteesta 35 (774 mg, 2,2 mmol) beigenvärisenä
vaahtona (329 mg, 43 %).

TLC: R_f 0,45 (eetteri).

Välituote 40

20 **(RS)-N-[2-bromi-4-ftaali-imidobutanoyyli]-L-leusyy-
li-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

Välituotetta 18 (2,33 g) ja tionyylikloridia (2,92
ml) kuumennettiin yhdessä 65 °C:n lämpötilassa 30 minuutin
ajan. Lisättiin N-bromisukkinimidiä (2,51 g) ja vielä tio-
nyylikloridia sekä 48-%:ista HBr:n vesiliuosta (1 tippa).
25 Liuosta kuumennettiin 60 °C:n lämpötilassa 10 minuutin
ajan, sitten 70 °C:n lämpötilassa 2 tuntia 15 minuuttia.
Lisättiin vielä N-bromisukkinimidiä (850 mg) ja seosta
kuumennettiin 70 °C:n lämpötilassa 2 tunnin ajan. Ylimää-
räinen tionyylikloridi poistettiin haihduttamalla alenne-
tussa paineessa ja öljyinen jäännös laimennettiin kuivalla
dikloorimetaanilla (10 ml). Lisättiin osa päällysnestettä
(4,0 ml) L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidin
(500 mg) ja trietyyliamiinin (0,24 ml) liuokseen kuivassa
35 dikloorimetaanissa (10 ml) 0 °C:n lämpötilassa ja tätä

seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Seos laimennettiin dikloorimetaanilla ja pestiin kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (50 ml), 1 N suolahapon vesiliuoksella (50 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (50 ml), sitten se kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin ruskea kiinteä aine. Tämä aine puhdistettiin flash-pylväskromatografian avulla (4 x 18 cm; eluointi 2-%:isella metanolilla dikloorimetaanis-
 5 la (50 ml), sitten se kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin ruskea kiinteä aine. Tämä aine puhdistettiin flash-pylväskromatografian avulla (4 x 18 cm; eluointi 2-%:isella metanolilla dikloorimetaanis-
 10 sa), jolloin saatiin otsikon yhdiste kellertävänä kiinteänä aineena (530 mg).

TLC: R_f 0,44 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 41

(RS)-N-[2-bromi-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi
 15

Välituotteesta 19 (4,0 g) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (1,18 g) vaaleanpunaisena kiinteänä aineena (1,2 g).

TLC: R_f 0,34 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

20 **Välituote 42**

(RS)-N-[2-bromi-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 20 (4,0 g) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (1,18 g) lähes värittömänä kiinteänä aineena (1,0 g).
 25

TLC: R_f 0,52 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 43

(RS)-2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-ftaali-imidopentaanihappo

Tert-butyylitiolia (11,3 ml, 0,1 mmol) lisättiin kalium-tert-butoksidin (22,45 g, 0,1 mol) sekoitettavaan liuokseen vedettömässä tetrahydrofuraanissa (215 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 20 minuutin ajan. Lisättiin välituotteen 13 (32,6 g, 0,1 mol) liuos vedettömässä tetrahydrofuraanissa (80 ml) ja seosta sekoitettiin
 30
 35

huoneenlämpötilassa yön yli. Lisättiin vettä (300 ml) ja seos tehtiin happamaksi pH-arvoon 1 lisäämällä 1 N suolahappoa ja uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 200 ml). Yhdistetyt uutteen kuivattiin sitten (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin keltainen öljy. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 5 - 15-%:isella dikloorimetaanilla etyyliasetaatissa), sitten kiteyttäminen dikloorimetaanista/heksaanista tuottivat otsikon yhdisteen (22 g, 66 %) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,48 (10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 44

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-ftaaliimidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteen 43 (8,06 g, 24 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidin (7,0 g, 24 mmol) liuos dikloorimetaanissa (250 ml) käsiteltiin N-hydroksibentsotriatsolilla (3,9 g, 28,9 mmol), sitten EDC:llä (5,06 g, 26,4 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Seos pestiin 1 N suolahapolla (300 ml) ja vesipitoinen osuus uutettiin uudelleen dikloorimetaanilla (2 x 100 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin peräjälkeen 1 N suolahapolla (300 ml), 8-%:isella natriumbikarbonaatilla (300 ml), vedellä (300 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (300 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin vaaleankeltainen kiinteä aine. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen (12,8 g, 88 %) lähes valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,55 (10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 45

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkapt]-5-amino-pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteen 44 (2,56 g, 4,2 mmol) liuos tetrahydrofuraanin (10 ml) ja etanolin (50 ml) seoksessa käsiteltiin hydratsiinihydraatilla (10 ml, xs) ja seosta kuumentettiin palautusjäähdyttäen 2 tunnin ajan. Se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen lisättiin vettä
 10 (30 ml), liuotin poistettiin tyhjöissä, jäännös tehtiin happamaksi pH-arvoon 1 1 N suolahapolla ja pestiin dikloorimetaanilla (2 x 100 ml). Vesipitoinen kerros tehtiin sitten emäksiseksi pH-arvoon 14 2 M natriumhydroksidilla ja uutettiin dikloorimetaanilla (2 x 100 ml). Yhdistetyt
 15 uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin vaaleankeltainen kiinteä aine. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 10 - 25-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen
 20 (9,2 g, 91 %) lähes valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,23 (30-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 46

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkapt]-5-(asetyyliamino)pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25 Asetyylikloridia (0,5 ml, 7 mmol) lisättiin välituotteen 45 (1,14 g, 2,38 mmol) ja trietyyliamiinin (2 ml, 14,4 mmol) sekoitettavaan liuokseen vedettömässä dikloorimetaanissa (45 ml), sitten seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Seos laimennettiin dikloorimetaanilla
 30 (75 ml) ja pestiin peräjälkeen 1 N suolahapolla (100 ml), 8-%:isellä natriumbikarbonaattiliuoksella (100 ml), vedellä (100 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin
 35 vaaleankeltainen kiinteä aine. Puhdistaminen flash-

pylväskromatografian avulla (eluointi 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen (1,2 g, 95 %) lähes valkoisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,31 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

5 Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 47

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(bentsoyyliamino)pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

10 Välituotteesta 45 (2,86 g, 5,97 mmol) ja bentsoyylidikloridista (0,84 ml, 7,2 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (3,43 g, 99 %).

TLC: R_f 0,41 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 48

15 (RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-sukkinimidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

20 Välituotteesta 45 (1,14 g, 2,38 mmol) ja meripihkahapon anhydridistä (0,33 g, 3,3 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (0,54 g, 40 %).

TLC: R_f 0,58 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 49

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(metaanisulfonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25 Välituotteesta 45 (2,03 g, 4,24 mmol) ja metaanisulfonyylikloridista (0,35 ml, 4,6 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (1,78 g, 77 %).

TLC: R_f 0,46 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).



Välituote 50

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(bentseenisulfonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 45 (2,03 g, 4,24 mmol) ja bentseenisulfonyylikloridista (0,59 ml, 4,6 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (2,18 g, 85 %).

TLC: R_f 0,54 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 51

10 (RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(metoksikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

15 Välituotteesta 45 (200 mg, 0,43 mmol) ja metyylikloroformaatista (0,03 ml, 0,41 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (196 mg, 89 %).

TLC: R_f 0,32 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 52

20 (RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(bentsyylioksikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 45 (200 mg, 0,43 mmol) ja bentsyylikloroformaatista (0,06 ml, 0,41 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (230 mg, 93 %).

TLC: R_f 0,44 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

25 **Välituote 53**

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(4-pyridyylikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Välituotteesta 45 (2,03 g, 4,24 mmol) ja isonikotinooylikloridista (834 mg, 4,66 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (1,81 g, 77 %).

TLC: R_f 0,22 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 54

(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(3-pyridyylikarboonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 45 (200 mg, 0,42 mmol) ja nikotinyylikloridista (83 mg, 0,47 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (130 mg, 56 %).

TLC: R_f 0,26 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 55

10 **(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(2-pyridyylikarboonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

15 Välituotteesta 45 (200 mg, 0,42 mmol) ja pikolinoyylikloridista (83 mg, 0,47 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (145 mg, 62 %).

TLC: R_f 0,21 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 56

20 **(RS)-N-[2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkaptol]-5-(2-pyratsinyylikarboonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

Välituotteesta 45 (200 mg, 0,42 mmol) ja pyratsinyylikloridista (85 mg, 0,47 mmol) lähes valkoisena kiinteänä aineena (145 mg, 62 %).

TLC: R_f 0,18 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

25 **Välituote 57**

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyli)sulfanyyli)merkaptol]-5-(asetyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Lisättiin 2-nitrosulfenyylidikloridia (3,26 g, 6,26 mmol) välituotteen 46 (1,23 g, 6,49 mmol) sekoitettavaan liuokseen jäätikassa (75 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin poistettiin tyhjässä ja jäännös puhdistettiin flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa), jol-

loin saatiin otsikon yhdiste (3,74 g, 97 %) keltaisena kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,34 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

5 **Välituote 58**

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptო]-5-(bentsoyyliamino)pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyyli-alaniini-N-metyyliamidi

10 Välituotteesta 47 (1,08 g, 5,67 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (3,43 g, 99 %).

TLC: R_f 0,54 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 59

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-sukkinimidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyyli-alaniini-N-metyyliamidi

15 Välituotteesta 48 (618 mg, 1,1 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (665 mg, 92 %).

TLC: R_f 0,25 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 60

20 (RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(metaanisulfonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyyli-alaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 49 (1,78 g, 3,27 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (1,84 g, 88 %).

25 TLC: R_f 0,32 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 61

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(bentseenisulfonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyyli-alaniini-N-metyyliamidi

30 Välituotteesta 50 (2,25 g, 3,71 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (1,6 g, 68 %).

TLC: R_f 0,37 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 62

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptო]-5-(metoksikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 51 (196 mg, 0,31 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (86 mg, 38 %).

TLC: R_f 0,25 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 63

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(bentsyylioksikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

10

Välituotteesta 52 (229 mg, 0,32 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (155 mg, 60 %).

TLC: R_f 0,37 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

15

Välituote 64

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(4-pyridyylikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

20

Välituotteesta 53 (1,92 g, 3,29 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (1,66 g, 74 %).

TLC: R_f 0,29 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 65

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(3-pyridyylikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25

Välituotteesta 54 (190 mg, 0,33 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (85 mg, 38 %).

TLC: R_f 0,24 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 66

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyyლისulfanyyli)merkaptο]-5-(2-pyridyylikarbonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30

Välituotteesta 55 (210 mg, 0,36 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (120 mg, 54 %).

35

TLC: R_f 0,21 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 67

(RS)-N-[2-[(2-nitrofenyylisulfanyyli)merkaptol]-5-(2-pyratsinyylikarboonyyli)aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 56 (300 mg, 0,51 mmol) keltaisena kiinteänä aineena (110 mg, 42 %).

TLC: R_f 0,18 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 68

10 (RS)-N-[2-[(2-nitrofenyylisulfanyyli)merkaptol]-5-aminopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

TLC: R_f 0,16 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 69

15 (R)-N-(fenyylimetoksi)karboonyyli-(S-metyyli)-L-kysteini

Bentsyylikloroformaattia (11,1 ml, 65 mmol) lisättiin tipoitain (S-metyyli)-L-kysteinin (10 g, 75 mmol) sekoitettavaan liuokseen 2 M natriumhydroksidin vesiliuoksessa (50 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 4
20 tunnin ajan. Seos tehtiin sitten emäksiseksi pH-arvoon 14 lisäämällä vielä 2 M natriumhydroksidia ja liuos pestiin etyyliasetaatilla (4 x 50 ml). Vesipitoinen faasi tehtiin happamaksi pH-arvoon 3 väkevällä suolahapolla ja sitten se
25 uutettiin etyyliasetaatilla (4 x 70 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuksella, kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote
30 vaaleankeltaisena öljynä (16,8 g, 84 %).

TLC: R_f 0,21 (10-%:inen MeOH-CHCl₃).

Välituote 70

30 (R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karboonyyli-(S-metyyli)-kysteini

Di-tert-butyylidikarbonaattia (8,88 g, 40,7 mmol) lisättiin S-metyyli-L-kysteinin (5 g, 37 mmol) ja natriumbikarbonaatin (7,8 g, 92,5 mmol) sekoitettavaan liuokseen veden (150 ml) ja dioksaanin (100 ml) seoksessa
35

0 °C:n lämpötilassa. Seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli, sitten se laimennettiin vedellä (100 ml), tehtiin happamaksi pH-arvoon 3 käyttäen 1 N suolahappoa ja sitten se uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 100 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuksella, kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä öljynä (6,64 g, 76 %).

TLC: R_f 0,55 (MeOH-H₂O).

10 Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 71

(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyylipropyyliiglysiini

15 (S)-norvaliinista (5 g, 42,7 mmol) värittömänä öljynä (6,3 g, 68 %).

TLC: R_f 0,50 (MeOH-H₂O).

Välituote 72

(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-(O-metyyli)seriini

20 Natriumhydridiä (60-%:inen dispersio, 4,3 g, 0,107 mol) lisättiin annoksittain 0 °C:n lämpötilassa (S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyliseriininiin (10 g, 48,7 mmol) sekoitettavaan liuokseen vedettömässä DMF:ssä (250 ml). Sitten lisättiin tipoittain jodimetaniin liuos (6,1 ml, 0,1 mol) vedettömässä DMF:ssä (10 ml). Seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli, sitten se laimennettiin 1 N suolahapolla pH-arvoon 3 ja liuos väkevöitiin tyhjöissä noin 200 ml:n tilavuuteen. Seos laimennettiin vedellä (200 ml) ja uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 100 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste kel-
30 taisena öljynä (7,48 g, 70 %).

TLC: R_f 0,39 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 73**(RS)-N-bentsoyyli-[b-(4-pyridyyli)alaniinimetyyli-
esteri**

5 a) Lisättiin 2-(4-pyridyyli)-1-(N-bentsoyyli)amino-
etyleeni-1-karboksyylihappohydrokloridi-4-pyridyylikar-
boksaldehydiä (85 g, 0,79 mol) natriumasetaatin (16 g,
0,195 mol) ja hippuurihapon (150 g, 0,84 mol) sekoitetta-
vaan jääkylmään suspensioon etikkahappoanhydridissä
10 (360 ml, 3,8 mol), seurasi eksoterminen reaktio ja si-
säinen lämpötila saavutti 30 - 40 °C:een. Seos jäädytet-
tiin huoneenlämpötilaan, sitten se kaadettiin veteen
(1 500 ml). Saatu kiinteä aine poistettiin suodattamalla
ja pestiin vedellä (2 x 500 ml), jolloin saatiin atslakto-
nivälituote (74 g, 37 %) ruskeanan kiinteänä aineena. Ats-
15 laktoni (70 g, 0,28 mol) liuotettiin väkevään suolahappoon
(210 ml), mikä johti nopeaan sakan muodostumiseen ja sakka
poistettiin suodattamalla, pestiin asetonilla (2 x 500 ml)
ja kuivattiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote (71 g, 78 %)
vaaleanvihreänä kiinteänä aineena.

20 b) **(RS)-N-bentsoyyli-[b-(4-pyridyyli)]alaniinihyd-
rokloridi**

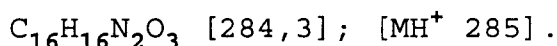
Olefiinihydrokloridia (70 g, 0,23 mol) hydrattiin
huoneenlämpötilassa ja ilmakehän paineessa 5-%:isella pal-
ladium-hiilellä-katalyytillä (7 g) vedessä (700 ml) yön
25 yli. Katalyytti poistettiin suodattamalla seliitin läpi ja
liuotin väkevöitiin noin 100 ml:n tilavuuteen. Lisättiin
asetonia (1 000 ml) ja saatu sakka poistettiin suodatta-
malla ja kuivattiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote (53 g,
75 %) kellertävänä kiinteänä aineena.

30 c) **(RS)-N-bentsoyyli-[b-(4-pyridyyli)]alaniinime-
tyyliesteri**

Tionyylikloridia (15 ml, 0,21 mol) lisättiin hapon
(53 g, 0,17 mol) jääkylmään liuokseen metanolissa
(200 ml). Seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan 30
35 minuutin kuluessa ennen kuin liuotin poistettiin tyhjöissä,

jolloin saatiin kellertävä puolikiinteä aine. Jäännös sus-
pendoitiin 8-%:iseen natriumbikarbonaattiin (500 ml) ja
tuote uutettiin etyyliasetaatiiin (4 x 400 ml). Yhdistetyt
5 orgaaniset uutteen pestiin sitten kyllästetyllä suolaliu-
oksella (1 000 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin
tyhjässä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (46 g, 94 %)

kellertävänä kiinteänä aineena.

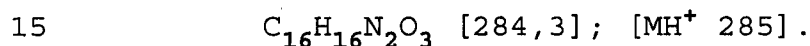


Samalla tavoin valmistettiin:

10 **Välituote 74**

**(RS)-N-bentsoyyli-[b-(3-pyridyyli)]alaniinimetyyli-
esteri**

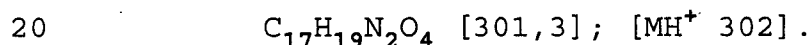
Kolmessa vaiheessa pyridiini-3-karboksaldehydistä
valkoisena kiinteänä aineena.



Välituote 75

(RS)-N-bentsoyyli-2-metoksialaniinimetyyliesteri

Kolmessa vaiheessa 2-metoksibentsaldehydistä val-
koisena kiinteänä aineena.



Välituote 76

**(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-[b-(4-pyri-
dyyli)]alaniini**

Välituote 73 (27 g, 0,104 mol) liuotettiin kuumaan
asetoniin (50 ml) ja liuos lisättiin 0,03 M kaliumdivety-
fosfaattiin (500 ml), pH-arvo 7,2. Sitten lisättiin alka-
laasia (1 ml) voimakasti sekoitettavaan liuokseen ja pH-
arvoa pidettiin 7,2:ssa lisäämällä 1 M natriumhydroksidia
(noin 20 ml) 30 minuutin kuluessa. Liukenematon esteri
30 suodatettiin pois ja suodos pestiin etyyliasetaatilla (4 x
250 ml). Liuotin haihdutettiin sitten tyhjässä, jäännös
liuotettiin 6 N suolahappoon (100 ml), sitten liuosta kuu-
mennettiin palautusjäähdyttään 5 tunnin ajan. Sitten se
jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen saostunut
35 bentsoehappo poistettiin suodattamalla ja suodos pestiin

ettyliasetaatilla (2 x 100 ml). Vesipitoinen osuus haihdutettiin sitten tyhjöissä, jolloin saatiin optisesti puhdas aminohappo dihydrokloridisuolana (9,48 g, 81 %). Dihydrokloridisuola liuotettiin veteen (150 ml) ja käsiteltiin
 5 Amberlite IRA-67-ioninvaihtohartsilla pH-arvoon 8. Hartsi poistettiin suodattamalla seliitin läpi ja liuos haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin vapaa aminohappo valkoisena kiinteänä aineena (6,7 g, 100 %).

Lisättiin di-tert-butyylidikarbonaattia (13, g, 60
 10 mmol) aminohapon sekoitettavaan suspensioon tert-butanolin (100 ml) ja veden (50 ml) seoksessa samalla, kun pH-arvoa pidettiin 8,5:ssä lisäämällä 1 M natriumhydroksidia (55 ml) 40 minuutin kuluessa. Lisättiin vettä (50 ml), seos pestiin heptaanilla (2 x 100 ml), sitten se tehtiin
 15 happamaksi pH-arvoon 3,5 lisäämällä kiinteätä kaliumvetysulfaattia. Seos haihdutettiin kuiviin ja jäännös trituroitiin metanolin kanssa (3 x 150 ml) tuotteen uuttamiseksi. Liuottimen haihduttaminen tyhjöissä tuotti otsikon yhdisteen valkoisena kiinteänä aineena, joka kiteytettiin
 20 uudelleen vesipitoisesta etanolista optiseen puhtauteen (3,27 g, 61 %).

$[a]_D +24,3 \text{ } ^\circ\text{C}$ (c = 1, trifluorietikkahappo).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 77

25 (S)-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-[b-(3-pyridyyli)]-alaniini

Välituotteesta 74 valkoisena kiinteänä aineena.

$[a]_D +16,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ (c = 1, trifluorietikkahappo).

Välituote 78

30 (S)-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-2-metoksifenyylialaniini

Välituotteesta 75 valkoisena kiinteänä aineena (11,1 g, 97 %).

$[a]_D -15,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ (c = 1, MeOH).

Välituote 79**(RS)-N-asetyyli-[b-(2-pyridyyli)]alaniini**

Natriummetoksidin (65,8 g, 1,22 mol) liuos metanolissa (300 ml) käsiteltiin annoksittain dietyyliasetamidomalonaatilla (132,3 g, 0,61 mol) pitäen lämpötila noin 5 45 °C:ssa. Sitten seosta kuumennettiin palautusjäähdyttäen 15 minuutin ajan. Seos jäähdytettiin 50 °C:n lämpötilaan, sitten se käsiteltiin hitaasti 2-kloorimetyylypyridiinihydrokloridin (100 g, 0,61 mol) suspensiolla, sitten vaa-

10 leanpunaista suspensiota kuumennettiin palautusjäähdyttäen vielä 6 tunnin ajan. Lisättiin vettä (500 ml) ja sen jälkeen 10 M natriumhydroksidia (122 ml, 1,22 mol) ja pH-arvoa pidettiin noin 11:ssä samalla kuumentaen seosta 70 °C:n lämpötilassa yön yli. Seos jäähdytettiin huoneen-

15 lämpötilaan ja metanoli poistettiin tyhjöissä. Vesipitoinen jäännös pestiin etyyliasetaatilla (2 x 500 ml), sitten se tehtiin happamaksi pH-arvoon 5 ja pestiin vielä etyyliasetaatilla (2 x 500 ml) ja sitten se haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin puolikiinteä aine. Jäännös trituroitiin

20 kuuman etanolin (500 ml) kanssa ja natriumkloridi poistettiin suodattamalla. Suodos haihdutettiin sitten tyhjöissä ja jäännös kiteytettiin metanoli-etyyliasetaatista, jolloin saatiin otsikon yhdiste (70 g, 66 %) keltaisena kiinteänä aineena.

25 TLC: R_f 0,5 [n-BuOH-AcOH-pyridiini-H₂O (15-3-10-12)].

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 80**(RS)-N-asetyyli-[b-(4-tiatsolyyli)]alaniini**

30 4-(kloorimetyyli)tiatsolistista valkoisena vaahtona (6,7 g, 73 %).

TLC: R_f 0,37 (1-%:inen AcOH-20-%:inen heksaani-EtOAc)

Välituote 81

(S)-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-[b-(2-pyridyyli)]alaniini

Välituotteen 79 (65 g, 0,31 mol) suspensio kaliumdivetyortofosfaatin vesiliuoksessa (10 mM, 650 ml) lämmitettiin 40 °C:n lämpötilaan ja saatu seos (pH-arvo 4) tehtiin emäksiseksi pH-arvoon 8 lisäämällä 10 M natriumhydroksidia (10 ml), jolloin muodostui liuos. Lisättiin asy-laasi 30 000:tta (1,3 g) ja seosta inkuboitiin 40 °C:n lämpötilassa yön yli. Saatu suspensio jäädytettiin huoneenlämpötilaan, kiinteä aine poistettiin suodattamalla, sitten suodos tehtiin happamaksi pH-arvoon 1 2 N suolahapolla ja pestiin etyyliasetaatilla (2 x 300 ml). Vesipitoinen osuus haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin puolikiinteä aine, joka trituroitiin kuuman metanolin (300 ml) kanssa ja kiinteä aine poistettiin suodattamalla. Jäädytettyyn liuokseen lisättiin sitten 5 M natriumhydroksidia pH-arvoon 10 ja sen jälkeen di-tert-butyylidikarbonaattia (28,6 g, 0,131 mol), sitten seoksen pH-arvoa pidettiin 10:ssä lisäämällä 5 M natriumhydroksidia (44 ml) 6 tunnin kuluessa. Metanoli poistettiin sitten tyhjöissä, vesipitoinen jäännös pestiin eetterillä (2 x 500 ml), sitten se tehtiin happamaksi pH-arvoon 3 lisäämällä 1 M kaliumvetysulfaattia. Seos uutettiin etyyliasetaatilla (4 x 500 ml), yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (500 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin raaka tuote, joka kiteytettiin etyyliasetaatista valkoisena kiinteänä aineena (11,6 g, 23 %).

30 $[\alpha]_D -16,0 \text{ } ^\circ\text{C} \text{ (} c = 1, \text{ MeOH) .}$

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 82

(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-[b-(4-tiatso-
lyyli)]alaniini

5 Välituotteesta 80 valkoisena kiinteänä aineena
(11 g, 94 %).

HPLC (Chirex (D)-penisillamiini; 2 mM CuSO₄;
0,7 ml/min; retentioaika = 3,25 min; 99 % ee.

Välituote 83

10 (S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-[b-(2-pyri-
dyyli)]alaniini-N-metyyliamidi

DCC:tä (4,07 g, 19,7 mmol) lisättiin välituotteen
81 (5,0 g, 18,8 mmol) ja N-hydroksisukkinimidin (2,27 g,
19,7 mmol) jääkylmään liuokseen kuivassa tetrahydrofuraa-
nissa (200 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3
15 tunnin ajan, minkä jälkeen se käsiteltiin 40-%:isella
(paino/tilavuus) metyyliamiinin vesiliuoksella (6,8 ml, 79
mmol) ja seosta sekoitettiin vielä 2 tunnin ajan. Saostu-
nut kiinteä aine poistettiin suodattamalla, suodos haihdu-
tettiin tyhjässä ja jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin
20 (100 ml). Liuos pestiin peräjälkeen vedellä (2 x 100 ml),
8-%:isella natriumbikarbonaatilla (2 x 100 ml) ja kylläs-
tetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja
haihdutettiin tyhjässä, jolloin saatiin raaka tuote.
Puhdistaminen pylväskromatografian avulla eluoiden 2 -
25 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa tuotti otsikon
yhdisteen (2,7 g, 51 %) punaisena vaahtona.

TLC: R_f 0,38 (3-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 84

30 (S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-L-[b-(4-tiat-
solyyli)]alaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 82 valkoisena kiinteänä aineena
(3,0 g, 64 %).

TLC: R_f 0,46 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 85**(R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyylipenisillamiini-N-metyyliamidi**

Liuosta, jossa oli (R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyylipenisillamiinia (14 g, 56,1 mmol), N-hydroksibentsotriatsolia (7,6 g, 56,1 mmol), metyyliamiinihydrokloridia (18,9 g, 280 mmol), N-metyylimorfoliinia (34 ml, 308 mmol), 4-dimetyyliaminopyridiinia (685 mg, 5,6 mmol) ja EDC:tä (11,8 g, 62 mmol) vedettömässä dimetyyliformamidissa (300 ml), sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Seos kaadettiin 10-%:iseen (paino/tilavuus) sitruunahappoon (750 ml) ja uutettiin eetterillä (3 x 500 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin sitten 8-%:isellä natriumbikarbonaatilla (2 x 500 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (500 ml), kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (12,3 g, 83 %).

TLC: R_f 0,47 (50-%:inen heksaani-EtOAc).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 86

(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-5-metyyli-L-glutaamiinihappo-N-metyyliamidi

(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-5-metyyli-L-glutaamiinihaposta valkoisena kiinteänä aineena (5,4 g, 94 %).

TLC: R_f 0,21 (2-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 87

(S)-N_d-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-N_a-(bentsyylioksi)karbonyyliornitiini-N-metyyliamidi

(S)-N_d-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-N_a-(bentsyylioksi)karbonyyliornitiinista (11,5 g, 31,4 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (11,0 g, 94 %).

TLC: R_f 0,65 (3-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 88

**(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-2-metoksife-
nyylialaniini-N-metyyliamidi**

Välituotteesta 78 (500 mg, 1,69 mmol) valkoisena
5 kiinteänä aineena (380 mg, 73 %).

TLC: R_f 0,55 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 89

**(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-b-(3-pyridyy-
li)alaniini-N-metyyliamidi**

10 Välituotteesta 77 (2,0 g, 7,5 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (1,0 g, 48 %).

TLC: R_f 0,42 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 90

**(S)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-b-(4-pyridyy-
li)alaniini-N-metyyliamidi**

15 Välituotteesta 76 (2,0 g, 7,5 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (1,7 g, 81 %).

TLC: R_f 0,38 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 91

**(R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-(S-metyyli)-
penisillamiini-N-metyyliamidi**

20 Jodimetaanin (0,59 ml, 9,55 mmol) liuos metanolissa
(5 ml) lisättiin tipoitain 0 °C:n lämpötilassa välituot-
teen 85 (500 mg, 1,51 mmol) sekoitettavaan liuokseen 2 M
25 natriumhydroksidin (5 ml) ja metanolin (15 ml) seoksessa.
Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli, sitten
metanoli poistettiin tyhjöissä, jäännös laimennettiin ve-
dellä (50 ml) ja uutettiin eetterillä (3 x 50 ml). Yhdis-
tetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella, kui-
vattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin
30 otsikon yhdiste värittömänä öljynä (540 mg, 99 %).

TLC: R_f 0,47 (50-%:inen heksaani-EtOAc).

Välituote 92**(R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-2,2-dimetyyli-2-metaanisulfonyylialaniini-N-metyyliamidi**

Oksonin (1,02 g, 1,66 mmol) suspensio vedessä
 5 (5 ml) lisättiin välituotteen 91 (153 mg, 0,55 mmol) sekoitettavaan liuokseen metanolissa (5 ml) 0 °C:n lämpötilassa, seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin 4 tunnin ajan. Seos laimennettiin vedellä (50 ml) ja uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 50 ml).
 10 Yhdistetyt uutteen pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (50 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä öljynä (101 mg, 59 %).

TLC: R_f 0,35 (50-%:inen heksaani-EtOAc).

15

Välituote 93**(R)-N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-2,2-dimetyyli-2-metaanisulfinyyli-alaniini-N-metyyliamidi**

3-klooriperbentsoehapon (670 mg, 2,89 mmol) liuos dikloorimetaanissa (25 ml) lisättiin välituotteen 91
 20 (800 mg, 2,89 mmol) sekoitettavaan liuokseen dikloorimetaanissa (25 ml) 0 °C:n lämpötilassa, seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli. Seos pestiin peräjälkeen 10-%:isella (paino/tilavuus) natriumsulfiitilla (2 x 50 ml), 8-%:isella natriumbikarbonaatilla (2 x 50 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella
 25 (50 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin raaka tuote värittömänä öljynä. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 10-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen värittömänä öljynä (470 mg, 55 %).
 30

TLC: R_f 0,05 (50-%:inen heksaani-EtOAc).

Välituote 94**(R)-2,2-dimetyyli-2-metaanisulfinyylialaniini-N-metyyliamidihydrokloridi**

Välituotteen 93 (470 mg, 1,61 mmol) liuosta dioksaanin (25 ml) ja 2 M suolahapon (25 ml) seoksessa sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin haihdutettiin kuiviin tyhjössä ja jäännöstä kylmäkuivattiin yön yli, jolloin saatiin otsikon yhdiste (370 mg, 100 %) värittömänä kumina.

10 TLC: R_f 0,06 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).
Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 95**(R)-2,2-dimetyyli-2-metaanisulfonyylialaniini-N-metyyliamidihydrokloridi**

15 Välituotteesta 92 (300 mg, 0,97 mmol) värittömänä vaahtona (210 mg, 100 %).

TLC: R_f 0,10 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 96**(R)-penisillamiini-N-metyyliamidihydrokloridi**

20 Välituotteesta 85 (300 mg, 1,14 mmol) värittömänä vaahtona (230 mg, 100 %).

TLC: R_f 0,13 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 97**(S)-b-(3-pyridyyli)alaniini-N-metyyliamididihydrokloridi**

25 Välituotteesta 89 (1,2 g, 4,29 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,1 g, 100 %).

TLC: R_f 0,05 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 98**(S)-b-(4-pyridyyli)alaniini-N-metyyliamididihydrokloridi**

30 Välituotteesta 90 (1,6 g, 5,73 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,45 g, 100 %).

TLC: R_f 0,08 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 99

(S)-b-(2-pyridyyli)alaniini-N-metyyliamididihydrokloridi

Välituotteesta 83 (1,4 g, 5,01 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,27 g, 100 %).

TLC: R_f 0,13 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 100

(S)-b-(4-tiatsolyyli)alaniini-N-metyyliamididihydrokloridi

Välituotteesta 84 (1,0 g, 3,5 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (730 mg, 94 %).

TLC: R_f 0,21 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 101

(R)-(S-metyyli)penisillamiini-N-metyyliamiditrifluoriasetaatti

Välituotteen 91 (200 mg, 0,72 mmol) liuosta dikloorimetaanissa (4 ml), joka sisälsi trifluorietikkahappoa (2 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin haihdutettiin tyhjössä ja ylimääräinen trifluorietikkahappo poistettiin tislamalla atseotrooppisesti heptaanin (3 x 20 ml) kanssa, jolloin saatiin otsikon yhdiste (196 mg, 94 %) värittömänä vaahtona.

TLC: R_f 0,32 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 102

(S)-2-(metoksifenyyli)alaniini-N-metyyliamiditrifluoriasetaatti

Välituotteesta 88 (200 mg, 0,65 mmol) vaaleankeltaisena vaahtona (209 mg, 100 %).

TLC: R_f 0,25 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 103

(S)-5-metyyliglutamiinihappo-N-metyyliamiditrifluoriasetaatti

Välituotteesta 86 (707 mg, 2,58 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (728 mg, 98 %).

TLC: R_f 0,37 (1-%:inen NET_3 -10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 104

(S)- N_α -(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyliornitiini-N-metyyliamidi

5 Välituotetta 87 (11 g, 29 mmol) hydrattiin huoneenlämpötilassa ja ilmakehän paineessa 10-%:isen palladiumhiilellä-katalyytin päällä (1 g) etanolissa yön yli. Katalyytti poistettiin suodattamalla hyflo-täytteen läpi ja suodos haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon
10 yhdiste (2,6 g, 36 %) värittömänä öljynä.

TLC: R_f 0,37 (5-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 105

N-(fenyylietoksi)karbonyyli-(S-metyyli)-L-kysteiinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

15 EDC:tä (10,5 g, 55 mmol) lisättiin L-fenyylialaniini-N-metyyliamidin (8,9 g, 50 mmol), välituotteen 69 (13,8 g, 50 mmol) ja N-hydroksibentsotriatsolin (8,1 g, 60 mmol) sekoitettavaan liuokseen kuivassa tetrahydrofuraanissa (100 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa
20 yön yli. Seos käsiteltiin 1 M suolahapolla (300 ml), sitten se uutettiin etyyliasetaatilla (4 x 200 ml). Yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin 8-%:isellä natriumbikarbonaatilla (2 x 200 ml), vedellä (200 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (200 ml), kuivattiin (MgSO_4) ja haihduttaminen tyhjöissä tuotti tuotteen valkoisena kiinteänä aineena (16,5 g, 75 %).
25

TLC: R_f 0,47 (10-%:inen MeOH-CHCl_3).

Välituote 106

N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-(S)-propyyli-glysiinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Välituotteesta 71 (5 g, 23 mmol) ja L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (4,1 g, 23 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (7,72 g, 89 %).

TLC: R_f 0,48 (10-%:inen $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$).

Välituote 107

N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-L-leusyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

5 N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-L-leusiinista (13,07 g, 56 mmol) ja L-tert-leusiini-N-metyyliamidista (8,11 g, 56 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (15,77 g, 79 %).

TLC: R_f 0,25 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 108

10 **N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-(S)-(S-metyyli)-kysteinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi**

Välituotteesta 70 (6,64 g, 28 mmol) ja L-tert-leusiini-N-metyyliamidista (4,07 g, 28 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (4,26 g, 42 %).

15 TLC: R_f 0,45 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 109

N-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-(S)-(O-metyyli)-serinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

20 Välituotteesta 72 (7,48 g, 34 mmol) ja L-tert-leusiini-N-metyyliamidista (4,92 g, 34 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (4,26 g, 42 %).

TLC: R_f 0,40 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 110

25 **N-(fenyylimetoksi)karbonyyli-L-valinyyli-N_d-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-L-ornitiini-N-metyyliamidi**

Välituotteesta 104 (2,6 g, 10,6 mmol) ja N-(fenyylimetoksi)karbonyyli-L-valiinista (2,82 g, 11,2 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (3,0 g, 61 %).

30 TLC: R_f 0,32 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 111

(S-metyyli)-L-kysteinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

35 Välituotteen 105 (2,0 g, 4,65 mmol) liuos dikloorimetäänissa (10 ml) käsiteltiin 25-%:isellä bromivetyhapol-

la etikkahapossa (18,6 ml) ja seosta sekoitettiin huoneen-
lämpötilassa yhden tunnin ajan. Lisättiin vettä (10 ml) ja
seos pestiin dikloorimetaanilla (3 x 15 ml). Vesipitoinen
faasi tehtiin sitten emäksiseksi pH-arvoon 14 lisäämällä
5 M natriumhydroksidia ja sitten uutettiin dikloorimetaa-
nilla (4 x 30 ml). Yhdistetyt orgaaniset utteet pestiin
sitten kyllästetyllä suolaliuoksella (30 ml), kuivattiin
(MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin tuote
valkoisena kiinteänä aineena (1,22 g, 88 %).

10 TLC: R_f 0,31 (10-%:inen MeOH-CHCl₃).

Välituote 112

**L-valinyyli-N_α-(1,1-dimetyylietoksi)karbonyyli-L-
ornitiini-N-metyyliamidi**

Välituotetta 110 (3,0 g, 6,5 mmol) hydrattiin huone-
lämpötilassa ja ilmakehän paineessa 10-%:isella palla-
dium-hiilellä-katalyytillä (300 mg) etanolissa (100 ml)
yön yli. Katalyytti poistettiin suodattamalla hyflo-täyt-
teen läpi ja suodos haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saa-
tiin otsikon yhdiste (2,2 g, 99 %) valkoisena kiinteänä
aineena.

20 TLC: R_f 0,26 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 113

**(S)-propyyli-glysiinyli-L-fenyyli-alaniini-N-metyy-
liamidi**

Välituotteen 106 (5,36 g, 14,2 mmol) liuosta diok-
saanin (250 ml) ja 2 M suolahapon (250 ml) seoksessa se-
koitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin haihdutet-
tiin kuiviin tyhjöissä, jolloin saatiin valkoinen kiinteä
aine. Jäännös liuotettiin veteen (200 ml), liuos pestiin
dikloorimetaanilla (3 x 100 ml), sitten se tehtiin emäksi-
seksi pH-arvoon 10 2 M natriumhydroksidilla ja uutettiin
dikloorimetaanilla (4 x 100 ml). Yhdistetyt utteet pes-
tiin kyllästetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin
(MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin otsikon
yhdiste valkoisena kiinteänä aineena (1,45 g, 37 %).

35

TLC: R_f 0,29 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Välituote 114

5 (S)-(S-metyyli)kysteinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 108 valkoisena kiinteänä aineena (3,5 g, 97 %).

TLC: R_f 0,45 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 115

10 (S)-(O-metyyli)serinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 109 valkoisena kiinteänä aineena (2,7 g, 98 %).

TLC: R_f 0,40 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

15 **Välituote 116**

L-leusyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 107 valkoisena kiinteänä aineena (11,2 g, 99 %).

TLC: R_f 0,57 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

20 **Välituote 117**

(R)-2-bromi-5-ftaali-imidopentaanihappo

D-ornitiinihydrokloridin (35 g, 0,208 mol) liuos vedessä (350 ml) käsiteltiin kupari(II)sulfaatilla (16,6 g, 0,104 mol). Lisättiin 5 M kaliumhydroksidia (noin 40 ml) pH-arvoon 3 saakka, sitten lisättiin N-karboetoksi-ftaali-imidiä (45,5 g, 0,208 mol) ja pH-arvoa pidettiin alueella 9 - 10 lisäämällä 5 M kaliumhydroksidia (noin 55 ml). Kahden tunnin kuluttua lisättiin 48-%:ista bromivetyhappoa pH-arvoon 0,4 (noin 77 ml) ja mikä tahansa saatu sakka poistettiin suodattamalla. Suodos jäähdytettiin < 5 °C:n lämpötilaan, sitten se käsiteltiin vielä bromivetyhapolla (152 ml) ja kaliumbromidilla (59 g, 0,5 mol). Seos käsiteltiin sitten tipoittain 45 minuutin kuluessa natriumnitriitin (28,6 g, 0,41 mol) liuoksella vedessä 35 (275 ml) samalla pitäen lämpötila < 5 °C:ssa. Seosta se-

koitettiin sitten < 5 °C:ssa yön yli. Saatu sakka poistettiin sitten suodattamalla, liuotettiin etyyliasettaattiin (400 ml) ja liuos pestiin vedellä (2 x 200 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (200 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja
 5 haihdutettiin tyhjässä, jolloin saatiin otsikon yhdiste (40,6 g, 47 %) kermanvärisenä kiinteänä aineena.

TLC: R_f 0,80 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavalla valmistettiin:

Välituote 118

10 **(S)-2-bromi-5-ftaali-imidopentaanihappo**

L-ornitiinihydrokloridista (20 g, 0,118 mol) kermanvärisenä kiinteänä aineena (22 g, 57 %).

TLC: R_f 0,80 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 119

15 **(S)-2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentaanihappo**

Valmistettiin aikaisemmin kuvatun menetelmän mukaisesti välituotteesta 117 (39,9 g, 0,11 mol) vaalean oranssinvärisenä öljynä (35,6 g, 99 %).

TLC: R_f 0,24 (50-%:inen heptaani-EtOAc).

20 **Välituote 120**

(R)-2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentaanihappo

Valmistettiin aikaisemmin kuvatun menetelmän mukaisesti välituotteesta 118 (20 g, 56 mmol) vaalean oranssinvärisenä öljynä (17,7 g, 99 %).

25 TLC: R_f 0,24 (50-%:inen heptaani-EtOAc).

Välituote 121

(RS)-2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imidopentanoyyli-L-leusiini-1,1-dimetyylietyyliesteri

30 EDC:tä (3,64 g, 19 mmol) lisättiin sekoitettavaan seokseen, jossa oli L-leusiini-1,1-dimetyylietyyliesteriä (3,93 g, 17,6 mmol), N-hydroksibentsotriatsolia (2,62 g, 19,4 mmol), trietyyliamiinia (2,51 ml, 18 mmol) ja välituotetta 15 (5,94 g, 18,5 mmol) kuivassa tetrahydrofuraa-

35 nissa (200 ml). Seosta sekoitettiin yön yli, sitten liuotin poistettiin tyhjässä ja jäännös jaettiin veden

(100 ml) ja etyyliasetaatin (100 ml) kesken. Vesipitoinen osuus uutettiin sitten etyyliasetaatilla (2 x 50 ml), yhdistetyt uutteen pestiin vedellä (2 x 100 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjöissä värittömäksi öljyksi.

Puhdistaminen pylväskromatografian avulla eluoiden heksaanin/etyyliasetaatin seoksella (2:1) tuotti otsikon yhdisteen (6,6 g, 77 %) valkoisena kiinteänä aineena, diastereoisomeerien 1:1-seoksena.

10 TLC: R_f 0,42 (EtOAc/heksaani (1:1)).

Välituote 122

(RS)-2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imidopentanoyyli-L-leusiini

15 Trifluorietikkahappoa (9,0 ml, 115 mmol) lisättiin välituotteen 121 (3,0 g, 6,1 mmol) sekoitettavaan liuokseen kuivassa dikloorimetaanissa (40 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Seos väkevöitiin tyhjöissä ja ylimääräinen trifluorietikkahappo poistettiin tislamalla atseotrooppisesti heptaanin kanssa, jolloin
20 saatiin otsikon yhdiste (2,48 g, 94 %) värittömänä vaahtona, diastereoisomeerien 1:1-seoksena.

TLC: R_f 0,42 (EtOAc/heksaani (3:2)).

Välituote 123

(RS)-2-(asetyylimerkapto)-4-sukkinimidobutaanihappo

25 Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin välituotteen 36 valmistamiseksi.

TLC: R_f 0,38 (HOAc/EtOAc/heksaani (0,1:1:1)).

Välituote 124

(S-metyyli)-L-kysteinyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

30 Valmistettiin käyttämällä menetelmä, joka on kuvattu aikaisemmin välituotteen 111 valmistamiseksi.

TLC: R_f 0,45 (EtOAc/heksaani (1:1)).

Välituote 125

(RS)-2-[(1,1-dimetyylietyyli)merkapt]-3-ftaaliimidopropaanihappo

5 Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin välituotteen 43 valmistamiseksi.

TLC: R_f 0,48 (HOAc/EtOAc/heksaani (0,1:1:1)).

Esimerkki 1

(RS)-N-[2,3-bis-asetyylimerkaptopropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

10 EDC:tä (198 mg) lisättiin liuokseen, jossa oli välituotetta 14 (209 mg), L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidia (274 mg) ja N-hydroksibentsotriatsolihydraattia (153 mg) kuivassa THF:ssä (10 ml) 0 °C:n lämpötilassa, ja seosta sekoitettiin tuossa lämpötilassa, kunnes TLC-analyysi (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂) osoitti, että lähtöaineet oli kulutettu täydellisesti (72 h). Liuotin poistettiin haihduttamalla ja jäännös jaettiin 1 N suolahapon (35 ml) ja etyyliasetaatin (50 ml) kesken. Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (2 x 200 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (2 x 20 ml), sitten kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjiössä, jolloin saatiin raaka tuote. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 2 - 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen värittömänä kiinteänä aineena (264 mg).

25 TLC: R_f 0,25 (2-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Esimerkki 2

(RS)-N-[(2,4-bis-asetyylimerkapt)butanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Välituotteesta 15 (870 mg, 3,7 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (1,07 g, 3,7 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,4 g, 74 %).

$C_{24}H_{35}N_3O_5S_2$ [509,7]; [MH⁺ = 510].

Esimerkki 3

(RS)-N-[(2,5-bis-asetyylimerkapto)pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 16 (906 mg, 3,6 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (1,06 g, 3,6 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,5 g, 79 %).

$C_{25}H_{37}N_3O_5S_2$ [523,7]; $[MH^+ = 524]$.

Esimerkki 4

10 (RS)-N-[(2,6-bis-asetyylimerkapto)heksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 17 (895 mg, 3,4 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (991 mg, 3,4 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (1,4 g, 74 %).

$C_{26}H_{39}N_3O_5S_2$ [537,75]; $[MH^+ = 538]$.

Esimerkki 5

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-3-metoksikarbonyylipropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

20 Välituotteesta 4 (0,26 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,33 g).

$C_{23}H_{33}N_3O_6S$ [479,6]; $[MH^+ = 480]$.

Esimerkki 6

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-4-metoksikarbonyylibutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25 Välituotteesta 5 (0,40 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,67 g).

$C_{24}H_{35}N_3O_6S$ [493,6]; $[MH^+ = 494]$.

Esimerkki 7

30 (RS)-N-[2-asetyylimerkapto-5-metoksikarbonyylipentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 6 (0,9 g) värittömänä kiinteänä aineena (1,1 g).

$C_{25}H_{37}N_3O_6S$ [507,6]; $[MH^+ = 508]$.

Esimerkki 8

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-6-metoksykarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 7 (0,95 g) värittömänä kiinteänä aineena (1,0 g).

$C_{26}H_{39}N_3O_6S$ [521,6]; $[MH^+ = 522]$.

Esimerkki 9

10 (RS)-N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanooyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

Välituotteesta 36 (730 mg) ja L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidista (700 mg) vaaleankeltaisena vaahtona (1,0 g, 74 %).

$C_{33}H_{39}N_5O_6S$ [633,7]; $[MH^+ = 634]$.

15 **Esimerkki 10**

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-6-metoksykarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

20 Välituotteesta 7 (375 mg) ja L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidista (500 mg) vaaleankeltaisena vaahtona (440 mg, 52 %).

$C_{28}H_{40}N_4O_6S$ [560,7]; $[MH^+ = 561]$.

Esimerkki 11

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanooyyli]-L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25 Välituotteesta 36 (232 mg) ja L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (200 mg) valkoisena kiinteänä aineena (230 mg, 55 %).

$C_{30}H_{36}N_4O_6S$ [580,7]; $[MH^+ = 581]$.

Esimerkki 12

30 (RS)-N-[2-asetyylimerkapto-6-metoksykarbonyyliheksanoyyli]-L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

35 Välituotteesta 7 (179 mg) ja L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (200 mg) valkoisena kiinteänä aineena (200 mg, 56 %).

$C_{25}H_{37}N_3O_6S$ [507,6]; $[MH^+ = 508]$.

Esimerkki 13

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-2-(3-ftaali-imidofenyyli)asetyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5

Välituotteesta 37 (690 mg) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (489 mg) valkoisena kiinteänä aineena (927 mg, 88 %).

$C_{34}H_{36}N_4O_6S$ [628,8]; $[MH^+ = 629]$.

10

Esimerkki 14

N-[2-(asetyylimerkapto)-2-[3-cis-ftaali-imidosyklopentyyli]asetyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

15

Välituotteesta 38 (140 mg, 0,4 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (117 mg, 0,4 mmol) nahanuskeana vaahtona (197 mg, 79 %), neljän odotetun diastereoisomeerin 1:1:1:1-seoksena.

$C_{33}H_{40}N_4O_6S$ [620,8]; $[MH^+ = 621]$.

20

Esimerkki 15

N-[2-(asetyylimerkapto)-2-[3-trans-ftaali-imidosyklopentyyli]asetyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25

Välituotteesta 39 (235 mg, 0,7 mmol) ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (197 mg, 0,7 mmol) ruskeana vaahtona (358 mg, 85 %), neljän odotetun diastereoisomeerin 1:1:1:1-seoksena.

$C_{33}H_{40}N_4O_6S$ [620,8]; $[MH^+ = 621]$.

Esimerkki 16

(S)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-(S)-tert-leusiini-N-metyyliamidi

30

Välituotteesta 119 (13,8 g, 43 mmol) ja välituotteesta 116 (11,2 g, 44 mmol) valkoisena kiinteänä aineena (11,6 g, 48 %).

$C_{28}H_{40}N_4O_6S$ [560,7]; $[MH^+ = 561]$.

Esimerkki 17

(S)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]pentano-
yyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 119 (10 g, 31 mmol) ja L-leusyyli-
5 L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (9,0 g, 31 mmol) val-
koisena kiinteänä aineena (10,5 g, 57 %).

$C_{31}H_{38}N_4O_6S$ [594,7]; $[MH^+ = 595]$.

Esimerkki 18

(R)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]pentano-
10 yyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 120 (1,0 g, 3,1 mmol) ja L-leusyyli-
L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista (900 mg, 3,1 mmol)
valkoisena kiinteänä aineena (885 mg, 48 %).

$C_{31}H_{38}N_4O_6S$ [594,7]; $[MH^+ = 595]$.

15

Esimerkki 19

(S)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]pentano-
yyli-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

Välituotteesta 119 (411 mg, 1,28 mmol) ja L-leusyy-
li-L-tryptofaani-N-metyyliamidista (423 mg, 1,28 mmol)
20 valkoisena kiinteänä aineena (330 mg, 41 %).

$C_{33}H_{39}N_5O_6S$ [633,7]; $[MH^+ = 634]$.

Esimerkki 20

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imidopentano-
yyli]-(S-metyyli)-L-kysteinyyli-L-fenyylialaniini-
25 N-metyyliamidi

Välituotteesta 36 (326 mg, 1 mmol) ja välituottes-
ta 114 (350 mg, 1 mmol) valkoisena kiinteänä aineena
(380 mg, 64 %).

$C_{29}H_{34}N_4O_6S_2$ [598,7]; $[MH^+ = 599]$.

Esimerkki 21

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-(S)-propyyli-glysiinyli-L-fenyylialaniini-N-
metyyliamidi

5 Välituotteesta 113 (145 mg, 0,52 mmol) ja välituot-
teesta 36 (168 mg, 0,52 mmol) valkoisena kiinteänä aineena
(160 mg, 53 %).

$C_{30}H_{36}N_4O_6S_2$ [580,7]; $[MH^+ = 581]$.

Esimerkki 22

10 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-valinyyli- N_α -(1,1-dimetyylietoksi)karbo-
noyyli-L-ornitiini-N-metyyliamidi

15 Välituotteesta 112 (508 mg, 1,47 mmol) ja välituot-
teesta 36 (491 mg, 1,53 mmol) valkoisena kiinteänä aineena
(687 mg, 72 %).

$C_{31}H_{45}N_5O_8S$ [647,8]; $[MH^+ = 648]$.

Esimerkki 23

20 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-valinyyli-L-ornitiini-N-metyyliamiditri-
fluoriasetaatti

Esimerkin 22 (585 mg, 0,90 mmol) liuosta dikloori-
metaanissa (20 ml), joka sisälsi trifluorietikkahappoa
(2 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin
poistettiin tyhjässä ja kaikki ylimääräinen trifluorietik-
kahappo poistettiin tislamalla atseotrooppisesti heptaa-
nin kanssa (3 x 20 ml), jolloin saatiin otsikon yhdiste
(596 mg, 99 %) kellertävänä kiinteänä aineena.

$C_{26}H_{38}N_5O_6S$ [548,7]; $[MH^+ = 549]$.

Esimerkki 24

30 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-valinyyli- N_α -(asetyyli-L-ornitiini-N-me-
tyyliamidi

35 Asetyylikloridia (0,024 ml, 0,34 mmol) lisättiin
0 °C:n lämpötilassa esimerkin 23 (205 mg, 0,31 mmol) ja N-
metyylimorfoliinin (0,134 ml, 0,31 mmol) sekoitettavaan

liuokseen vedettömässä dikloorimetaanissa (20 ml). Seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin 1 tunnin ajan, sitten se laimennettiin dikloorimetaanilla (20 ml) ja pestiin peräjälkeen 2 N hydrokloridilla (20 ml), 8-%:isella natriumbikarbonaatilla (20 ml), vedellä (20 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (20 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjässä värittömäksi vaahdoksi. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 3 - 5-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen (30 mg, 17 %) valkoisena kiinteänä aineena.

$C_{28}H_{41}N_5O_7S$ [590,7]; [MH⁺ = 591].

Esimerkki 25

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-4-ftaali-imidobutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi
 Kaliumtioliasetaatin (98 mg) liuos metanolissa (2 ml) lisättiin välituotteen 40 (0,5 g) suspensioon metanolissa (10 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan, sitten palautusjäähdytyslämpötilassa 6 tunnin ajan. Liuotin poistettiin sitten alennetussa paineessa ja jäännös jaettiin veden (50 ml) ja dikloorimetaanin (150 ml) kesken. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen kerros kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin raaka tuote. Puhdistaminen flash-pylväskromatografian avulla (eluoiden 50-%:isella etyyliasetaatilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen värittömänä kiinteänä aineena (270 mg).

TLC: R_f 0,30 (50-%:inen EtOAc-CH₂Cl₂).

Samalla tavoin valmistettiin:

Esimerkki 26

(RS)-N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi
 Välituotteesta 41 (0,50 g) lähes värittömänä kiinteänä aineena (0,42 g).

TLC: R_f 0,20 (50-%:inen EtOAc-CH₂Cl₂).

Esimerkki 27

(RS)-N-[2-asetyyliitio-4-ftaali-imidoheksanoyyli]-
L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 42 (0,50 g) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena (0,39 g).

TLC: R_f 0,31 (50-%:inen EtOAc-CH₂Cl₂).

Esimerkki 28

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-L-[β-(4-tiatsolyyli)]alaniini-N-
metyyliamidi

EDC:tä (107 mg, 0,56 mmol) lisättiin liuokseen, jossa oli välituotetta 122 (222 mg, 0,51 mmol), N-hydroksibentsotriatsolia (76 mg, 0,56 mmol), trietyyliamiinia (75 ml, 0,53 mmol) ja välituotetta 100 (113 mg, 0,51 mmol) kuivassa tetrahydrofuraanissa (30 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli, sitten liuotin poistettiin tyhjässä ja jäännös jaettiin veden (20 ml) ja etyyliasettaatin (20 ml) kesken. Vesipitoinen osuus uutettiin sitten etyyliasetaatilla (2 x 20 ml), yhdistetyt utteet pestiin vedellä (2 x 50 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (50 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin tyhjässä vaaleankeltaiseksi öljyksi. Puhdistaminen pylväskromatografian avulla eluoiden dikloorimetaanilla/metanolilla (98:2) tuotti otsikon yhdisteen (170 mg, 55 %) valkoisena kiinteänä aineena.

$C_{28}H_{35}N_5O_6S_2$ [601,7]; [MH⁺ = 602].

Samalla tavoin valmistettiin:

Esimerkki 29

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-L-[β-(2-pyridyyli)]alaniini-N-
metyyliamidi

Välituotteesta 122 ja välituotteesta 99 valkoisena kiinteänä aineena (277 mg, 67 %).

$C_{30}H_{37}N_5O_6S$ [595,7]; [MH⁺ = 596].

Esimerkki 30

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-L-[β-(3-pyridyyli)]alaniini-N-
metyyliamidi

5 Välituotteesta 122 ja välituotteesta 97 valkoisena
kiinteänä aineena (50 mg, 12 %).

$C_{30}H_{37}N_5O_6S$ [595,7]; $[MH^+ = 596]$.

Esimerkki 31

10 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-L-[β-(4-pyridyyli)]alaniini-N-
metyyliamidi

Välituotteesta 122 ja välituotteesta 98 valkoisena
kiinteänä aineena (310 mg, 77 %).

$C_{30}H_{37}N_5O_6S$ [595,7]; $[MH^+ = 596]$.

Esimerkki 32

15 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-5-metyyli-L-glutamiinihappo-N-
metyyliamidi

20 Välituotteesta 122 ja välituotteesta 103 valkoisena
kiinteänä aineena (201 mg, 49 %).

$C_{28}H_{38}N_4O_8S$ [590,3]; $[MH^+ = 591]$.

Esimerkki 33

25 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(S)-(2-metoksifenyyli)alaniini-
N-metyyliamidi

Välituotteesta 122 ja välituotteesta 102 valkoisena
kiinteänä aineena (150 mg, 37 %).

$C_{32}H_{40}N_4O_7S$ [624,8]; $[MH^+ = 625]$.

Esimerkki 34

30 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(R)-penisillamiini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 122 ja välituotteesta 96 valkoisena
kiinteänä aineena (230 mg, 35 %).

$C_{27}H_{38}N_4O_6S$ [578,8]; $[MH^+ = 579]$.

Esimerkki 35

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(R)-(S-metyyli)penisillamiini-N-
metyyliamidi

5 Välituotteesta 122 ja välituotteesta 101 valkoisena
kiinteänä aineena (400 mg, 35 %).

$C_{28}H_{40}N_4O_6S_2$ [592,8]; $[MH^+ = 593]$.

Esimerkki 36

10 (RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(R)-(2,2-dimetyyli-2-metaanisul-
fonyyli)alaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 122 ja välituotteesta 95 valkoisena
kiinteänä aineena (380 mg, 66 %).

$C_{28}H_{40}N_4O_8S_2$ [624,8]; $[MH^+ = 625]$.

15 **Esimerkki 37**

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(R)-(2,2-dimetyyli-2-metaanisul-
finyyli)alaniini-N-metyyliamidi

20 Välituotteesta 122 ja välituotteesta 94 valkoisena
kiinteänä aineena (360 mg, 37 %).

$C_{28}H_{40}N_4O_7S_2$ [608,8]; $[MH^+ = 609]$.

Esimerkki 38

(RS)-N-[2-(asetyylimerkapto)-5-ftaali-imido]penta-
noyyli-L-leusyyli-(S)-tert-leusiini-N-metyyliamidi

25 Välituotteesta 122 ja tert-leusiini-N-metyyliamidi-
hydrokloridista valkoisena kiinteänä aineena (120 mg,
25 %).

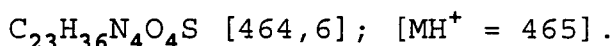
$C_{28}H_{40}N_4O_6S$ [560,7]; $[MH^+ = 561]$.

Esimerkki 39

30 (RS)-N-[2-merkapto-5-(asetyyli)aminopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

35 Lisättiin 0,4 M natriumhydroksidia (0,82 ml) väli-
tuotteen 57 (203 mg, 0,328 mmol) ja 2-merkaptoetanolin
(0,23 ml, 3,28 mmol) sekoitettavaan liuokseen metanolissa
0 °C:n lämpötilassa. Sitten 15 minuutin kuluttua lisättiin

etikkahappoa (0,5 ml) ja liuottimet haihdutettiin tyhjö-
ssä, jolloin saatiin keltainen öljy. Lisättiin eetteriä
(20 ml) ja saatu sakka poistettiin suodattamalla, jolloin
saatiin raaka tioli. Puhdistaminen flash-pylväskromatogra-
fian avulla (eluoiden 5-%:isella metanolilla dikloorime-
taanissa) tuotti otsikon yhdisteen (86 mg, 56 %) valkoi-
sena kiinteänä aineena.

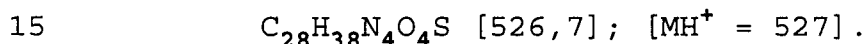


Samalla tavoin valmistettiin:

10 **Esimerkki 40**

(RS)-N-[2-merkaptto-5-(bentsoyyli)aminopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

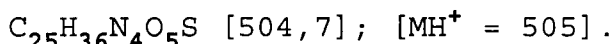
Välituotteesta 58 (400 mg, 0,59 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (175 mg, 59 %).



Esimerkki 41

(RS)-N-[2-merkaptto-5-(sukkinimido)pentanoyyli]-L-
leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

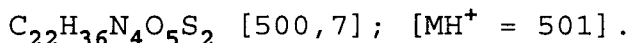
20 Välituotteesta 59 (600 mg, 0,91 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (147 mg, 32 %).



Esimerkki 42

(RS)-N-[2-merkaptto-5-(metaanisulfonyyli)aminopenta-
noyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

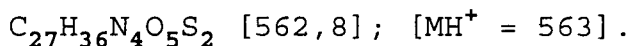
25 Välituotteesta 60 (600 mg, 1,0 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (262 mg, 57 %).



Esimerkki 43

(RS)-N-[2-merkaptto-5-(bentseenisulfonyyli)aminopen-
tanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyli-
amidi

30 Välituotteesta 61 (500 mg, 0,7 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (221 mg, 56 %).



Esimerkki 44

(RS)-N-[2-merkaptto-5-(4-pyridyylikarboonyyli) amino-
pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyy-
liamidi

5 Välituotteesta 64 (330 mg, 0,48 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (115 mg, 22 %).

$C_{27}H_{37}N_5O_4S$ [527,7]; $[MH^+ = 528]$.

Esimerkki 45

10 (RS)-N-[2-merkaptto-5-(3-pyridyylikarboonyyli) amino-
pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyy-
liamidi

Välituotteesta 65 (200 mg, 0,29 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (34 mg, 22 %).

$C_{27}H_{37}N_5O_4S$ [527,7]; $[MH^+ = 528]$.

Esimerkki 46

15 (RS)-N-[2-merkaptto-5-(2-pyridyylikarboonyyli) amino-
pentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyy-
liamidi

20 Välituotteesta 66 (150 mg, 0,22 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (60 mg, 52 %).

$C_{27}H_{37}N_5O_4S$ [527,7]; $[MH^+ = 528]$.

Esimerkki 47

25 (RS)-N-[2-merkaptto-5-(2-pyratsinyylikarboonyyli) ami-
nopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-me-
tyyliamidi

Välituotteesta 67 (100 mg, 0,15 mmol) valkoisena
kiinteänä aineena (30 mg, 38 %).

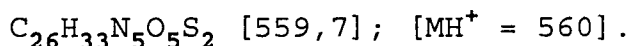
$C_{26}H_{36}N_6O_4S$ [528,7]; $[MH^+ = 529]$.

Esimerkki 48

30 (RS)-N-[2-merkaptto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-
leusyyli-L-[β -(4-tiatsolyyli)]alaniini-N-metyyli-
amidi

35 Väkevää ammoniumhydroksidia (0,5 ml) lisättiin esi-
merkin 28 (110 mg, 0,18 mmol) liuokseen metanolissa
(10 ml) 0 °C:n lämpötilassa ja seosta sekoitettiin tuossa

lämpötilassa 3 tunnin ajan. Seos laimennettiin vedellä (10 ml), tehtiin happamaksi 2 N suolahapon vesiliuoksella ja uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 20 ml). Yhdistetyt utteet kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin raaka tuote. Puhdistaminen flash-pylväs-kromatografian avulla (eluoiden 2-%:isella metanolilla dikloorimetaanissa) tuotti otsikon yhdisteen värittömänä kiinteänä aineena (71 mg, 71 %).

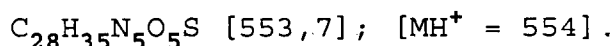


10 Samalla tavoin valmistettiin:

Esimerkki 49

(RS)-N-[2-merkapto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-L-[β -(2-pyridyyli)]alaniini-N-metyyliamidi
Esimerkistä 29 valkoisena kiinteänä aineena (75 mg,

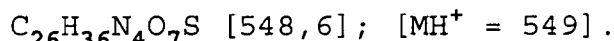
15 80 %).



Esimerkki 50

(RS)-N-[2-merkapto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-5-metyyli-L-glutamiinihappo-N-metyyliamidi
Esimerkistä 32 valkoisena kiinteänä aineena (68 mg,

20 78 %).

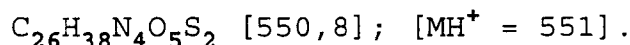


Esimerkki 51

(RS)-N-[2-merkapto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-(R)-(S-metyyli)penisillamiini-N-metyyliamidi

25

Esimerkistä 35 valkoisena kiinteänä aineena (160 mg, 70 %).



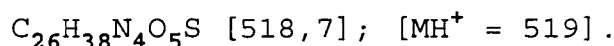
30

Esimerkki 52

(S)-N-[2-merkapto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-(S)-tert-leusiini-N-metyyliamidi

Esimerkistä 16 valkoisena kiinteänä aineena (8,12 g, 80 %).

35



Esimerkki 53

(S)-N-[2-merkaptto-5-ftaali-imido]pentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Esimerkistä 17 valkoisena kiinteänä aineena (2,7 g, 67 %).

$C_{29}H_{36}N_4O_5S$ [552,7]; $[MH^+ = 553]$.

Esimerkki 54

(RS)-N-[2,3-dimerkaptopropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

10 Esimerkistä 1 värittömänä kiinteänä aineena (76 mg).

$C_{19}H_{29}N_3O_3S_2$ [411,5]; $[MH^+ = 412]$.

Esimerkki 55

(RS)-N-[2-merkaptto-3-metoksikarbonyylipropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

15 Esimerkistä 5 (0,16 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,14 g).

$C_{21}H_{31}N_3O_5S_2$ [437,5]; $[MH^+ = 438]$.

Esimerkki 56

(RS)-N-[2-merkaptto-4-metoksikarbonyylibutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

20 Esimerkistä 6 (0,18 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,16 g).

$C_{22}H_{33}N_3O_5S$ [451,5]; $[MH^+ = 452]$.

Esimerkki 57

(RS)-N-[2-merkaptto-5-metoksikarbonyylipentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

25 Esimerkistä 7 (0,32 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,15 g).

TLC: R_f 0,29 (5-%:inen MeOH- CH_2Cl_2).

Esimerkki 58

(RS)-N-[2-merkaptto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Esimerkistä 8 (0,31 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,22 g).

TLC: R_f 0,30 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Esimerkki 59

(RS)-N-[2-merkaptto-4-ftaali-imidobutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Esimerkistä 25 (0,20 g) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena (0,12 g).

C₂₈H₃₄N₄O₅S [538,6]; [MH₂⁺ = 540].

Esimerkki 60

(RS)-N-[2-merkaptto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

10 Esimerkistä 26 (0,2 g) värittömänä kiinteänä aineena (0,18 g).

TLC: R_f 0,41 (5-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Esimerkki 61

(RS)-N-[2-merkaptto-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

15 Esimerkistä 27 (0,15 g) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena (0,12 g).

TLC: R_f 0,25 (10-%:inen MeOH-CH₂Cl₂).

Esimerkki 62

(RS)-N-[2-merkaptto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

20 Esimerkistä 9 (250 mg) vaaleankeltaisena vaahtona (222 mg, 96 %).

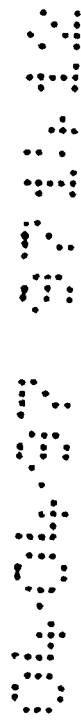
C₃₁H₃₇N₅O₅S [591,7]; [MH⁺ = 592].

Esimerkki 63

(RS)-N-[2-merkaptto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

25 Esimerkistä 10 (330 mg) vaaleankeltaisena vaahtona (300 mg, 98 %).

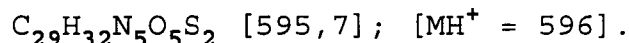
C₂₆H₃₈N₄O₅S [518,7]; [MH⁺ = 519].



Esimerkki 64

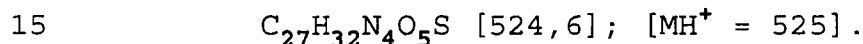
(S)-N-[2-merkaptto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-(S-metyyli)kysteinyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 119 ja välituotteesta 124.

**Esimerkki 65**

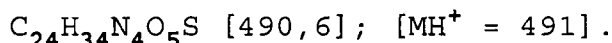
(RS)-N-[2-merkaptto-3-ftaali-imidopropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkin 39 valmistamiseksi, välituotteen 43 kautta välituotteesta 125 ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista.

**Esimerkki 66**

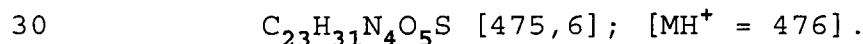
(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista.

**Esimerkki 67**

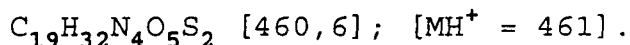
(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-propyyli-glysiinyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 113.

**Esimerkki 68**

(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-(S-metyyli)kysteinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

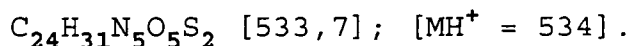
Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 114.



5 **Esimerkki 69**

(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-(S-metyyli)kysteinyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

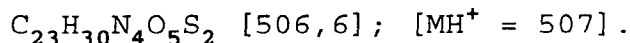
Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 124.



Esimerkki 70

(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-(S-metyyli)kysteinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

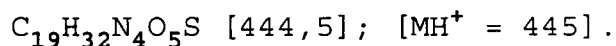
15 Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 111.



20 **Esimerkki 71**

(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-(O-metyyli)serinyyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

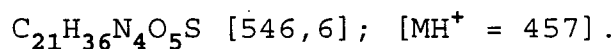
Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 115.



Esimerkki 72

(RS)-N-[2-merkaptto-4-sukkinimidobutanoyyli]-L-leu-syyli-L-tert-leusiini-N-metyyliamidi

30 Valmistettiin käyttämällä menetelmää, joka on kuvattu aikaisemmin esimerkkien 28 ja 48 valmistamiseksi, välituotteesta 123 ja välituotteesta 116.



Esimerkki 73

(RS)-N-[2-merkaptto-6-karboksiheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

Valmistettiin hydrolysoimalla esimerkin 10 yhdiste.

5 $C_{25}H_{36}N_4O_5S$ [504,7]; $[MH^+ = 505]$.

Esimerkki 74

(R)-N-[2-asetyylimerkaptto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

10 Valmistettiin erottamalla esimerkissä 10 läsnä olevien diastereosiomeerien 1:1-seos flash-pylväskromatografian avulla.

$C_{26}H_{38}N_4O_5S$ [518,7]; $[MH^+ = 519]$.

Esimerkki 75

(S)-N-[2-asetyylimerkaptto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

15 Valmistettiin erottamalla esimerkissä 10 läsnä olevien diastereosiomeerien 1:1-seos flash-pylväskromatografian avulla.

$C_{26}H_{38}N_4O_5S$ [518,7]; $[MH^+ = 519]$.

20 **Esimerkki 76**

(R)-N-[2-asetyylimerkaptto-5-ftaali-imidopentanooyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidi

25 Valmistettiin erottamalla esimerkissä 9 läsnä olevien diastereosiomeerien 1:1-seos flash-pylväskromatografian avulla.

$C_{31}H_{37}N_5O_5S_2$ [591,7]; $[MH^+ = 592]$.

Esimerkki 77

(R)-N-[2-asetyylimerkaptto-5-metoksikarbonylipentanooyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

30 Valmistettiin erottamalla esimerkissä 7 läsnä olevien diastereosiomeerien 1:1-seos flash-pylväskromatografian avulla.

$C_{25}H_{36}N_4O_5S$ [504,7]; $[MH^+ = 505]$.

Esimerkki 78

(RS)-N-[2-merkapto-6-(metyyliamino)karbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi
Valmistettiin hydrolysoimalla esimerkin 8 yhdiste.
5 $C_{24}H_{38}N_4O_4S_2$ [478,6]; $[MH^+ = 479]$.

Esimerkki 79

(RS)-N-[2-merkapto-6-(amino)karbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi
Valmistettiin hydrolysoimalla esimerkin 8 yhdiste.
10 $C_{23}H_{36}N_4O_4S$ [464,6]; $[MH^+ = 465]$.

Esimerkki A**Kollagenaasia estävä aktiivisuus**

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden teho toimia kollagenaasin estäjinä määritettiin käyttämällä Cawstonin ja Barrettin menetelmää [Anal. Biochem., 99:340 -
15 345 (1979)], jolloin tutkittavan estäjän 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 16 tunnin ajan kollageenin ja kollagenaasin kanssa (puskuroitu 50 mM Tris-puskurilla, pH-arvo 7,6, joka sisältää 5 mmol/l
20 $CaCl_2$:a, 0,05 % Brij 35:ttä, 60 mmol/l NaCl:a ja 0,02 % NaN_3 :a). Kollageeni oli asetyloitu 3H - tai ^{14}C -kollageeni, joka oli valmistettu Cawstonin ja Murphyn menetelmän mukaisesti [Methods in Enzymology, 80:711, (1981)]. Radioleiman valinta ei muuttanut kollagenaasin kykyä hajottaa
25 kollageenisubstraattia. Näytteet sentrifugoitiin hajottamattoman kollageenin sedimentoimiseksi ja radioaktiivisen päällysnesteen näyte poistettiin tuikelaskimella suoritettavaa määrittystä varten hydrolyysin mittana. Kollagenaasin aktiivisuutta, kun läsnä oli 1 mM estäjä tai sen laimennus,
30 verrattiin kontrollin aktiivisuuteen ilman estäjää ja tulokset on esitetty estäjän konsentraationa, joka estää 50 %:lla kollagenaasia (IC_{50}).

Esimerkki B**Stromelysiiniä estävä aktiivisuus**

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden teho toimia stromelysiinin estäjinä määritettiin käyttäen Nagasen et al. menetelmää [Methods in Enzymology, Vol. 254 (1994)], jolloin tutkittavan estäjän 0,1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 16 tunnin ajan stromelysiinin ja ³H-transferrinin kanssa (puskuroitu 50 mM Tris-puskurilla, pH-arvo 7,6, joka sisältää 10 mmol/l CaCl₂:a, 150 mmol/l NaCl:a, 0,05 % Brij 35:ttä, ja 0,02 % NaN₃:a). Transferrini oli karboksimeetyloitu ³H-jodietikkahapolla. Stromelysiinin aktiivisuutta, kun läsnä oli 1 mM liuos tai sen laimennus, verrattiin kontrollin aktiivisuuteen ilman estäjää ja tulokset on esitetty estäjän konsentraationa, joka estää 50 %:lla stromelysiiniä (IC₅₀).

Esimerkki C**Gelatinaasia estävä aktiivisuus**

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden teho toimia gelatinaasin estäjinä määritettiin käyttäen Harrisin ja Kranen menetelmää [Biochem. Biophys. Acta, 258:566 - 576 (1972)], jolloin tutkittavan estäjän 0,1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 16 tunnin ajan gelatinaasin ja lämmön avulla denaturoidun ³H- tai ¹⁴C-asetyloidun kollageenin kanssa (puskuroitu 50 mM Tris-puskurilla, pH-arvo 7,6, joka sisältää 5 mmol/l CaCl₂:a, 0,05 % Brij 35:ttä ja 0,02 % NaN₃:a). ³H- tai ¹⁴C-gelatiini oli valmistettu denaturoimalla ³H- tai ¹⁴C-kollageeni, joka oli tuotettu Cawstonin ja Murphyn menetelmän mukaisesti [Methods in Enzymology, 80:711 (1981)] inkuboidulla 60 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan. Hajottamaton gelatiini saostettiin lisäämällä trikloorietikkahappoa ja sentrifugoimalla. Gelatinaasin aktiivisuutta, kun läsnä oli 1 mM liuos tai sen laimennus, verrattiin kontrollin aktiivisuuteen ilman estäjää ja tulokset on esitetty estä-

jän konsentraationa, joka estää 50 %:lla gelatinaasia (IC₅₀).

Esimerkki D

TNF α :n tuotannon estäminen

5 Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden teho toimia TNF α :n tuotannon estäjinä määritettiin käyttämällä seuraavaa menetelmää. Tutkittavan estäjän 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 5 %:n CO₂-ilmakehässä THP-1-solujen (ihmisen monosyyttejä) kans-
10 sa, jotka oli suspendoitu RPMI 1640 -elatusaineeseen ja 20 μ M β -merkaptotetanoliin, jolloin solujen tiheys oli 1 x 10⁶ solua/ml ja ne oli stimuloitu LPS:n loppukonsentraatiolla, 5 μ g:lla/ml. Sitten 18 tunninkuluttua päällysneesteestä määritetään TNF α :n pitoisuudet käyttäen kaupalli-
15 sestä saatavissa olevaa ELISA-pakkausta (R & D Systems).

Aktiivisuutta, kun läsnä oli 1 mM estäjä tai sen laimennus, verrattiin kontrollin aktiivisuuteen ilman estäjää ja tulokset on esitetty estäjän konsentraationa, joka estää 50 %:lla TNF α :n tuotannon.

Esimerkki E

Rotan adjuvanttiniveltulehdusmalli

Yleisen kaavan (I) mukaiset yhdisteet arvioitiin adjuvanttiniveltulehdusmallissa rotalla perustuen menetelmiin, jotka on selostettu julkaisuissa B. B. Newbould, Br. J. Pharmacol, 21 , 127 - 136 (1963) ja C. M. Pearson ja F. D. Wood Arthritis Rheum, 2, 440 - 459 (1959). Lyhyesti sanottuna Wistar-rotille (180 - 200 g) annettiin ruiskeena hännän tyveen Freundin adjuvanttia. Sitten 12 päivää myöhemmin vasteen tuottavat eläimet jaettiin satunnaisesti koeryhmiin. Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteistä annettiin joko suun kautta suspensiona 1-%:isessä metyyli-
25 loosassa tai intraperitoneaalaisesti 0,2-%:isessä karboksimetyyli-
30 loosassa päivästä 12 lähtien kokeen loppumiseen saakka päivänä 22. Takakäpälien tilavuus mitattiin joka toinen päivä päivästä 12 eteenpäin ja takajaloista
35

otettiin röntgenkuvat kokeen loppuessa. Tulokset on esitetty jalan tilavuuden lisäyksen prosenttina päivän 12 arvoon verrattuna.

Esimerkki F

5 Hiiren munasarjasyövän ksenograftimalli

Yleisen kaavan (I) mukaiset yhdisteet arvioitiin munasarjasyövän ksenograftimallissa, joka perustuu lähteeseen B. Davies et al., Cancer Research, 53, 2087 - 2091 (1993). Lyhyesti sanottuna tässä mallissa naaraspuolisiin
 10 nu/nu-hiiriin istutetaan 1×10^9 OVCAR3-icr-soluja vatsakalvononteloon. Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä annetaan suun kautta suspensiona 1-%:isessä metyyli-

loosassa tai intraperitoneaalisesti suspensiona fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa 0,01-%:isessä Tween-
 15 20:ssä. Kokeen lopussa (4 - 5 viikkoa) peritoneaalisten solujen lukumäärä lasketaan ja mitkä tahansa kiinteät kasvainmuodostumat punnitaan. Joissakin kokeissa kasvaimen kehittymistä seurataan määrittämällä kasvainspesifiset antigeenit.

20 Esimerkki G

Rotan rintarauhasen syöpämalli

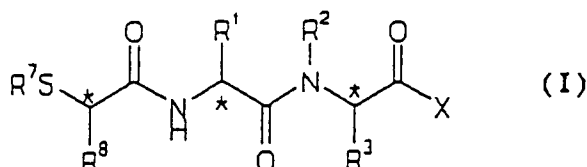
Yleisen kaavan (I) mukaiset yhdisteet arvioitiin rotan HOSP.1-rintarauhasen syöpämallissa [S. Eccles et al., Cancer Research, painossa (1995)]. Tässä mallissa
 25 naaraspuolisiin CBH/cbi-rottiin istutetaan laskimonsisäisesti 2×10^4 kasvainsolua kaulalaskimoon. Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä annetaan suun kautta suspension
 1-%:isessä metyyli-

loosassa tai intraperitoneaalisesti suspensiona fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa
 30 0,01-%:isessä Tween-20:ssä. Kokeen lopussa (4 - 5 viikkoa) eläimet lopetetaan, keuhkot poistetaan ja yksittäiset kasvaimet lasketaan 20 tunnin kuluttua siitä, kun ne on kiinnitetty Methacarnilla.

Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sillä on yleinen kaava (I):

5



10

jossa

R^1 on C_{1-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli, $-C_{1-6}$ -alkyyliaryyli, aryyli, $-C_{1-6}$ -alkyyliheteroaryyli, heteroaryyli tai $-C_{1-6}$ -alkyyli- AR^9 , jossa A on O, NR^9 tai $S(O)_m$, jolloin m on 0 - 2 ja R^9 on H, C_{1-4} -alkyyli, aryyli, heteroaryyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli tai $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli; jos A = NR^9 , R^9 -ryhmät voivat olla samoja tai erilaisia;

15

R^2 on H tai C_{1-6} -alkyyli;

20

R^3 on $[Alk]_nR^6$, jossa Alk on C_{1-6} -alkyyli tai C_{2-6} -alkenylyli ja n on nolla tai 1;

X on NR^4R^5 , jossa joko R^4 on vety tai C_{1-6} -alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu aminolla (NH_2), aryyliillä, aryyliaminolla, suojatulla aminolla, di(C_{1-6} -alkyyli)aminolla, mono(C_{1-6} -alkyyli)aminolla, CO_2H -ryhmällä, suojatulla karboksyyllillä, karbamoyylillä, mono(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyylillä tai di(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyylillä, ja R^5 on vety tai C_{1-6} -alkyyli; tai NR^4R^5 muodostaa renkaan, kuten pyrrolidinon, piperidinon tai morfolinon;

•••

•••

•••

•••:25

•••

•••

•••

•••

•••:30

•••

•••

•••

•••

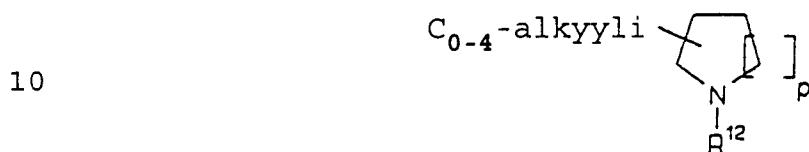
•••

•••

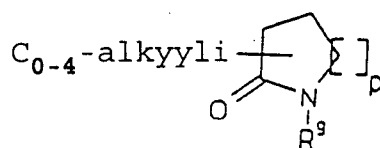
R^7 on vety tai $R^{10}CO$, jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli, $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli, syklo(C_{3-6})-alkyyli, $-C_{1-4}$ -alkyyli- $syklo(C_{3-6})$ -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli, $-C_{2-6}$ -alkenyliaryyli, aryyli tai heteroaryyli;

R^8 on aryyli (substituoitu R^{11} -ryhmällä), heteroaryyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä), C_{1-4} -alkyy-

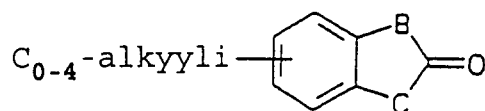
li- R^{11} , $-C_{1-4}$ -alkyyliaryyli (substituoitu R^{11} -ryhmällä),
 $-C_{1-4}$ -alkyyliheteroaryyli (mahdollisesti substituoitu R^{11} -
 ryhmällä), syklo- (C_{3-6}) -alkyyli (mahdollisesti substituoitu
 R^{11} -ryhmällä), syklo- (C_{3-6}) -alkenyli (mahdollisesti subs-
 tituoitu R^{11} -ryhmällä), $-C_{1-4}$ -alkyyli- (C_{3-6}) -alkyyli
 5 (mahdollisesti substituoitu R^{11} -ryhmällä) tai mikä tahansa
 seuraavista kolmesta ryhmästä



15 tai



20



25

jolloin p on 1 tai 2 ja B ja C on valittu toisis-
 taan riippumatta O-atomista, S-atomista, $C(R^9)_2$ -ryhmästä ja
 NR^9 -ryhmästä;

30

R^6 on AR^9 , syklo- (C_{3-6}) -alkyyli, syklo- (C_{3-6}) -alke-
 nyli, C_{1-6} -alkyyli, $-C_{1-6}$ -alkoksiaryyli, bentsyylioksi-
 aryli, aryli, heteroaryli, $-C_{1-3}$ -alkyyliheteroaryyli,
 $-C_{1-3}$ -alkyyliaryyli, $-C_{1-6}$ -alkyyli-COOR⁹, $-C_{1-6}$ -alkyyli-NHR,
 CONHR, NHCO₂R, NHSO₂R tai NHCOR, jolloin R on kuten ryhmän
 R^{10} yhteydessä on määritelty;

R^{11} on SO_2R^{13} , SR^7 , SR^9 , COR^{13} , $N(R^9)_2$, NR^9R^{12} , OR^9 ,
sukkinimido tai ftaali-imido;

R^{12} on H tai COR^9 , CO_2R^9 (jossa R^9 ei ole H), $CONHR^9$
tai SO_2R^9 (jossa R^9 ei ole H); ja

5 R^{13} on OH, OC_{1-4} -alkyyli, O- C_{1-4} -alkyyliaryyli, N-
(R^9)₂ (jossa R^9 -ryhmät ovat samoja tai erilaisia), C_{1-4} -
alkyyli, ariyli, heteroaryyli, - C_{1-4} -alkyyliaryyli tai
- C_{1-4} -alkyyliheteroaryyli;

10 jolloin yhdiste on ei-suolan, suolan, solvaatin tai
hydraatin muodossa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
siitä, että R^1 on C_{1-6} -alkyyli tai C_{1-6} -alkyyli-
 AR^9 , jossa A on $S(O)_m$, NR^9 tai O ja $m = 0, 1$ tai 2, ja R^9
on H, C_{1-4} -alkyyli tai ariyli.

15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 2
mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^3 on
 $[Alk]_mR^6$, jossa $n = 0$ tai 1, Alk on C_{1-6} -alkyyli ja R^6 on
 C_{1-6} -alkyyli, - C_{1-3} -alkyyliaryyli, - C_{1-3} -alkyyliheteroaryyli
tai AR^9 .

20 4. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuk-
sen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^4 on
H.

25 5. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuk-
sen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että X on
pyrrolidino, piperidino tai morfolino.

6. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuk-
sen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^7 on
H tai (C_{1-6} -alkyyli)karbonyyli.

30 7. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuk-
sen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^8 on
 C_{1-4} -alkyyli- R^{11} tai syklo- (C_{3-6}) -alkyyli- R^{11} ja R^{11} on
 COR^{13} , NR^9R^{12} , $N(R^9)_2$, sukkinimido tai ftaali-imido, R^{12} on
 COR^9 , CO_2R^9 (edellyttäen, että R^9 ei ole H) tai SO_2R^9

(edellyttäen, että R^9 ei ole H) ja R^{13} on OH, OC_{1-4} -alkyyli tai $N(R^9)_2$.

8. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^5 on H tai C_{1-6} -alkyyli.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että

R^1 on alkyyli, alkenyyli, alkyliaryyli, aryyli tai alkyyli- AR^9 ja R^9 on alkyyli, aryyli tai heteroaryyli;

R^7 on H tai $R^{10}CO$, jossa R^{10} on alkyyli, alkyliaryyli, sykloalkyyli, sykloalkyylialkyyli, alkenyyli tai alkenyyliaryyli;

R^8 on mahdollisesti substituoitu aryyli, heteroaryyli, alkyliaryyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli tai alkyylisykloalkyyli, alkyli- R^{11} tai mikä tahansa mainituista kolmesta ryhmästä;

R^6 on sykloalkyyli, sykloalkenyyli, alkyyli, bentsyyli, alkoksibentsyyli, bentsyylioksibentsyyli tai 3-indolyylimetyyli;

R^{11} on SR^7 , SR^9 , COR^{13} , $N(R^9)_2$, NR^9R^{12} , OR^9 , sukkinimido tai ftaali-imido; ja

R^{13} on OH, O-alkyyli, O-alkyyliaryyli, $N(R^9)_2$, alkyyli, aryyli tai alkyliaryyli.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on valittu

N-[2,3-bis-asetyylimerkaptopropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-3-metoksikarbonyylipropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-4-metoksikarbonyylibutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-5-metoksikarbonyylipentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-asetyylimerkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-asetyylimerkapto-4-ftaali-imidobutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

5 N- [2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-asetyylimerkapto-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

10 N- [2,3-bis-merkaptopropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-merkapto-3-metoksikarbonyylipropanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-merkapto-4-metoksikarbonyylibutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

15 N- [2-merkapto-5-metoksikarbonyylipentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-merkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

20 N- [2-merkapto-4-ftaali-imidobutanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista ja

N- [2-merkapto-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista.

25 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on valittu

N- [2-asetyylimerkapto-5-metoksikarbonyylipentanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

30 N- [2-asetyylimerkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-asetyylimerkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N- [2-asetyylimerkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-6-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-valinyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

5 N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-[β -(4-tiatsolyyli)]alaniini-N-metyyliamidis-
ta;

10 N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-leusyyli-L-[β -(2-pyridyyli)]alaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-
L-leusyyli-5-metyyli-L-glutamiinihappo-N-metyyliamidista;

15 N-[2-asetyylimerkapto-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-
L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-asetyylimerkapto-2-(3-ftaali-imido)fenyyliase-
tyyli]-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-merkapto-5-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-
leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

20 N-[2-merkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-
leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-merkapto-6-metoksikarbonyyliheksanoyyli]-L-
leusyyli-L-tryptofaani-N-metyyliamidista;

25 N-[2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyy-
li-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyy-
li-L-tryptofaani-N-metyyliamidista;

N-[2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyy-
li-L-[β -(4-tiatsolyyli)]alaniini-N-metyyliamidista;

30 N-[2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leu-
syyli-L-[β -(2-pyridyyli)]alaniini-N-metyyliamidista;

N-[2-merkapto-5-ftaali-imidopentanoyyli]-L-leusyy-
li-5-metyyli-L-glutamiinihappo-N-metyyliamidista ja

35 N-[2-merkapto-6-ftaali-imidoheksanoyyli]-L-leusyy-
li-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidista.

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 9 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^1 on $-CH_2SCH_3$.

5 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen yhdiste kuten se on määritelty missä tahansa esimerkeistä 20, 64, 68, 69 ja 70.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 9 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^3 on tert-butyyli tai $-C(CH_3)_2S(O)_{0-2}CH_3$.

10 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen yhdiste kuten se on määritelty missä tahansa esimerkeistä 16, 34, 35, 36, 37, 38, 51, 52 ja 72.

16. Minkä tahansa edellä esitetyistä patenttivaatimuksista mukainen yhdiste yhden enantiomeerin tai diaste-
15 reomeerin tai tällaisten isomeerien seoksen muodossa.

17. Farmaseuttinen koostumus käytettäväksi hoidos-
sa, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä taha-
sa edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukaisen yhdisteen
ja farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen tai kan-
20 tajan.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 16 mu-
kaisen yhdisteen käyttö lääkkeen valmistamiseksi sairauden
hoitamiseksi tai estämiseksi, joka on yhteydessä matriisin
metalloproteinaaseihin tai on TNF α :n välittämä.

25 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on valittu syövästä, tuleh-
duksesta ja tulehdustaudeista, kudoksen rappeumasta, ham-
paan vieruskudoksen sairaudesta, silmäsairaudesta, ihosai-
rauksista, kuumeesta, kardiovaskulaarisista vaikutuksista,
30 verenvuodosta, koagulaatiosta ja akuutin vaiheen vastees-
ta, kakeksiasta ja anoreksiasta, akuutista infektiosta,
HIV-infektiosta, shokkitiloista, siirrännäisen ja isännän
välisistä reaktioista, autoimmuunitaudista, reperfuusio-
vammasta, aivokalvontulehduksesta ja migreenistä.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on valittu kasvaimen kas-
vusta, angiogeneesistä, kasvaimen invaasiosta ja leviämi-
sestä, etäpesäkkeistä, pahanlaatuisesta askiteksesta ja
5 pahanlaatuisista keuhkopussin nestepurkautumista.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on valittu nivelreumasta,
nivelrikosta, luukadosta, astmasta, multippelisklerosis-
ta, hermoston rappeumasta, Alzheimerin taudista, ateros-
10 kleroosista, aivohalvauksesta, verisuonitulehduksesta,
Crohnin taudista ja haavaisesta paksusuolitulehduksesta.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on valittu sarveiskalvon
haavaumasta, verkkokalvotaudista ja kirurgisen haavan pa-
15 rantamisesta.

23. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on valittu psoriasiksesta,
atooppisesta ihottumasta, kroonisista haavaumista ja epi-
dermolysis bullosasta.

20 24. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n-
n e t t u siitä, että sairaus on hampaanvieruskudoksen
tulehdus tai ientulehdus.

