



C (45) Patentti- ja rekisterihallitus  
Patentti- ja rekisterihallitus 00 00 1008

(51) Kv.Ik.<sup>4</sup>/Int.Cl.<sup>4</sup> C 07 K 5/08

## SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

|                                                                                             |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| (21) Patenttihakemus – Patentansökning                                                      | 802057   |
| (22) Hakemispäivä – Ansökningsdag                                                           | 27.06.80 |
| (23) Alkupäivä – Giltighetsdag                                                              | 27.06.80 |
| (41) Tullut julkiseksi – Blivit offentlig                                                   | 29.12.80 |
| (44) Nähtäväksiapanon ja kuuljulkaisun pvm. –<br>Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 30.10.87 |
| (86) Kv. hakemus – Int. ansökan                                                             |          |
| (32) (33) (31) Pyydetty etuoikeus – Begärd prioritet                                        | 28.06.79 |
| Unkari-Ungern(HU) RI-717                                                                    |          |

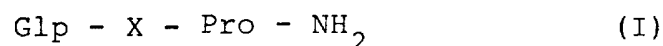
(71) Richter Gedeon Vegyeszeti Gyar R.T., Gyömrői ut 19, Budapest,  
Unkari-Ungern(HU)

(72) Lajos Kisfaludy, Budapest, Tamas Szirtes, Budapest,  
Lajos Balaspiri, Szeged, Eva Palosi, Budapest,  
Laszlo Sporny, Budapest, Adam Sarkadi, Budapest, Unkari-Ungern(HU)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä uusien keskushermostoon vaikuttavien tripeptidiamidien valmistamiseksi - Förfarande för framställning av nya, på det centrala nervsystemet inverkan tripeptidamider

Keksinnön kohteena on menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten yleisen kaavan I



mukaisten tripeptidiamidien valmistamiseksi, jossa kaavassa

X on L-valyyli-, L-propyyli-, D-leusyyli-, L-isoleusyyli-, L-treonyyli-, L-norvalyyli-, L-norleusyyli- tai L-2-aminobutyryyli-ryhmä, ja

Glp on L-pyroglutamyliryhmä ja Pro tarkoittaa L-propyyli-ryhmää.

Uudet, edellä määritellyt yleisen kaavan I mukaiset tripeptidiamidit ovat myös nimellä "tyrotropiinia vapauttava hormoni" (TRH) tunnetun L-pyroglutamyl-L-histidyyli-L-proliiniamidin (Glp-His-Pro-NH<sub>2</sub>) analogeja, jolloin kuitenkin yksi aminohappo ja vieläpä toisessa kohdassa oleva L-histidyyli-ryhmä tai kolmannessa kohdassa oleva L-propyyli-ryhmä on korvattu muulla, edelläolevan määritelmän mukaisella aminohapolla.

TRH-yhdisteen olemassolo tunnettiin jo 60-luvulla, sen rakenne selvitettiin kuitenkin vasta vuosina 1969-1970 R. Guillemin'in ja A. Schally'n tutkijaryhmien toimesta lähes samanaikaisesti, mutta toisistaan riippumatta (vert. Bowers C.Y. jne, *Endocrinology*, 86, 1143 (1970); R. Burgus jne. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 269, 1870 (1969)).

Tripeptidi TRH esitettiin alunperin TSH-hormonin (tyreotrooppisen hormonin vapauttamista imettäväisten hypofyysissä sääteleväksi tekijäksi; tähän hormoniin kohdistuva tuktimus sai kuitenkin uuden suunnan, kun tuli tunnetuksi, että tämän tripeptidin biologinen vaikutus ei rajoitu tyreotrooppisen hormonin vapauttamisen säätelyyn, vaan se vaikuttaa myös keskushermostojärjestelmään (vert. N.P. Plotnikoff et al, *Science* 178, 417 (1972); A.J. Prange et al, *Lancet* 2, 999 (1972)). Tällöin todettiin, että TRH edellämainitun hormoni-toiminnan lisäksi lyhentää myös huomattavasti barbituraattien tai alkoholin aiheuttamaa unitilaa, edelleen vähentää myös eri lääkeaineiden aiheuttamaa hypotermiaa ja parantaa lokomotoorista aktiviteettia. Seuraava tärkeä TRH-hormonin keskushermostojärjestelmään kohdistuva vaikutus on haloperidolin aiheuttaman katalepsian esto. Täten osoittautui suotavaksi sellaisten TRH-analogien valmistaminen terapeuttisiin tarkoituksiin, jotka vaikuttavat hypofyysiin vain heikosti, mutta jotka sitävastoin omaavat TRH:n vaikutusta vastaavan tai jopa sen ylittävän vaikutuksen keskushermostojärjestelmään. Tähän tarkoitukseen on valmistettu patenttijulkaisuissa DE-OS 2 343 035, 2 343 037, 2 449 167, 2 514 381, 2 609 154 ja 2 693 393 sekä BE-PS 819 198 esitettyjä tämän tapaisia yhdisteitä. Niihin tähän mennessä kohdistunut tutkimus, jonka tulokset ja kokemukset ovat yhteenvetona esittäneet A.J. Prange et al ("The Role of Hormones in Depression", *Life Sciences* 20, 1305, (1977)) ja A.V. Schally et al., ("Hypothalamic Regulatory Hormones", *Ann. Rev. Biochem.* 47, 89 (1978)), ei kuitenkaan ole johtanut terapeuttisen käytännön tarpeita joka suhteessa tyydyttäviin tuloksiin.

Nyt on havaittu, että vaihtamalla yksi aminohappo kolmesta aminohaposta rakentuvassa TRH-molekyylissä voidaan saada aikaan tripeptidin hormonivaikutuksen huomattava lasku, mutta keskushermostoon kohdistuva vaikutus säilyy tai jopa merkittävästi kasvaa. Erikoisen edullisiksi ovat tässä suhteessa osoittautuneet ne TRH-analogit,

jotka 2-asemassa L-histidyyliiryhmän asemesta sisältävät suoran tai haaroittuneen hiiliketjun omaavan alifaattisen aminohapporyhmän. Nämä TRH-analogit omaavat, hormonivaikutuksen käytännöllisesti katsoen lähes täysin puuttuessa, TRH:n vaikutuksen moninkertaisesti ylittävän vaikutuksen keskushermostojärjestelmään.

Yleisen kaavan I mukaisten uusien tripeptidien valmistamiseksi lähdetään keksinnön mukaan yleisen kaavan  $\text{Pro-NH}_2$  mukaisesta substituoidusta aminohappoamidista; tähän amidiin liitetään sitten vaiheittain, peptidikemiassa tavanomaisten menetelmien avulla ensin kohtaan X haluttu L-aminohappo ja sitten lopputuotteessa 1-asemassa oleva L-pyroglutamyyliiryhmä ja haluttaessa sitten poistetaan mainituissa kytkentäreaktioissa käytetyt suojaryhmät.

Edellä esitetyllä tavalla valmistetut, yleisen kaavan I mukaiset tripeptidiamidit voidaan eristää reaktioseoksesta kiteyttämällä tai lyofiloimalla; haluttaessa voidaan saatu tuote muuttaa tavanomaisella tavalla kompleksiksi.

Vaiheittain tapahtuvassa tripeptidimolekyylin muodostamisessa annetaan edullisesti ylimäärin olevan, yleisen kaavan  $\text{Pro-NH}_2$  mukaisen lähtöyhdisteen reagoida yleisen kaavan  $\text{Boc-X-OH}$  mukaisen suojatun L-aminohapon aktivoituneen johdannaisen, edullisesti pentafluorifenyyliesterin tai haluttaessa sen sek-anhydridin kanssa. Pentafluorifenyyliestereitä käytettäessä saadaan vastaavat, yleisen kaavan  $\text{Boc-X-Pro-NH}_2$  mukaiset suojatut dipeptidijohdannaiset erittäin lyhyen reaktioajan kuluessa, muutamien minuuttien aikana, jolloin tuote voidaan eristää helposti ja muodossa, joka ei yleensä vaadi jatkopuhdistusta. Tällä tavalla saaduista, suojatuista dipeptidijohdannaisista voidaan sitten asidolyysin avulla saada yleisen kaavan  $\text{H-X-Pro-H}$  mukaiset, vapaat pääteryhmät omaavat dipeptidit; näiden annetaan siten reagoida yleisen kaavan  $\text{Z-Glp-OPFP}$  mukaisen suojatun L-pyroglutaminihapon pentafluorifenyyliesterien kanssa, jolloin saadaan yleisen kaavan  $\text{Z-Glp-X-Pro-NH}_2$  mukainen suojattu tripeptidi, josta suojaryhmä Z voidaan poistaa edullisesti katalyyttisen hydrolyysin avulla.

Saadun lopputuotteen puhdistus voidaan suorittaa yksinkertaisen kiteytyksen tai saostamisen avulla, tarvittaessa myös

kuitenkin pylväskromatograafisia menetelmiä käyttäen. Eräissä tapauksissa voidaan lopputuotetta sivutuotteiden poistamisen jälkeen käsitellä myös yksinkertaisen lyofiloinnin avulla.

Keksinnön mukaisesti valmistetut, yleisen kaavan I mukaiset tripeptidit testattiin seuraavassa esiteltävien biologisten menetelmien mukaan niiden farmakologisten vaikutusten suhteen.

#### 1. Haloperidolisen katalepsian esto rotilla.

(vert. J. Delay ja P. Deniker: Compt. Rend. Cong. Med. Alenistes Neurologistes, 19, 497, Luxemburg 1952).

40 mg/kg haloperidolia, so. 4-(p-kloorifenyyli)-1-(3-p-fluoribentsoyyli)-propyyli)-piperidiini-4-olia, annosteltiin ihonalaisesti eläimille ja 120 minuutin kuluttua tarkistettiin katalepsian esiintyminen; tämän jälkeen jaettiin rotat 10 eläimen muodostamiin ryhmiin ja niitä käsiteltiin suonensisäisesti annetuilla TRH-hormonin tai uusien TRH-analogien tripeptidien annoksilla. Vertailuryhmän eläimiä käsiteltiin fysiologisella keittosuolaliuoksella. 15, 30, 90 ja 120 minuutin kuluttua käsittelystä määritettiin yksittäisten yhdisteiden katalepsiaa estävä vaikutus. Niitä eläimiä pidettiin kataleptisina, jotka sijoitettuna etukäpäälilleen 7 cm korkuiselle pylvälle eivät 30 sekunnin aikana korjanneet asentoaan.

Niistä eläimistä, joissa ei esiintynyt katalepsiaa, määritettiin probit-analyysin avulla vastaavat  $ED_{50}$ -arvot kullekin vaikutusaineelle.

Nämä kokeet suoritettiin urospuolisilla Wistar-rotilla, joiden paino oli 160-180 g.

#### 2. L-dopan avulla aiheutetun lokomotorisen vaikutuksen voimistaminen hiirillä.

(vert. The Thyroid Axis, Drugs and Behavior, s. 116, A.J. Prage jr., Raven Press, New York, 1974).

Eläimille annosteltiin ensin kullekin intraperitoneaalisesti 40 mg/kg N-metyyli-N-propargyyli-bentsyyliamiinia (Pargyliiniä), sitten 20 mg/kg TRH-hormonia tai samat annokset tutkittavia uusia tripeptidejä ja lopuksi 100 mg/kg L-dopaa. 30, 60 ja 90 minuutin kuluttua edelläesitetystä käsittelystä mitattiin eläinten lokomotorinen aktiviteetti; saadut arvot on esitetty seuraavassa taulu-

kossa prosentteina TRH-hormonilla käsitellyillä eläimillä saaduista arvoista. Näihin kokeisiin käytettiin kulloinkin 15 uroshiirtä, joiden yksittäispaino oli 18-22 g.

### 3. Reserpiini-hypotermiaa vastustava vaikutus hiirillä.

(vert. B.M. Askew: Life Sci. 2, 725-730 (1963)).

10 eläimen ryhmiin jaetuille urospuolisille hiirille, joiden yksittäispaino oli 18-22 g, annosteltiin 5 mg/kg reserpiiniä i.p.; 16 tunnin kuluttua käsiteltiin eläimiä 20 mg/kg olevilla annoksilla TRH-hormonia tai tutkittavaa tripeptidiä.

Eläinten rektaalilämpötila mitattiin ennen reserpiinikäsittelyä (seuraavassa taulukossa merkitty "norm") 16 tunnin kuluttua reserpiinikäsittelystä (taulukossa merkitty "res.") ja yhden ja kahden tunnin kuluttua tutkittavan tripeptidin annostuksen jälkeen (taulukossa "käsitt. jälkeen"). Taulukossa on ilmoitettu kulloinkin 10 hiireltä mitattujen rektaalisten lämpötilojen keskiarvot.

### 4. Vaikutus heksobarbitaalilla aiheutetun unen kestoon.

Kulloinkin 10 eläimen ryhmiin jaetuille urospuolisille hiirille annosteltiin kullekin 60 mg/kg heksobarbitaali-Na (Evipan<sup>R</sup>, Bayer) suonensisäisesti; 10 minuutin kuluttua käsiteltiin eläimiä kulloinkin 20 mg/kg olevalla annoksella TRH-hormonia tai tutkittavaa tripeptidiä intraperitoneaalisesti. Unen kesto on esitetty seuraavassa taulukossa prosentteina vertailuryhmän eläimiltä mitatuista arvoista (keskiarvo kulloinkin 10 eläimestä).

### 5. Etanoli-narkoosi

(vert. J.M. Cott et al." 3. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 594 (1976)).

Kulloinkin 20 eläimeen jaettuihin ryhmiin kuuluviin, eri sukupuolta oleville CFLP- (LATI-) hiirille, joiden yksittäispainot olivat 18-22 g, annosteltiin jokaiselle 4,5 g etanolia i.p.; 10 minuutin kuluttua tästä käsiteltiin jokaista eläintä 20 mg/kg olevalla annoksella tutkittavaa tripeptidiä intraperitoneaalisesti. Nukkumisaikat on esitetty seuraavassa taulukossa prosentuaalisina vertailuryhmän eläimiltä mitattujen arvojen suhteen (keskiarvo kulloinkin 20 eläimestä).

#### 6. Hormoniaktiviteetti (TSH-vaikutus) rotilla

Urospuolisia Wistar-rottia, joiden yksittäispaino oli noin 200 g, jaettiin kulloinkin 7-8 eläintä käsittäviin ryhmiin ja jokaista käsiteltiin 20 mg/kg olevalla TRH-annoksella tai tutkitavan tripeptidin annoksella suonensisäisesti. Eläinten TSH-reaktio määritettiin 15 minuutin kuluttua käsittelyn jälkeen TRH-yhdisteellä tai TRH-analogisella yhdisteellä eläinten plasmasta radioimmuunisen tutkimuksen avulla. Suhteelliset vaikutustasot laskettiin nelipistemenetelmän mukaan TPA 101 tietokoneen avulla, jolloin TRH-yhdisteen vaikutustasolle annettiin arvo 100.

Edellä esitettyjen farmakologisten menetelmien mukaan määrätyt, yleisen kaavan I mukaisten tärkempien yhdisteiden biologisten vaikutusten arvot on esitetty seuraavassa taulukossa I.

Taulukko

| Glp-X-Y-NH <sub>2</sub><br>X | Y    | Haloperidoli-<br>katalapsian<br>esto<br>ED <sub>50</sub><br>mg/kg | Aika<br>min. | L-dopan lokomo-<br>toorisen vaiku-<br>tuksen parane-<br>minen, %<br>30 60 90<br>min min min<br>kuluttua | Reserpiinihypotermian<br>esto; rektaalinen läm-<br>pötila °C<br>norm. res. Käsitte-<br>1 h 2 h | Heksobarbi-<br>taalin ai-<br>heuttaman<br>unen<br>kesto % ver-<br>tailueläin-<br>ten ajas-<br>ta | Etanoli<br>uniaika<br>% vertai-<br>tus | TSH-<br>vaiku-<br>tus |
|------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| Nva                          | Pro  | 11,4                                                              | 120          | 254 156 214                                                                                             | 36,2 25,9 36,4 32,0                                                                            | 114                                                                                              | 77                                     | 0                     |
| Nleu                         | Pro  | 16,8                                                              | 120          | 249 105 112                                                                                             | 36,3 27,1 37,6 32,2                                                                            | 77                                                                                               | 74                                     | 3,8                   |
| *His                         | HPro | 13,7                                                              | 120          | 209 85 110                                                                                              | 36,5 28,5 35,3 35,4                                                                            | 63                                                                                               | 114                                    | 68,6                  |
| Abu                          | Pro  | 80                                                                | 15           | 27 14 18                                                                                                | 36,3 19,7 22,2 25,4                                                                            | 84                                                                                               | 39                                     | 0,02                  |
| <hr/>                        |      |                                                                   |              |                                                                                                         |                                                                                                |                                                                                                  |                                        |                       |
| TRH                          | 80   | 15                                                                | 15           | 100 100 100 100                                                                                         | 36,2 25,9 35,5 30,2                                                                            | 56                                                                                               | 35                                     | 100,0                 |

Heksobarbitaali-uniaika ( $\bar{X} \pm SE$ ) : 38,4  $\pm$  1,36 min

Etanoli-uniaika ( $\bar{X} \pm SE$ ) : 46,9  $\pm$  2,17 min

\* vertailuyhdiste

74473

Tämän taulukon arvoista voidaan havaita, että korvaamalla His suoran tai haaroittuneen hiiliketjun omaavalla alifaattisella aminohapolla TRH-molekyylissä, aiheutuu TSH-hormonin erittymisen lakkaaminen tai vähintään sen huomattava aleneminen, jolloin esimerkiksi haloperidolin aiheuttaman katalepsian esto kasvaa 2 - -7-kertaiseksi. Eräät uudet TRH-analogit omaavat myös huomattavan lokomotorisen aktiviteetin voimistamisvaikutuksen tai heksobarbitaali- tai etanoli-unen lyhentämisvaikutuksen. On myös huomioitava, että uudet His-ryhmän sisältävät TRH-analogit säilyttävät tosin noin 70 % hormoonivaikutuksestaan, mutta samanaikaisesti omaavat merkittävän vaikutuksen keskushermostojärjestelmään.

Alan tunnetusta kirjallisuudesta ei löydy tietoa, jonka perusteella hormoni- ja keskushermostovaikutukset voidaan erottaa toisistaan, ja keksinnön mukaisten yhdisteiden vaikutus nimenomaan keskushermostoon on suurempi kuin TRH-vaikutus.

CNS- ja TRH-vaikutusten yllättävä erottaminen ilmenee seuraavasta taulukosta:

| Aine                                                | Hormonivaikutus <sup>*)</sup> | CNS-vaikutus <sup>*)</sup> |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Luonnollinen TRH                                    | 1                             | 1                          |
| SE-patenttijulkaisun<br>425 659 mukaiset yhdisteet: |                               |                            |
| Kpc-His-Tca-NH <sub>2</sub>                         | 1                             | 8                          |
| Kpc-His-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 1                             | 4                          |
| DL-Kpc-His-Pro-NH <sub>2</sub>                      | 0,2                           | 3                          |
| Kic-His-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 0,1                           | 1                          |
| Kic-His-Pro-OCH <sub>3</sub>                        | 0,001                         | 0                          |
| Keksinnön mukaiset<br>yhdisteet:                    |                               |                            |
| Glp-Nva-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 0                             | 7                          |
| Glp-Nle-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 0,038                         | 5                          |
| Glp-Abu-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 0                             | 1                          |
| Glp-Pro-Pro-NH <sub>2</sub>                         | 0                             | 1                          |



| Aine                          | Hormonivaikutus *) | CNS-vaikutus *) |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|
| Keksinnön mukaiset yhdisteet: |                    |                 |
| Glp-Val-Pro-NH <sub>2</sub>   | 0,03               | 1               |
| Glp-Thr-Pro-NH <sub>2</sub>   | 0,26               | 1,4             |
| Glp-D-Leu-Pro-NH <sub>2</sub> | 0                  | 1,4             |
| Glp-Ile-Pro-NH <sub>2</sub>   | 0                  | 1               |

\*) Suhteellinen vaikutus verrattuna TRH:n vaikutukseen.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja uusia tripeptidejä sekä niiden farmaseuttisesti käyttökelpoisia suoloja tai komplekseja voidaan käyttää terapeuttisesti tavanomaisina lääkeainevalmisteina. Nämä lääkeainevalmisteet sisältävät keksinnön mukaisia vaikutusaineita yhdessä enteraaliseen tai parenteraaliseen annostukseen sopivien epäorgaanisten tai orgaanisten kantajien kanssa. Lääkeainevalmisteet voidaan valmistaa esimerkiksi kiinteiksi lyofilisaateiksi, jolloin voidaan käyttää peptidien kanssa reagoimattomia yhdisteitä, esimerkiksi hiilihydraatteja kantajina; ne voidaan valmistaa myös väkevöidyiksi tai laimennetuiksi suspensioiksi tai emulsioiksi tai tableteiksi tai injektioitaviksi valmisteiksi.

Keksinnön mukaisen menetelmän soveltamista käytäntöön sekä keksinnön mukaisten uusien TRH-analogien kemiallista valmistusta esitellään tarkemmin seuraavissa esimerkeissä. Näissä esimerkeissä käytetyt lyhtenteet vastaavat peptidikemiassa tavanomaisesti käytettyjä lyhenteitä: vert.: J. Biol. Chem. 247, 977 (1972). Lisäksi käytetään seuraavia lyhennyksiä:

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| Ada   | L-2-amino-dekaanihappo        |
| Abu   | L-2-amino-voihappo            |
| Cha   | L-sykloheksyyli-alaniini      |
| Pip   | L-pipekoliinihappo            |
| HPro  | L-homopropiini                |
| DAE   | 2-metyyliamino-etyyli         |
| DCC   | disykloheksyyli-karbodi-imidi |
| PFPOH | pentafluorifenoli             |
| DCU   | disykloheksyyli-virtsä-aine   |
| DMFA  | dimetyyliformamidi            |

Yhdisteiden esimerkeissä annetut sulamispisteet määritettiin dr. Tottoli'n (Büchi) sulamispistemittalaitteen avulla. Optiset kiertoarvot mitattiin Perkin-Elmer tyyppiä 141 olevan polarimetrin avulla. Ohutkerroskromatografisissa tutkimuksissa tai eroituksissa käytettiin "Kieselgel G nach Stahl" (E. Merck, Darmstadt) piigeeleilyvyjä. Kromatogrammien kehittämiseen käytettiin seuraavia liuotinaineseoksia:

- (1) kloroformi : metanoli 9:1
- (2) etyyliasetaatti : (pyridiini-etikkahappo:vesi 20:6:11) 9:1
- (3) etyyliasetaatti: (pyridiini:etikkahappo:vesi 20:6:11) 8:2
- (4) etyyliasetaatti: (pyridiini:etikkahappo:vesi 20:6:11) 3:2

Täplien kehittämiseen käytettiin ninhydriiniliuosta; ruiskuttamisen jälkeen kuivattiin levyjä 5 minuuttia 105°C:ssa. Sitten pantiin kromatogrammit kloorikaasuun ja ilmastuksen jälkeen kehitettiin o-tolidiini-kaliumjodidiliuoksella.

Tuotteiden pylväskromatograafisiin puhdistuksiin käytettiin "Kieselgel G" (E. Merck) piigeeleilyä, jonka osaskokooli 0,062-0,2 mm.

Liuosten haihduttamiseen tyhjiössä käytettiin "Rotavapor R" (Büchi) tyhjiöhaihdutusalaitetta, haihdutuksessa ei ylitetty 50°C olevia lämpötiloja.

BOC-suojattujen aminohappojen pentafluorifenyyliesterit valmistettiin menetelmän mukaan, jonka ovat esittäneet Kisfaludy et al (Ann. 1973, 1421).

Tarkemmat yksityiskohdat uusien TRH-analogien valmistamiseksi esiteltävän keksinnön mukaisesti on esitetty seuraavissa suoritusesimerkeissä.

#### Esimerkki 1

##### L-pyroglytamyyli-L-norleusyyli-L-proliiniamidi

##### Vaihe 1:

l-norleusyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

2,28 g (20 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 3,97 g (10 mmoolia)

BOC-Nle-OPFP:tä (vert. Kisfaludy et al, Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chemie 359, 887 (1978)) liuotetaan 40 millilitraan DMFA:ta ja 5 minuutin kuluttua haihdutetaan liuos kuiviin tyhjiössä. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 50 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kolmesti kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoliuosta, sit-

ten kolmasti kulloinkin 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi kerran 10 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännös liuotetaan 5 millilitraan etyyliasetaattia ja liuokseen lisätään 10 ml 5N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Reaktioseos laimennetaan 30 minuutin kuluttua eetterillä, muodostunut sakka poistetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 2,48 g H-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää (94 % kaavan BOC-Nle-OPFP mukaan lasketusta teoreettisesta saannosta),  $R_f^{(4)} = 0,20$ .

Vaihe 2:

Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L-norleusyyli-L-proliiniamidi

1,05 g (4 mmoolia) H-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää liuotetaan 10 millilitraan DMFA:ta ja liuokseen lisätään jäähdyttäen jäällä ja sekoittaen 0,56 ml (4 mmoolia) trietyyliamiinia ja 1,89 g (4,4 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Viiden minuutin sekoittamisen jälkeen lisätään vielä 0,56 ml (4 mmoolia) trietyyliamiinia; seosta sekoitetaan vielä 20 minuuttia ja haihdutetaan sitten tyhjiössä kuiviin. Haihdutusjäännös liuotetaan 40 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kahdesti kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa, kolmasti kulloinkin 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi kerran 10 ml kanssa vettä, kuivataan sitten vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin tyhjiössä. Jäännöksenä saatu öljy kiteytetään eetterin alla ja tällä tavalla saatu raaka tuote (1,52 g) kiteytetään uudestaan 8 millilitrasta etyyliasetaattia. Saadaan 1,36 g Z-Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub> (72 % teoreettisesta); sp. 146-148°C;  $R_f^{(3)} = 0,32$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -79,8^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Analyysi kaavalle C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekyylipaino 472,55):

laskettu: C 61,00 %, H 6,83 %, N 11,86 %;

havaittu: C 60,90 %, H 7,04 %, N 11,87 %.

Vaihe 3:L-pyroglutamyyli-L-norleusyyli-L-proliiniamidi

1,16 g (2,46 mmoolia) Z-Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 25 millilitraan metanolia, liuokseen lisätään 0,2 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiilikatalyyttiä ja vetyä johdetaan 20 minuutin ajan liuoksen lävitse. Katalyytti poistetaan sitten suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Kiinteää, amorfista jäännöstä hierretään eetterin kanssa ja suodatetaan. Tällä tavalla saatu raaka tuote (0,72 g) liuotetaan veteen, liuos selkeytetään aktiivihiilellä ja vesikirkas liuos lyofiloidaan. Saadaan 0,66 g Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (79,5 % teoreettisesta);  $R_f^{(4)} = 0,43$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -77,1^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Aminohappoanalyysi: Glu (0,96 (1,0), Nle = 1,00 (1,0), Pro 1,00 (1,0).

Esimerkki 2L-pyroglutamyyli-L-norvalyyli-L-proliiniamidiVaihe 1:L-norvalyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

2,2 g (20 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 3,83 g (10 mmoolia) BOC-Nva-OPFP:tä (vert. L. Kisfaludy et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 395, 887 (1978) liuotetaan 40 millilitraan DMFA:ta, liuoksen annetaan seistä 5 minuuttia ja haihdutetaan sitten kuiviin tyhjiössä. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 50 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kolmasti kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa, kolmasti kulloinkin 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattia ja lopuksi kerran 10 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin kanssa ja haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännös liuotetaan 5 millilitraan etyyliasetaattia ja lisätään 10 ml 5N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Reaktioseos laimennetaan 30 minuutin kuluttua eetterillä, saatu sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 1,83 g H-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>. HCl:ää (73 % teoreettisesta, BOC-Nva-OPFP:n mukaan lasketusta saannosta);  $R_f^{(4)} = 0,10$ .

Vaihe 2:Bentsyylioksidikarbonyyli-L-pyrogulutamyli-L-norvalyyli-L-propiiniamidi

1,25 g (5 mmoolia) H-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää lietetään 15 millilitraan FMFA:ta ja jäähdyttään jäällä ja sekoittaen lisätään 0,7 ml (5 mmoolia) trietyyliamiinia ja 2,15 g (5 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Viiden minuutin kuluttua lisätään vielä 0,7 ml (5 mmoolia) trietyyliamiinia, seosta sekoitetaan edelleen 20 minuuttia ja haihdutetaan sitten kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 50 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kolme kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa, kolme kertaa 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi kerran 10 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy kiteytetään eetterin avulla ja tällä tavalla saatu raaka tuote (1,80 g) kiteytetään uudestaan etanolin ja eetterin seoksesta. Saadaan 1,66 g Z-Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (72 % teor.); sp. 166-167°C;  $R_f^{(3)} = 0,29$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -87,5^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Analyysi kaavalle C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekyylipaino 458,52):

laskettu C 60,25 %, H 6,59 %, N 12,22 %;

havaittu C 60,08 %, H 6,70 %, N 12,15 %.

Vaihe 3:L-pyrogulutamyli-L-norvalyyli-L-proliiniamidi

1,42 g (3,1 mmoolia) Z-Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 30 millilitraan metanolia, liuokseen lisätään 0,2 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiilikatalyyttiä ja vetykaasua johdetaan liuoksen lävitse 30 minuutin ajan. Katalyytti poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Kiinteää, amorfista jäännöstä hierretään eetterin kanssa ja erotetaan suodattamalla. Tällä tavalla saatu raaka tuote liuotetaan veteen, liuos selkeytetään aktiivihiihellä ja vesikirkas liuos lyofiloidaan. Saadaan 0,95 g Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (94 % teor.);  $R_f^{(4)} = 0,36$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -87,0^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Aminohappoanalyysi: Glu 0,97 (1,0), Nva 1,09 (1,0), Pro 1,00 (1,0).

Esimerkki 3L-pyroglutamyyli-L-prolyyli-L-proliiniamidiVaihe 1:L-prolyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

2,28 g (20 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 3,81 g (10 mmoolia) BOC-Pro-OPFP:tä liuotetaan 40 millilitraan DMFA:ta, liuosta ravistellaan kolme kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa, sitten myös kolme kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi kerran 10 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännös liuotetaan 5 millilitraan etyyliasetaattia ja lisätään 10 ml 5N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Reaktiosos laimennetaan 30 minuutin kuluttua eetterillä, muodostunut sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 2,06 g H-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää (83 % teoreettisesta, BOC-Pro-OPFP:n mukaan lasketusta saannosta);  $R_f^{(4)} = 0,05$ .

Vaihe 2:Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L-prolyyli-L-proliiniamidi

0,75 g (3 mmoolia) H-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää lietetään 10 millilitraan DMFA:ta ja jäähdyttäen jäällä ja sekoittaen lisätään 0,42 ml (3 mmoolia) trietyyliamiinia ja 1,35 g (3,15 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Viiden minuutin kuluttua lisätään vielä 0,42 ml (3 mmoolia) trietyyliamiinia ja 10 minuutin sekoittamisen jälkeen muodostunut paksu suspensio haihdutetaan kuiviin. Kiteistä haihdutusjäännöstä hierretään 8 ml kanssa etanolia ja sitä pidetään 3 tuntia jääkaapissa. Saatu sakka erotetaan sitten suodattamalla ja kuivataan. Tällä tavalla saadaan 1,0 g Z-Glp-PropPropNH<sub>2</sub>:ta (73 % teor.); sp. 247-248°C (haj.)  $R_f^{(3)} = 0,19$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -82,8^\circ$  (c = 1 etikkahapossa).

Analyysi kaavalle C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekyylipaino 456,50):

laskettu: C 60,52 %, H 6,18 %, N 12,27 %;

havaittu: C 60,03 %, H 6,20 %, N 12,20 %.

Vaihe 3:L-pyroglutamyyli-L-prolyyli-L-proliiniamidi

1,0 g (2,2 mmoolia) Z-Glp-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 50 millilitraan etikkahappoa, lisätään 0,2 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiihi-katalyyttiä ja vetykaasua johdetaan seoksen lävitse tunnin ajan. Katalyytti poistetaan sitten suodattamalla, suodos haihdutetaan kuiviin ja haihdutusjäännöstä hierretään eetterin kanssa. Tällä tavalla saatu raaka tuote (0,60 g) liuotetaan veteen, liuos selkeytetään aktiivihiihellellä ja vesikirkas liuos lyofiloidaan. Saadaan 0,50 g Glp-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (70 % teor.);  $R_f^{(4)} = 0,10$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -223,1^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Esimerkki 4L-pyroglutamyyli-L-valyyli-L-proliiniamidiVaihe 1:

0,49 g (4,2 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 0,82 g (2,14 mmoolia) BOC-Val-OPFP:tä liuotetaan 10 millilitraan DMFA:ta ja 30 minuutin kuluttua haihdutetaan liuos kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännöksenä saatu öljy liuotetaan 10 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 3 ml kanssa 1N suolahappoa, kolme kertaa kulloinkin 3 ml kanssa natriumvetykarbonaattia ja lopuksi kerran 3 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännös liuotetaan 3 millilitraan etyyliasetaattia ja lisätään 3 ml 5N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Tunnin kuluttua laimennetaan reaktioseos eetterillä, sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 0,51 g H-Val-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl (95 % teoreettisesti BOC-Val-OPFP:n mukaan lasketusta saannosta);  $R_f^{(4)} = 0,10$ .

Vaihe 2:Bentsyylioksidikarboxyyli-L-pyroglutamyyli-L-valyyli-L-proliiniamidi

0,38 g (1,52 mmoolia) H-Val-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää lietetään 10 millilitraan DMFA:ta ja jäähdyttäen jäällä ja sekoittaen lisätään 0,22 ml (1,52 mmoolia) trietyyliamiinia ja 0,69 g (1,6 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Kymmenen minuutin kuluttua lisätään vielä 0,22 ml

(1,52 mmoolia) trietyyliamiinia ja 30 minuutin sekoittamisen jälkeen haihdutetaan reaktioseos kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 15 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 5 ml kanssa 1N suolahappoa, kolme kertaa kulloinkin 5 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattia ja lopuksi kerran 5 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin tyhjiössä. Öljymäinen jäännös kiteytetään eetterin avulla; tällä tavalla saadaan 0,54 g Z-Glp-Val-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (77 % teor.); sp. 116-118<sup>o</sup>C; R<sub>f</sub>(3) = 0,30;  $[\alpha]_D^{25} = -100,5^{\circ}$  (c = 1, etikkahapossa).

#### Vaihe 3:

##### L-pyroglutamyyli-L-valyyli-L-proliiniamidi

9,65 g (21,2 mmoolia) Z-Glp-Val-Pro.NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 300 millilitraan vettä ja lisätään 2 g 10-prosenttista palladium/aktiivihili-katalyyttiä sekä johdetaan vetykaasua 5 tunnin ajan liuoksen lävitse. Katalyytti poistetaan sitten suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan etanoliin, liuos haihdutetaan kuiviin ja tämä menettely toistetaan vielä kaksi kertaa. Lopuksi saatu kiinteä jäännös hierretään eetterin kanssa. Tällä tavalla saadaan 4,47 g Glp-Val-PropNH<sub>2</sub>:ta (65 % reor) R<sub>f</sub><sup>(4)</sup> = 0,34  $[\alpha]_D^{25} = -104,9^{\circ}$  (c = 1, etikkahapossa).

Aminohappoanalyysi: Glu 1,03 (1,01), Val 1,00 (1,0), Pro 0,94 (1,0).

#### Esimerkki 5

##### L-pyroglutamyyli-L-isoleusyyli-L-proliiniamidi

#### Vaihe 1:

##### Bentsyylioksikarbonyyli-L-isoleusyyli-L-proliiniamidi

51,4 g (0,1 moolia) Z-Ile-OPFP:tä ja 12,5 g (0,11 moolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 250 millilitraan DMFA:ta ja liuokseen lisätään 14,0 ml (0,1 moolia) trietyyliamiinia. Reaktioseoksen annetaan seistä yön ylitse ja haihdutetaan kuiviin seuraavana päivänä. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 500 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan peräkkäin kaksi kertaa kulloinkin 100 ml kanssa 1N suolahappoa, myös kaksi kertaa kulloinkin 100 ml kanssa natriumvetykarbonaattia ja kerran 100 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Öljymäinen jäännös



kiteytetään seoksesta, joka sisältää 100 ml eetteriä ja 100 ml n-heksaania. Tällä tavalla saatu raaka tuote (31,7 g) kiteytetään uudestaan seoksesta, joka sisältää 60 ml etyyliasettaattia ja 60 ml n-heksaania. Saadaan 30,32 g Z-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (84 % teor.); sp. 127-128°C; R<sub>f</sub>(2) = 0,54.

Vaihe 2:

L-isoleusyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

24,0 g (66,5 mmoolia) Z-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 470 millilitraan metanolia, lisätään 30 ml 2,4N metanolipitoista suolahappoliuosta ja 4 g 10-prosenttista palladium/aktiivihili-katalyyttiä ja vetyä johdetaan yhden tunnin ajan seoksen lävitse. Katalyytti poistetaan sitten suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännöstä hierretään eetterin kanssa ja tällä tavalla saatu raaka tuote (20 g) kiteytetään metanolin ja eetterin seoksesta uudestaan. Saadaan 16,05 g H.Ile-Pro-NH<sub>2</sub>HCl:ää (81 % teor.); sp. 135-140°C; R<sub>f</sub>(4) = 0,15.

Vaihe 3:

Bentsyylioksidikarbonyyli-L-pyroglyutamyyli-L-isoleusyyli-L-proliiniamidi

0,90 g (3,5 mmoolia) H.Ile-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää lietetään 20 millilitraan DMFA:ta ja jäähdyttäen jäällä ja sekoittaen lisätään 0,49 ml (3,5 mmoolia) trietyyliamiinia ja 1,57 g (3,7 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Viiden minuutin kuluttua lisätään vielä 0,49 ml (3,6 ml) trietyyliamiinia ja 20 minuutin sekoittamisen jälkeen haihdutetaan reaktioseos kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 30 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kolme kertaa kulloinkin 7 ml kanssa 1N suolahappoa, myös kolme kertaa kulloinkin 7 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi 7 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatua öljyä käsitellään useita kertoja eetterillä ja eetteri poistetaan dekantoimalla; lopuksi kiteytetään raaka tuote eetterin alla, erotetaan, liuotetaan etyyliasetattiin ja lisäämällä eetteriä saostetaan uudestaan. Tällä tavalla saadaan 1,18 g Z-Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (71 % teor.); sp. 87-89°C; R<sub>f</sub><sup>(3)</sup> = 0,36;  $[\alpha]_D^{25} = -91,4^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Analyysi kaavalle  $C_{24}H_{32}O_6N_4$  (molekyylipaino 427,55):

laskettu: C 61,00 %, H 6,83 %, N 11,6 %;

havaittu: C 59,19 %, H 6,88 %, N, 11,16 %.

#### Vaihe 4:

##### L-pyroglutamyyli-L-isoleusyyli-L-proliiniamidi

4,72 g (10 mmoolia) Z-Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 100 millilitraan metanolia, lisätään 1 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiili-katalyyttiä ja johdetaan vetykaasua tunnin ajan seoksen lävitse. Katalyytti poistetaan suodattamalla, suodos haihdutetaan kuiviin ja jäännöstä hierretään eetterin kanssa. Tällä tavalla saatu raaka tuote (3,22 g) liuotetaan veteen ja liuos selkeytetään aktiivihiilellä. Vesikirkas liuos lyofilioidaan; saadaan 3,03 g Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (98 % teor.);  $R_f^{(4)} = 0,45$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -100,7^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Aminohappoanalyysi: Glu 0,95 (1,0), Ile 1,00 (1,0), Pro 1,02 (1,0).

#### Esimerkki 6

##### L-pyroglutamyyli-L- $\alpha$ -aminobutyryyli-L-proliiniamidi

#### Vaihe 1:

Tert.-butyylioksikarbonyyli-L- $\alpha$ -aminovoihappo-pentafluorifenyyliesteri

7,7 g (20 mmoolia) BOC-Abu-OH.DCHA:ta lietetään 60 millilitraan eetteriä, lisätään 20 ml 2N rikkihappoa ja ravistellaan, kunnes suspendoitunut aine on liuonnut. Eetterifaasi erotetaan sitten, ravistellaan 20 ml kanssa rikkihappoa ja sen jälkeen 20 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy (4,14 g) ja 3,7 g (20 mmoolia) PFPOH:ta liuotetaan 25 millilitraan etyyliasetaattia, liuos jäähdytetään 5°C alapuolella olevaan lämpötilaan ja sekoittaen lisätään 3,92 g (10 mmoolia) DCC:tä. Reaktioseosta sekoitetaan tunti jäähauteessa, sitten DCU poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan n-heksaaniin ja liuosta pidetään yksi tunti jääkaapissa. Vielä saostunut DCU poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan 20 ml tilavuuteen. Kiteyttämisen aluksi pannaan suspensio jääkaappiin ja annetaan olla siellä yön ylitse; seuraavana päivänä poistetaan kiteet suodatta-

mallalla. Tällä tavalla saadaan 5,57 g BOC-Abu-OPFP:tä (76 % teor.); sp. 83-84°C;  $R_f^{(1)} = 0,86$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -32,8^\circ$  ( $v = 1$ , etyyliasetaatissa).

Analyysi kaavalle  $C_{15}H_{16}O_4NF_5$  (molekyyllipaino 369,29):

laskettu: C 48,79 %, H 4,37 %, N 3,79 %, F 25,72 %;

havaittu: C 48,55 %, H 4,28 %, N 3,70 %, F 25,44 %.

#### Vaihe 2:

##### L- $\alpha$ -aminobutyryyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

3,2 g (28 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 5,16 g (14 mmoolia) BOC-Abu-OPFP:tä liuotetaan 60 millilitraan DMFA:ta ja 5 minuutin seisomisen jälkeen haihdutetaan liuos kuiviin tyhjiössä. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 100 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 20 ml kanssa 1N suolahappoa ja sitten myös kaksi kertaa kulloinkin 20 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 20 millilitraan etyyliasetaatia ja lisätään 20 ml 6N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Tunnin kuluttua laimennetaan reaktioseosta eterillä, saatu sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saatua raakaa tuotetta (3,86 g) hierretään 20 ml kanssa kylmää DMFA:ta. Saadaan 2,40 g Abu-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää (73 % teoreettisesta, kaavan BOC-Abu-OPFP mukaan lasketusta saannosta):  $R_f^{(4)} = 0,10$ .

#### Vaihe 3:

##### Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L- $\alpha$ -aminobutyryyli-L-proliiniamidi

2,13 g (9 mmoolia) H-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää lietetään 30 millilitraan DMFA:ta ja jäädyttäen jäällä ja sekoittaen lisätään 1,26 ml (9 mmoolia) trietyyliamiinia ja 3,95 g (9,2 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä. Viiden minuutin kuluttua lisätään vielä 1,26 ml (9 mmoolia) trietyyliamiinia ja 20 minuutin sekoittamisen jälkeen haihdutetaan reaktioseos kuiviin tyhjiössä. Kiteistä jäännöstä hierretään 20 ml kanssa etanolia, sitä pidetään yön ylitse jääkaapissa ja suodataan sitten. Tällä tavalla saadaan 3,30 g Z-Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (82 % teor.); sp. 175-176°C;  $R_f^{(3)} = 0,28$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -99,6^\circ$  ( $c = 1$ , etikkahapossa).

Vaihe 4:L-pyroglutamyyli-L- $\alpha$ -aminobutyryyli-L-proliiniamidi

2,67 g (6 mmoolia) Z-Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 100 millilitraan etikkahapossa, liuokseen lisätään 0,5 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiili katalyyttiä ja vetykaasua johdetaan tunnin ajan seoksen lävitse. Katalyytin poistamisen jälkeen suodattamalla haihdutetaan suodos kuiviin ja jäännöstä hierretään eetterin kanssa. Tällä tavalla saatu amorfinen raaka tuote (1,82 g) liuotetaan veteen, liuos selkeytetään aktiivihiilellä ja vesikirkas liuos lyofiloidaan. Saadaan 1,70 g Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (91 % teor.);  
 $R_f^{(4)} = 0,24$ ;  $[\alpha]_D^{25} = 102,5^\circ$  (c = 1 etikkahapossa).

Esimerkki 7L-pyroglutamyyli-L-treonyyli-L-proliiniamidiVaihe 1:O-bentsyyli-L-treonyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

1,43 g (12,5 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 2,98 g (6,27 mmoolia) BOC-Thr(Rzl)-OPFP:tä liuotetaan 20 millilitraan DMFA:ta ja 5 minutin seisomisen jälkeen haihdutetaan liuos kuiviin tyhjiössä. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 30 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa, sitten kolme kertaa kulloinkin 10 ml kanssa natriumvetykarbonaattiliuosta, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Haihdutusjäännöksenä saatu öljy liuotetaan 4 millilitraan etyyliasetaattia ja lisätään 5 ml 5N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa. Tunnin seisomisen jälkeen laimennetaan reaktioseos eetterillä, muodostunut sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 2,05 g H-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää (95 % teor.);  
 $R_f^{(4)} = 0,40$ .

Vaihe 2:Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L-O-bentsyyli-treonyyli-L-proliiniamidi

2,05 g (6 mmoolia) H-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää ja 2,69 g (6,27 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä liuotetaan 20 millilitraan DMFA:ta, liuokseen lisätään tipoittain 0,84 ml (6 mmoolia) trietyyliamiinia ja 5 minuutin kuluttua vielä 0,84 ml (6 mmoolia) trietyyliamiinia.

Reaktioseos haihdutetaan 20 minuutin sekoittamisen jälkeen kuiviin tyhjiöissä, jäännös liuotetaan 50 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N suolahappoa ja kolme kertaa kulloinkin 10 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattiliuosta, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatua öljyä käsitellään eetterillä ja jäähdytetään, jolloin tuote jähmettyy amorfisena. Tällä tavalla saatua raaka tuote (2,76 g) liuotetaan etyyliasetaattiin ja selkeytetään aktiivihiiilen avulla. Suodatuksen jälkeen haihdutetaan suodos kuiviin ja kiinteää, amorfista, vaahtoavaa jäännöstä hierretään eetterin kanssa. Saadaan 2,47 g Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (75 % teor.).

Vaihe 3:

L-pyroglutamyyli-L-treonyyli-L-proliiniamidi

2,04 g (3,7 mmoolia) Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 40 millilitraan etikkahappoa, liuokseen lisätään 0,4 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiiili-katalyyttiä ja vetykaasua johdetaan seoksen lävitse 4 tunnin ajan. Katalyytin poistamisen jälkeen suodattamalla haihdutetaan suodos kuiviin ja jäännöstä hierretään eetterin kanssa. Tällä tavalla saatua amorfinen raaka tuote (1,31 g) pannaan 30 g piigeeliä (osaskoko 0,063-0,2 mm) sisältävään pylväseen ja eluoidaan liuotinaineseoksella (3). Puhdasta tuotetta sisältävät eluaattijakeet yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin ja jäännöksenä saatua raakaa tuotetta käsitellään eetterillä. Saadaan 0,72 g Glp-Thr-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (59,5 % teor.);  $R_f^{(4)} = 0,16$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -90,0^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Aminohappoanalyysi: Glu 1,00 (1,0), Thr 0,99 (1,0), Pro 1,03 (1,0).

Esimerkki 8

L-proglutamyyli-D-leusyyli-L-proliiniamidi

Vaihe 1:

Tert.-butyylioksikarbonyyli-D-leusiini-pentafluorifenyyli-esteri

4,62 g (20 mmoolia) BOC-D-Leu-OH:ta ja 4,23 g (22 mmoolia) PFPOH:ta liuotetaan 50 millilitraan etyyliasetaattia ja liuokseen lisätään jäähdyttään jäillä ja sekoittaen 4,12 g (20 mmoolia) DCC:tä. Reaktioseosta sekoitetaan tunti jäähauteessa, sitten saostunut di-

sykloheksyylivirtsa-aine poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy sijoitetaan jääkaappiin yhdeksi tunniksi ja tällöin erottunut disykloheksyylivirtsa-aine poistetaan jälleen suodattamalla. Suodosta ravistellaan viisi kertaa kulloinkin 50 ml kanssa 1N natriumvetykarbonaattia ja kaksi kertaa kulloinkin 50 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy kiteytyy yön aikana. Tällä tavalla saadaan 7,0 g BOC-D-Leu-OPFP:tä (88 % teor.); sp. 53-55°C;  $[\alpha]_D^{25} = +31,7^\circ$  (c = 1, etyyliasetaatissa).

Analyysi kaavalla  $C_{17}H_{20}O_4NF_5$  (molekyylipaino 397,35):

laskettu: C 51,39 %, H 5,07 %, N 3,53 %, F 23,91 %;

havaittu: C 51,51 %, H 4,68 %, N 3,66 %, F 23,65 %.

#### Vaihe 2:

##### D-leusyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

3,42 g (30 mmoolia) H-Pro-NH<sub>2</sub>:ta ja 60,0 g (15 mmoolia) BOC-D-Leu-OPFP:tä liuotetaan 60 millilitraan DMFA:ta ja liuos haihdutetaan viiden minuutin kuluttua kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 100 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kaksi kertaa kulloinkin 20 ml kanssa 1N suolahappoliuosta, kolme kertaa kulloinkin 20 ml kanssa natriumvetykarbonaattia ja lopuksi 20 ml kanssa vettä kerran, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy liuotetaan 10 millilitraan etyyliasetaattia, liuokseen lisätään 15 ml 4N suolahappoliuosta etyyliasetaatissa tunnin kuluttua laimennetaan reaktioseos eetterillä, sakka erotetaan suodattamalla ja kuivataan tyhjiössä vedettömän natriumhydroksidin yläpuolella. Tällä tavalla saadaan 3,66 g H-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää (92,5 % BOC-D-Leu-OPFP:n mukaan lasketusta teoreettisesta saannosta);  $R_f^{(4)} = 0,26$ .

#### Vaihe 3:

##### Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyli-D-leusyyli-L-proliiniamidi

3,66 g (13,9 mmoolia) H-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>.HCl:ää ja 6,43 g (15 mmoolia) Z-Glp-OPFP:tä liuotetaan 50 millilitraan DMFA:ta ja liuokseen lisätään jäähdyttäen jäällä ja sekoittaen 1,95 ml (13,9 mmoolia) trietyyliamiinia. Seosta sekoitetaan 5 minuuttia ja sitten lisätään vielä 1,95 ml (13,9 mmoolia) trietyyliamiinia;

20 minuutin sekoittamisen jälkeen haihdutetaan reaktioseos kuiviin tyhjiössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 120 millilitraan kloroformia, liuosta ravistellaan kolme kertaa kulloinkin 30 ml kanssa 1N suolahappoliuosta, myös kolme kertaa kulloinkin 30 ml kanssa natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi kerran 30 ml kanssa vettä, kuivataan vedettömän natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy kiteytetään käsittelemällä eetterillä. Tällä tavalla saatu raaka tuote (6 g) kiteytetään uudestaan 30 millilitrasta etanolia. Saadaan 5,48 g Z-Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (77 % teor.) sp. 189-194°C;  $R_f^{(3)} = 0,38$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -33,2^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

Vaihe 4:

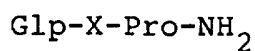
L-pyroglutamyyli-D-leusyyli-L-proliiniamidi

3,78 g (8 mmoolia) Z-Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta liuotetaan 150 millilitraan metanolia liuokseen lisätään 0,8 g 10-prosenttista palladium/aktiivihiilikatalyyttiä ja vetykaasua johdetaan tunnin ajan seoksen lävitse. Katalyytin poistamisen jälkeen suodattamalla haihdutetaan suodos kuiviin ja jäännöstä hierretään eetterillä. Tällä tavalla saatu raaka tuote (2,5 g) liuotetaan veteen, selkeytetään aktiivihiilellä ja vesikirkas liuos lyofiloidaan. Saadaan 2,35 g Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>:ta (87 % teor.);  $R_f^{(4)} = 0,48$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -83,3^\circ$  (c = 1, etikkahapossa).

## Patenttivaatimus

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten yleisen kaavan

I



(I)

mukaisten tripeptidiamidien valmistamiseksi, jossa kaavassa

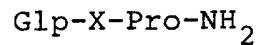
X on L-valyyli-, L-prolyyli-, D-leusyyli-, L-isoleusyyli-, L-treonyyli-, L-norvalyyli-, L-norleusyyli- tai L-2-aminobutyryyli-ryhmä,

Glp on L-pyroglutamyyli-ryhmä ja Pro tarkoittaa L-prolyyli-ryhmää, t u n n e t t u siittä, että yleisen kaavan I mukaiset tripeptidit rakennetaan vastaavista aminohapoista tai aminohappojohdannaisista sinänsä tunnettujen peptidikemiallisten menetelmien mukaan, edullisesti siten, että yleisen kaavan  $\text{Pro-NH}_2$  mukainen aminohappoamidi, N-asyloidaan mahdollisesti suojatun L-aminohappotähteen X kanssa tavanomaisten peptidikemiallisten menetelmien mukaan ja saatu dipeptidi N-asyloidaan L-pyroglutamyylihapon tai sen suojatun ja/tai aktivoidun johdannaisen kanssa ja käytetyt suojaryhmät poistetaan.



## Patentkrav

Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara tripeptidamider med den allmänna formeln I



(I)

i vilken formel

X är en L-valyl-, L-prolyl-, D-leucyl-, L-isoleucyl-, L-treonyl-, L-norvalyl-, L-norleucyl- eller L-2-aminobutyrylgrupp,

Glp är en L-pyroglutamylgrupp och Pro betecknar en L-prolylgrupp, k ä n n e t e c k n a t därav, att man uppbygger tripeptider med den allmänna formeln I ur motsvarande aminosyror eller aminosyraderivat enligt i och för sig kända peptidkemiska metoder, företrädesvis så att man N-acylerar en aminosyraamid med den allmänna formeln  $\text{Pro-NH}_2$ , med en eventuellt skyddad L-aminosyrarest X enligt sedvanliga peptidkemiska metoder och N-acylerar den erhållna dipeptiden med L-pyroglutamylsyra eller med ett skyddat och/eller aktiverat derivat därav och avlägsnar de använda skyddsgrupperna.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Chemical Abstracts, vol. 89 (1978), 110349r, Chem. Ztg. 1978, vol. 102, nro 3, p. 109-111(saksankiel.),  
Chemical Abstracts, vol. 86 (1977), 55668m, Acta Pol. Pharm. 1976, vol. 33, nro 1, p. 81-86 (puolankiel.),  
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 84, 1978, p. 1079-1102,  
Acta Pharm. Suec., vol. 10, 1973, p. 297-308,  
J. Med. Chem. vol. 14, 1971, p. 484-487.