

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3613**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 7/06**
A61K 37/02

(21) Paraiškos numeris: **IP606**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 12 27**

(31,32,33) Prioritetas: **9211677, 1992 06 02, GB**

(72) Išradėjas:

Kjell Undheim, NO
Magne Solbakken, NO
Erik Agner, NO
Mette Lene Falck-Pedersen, NO

(73) Patento savininkas:

HAFSLUND NYCOMED AS, Slemdalsveien 37, N-0301 Oslo 3, NO

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Peptidiniai junginiai, jų gavimo būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Atskleisti dipeptidiniai junginiai, kuriuose dvi peptidinės grandinės yra prijungtos kartu prie neterminalinės aminorūgšties C α -atomo divalente jungiančia tilteliu grupė -A-. C α -atomai, prijungti prie grupės -A-, yra išdėstyti ekvivalentiškose vietose kiekvienoje peptidinėje grandinėje ir kiekvienas neturi savo nuosavos α -šoninės grandinės. Atskleisti tilteliniai dipeptidiniai junginiai turi stimuliuojantį poveikį ląstelės dalijimuisi, ypač mielopoezės ir kaulų čiulpų ląstelėms.

Šis išradimas yra apie ląstelių proliferaciją skatinančių peptidų panaudojimą ir naujus peptidus, pasižyminčius specifiniu ir/ar bendru ląsteles stimuliuojančiu poveikiu.

5

Žinduolių kūnas sudarytas iš ląstelių, itin stipriai besiskiriančių struktūra ir funkcijomis, todėl, ląstelių diferenciacijos ir vystymosi mechanizmai buvo daugelio tyrinėjimų objektu. Žinoma, kad nuolat atsinaujinančių ląstelių sistemoje paprastai būna rezervuaras daugiavaisių (pliuripotentinių) kamieninių ląstelių, kurios dalijasi ir pastoviai teikia sistemai naujas ląsteles. Nors pateiktos iš "rezervuaro" kamieninės ląstelės pradžioje yra vienodos, tačiau netrukus jos patiria vienokią ar kitokią morfologinį pakitimą ir vėliau išsivysto į ląsteles, atliekančias reikiamą funkciją.

15

Minėtų kamieninių ląstelių sistemų pavyzdžiais yra kraujodaros sistema kaulų čiulpuose bei epitelio ir epidermio sistemos.

20

Kamieninių ląstelių dalijimosi valdymas ar reguliavimas yra labai perspektyvi terapijos sritis, todėl daugelio tyrimų tikslas tebėra mechanizmų išaiškinimas ir specifinių cheminių mediatorių suradimas. Iki šiol buvo nustatytos kelios tikrai dalyvaujančios ląstelių gamyboje ir diferenciacijoje molekulės, kurios skatina arba slopina tam tikrą proceso grandį. Tuo požiūriu itin gerai ištirta mielopoezė, nustatytos joje dalyvaujančios molekulės: kolonijas stimuliuojantis faktorius (KSF), kaip antai, granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-KSF), makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (M-KSF), granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-KSF), įvairiakilmes kolonijas stimuliuojantis faktorius (multi-KSF; IL-3) [žiūr. Metcalf, Science 229: 16 (1985)],

25

30

35

interleukinas 11 (IL-11) [žiūr. Paul et al, Proc, Natl. Acad. Sci., USA, 87: 7521 (1990)], Laktoferinas [žiūr, Broxmeyer et. al, Blood Cells, 11: 429 (1989)] prostaglandinai [žiūr, Pelus et al, J. Immunol. 140: 479 (1988)], rūgštinis (H-subvienetas) feritinas [žiūr, Broxmeyer et al, Blood 68: 1257 (1986)], interferonai (α , β ir γ) [žiūr. Pelus et al aukščiau, ir Broxmeyer et al, J. Immunol., 131: 1300 (1983)], auglio nekrozės faktoriai (α ir β) [žiūr. Broxmeyer et al, J. Immunol. 136: 4487 (1986)], transformuojantis augimą faktorius - β [žiūr. Ottman et al, J. Immunol., 140: 2661 (1988)], ir aktivinas bei inhibinas [žiūr. Broxmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 779 (1989)].

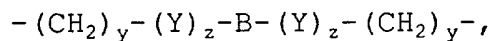
15 Taip pat buvo rasta, kad hemoreguliacinis pentapeptidas (pEEDCK) selektyviai inhibuoja mielopoezės ląstelių proliferaciją (žiūr. Paukovits et al, Z. Naturforsch 37: 1297 (1982)], ir buvo atskleisti kiti peptidai, atitinkantys siaurą bendrą formulę, duodantys panašų
20 inhibicinį poveikį hemopoezėje [žiūr. EP-A-112656 ir W090/027531. Peptido monomerų oksidacija davė dimerines molekules, sujungtas cisteino tilteliu, ir buvo rasta, kad tos bimerinės molekulės stimuliuoja mielopoezę [žiūr. Laerum et al, Exp Hematol., 16: 274 (1988)].
25 (pEEDCK)₂ dimeras ir kiti panašūs junginiai yra atskleisti WO-A-88/03535. Kiti dimeriniai peptidų junginiai yra atskleisti EP-A-408371, kuriame disulfidinė jungtis buvo pakeista anglimi arba anglies/sieros tilteliu, jungiančiu parinktas peptidines grandines.
30 Tiltelis tuo būdu yra santykinai atsparus hidrolizei, bet pats yra inertinis ir negali dalyvauti receptoriaus- dimero sąveikose.

Nors mes nenorime būti surišti teorinių svarstymų, bet
35 dabar tikimasi, kad tokie peptidiniai junginiai sąveikauja su stromos ląstelėmis in vivo ir kad stromos ląstelės atsakingos už ląstelinio dalijimosi stimu-

liavimą arba inhibiciją per kitus išaiškinamus faktorius. Tuo būdu tikimasi, kad dimerai indukuoja arba pagreitina stimuliuojančių ląstelinių reguliuojančių faktorių stromatinę gamybą, tuo tarpu kai monomeriniai peptidai gali arba inhibuoti šį procesą, arba sukelti faktorių, kurie užkerta kelią ar trukdo ląstelės dalijimuisi, gamybą. Tuo būdu, pagal tokią galvosena stromos ląstelės gali sustiprinti dimerinių ir monomerinių peptidų atitinkamai stimuliacinį arba inhibicinį poveikį.

Yra nuolatinis dimerinių peptidinių junginių, galinčių stimuliuoti ląstelės proliferaciją iki įprasto lygio in vivo, poreikis. Šiuo atžvilgiu reikėtų pastebėti, kad skirtingi stimuliavimo laipsniai gali būti labiau tinkami tam tikroms klinikinėms situacijoms negu kitoms, ir ypač yra svarbus individualių ląstelių tipų selektyvus stimuliavimas.

Šis išradimas pateikia peptidinius junginius, sudarytus iš dviejų vienos grandinės hemoreguliacinių, pvz., hemopoezę, inhibuojančių peptidų, sujungtų kartu tilteline grupe, kurios galai prijungti prie ne-galinių aminorūgščių α atomų esančių ekvivalentiškose vietose kiekviename minėtame peptide, kai peptide nėra nuosavos α -šoninės grandinės, minėtai tiltelinei grupei esant divalente grupe -A-, kai A yra



(kurioje

kiekvienas y yra nepriklausomai 0, 1 arba 2;

kiekvienas z yra nepriklausomai 0 arba 1;

kiekvienas Y yra nepriklausomai 0, S, arba NR,

kur R reiškia vandenilį arba C-prijungtą organinę grupę (pvz., alkilą, aralkilą arba arilo grupę);

5 B reiškia karboksilinią arba heterociklinį žiedą (pvz., 5-ių arba 6-ių narių aromatiniį žiedą), pasirinktinai turinti vieną arba du heteroatomus (pvz., deguonies, azoto arba sieros), ir pasirinktinai mono-, di- arba tri-pakeistus $-OR^A$, $-NR^A R^A$, $-COOR^A$ grupę arba halogeno atomu, tokiu kaip jodo, chloro, fluoro arba bromo atomas; ir kiekvienas R^A nepriklausomai reiškia vandenilio atomą arba alkilo, alkanolio arba alkoksialkilo grupes, iš kurių kiekviena taip pat gali būti hidrosilinta).

15 Kur grupė B yra di- arba tri-pakeista bet kuria iš aukščiau paminėtų grupių, kiekvienas pakaitalas neturi būti identiškasis kitiems arba to paties tipo.

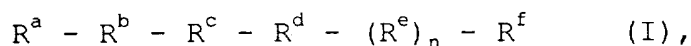
20 Kur grupė R yra C-prijungta organinė grupė, geriau, kai turi nuo 1 iki 10 atomų, ypač nuo 1 iki 6 anglies atomų. Alkilo grupės gali būti tiesių grandinių arba šakotos ir gali būti pakeistos arilo grupėmis, turinčiomis 6-10 anglies atomų (t.y. sudarančiomis aralkilo grupę), alkoksilo, hidrosilo, aciloksi, amino, acilamino arba karboksilo grupėmis. Arilo grupės apima 25 5-ių arba 6-ių narių heterociklines arilo grupes, turinčias vieną arba daugiau heteroatomų, parinktų iš O, N arba S, tokias kaip furilo, imidazolilo, pirolilo, piridinilo ir tienilo grupes. Pakaitalai, kurie gali būti prie arilo grupių, apima C_{1-6} alkilo grupes, 30 hidrosilo ir karboksilo grupes. Pavyzdžiai apima metilo, etilo, propilo, t-butilo, pentilo, karboksietilo ir benzilo grupes.

35 Geriau, kai R^A turi nuo 1 iki 6 anglies atomų, ypač nuo 1 iki 4 anglies atomų, kur tai reiškia alkilo, alkanolio arba alkoksialkilo grupę.

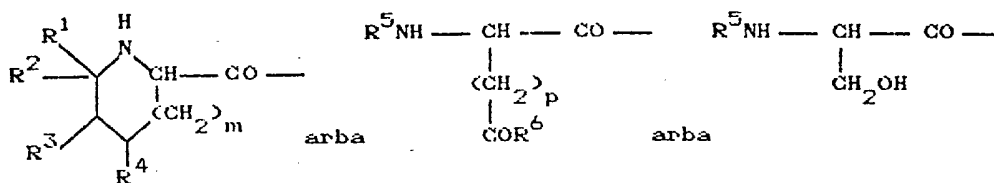
Viename tinkamesniame įgyvendinime divalentė jungianti tilteliu grupė -A- yra -CH₂ CH₂ Bz CH₂ CH₂-, kurioje Bz reiškia benzeno žiedą, kuris pasirinktinai yra mono-, di- arba tri-pakeistas grupe -OR^A, NR^AR^A, -COOR^A arba halogeno atomu, tokiu kaip jodo, chloro, fluoro ar bromo atomas, ir R^A yra toks, kaip apibrėžta aukščiau.

Bet kuris vienos grandinės peptidas, kuris rodo hemo-reguliacinį poveikį, yra tinkamas kaip peptidas, kuris yra tiltelinis pagal šį išradimą.

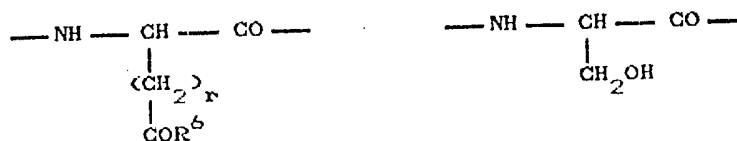
Apibūdinus alternatyviai, šis išradimas pateikia junginius pagal šį išradimą, kuriuose minėtos hemo-reguliacinės peptidinės grandinės apima šias formules:



kurioje R^a reiškia

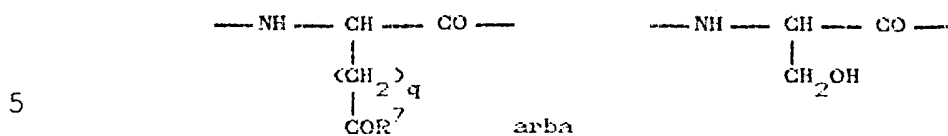


R^b reiškia

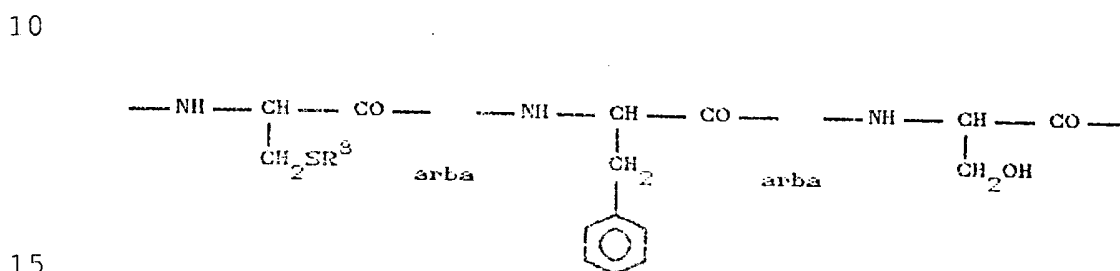


arba

R^c reiškia



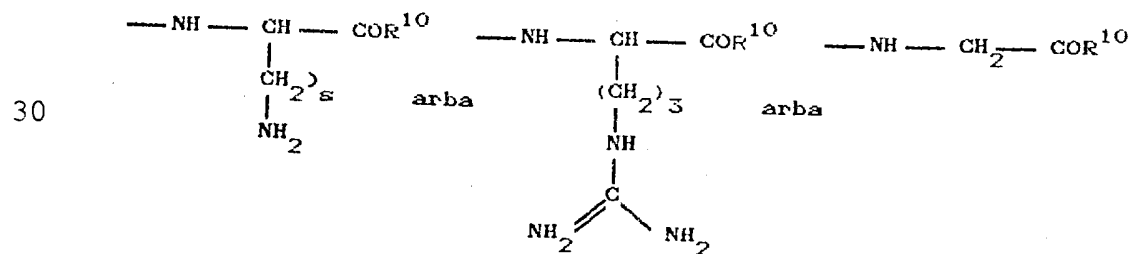
R^d reiškia



R^e reiškia



R^f reiškia



35 (kuriose

n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

p, q ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2;

s reiškia 3 arba 4;

5 R^1 ir R^2 abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia okso grupę;

R^3 ir R^4 abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia jungtį anglis-anglis;

10 R^5 yra vandenilis arba acilo grupė;

kiekvienas R^6 ir R^7 nepriklausomai reiškia hidroksilo grupę arba aminogrupę, bet tinkamesnės yra hidroksilo grupės;

15

R^8 reiškia vandenilį, C_{2-6} alkilo grupę, C_{7-20} aralkilo grupę, kuri gali turėti vieną arba daugiau hidroksilo, amino arba metoksilo pakaitalų, arba metaboliškai labiliaią S-apsauginę grupę;

20

R^9 reiškia vandenilį arba metilo grupę; ir

25 R^{10} reiškia hidroksilo arba aminogrupę, aminorūgšties gliutamino liekaną arba peptidą, turintį N-galutinį glutamino vieneta).

Visos minėtos aminorūgšties liekanos gali būti arba D, arba L formos. Tačiau aminorūgščių L forma yra tinkamesnė.

30

35 Kur yra N-galutinė apsauginė grupė R^5 , tai gali būti, kaip pažymėta aukščiau, acilo grupė, turinti 1-20 anglies atomų, pvz., žemesnio alkanoilo grupė, turinti 1-5 anglies atomų, tokia kaip acetilo grupė, arba aroilo ar aralkanoilo grupė, turinti nuo 7 iki 20 anglies atomų, tokia kaip benzoilo fenilacetilo grupė.

5 R^5 gali taip pat būti acilo grupė, išvesta iš amino rūgšties arba peptido grandinės. Konkrečiai, R^5 gali būti acilo grupė, išvesta iš serino, arba iš bet kurio iš peptidų, išvestų iš tokios amino rūgšties sekos, pašalinant einančias iš eilės N-galutinės amino rūgštis:

Lys-Ile-Ile-His-Glu-Asp-Gly-Tyr-Ser.

10 Yra geriau, kai bendro (I) formulės peptido galinė grupė yra apsaugota, pvz., acilinant su alkanolio, aralkanoolio arba arolio grupe.

15 Kur R^8 yra C_{2-6} alkilo grupė, tai ji gali būti, pvz., etilo, butilo arba heksilo grupė. Kai R^8 yra aralkilo grupė, tai ji gali patogiai būti arilmetilo grupė, tokia kaip benzilas, difenilmetilas arba trifenilmetilas. Kur R^8 yra metaboliškai labili grupė, tai ji gali, pvz., būti ariltio grupė, turinti nuo 5 iki 10 anglies atomų, pvz., piridiltio grupė arba acilo grupė kaip apibrėžta aukščiau.

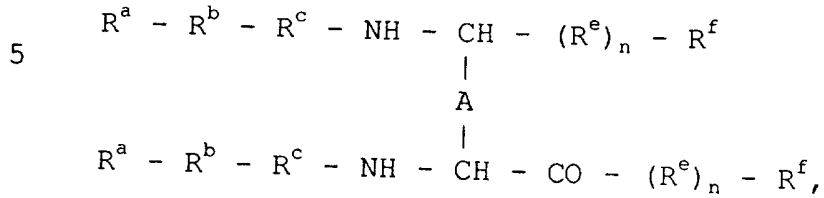
25 Tinkamesni šio išradimo junginiai yra pentapeptidai kiekvienoje grandinėje, t.y. n yra geriau 0.

Geriau, kai ciklinės grupės R^a liekanoje yra penkių narių, t.y. m yra geriau 0.

30 Nors bet kuris iš peptidų, apibrėžtų (I) formule aukščiau, yra žemo arba nežymaus hemoreguliacinio aktyvumo, nepaisant to, jie gali būti efektyvūs būdami tiltelio formos pagal šį išradimą, stimuliuojant ląstelių proliferaciją.

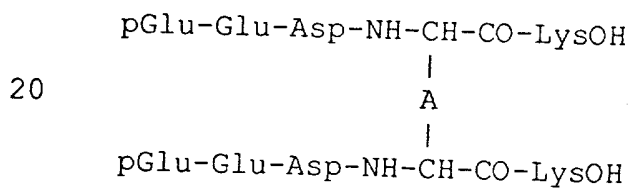
35 Dimeriniuose peptiduose, sudarytuose iš peptidinių grandinių, kaip pavaizduota (I) formulėje, jungiantis grandinės taškas yra pageidaujamas prie R^d .

Ypač tinkami peptidiniai junginiai pagal šį išradimą yra ir II formulės junginiai



10 kuriuose R^a , R^b , R^c , R^e , R^f , A ir n visi yra tokie, kaip apibrėžta aukščiau, ir grupė -NH-CH-CO- yra R^d išvestinė forma, kuri yra prijungta prie tiltelinės grupės -A- tokiu būdu, kad jos nuosavos šoninės grandinės nėra.

15 Vienas ypač tinkamas peptidas II formulės junginys yra



25 kur grupė -A- yra divalentė jungianti grupė, kaip svarstyta aukščiau.

30 Šis išradimas ypatingai tinkamas stimuliuoti mielopoezę pacientams, kurie kenčia nuo sumažinto mielopoetinio aktyvumo, įskaitant kaulų čiulpu pažeidimą, agranulocitozę ir aplastinę anemiją. Į tai įeina gydymas pacientų, turinčių sumažintą kaulų čiulpu funkciją, imunosupresiniam gydymui, slopinti audinių reakcija, t.y. kaulų čiulpu transplantavimo chirurgijoje.

35 Junginiai taip pat gali būti panaudoti pagreitinti kaulų čiulpu regeneraciją po citostatinės chemoterapijos ir radiacinės terapijos neoplastinėms ir virusinėms ligoms.

Be to, nauji junginiai gali būti labai vertingi, kur pacientai turi rimtas infekcijas dėl imunoreakcijos trūkumo po kaulų čiulpų pažeidimo.

5 Kitas klinikinis taikymas bus kartu su atitinkamais monomerais arba susijusiais mielopoezės inhibitoriais, kaip atskleista EP-A-112656 arba WO-A-90/02753, indukuoti kintamas aukšto ir žemo aktyvumo pikus kaulų čiulpų ląstelėse, tuo būdu sustiprinant natūralų cirkadinių hemopoezės ritmą. Taip citostatinė terapija gali būti panaudota žemo kaulų čiulpų aktyvumo periodais, tuo būdu sumažinant kaulų čiulpų pažeidimo riziką, tuo tarpu kai regeneracija bus pagreitinta iš eilės einančiais aktyvumo pikais.

15

Apskritai, kad būtų pasiektas stimuliacinis poveikis, šio išradimo peptidai gali būti paskirti pacientui oraliai arba injekcijomis 0.001-100 mg, pvz., 1-5 mg 70 kg kūno svoriui, dienos doze. Jei paskyrimas intraveninis arba poodinis, dozė gali būti 1-10 mg ribose 70 kg kūno svoriui per dieną. pvz., apie 6 mg, iki 10 dienų. Nazalinis, vietinis (transdermalinis) arba rektalinis paskyrimas taip pat yra, žinoma, lankstus. Iš esmės reikalaujama pagaminti peptido koncentracijas apie $10^{-13}M$ - $10^{-15}M$ neląsteliniame paciento skystyje.

25

Pagal tolimesnius šio išradimo požymius, pateikiamos farmacinės kompozicijos, turinčios savyje kaip aktyvią komponentę vieną arba daugiau pagal šį išradimą, ypač (I) formulės junginių arba fiziologiškai suderinamų jų druskų, kartu su farmaciniu nešikliu arba užpildu. Kompozicijos pagal šį išradimą gali būti, pvz., tokio pavidalo, kad tiktų oraliniam, nazaliniam, parenteraliniam arba rektaliniam paskyrimui.

35

Čia naudojamas terminas "farmacinis" apima ir veterinarinius šio išradimo taikymus.

Junĝiniai pagal šią išradimą gali būti įprastų vaistų formų, tokių kaip tabletės, apvilktos tabletės, aerozoliai nosiai, tirpalai, emulsijos, milteliai, kapsulės arba ilgalaikio atpalaidavimo formos. Įprasti farmaciniai užpildai, kaip ir įprasti gamybos būdai, gali būti panaudoti šių formų paruošimui. Tabletės gali būti pagamintos, pvz., sumaišant aktyvią komponentę arba žinomais užpildais, kaip pvz., skiedikliais, tokiais kaip kalcio karbonatas, kalcio fosfatas arba laktozė, skaidytojais, tokiais kaip grūdų krakmolai arba algininė rūgštis, rišikliais, tokiais kaip krakmolai arba želatinas, tepalais, tokiais kaip magnio stearatas arba talko milteliai, ir/arba ilgalaikio atpalaidavimo agentais, tokiais kaip karboksipolimetilenas, karboksime-tilceliuliozė, celiulozės acetato ftalatas arba polivinilacetatas.

Tabletės, jeigu reikia, gali susidėti iš kelių sluoksnių. Apvilktos tabletės gali būti pagamintos, apvelkant vidurį, gautą panašiai kaip tabletės, su agentais, paprastai naudojamais tablečių apvilkimui, pvz., polivinilo pirolidonu arba šelaku, gumiarabiku, talku, titano dioksidu arba cukrumi. Tam, kad būtų gautas ilgalaikis atpalaidavimas arba išvengta nesuderinamųjų, vidurys gali susidėti iš kelių sluoksnių taip pat. Tablečių apvalkalas taip pat gali susidėti iš kelių sluoksnių, kad būtų gautas ilgalaikis atpalaidavimas, ir tuo atveju gali būti panaudoti anksčiau paminėti užpildai tabletėms.

Organinės specifinės nešiklių sistemos taip pat gali būti panaudotos.

Injekcijų tirpalai gali būti, pvz., pagaminti įprastu būdu, tokiu kaip konservavimo agentų, tokių kaip p-hidroksibenzoatai, arba stabilizatorių, tokių kaip

EDTA, pridėjimas. Tirpalais paskui užpildomi injekcijų buteliukai arba ampulės.

5 Nazaliniai aerosoliai gali būti sudaryti panašiai vandens tirpale ir supakuoti į purškimo konteinerius arba su aerosoliniu išstūmėju, arba su priemonėmis rankiniam spaudimui. Kapsulės, turinčios vieną arba kelias aktyvias komponentes, gali būti pagamintos, pvz., sumaišant aktyvias komponentes su inertiniais nešikliais, 10 tokiais kaip laktozė arba sorbitalis, ir užpildant mišinį į želatino kapsules.

Tinkamos žvakutės gali, pvz., būti pagamintos, sumaišant aktyvią komponentę arba aktyvių komponentių 15 kombinacijas su įprastais nešikliais, numatytais šiam tikslui, tokiais kaip natūralūs riebalai arba polietileno glikolis arba jo dariniai.

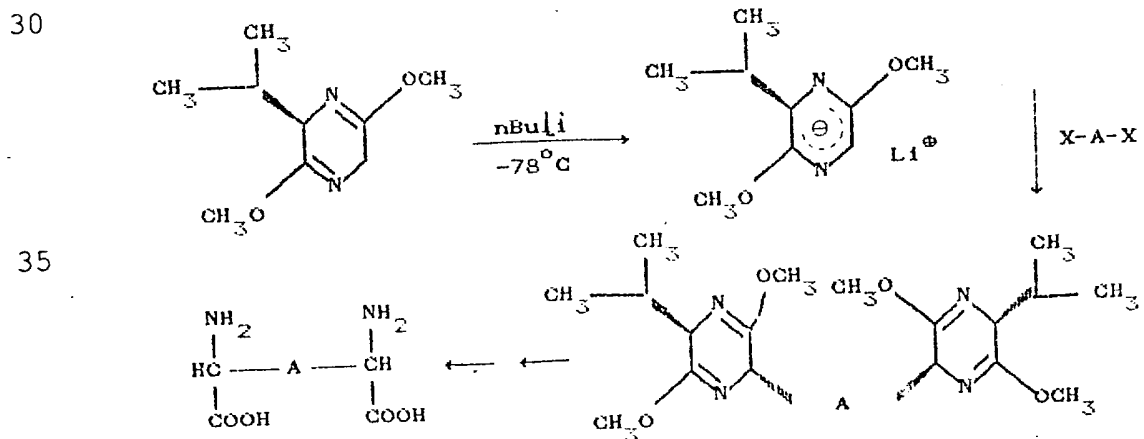
Tinkami dozavimo vienetai, turintys savyje šio išradimo 20 junginių, turi 0,1-10 mg, pvz., 1-5 mg (I) formulės peptido arba jo druskos.

Tačiau kitas svarbesnis naujų peptidų panaudojimas yra 25 medžiagų, skirtų imunologinių tyrimų technikos gamyboje. Tada peptidas gali būti kovalentiškai prijungtas prie tinkamo didelio molekulinio nešiklio, tokio kaip albuminas, polilizinas arba poliprolinas tam, kad būtų įvestas antikūnus gaminantiems gyvuliams (pvz., triušiams, jūros kiaulytėms arba ožkoms). Imunizacijos me- 30 todai taip pat gali būti panaudoti in vitro. Labai specifiškai antiserumai yra gaunami, naudojant gerai žinomus absorbcijos metodus, panaudojant didelį molekulinį nešiklį. Įvedant radioaktyvumą (^3H , ^{125}I , ^{14}C , ^{35}S) į peptido molekulę, radioimuninis tyrimas gali būti 35 suprojektuotas ir panaudotas peptido nustatymui įvairiuose biologiniuose skysčiuose, tokiuose kaip serumas (plazma), šlapimas ir cerebrospinalinis skystis.

Šio išradimo peptidai gali būti sintezuoti bet kuriuo patogiu būdu. Tinkami metodai aminorūgšties vienetų sudarymui yra aprašyti, pvz., "Synthesis of Optically Active α -Amino Acids" ("Optiškai aktyvių α -Amino rūgščių sintezė"), Robert M. Williams (Pergamon Press, 1989). Apskritai, esančios reaktyvios šoninių grandinių grupės (amino, tiolo ir/arba karboksilo) bus apsaugotos per visos sintezės susijungimo reakcijas, bet galima palikti kai kurias šoninių grandinių grupes neapsaugotas (hidroksilo grupes, imidazolo grupes, pirmines amido grupes, amido grupes ciklinėse aminorūgštyse kaip piroGlu) per visą sintezės procedūrą.

Tuo būdu galutinė stadija bus visiškai apsaugoto arba iš dalies apsaugoto I bendros formulės peptido darinio deblokavimas ir šie procesai sudaro tolimesnį šio išradimo aspektą.

Schöllkopf ir kt. aprašė daugybės aminorūgščių gavimą bis-laktimo eterių metalinimu ir po to einančiu alkiliniu (žiūr., pvz., Tetrahedron 39: 2085 (1983) ir Topics Curr, CHEM., 109: 65 (1983)). Šio metodo pritaikymas pasirodė ypač naudingas tiltelinių aminorūgščių, kurios sudaro šio išradimo pagrindą, gavimui. Konkrečiai, bis-laktimo eteris, išvestas iš valino-glicino dipeptido, sudaro naudingą pradinį junginį sujungimo tilteliu reakcijoje, kuri gali būti reziumuota taip:



(kurioje X yra nueinanti grupė, tokia kaip halogeno atomas, pvz., bromas).

5 Tiltelinės (S,S)- α,α' -diaminorūgštys gali būti susintetintos šiuo metodu, jei D-valinas yra iš pradžių naudojamas sudaryti bis-laktimo eterį. Lygiai taip pat (R,R)- α,α' -diaminorūgštys gali būti sudarytos, panaudojant L-valiną.

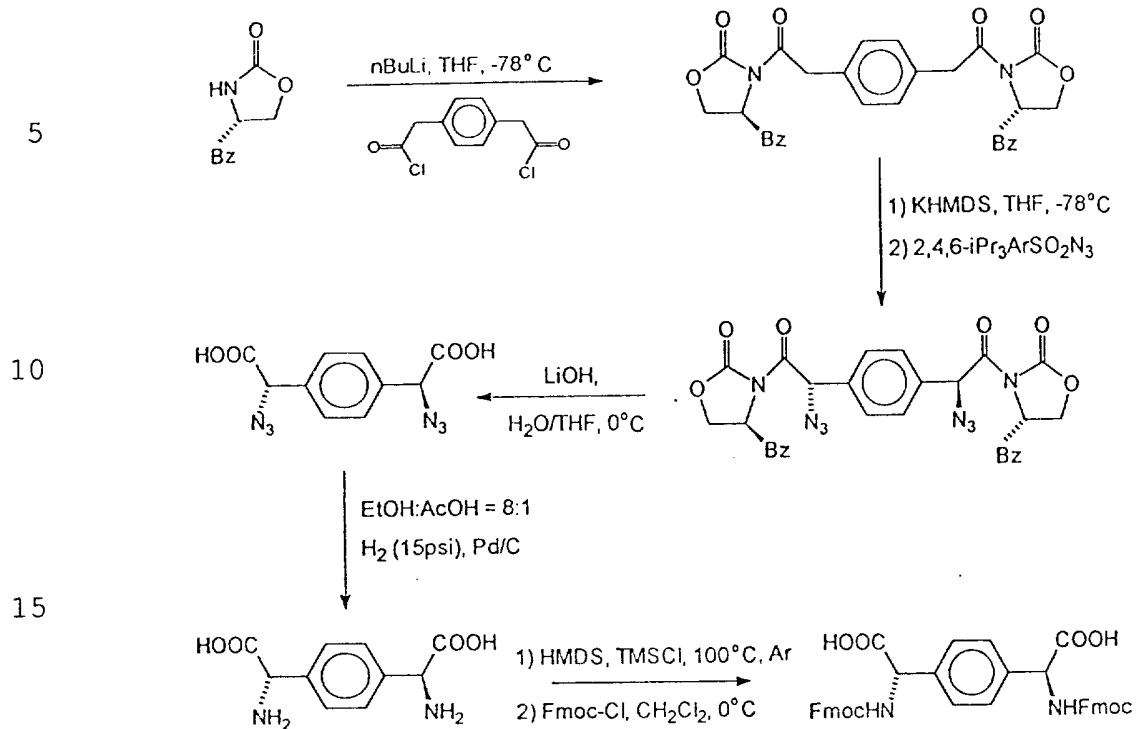
10 Mes taip pat suradome, kad arilo (įskaitant heteroarilą) diglicino dariniai gali būti gauti iš atitinkamų di-(halokarbonilmetil) arilo junginių. Pastarieji junginiai gali būti paveikti chiraliniu oksazolidonu ir sudaryti karboksimido enoliatą, kuris tada
15 yra paveikiamas azidą sudarančiu reagentu, tokiu kaip 2,4,6-triizopropil benzenosulfonilazidu, kad būtų įvestos azido grupės, po ko atliekama hidrogenolizė, pvz., su 10% paladžio/medžio anglies, kad būtų pagamintas reikalingas diglicinas.

20

Mūsų metodas yra metodikos, aprašytos Evans et al, J. Am Chem. Soc., 109, 6881 (1987) ir J. Am. Chem. Soc., 111, 1063 (1987), pritaikymas.

25 Alternatyviai tinkamas elektrofilinis amino azotas gali būti rastas azodikarboksilato esteryje, ir šiuo atveju atitinkama dihidrazino rūgštis yra tarpinis junginys hidrogenolizei iki amino rūgšties.

Ši metodika yra iliustruojama reakcijos schema, duodama žemiau:



20 Tuo būdu, šis išradimas taip pat pateikia peptidinio junginio gavimo būdą, susidedantį iš dalinai arba visiškai apsaugoto jo darinio deblokavimo.

Taip pat šis išradimas pateikia peptidinio junginio gavimo būdą, kuris susideda iš:

25

a) bis-laktimo eterio metalinimo ir po to einančio alkilavimo, kad būtų sudarytas bis-laktimo dipeptido eteris;

30

b) stadijos a) bis-laktimo dipeptido eterio hidrolizės, kad būtų sudaryta tiltelinė α, α' -diamino rūgštis;

c) pasiliekančių amino rūgščių įvedimo į peptido grandines;

35

d) bet kurios apsauginės grupės deblokavimo.

Bis-laktimo dipeptido eteriai ir pagaminta šiuo būdu tiltelinė rūgštis- α, α' -diaminorūgštis sudaro tolimesnį šio išradimo aspektą.

5 Kai tiltelinis dipeptidas sudarytas, tada pasiliekančios amino rūgštys peptido grandinėje gali būti įvestos, panaudojant įprastus metodus.

10 Sudarant peptido grandines, iš esmės galima pradėti arba nuo C-galo, arba N-galo, nors įprasta naudoti tik C-galo pradinę procedūrą.

15 Tuo būdu galima pradėti nuo C-galo, paveikiant tinkamą apsaugotą darinį, pvz., liziną su tinkamu apsaugotu cisteino dariniu. Lizino darinys turės arba laisvą, arba aktyvuotą karboksilo grupę ir apsaugotą amino-
 20 grupę. Po sujungimo, tarpiniai produktai gali būti išvalyti, pvz., chromatografija, ir tada selektyviai N-apsauga nuskeliamą, leidžiant tolesnį N-apsaugotos ir laisvos arba aktyvuotos aminorūgšties liekanos pridėjimą. Ši procedūra tęsiama, kol sudaroma reikalinga aminorūgšties seka.

25 Karboksilo rūgščių aktyvuojantys pakaitalai, kurie gali, pvz., būti naudojami, apima simetrinius arba mišrius anhidridus arba aktyvuotus esterius, tokius kaip, pvz., p-nitrofenilo esteris, 2,4,5-trichlorfenilesteris, N-hidroksibenzotriazolo esteris, (OBt), N-hidroksi-sukcinimidilesteris (OSu) arba pentafluorofenilesteris (OPFP).

30 Laisvų amino ir karboksilo grupių sujungimas gali pvz., būti atliktas, panaudojant dicikloheksilkarbodiimidą (DCC). Kitas sujungimo agentas, kuris gali, pvz., būti panaudotas, yra N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidro-
 35 chinolinas (EEDQ).

Apskritai patogiu atlikti jungimo reakcijas žemose temperatūrose, pvz., nuo -20°C iki aplinkos temperatūros, patogiai tinkamoje tirpiklio sistemoje, pvz., tetrahidrofurane, dioksane, dimetilformamide, metileno chloride arba šių tirpiklių mišinyje.

Gali būti patogiau atlikti sintezę ant kietos fazės dervos nešiklio. Chlorometilintas polistirenas susiūtas su 1% divinilo benzeno yra vienas naudingas nešiklio tipas; tuo atveju sintezė prasidės C-gale, pvz., sujungiant N-apsaugotą liziną su nešikliu.

Visa eilė tinkamų kietos fazės metodų yra aprašyta Eric Atherton, Christopher J. Logan and Robert C. Sheppard, J. Chem. Soc. Perkin I, 538-46 (1981); James P. Tam, Foe S. Tjoeng, and R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 102, 6117-27 (1980); James P. Tam, Richard D. Dimarchi and R. B. Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 16, 412-25, (1980); Manfred Mutter and Dieter Belfof, Helvetica Chimica Acta, 67, 2009-16 (1984).

Taip pat galima jungimo reakcijas atlikti tirpale.

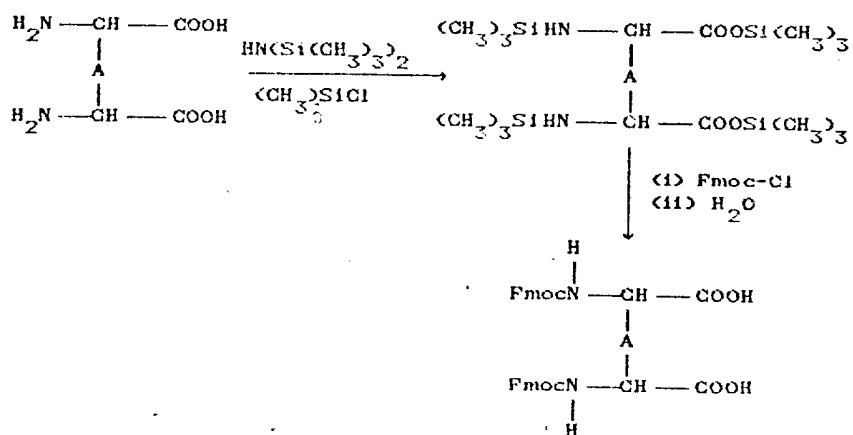
Yra žinomas platus apsauginių grupių aminorūgštims pasirinkimas ir pateikta pavyzdžių Schroder, E. and Lubke, K., The Peptides, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York and London, 1965 and 1966; Pettit, G. R., Synthetic Peptides, Vols. 1-4, Van Nostrand, Reinhold, New York 1970, 1971, 1975 and 1976; Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Synthese von Peptiden, Band 15, Georg Thieme Verlag Stuttgart, NY 1983; The Peptides, Analysis, synthesis, biology 1-7, Ed: Erhard Gross, Johannes Meienhofer, Academic Press, NY, San Francisco, London; Solid phase peptide synthesis 2nd ed., John M. Stewart, Janis D. Young, Pierce Chemical Company.

Tuo būdu. pvz., amino apsauginės grupės kurios gali būti panaudotos, apima apsaugines grupes tokias kaip karbobenzoksi (Z-), t-butoksikarbonilas (Boc-), 4-metoksi-2,3,6-trimetilbenzeno sulfonilas (Mtr-) ir 9-fluorenilmetoksikarbonilas (Fmoc-).

Bus suprantama, kad kai peptidas sudarytas nuo C-galo, amino apsauginė grupė bus ant kiekvienos naujos pridamos liekanos L-amino grupės ir ją reikės pašalinti selektyviai prieš kitą jungimo ~~stadiją~~ stadiją. Kietos fazės sistemoms viena ypač naudinga grupė tokiai laikinai amino apsaugai yra Fmoc grupė, kuri gali būti pašalinta selektyviai, paveikiant piperidinu organiniame tirpiklyje. Sintzei tirpale, Boc- yra tinkamesnė apsauginė grupė, kuri gali būti įvesta ir pašalinta įprastu būdu.

Aminorūgštys arba peptidai dažnai reikalauja silicilinimo prieš apsaugojimą, pvz., pridedant Fmoc, kad būtų pagerintas jų tirpumas organiniuose tirpikliuose. Silicilinimas ir Fmoc apsaugos reakcijos yra susumuotos žemiau:

25



30

35

5 Karboksilo apsauginės grupės, kurios gali, pvz., būti panaudotos, apima suskaldytas esterio grupes, tokias kaip benzilas (-OBZI), p-nitrobenzilas (-ONB) arba t-butilas (t-tOBu), kaip ir jungimą ant kieto nešiklio, pvz., metilo grupes, prijungtas prie polistireno.

Tiolo apsauginės grupės apima p-metoksibenzilą (Mob), tritilą (Trt) ir acetamido metilą (Acm).

10 Bus suprantama, kad egzistuoja daug kitų tokių grupių, kaip pvz., detaliam aprašymui nurodytoje literatūroje, ir visų tokių grupių panaudojimas čia aukščiau aprašytuose procesuose įeina į šio išradimo sritį.

15 Egzistuoja daug procedūrų amino- ir karboksil-apsauginių grupių pašalinimui. Tačiau tai turi būti suderinama su naudojama sintezės strategija. Šoninės grandinės apsauginės grupės turi būti atsparios sąlygoms, naudojamoms pašalinti laikinas α -amino apsaugines grupes prieš kitą jungimo stadiją.

25 Amino apsauginės grupės, tokios kaip Boc, ir karboksilo apsauginės grupės, tokios kaip tOBu, gali būti pašalintos vienu metu paveikiant rūgštimi, pvz., trifluoro acto rūgštimi. Tiolo apsauginės grupės, tokios kaip Trt, gali būti pašalintos selektyviai, panaudojant oksidavimo agentą, tokį kaip jodas.

30 Cisteino turintys peptidai gali būti sintezuoti metodais, aprašytais tekste, su visų apsauginių grupių pašalinimu, įskaitant tiolo apsaugines grupes kaip paskutinę sintezės stadiją.

35 Toliau einantys pavyzdžiai pateikiami tik kaip iliustracijos.

HOBt = Hidroksibenzotriazolas

Pfp = Pentafluorofenilas

Fmoc = 9-Fluorenilmetoksikarbonilas

Boc = t-Butoksikarbonilas

DCC = Dicikloheksilkarbodiimididas

5 (E)-DHS = (S,S)- β,β' -Diamino-1,3-dietilbenzeno- β,β' -dikar-
boksilo rūgštis

FCh = Plonasluoksnė chromatografija

HPLC = Didelio efektyvumo skysčių chromatografija

10 1 PAVYZDYS

(S,S)- α,α' -Diamino-1.3-benzendipropiono rūgštis.

15 a) α,α' -Bis(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopro-
pil-5-pirazinil)-m-ksilenas

n-Butillitis heksane (1,6 M, 9,4 ml, 15 mmol) pridėtas
i (2R)-(-)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazi-
no (2,8 g, 15 mmol) tirpalą sausame THF (5 ml), at-
šaldytą iki -78°C . Mišinys maišomas 15 minučių. Po to
20 pridėtas α,α' -dibrom-m-ksileno (2,0 g, 7,5 mmol) tirpa-
las sausame THF (5 ml). Reakcijos mišiniui leista
sušilti iki aplinkos temperatūros per naktį. Tirpiklis
išgarintas ir likutis užpiltas dietilo eteriu. Eterio
25 tirpalas buvo perplautas vandeniu, išdžiovintas (MgSO_4)
ir išgarintas. Produktas išvalytas impulsine chroma-
tografija (silikagelis, heksanas/EtOAc 3:1). Išeiga 2,8 g
(80%) - gelsvai baltos pusiau kietos medžiagos.

30 ^1H BMR (200 MHz, CDCl_3) : δ

0,60 (6H, d), 0,94 (6H, d, CH_3), 2,1 (2H, m), 3,0 (4H, m),
3,3 (2H, m), 3,66 (6H, s), 3,71 (6H, s), 4,3 (2H, dd),
6,8-7,1 (4H, m);

^{13}C BMR (50 MHz, CDCl_3) : δ

18,0, 20,6, 32,6, 41,5, 53,2, 53,4, 57,9, 61,3, 127,5,
128,1, 131,9, 137,1, 162,5, 163,7.

5

MS (IP 70 eV): m/z 470 (0,2), 288 (50), 183 (47), 182
(20), 141 (100), 105(40).

$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$ Paskaič., % : C 66,34; H 8,14; N 11,91;

10

Rasta, %: C 66,48; H, 8,07; N 11,85.

b) Dimetil (S,S)- α,α' -diamino-1,3-benzendipropionatas

15 α,α' -Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-
5-pirazinil] -m-ksilenas (2,00 g, 4,25 mmol) ištirpintas
metanolyje (10 ml) ir pridėta 0,25 M druskos rūgštis
(68 ml, 17 mmol). Mišinys maišomas aplinkos temperatū-
roje per naktį. Vandens/metanolio mišinys ekstrahuotas
20 dietilo eteriu ir tada pH buvo sureguliuotas iki 10,
pridedant amoniako. Produktai buvo ekstrahuoti eteriu.
Eterio tirpalas išdžiovintas (MgSO_4), filtruotas ir išga-
rintas. D-Valino metilesteris nudistiliuotas Kugelrohr'o
įrenginyje (50-60°C/0,1 mbar). Likutis buvo panaudotas
25 sekančioje stadijoje be tolimesnio valymo.
Išeiga 1,10 g (92%).

^1H BMR (200 MHz, CDCl_3) : δ

30 1,4 (4H, pl, s), 2,83 (2H, dd, ^2J 13,5Hz), 3,05 (2H,
dd, ^2J 13,5Hz, ^3J 5,1Hz), 3,7 (2H, dd), 3,71 (6H, s),
7,0-7,3 (4H, m).

c) (S,S)- α,α' -Diamino-1,3-benzendipropiono rūgštis.2HCl

35

Dimetil (S,S)- α,α' -diamino-1,3-benzendipropionato (1,0 g,
3,6 mmol) tirpalas 6 M druskos rūgštyje (10 ml) maišo-

mas, esant 50°C, per naktį. Druskos rūgštis pašalinta rotaciniu garintuvu, ir gauta balta kieta medžiaga išdžiovinta vakuuminėje krosnyje, esant 40°C.

5 Išeiga 1,1 g (95%).

¹H BMR (200 MHz, H₂O) : δ

10 3,18 (2H, dd, ²J 14,5 Hz, ³J 7,4Hz), 3,29 (2H, dd, ²J 14,5 Hz, ³J 5,7Hz), 4,28 (2H, dd, ³J 5,7, 7,4 Hz), 7,1-7,4 (4H, m);

¹³C BMR (50 MHz, H₂O) : δ

15 39,2, 57,7, 131,8, 132,8, 133,0, 137,7, 173,7.

C₁₂H₁₈Cl₂N₂O₄ Paskaič. %: C 44,32; H 5,58; N 8,61;

Rasta %: C 44,78; H 5,81; N 8,73;

d) (S,S)-α,α'-Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-1,3-benzendipropiono rūgštis

20

(S,S)-α,α'-Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-1,3-benzendipropiono rūgšties dihidrochlorido (1,05 g, 3,23 mmol) suspensija heksametildisilazano (15 ml) ir trimetilchlorsilano (1,5 ml) mišinyje maišoma azoto atmosferoje 25 100°C temperatūroje per naktį. Skaidrus reakcijos mišinys atšaldytas, ir sililinantys reagentai pašalinti vakuume. Likutis ištirpintas sausame dichlormetane (10 ml) ir atšaldytas ledo/vandens vonioje. Buvo pridėtas 9-fluorenilmetoksikarbonilo chlorido (1,75 g, 6,76 mmol) 30 tirpalas sausame dichlormetane (5 ml) ir reakcijos mišinys maišomas azoto atmosferoje 3 valandas. Dichlormetanas pašalintas rotaciniu garintuvu, ir likutis ištirpintas THF (8 ml) bei vandens (1 ml) mišinyje. Šis mišinys maišomas 35 30 minučių ir po to išgarintas. Likutis buvo ištirpintas etilo acetate ir kelis kartus

perplautas vandeniu. Organinė fazė buvo išdžiovinta (MgSO₄), filtruota ir koncentruota. Produktas išsikristalizavo, pridėjus heksano. Kristalai perplauti heksanu, ir produktas išvalytas kolonėlės chromatografija (silicio dioksidas, heksanas/etilo acetatas, acto rūgštis 3:6:1), balta kieta medžiaga, lyd.t. 143-144°C.

Išeiga 1,85 g (82%).

¹H BMR (200 MHz, CDCl₃) : δ

2,8-3,1 (4H, m) 4,0-4,4 (8H, m), 7,0-8,0 (22H, m);

¹³C BMR (50 MHz, CDCl₃) : δ

15

37,5, 47,6, 55,3, 66,4, 120,2, 125,3, 127,1, 127,3, 127,7, 128,1, 129,9, 137,8, 140,6, 143,6, 155,7, 172,9.

FAB-MS signalas prie m/z 719,1(2), 539,1(6), 271,0(6) ir 179,1(100).

2 PAVYZDYS

(S,S)-α,α'-Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-1,4-benzodipropioninė rūgštis

25

a) α,α'-Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil-p-ksilenas

Pavadinime nurodytas junginys susintetintas kaip anksčiau iš (2R)-(-)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino (18 mmol) ir α,α'-dibrom-p-ksileno (9 mmol). Gautas produktas išvalytas impulsine chromatografija ant silikagelio (CHCl₃).

35

Išeiga 76%.

^1H BMR (CDCl_3) : δ

0,6-0,9 (2d, 12H), 2,05-2,20 (m, 2H), 3,05 (d, 4H),
3,25 (s, 2H), 3,60 (s, 6H), 3,70 (s, 6H), 6,9 (s, 4H).

5

PCh (heptanas: EtOAc; 12:1), Rf 0,32.

HPLC (50-100% MeOH, 10 min.), RT 7,87 min.

10 **b) Dimetil (S,S)- α,α' -diamino-1,4-benzendipionatas**

Produktas iš priešėinančios stadijos (3,4 mmol) buvo
suskaldytas į pavadinime nurodytą junginį, panaudojant
0,25 M HCl aplinkos temperatūroje, kaip aprašyta m-izo-
merui aukščiau.

15

PCh (MeCN: MeOH: H_2O , 4:1:1), Rf 0,36.

20 **c) (S,S)- α,α' -Diamino-1,4-benzendipiono rūgšties di-
hydrochloridas**

Metilo esterio grupė priešėinančiame produkte hidro-
lizuota, pašildant su konc. HCl, kaip aprašyta m-izo-
merui aukščiau.

25

PCh (MeCN: MeOH: H_2O , 4:1:1).

^1H BMR (D_2O) : δ

30 0,8-0,9 (2d, 6H), 2,10 (m, 1H), 3,00 (m, 2 H₉), 3,45
(d, 1H), 3,81 (t, 2H), 7,13 (s, 4H).

**d) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-1,4-
benzendipiono rūgštis**

35

Pavadinime nurodytas junginys buvo susintetintas iš aukščiau minėtos rūgšties ir 9-fluorenilmetoksikarbonilo chlorido, kaip aprašyta m-izomerui aukščiau.

5 PCh (heptanas: EtOAc; 3:6:1), Rf 0,58.

HPLC (40-70% MeCN 0,1% TFA, 10 min), RT 4,86 min.

¹H BMR (DMSO-d₆) : δ

10

2,79-3,11, (m, 6H), 4,09-4,21 (pl, s, 6H), 7,13-7,92 (m, 20H).

FAB-MS: (M+H) 697.

15

3 PAVYZDYS

(S,S)- α,α' -Diamino-1,2-benzendipropiono rūgštis

20

a) α,α' -Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil-o-ksilenas

25

(R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (3,5 g, 19,00 mmol) ištirpintas sausame THF (8 ml). Tirpalas atšaldytas (-78°C), ir lašinant pridėta BuLi (13 ml, 19,50 mmol, 1,5 M heksane), azoto atmosferoje. Elektrofilytas, α,α' -dichlor-o-ksilenas (1,66 g, 9,50 mmol) THF (5 ml) pridėtas lašinant (-78°C). Reakcijos mišiniui leista atšalti iki aplinkos temperatūros per naktį. Tirpiklis pašalintas ir gautas nevalytas produktas išvalytas impulsine chromatografija, panaudojant heksaną/etilo acetatą (4:1) kaip eliuentą. Blyškiai geltoni kristalai, 3,512 g (78%). Lyd.t. 109-112°C.

30

35

¹H BMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

0,59 (6H, d, J 6,7 Hz, 2 x CH₃), 0,94 (BH, d, J 6,8 Hz, 2 x CH₃), 2,13 (2H, m, 2 x CH), 2,95, 3,45 (4H, m, 2 x CH₂), 3,28 (2H, t, J 3,3 Hz, 2 x CH), 3,62 (6H, s, OCH₃), 4,26 (2H, m, 2 x CH), 7,05 (4H, m, 4 x CH).

5

¹³C BMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

16,38, 18,98, 30,96, 36,49, 52,10, 52,20, 57,14, 59,98, 125,86, 130,41, 136,75, 162,85, 163,61.

10

C₂₆H₃₈N₄O₄ Paskaič., %: C, 66,35; H, 8,14.

Rasta %: C, 66,03; H, 8,04.

b) Dimetil (S,S)-α,α'-diamino-1,2-benzendipropionatas

Į α,α'-Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil]-o-ksilena (1,155 g, 2,45 mmol) pridėta 0,5 M HCl (20 ml, 10,00 mmol) ir dioksano (20 ml). Šis mišinys maišomas 7 valandas aplinkos temperatūroje. Didžioji tirpiklių dalis pašalinta sumažintame slėgyje, vandens (15 ml) ir chloroformo (15 ml) buvo pridėta. Chloroformo sluoksnis buvo nuleistas, o vandens sluoksnis pašarintas konc. NH₃ (pH 10). Vanduo išekstrahuotas, chloroformu (3 x 20 ml), ir sujungti chloroformo sluoksniai išdžiovinti (MgSO₄) bei sukonzentruoti. Valino metilo esteris buvo pašalintas distiliacija iš kolbos į kolbą (0,3 mm Hg, 50°C) per 1,5 valandas. Likutis yra gelsvas aliejus, 0,55 g (80%).

20

25

¹H BMR (200 MHz, CDCl₃) δ:

30 1,63 (4H, s, NH₂), 3,02 (4H, m, 2 x CH₂), 3,71 (6H s, OCH₃), 3,74 (2H, m, 2 x CH), 7,18 (4H, m, 4 x CH).

¹³C BMR (50 MHz, CDCl₃) δ:

35 38,26, 52,47, 56,10, 127,48, 130,80, 136,73, 175,92.

$C_{14}H_{18}N_2O_4$ Paskaič., %: C, 59,98; H, 7,19.

Rasta, %: C, 59,54; H, 7,04.

c) (S,S)- α,α' -Diamino-1,2-benzendipropiono rūgštis.2HCl

5 Dimetil(S,S)- α,α' -diamino-1,2-benzendipropionatas (270 mg, 0,963 mmol) veikiamas 6N HCl (20 ml), esant 50°C, 20 valandų. Vanduo pašalintas vakuume pridėta benzono ir išgarinta (2 x 20 ml), liko bespalvė kieta medžiaga, 0,313 g.

10

1H BMR (300 MHz, D_2O) δ :

3,18 (4H, m, 2 x CH_2), 4,12 (2H, m, CH), 4,64 (6H, s, NH_3), 7,23 (4H, m, 4 x CH).

15

^{13}C BMR (75 MHz, D_2O) δ :

32,56, 53,85, 128,62, 130,81, 133,27, 171,36.

20 **d) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-1,2-benzendipropiono rūgštis**

(S,S)- α,α' -Diamino-1,2-benzendipropiono rūgšties dihidrochloridas (130 mg, 0,4 mmol) suspenduotas heksametilidisilazane (7 ml) bei trimetilsililo chloride (0,5 ml) ir virinta su grižtamu šaldytuvu azoto atmosferoje per naktį. Tirpikliai buvo pašalinti vakuume, likutis ištirpintas sausame dichlormetane (10 ml). Tirpalas atšaldytas (0°C), ir lašinant pridėta 9-fluorenilmetoksikarbonilo chlorido (260 mg, 1,00 mmol) sausame dichlormetane. Šaldanti vonia pašalinta po 1 valandos, ir reakcijos mišinys maišomas per naktį, azoto atmosferoje. Buvo pridėta 1N HCl (5 ml). Tirpikliai pašalinti, ir likutis perplautas 1M HCl (5 ml) dioksane
35 (5 ml) bei išdžiovintas.

Išeiga: 100 mg (40%).

^1H BMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ :

5 2,49-3,54 (14H, m, 4 x CH_2 , 4xCH, 2 x NH), 7,29-7,84 (20H, m, 20 x CH).

^{13}C BMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ :

10 33,41, 46,94, 54,75, 66,14, 120,46, 125,64, 126,79, 127,48, 128,07, 130,21, 136,42, 141,02, 144,05, 156,37, 173,64.

4 PAVYZDYS

15

(S,S)- α,α' -Diamino-2,5-tiofeno-dipropiono rūgštis

a) 2,5-Bis[(2R,5S)-(-)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-pirazinilmetil]-tiofenas

20

(R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (5,00 g, 27,14 mmol) ištirpintas sausame THF (15 ml). Tirpalas atšaldytas (-78°C) ir lašinant pridėta BuLi (19 ml, 30,4 mmol, 1,5 M heksane) azoto atmosferoje. Po 25 10 minučių lašinant pridėtas elektrofily, 2,5-bis(chlormetil)tiofenas (2,5 g, 13,8 mmol) THF (10 ml). Reakcijos mišiniui leista pasiekti aplinkos temperatūrą per naktį, azoto atmosferoje. Tirpiklis pašalintas vakuume ir gautas produktas išvalytas impulsine chromatografija, heksanas/etilo acetatas (4:1). 30

Išeiga: 4,87 g (75%) baltų kristalų, 2,3% blogo diastereomero (kuris gali būti pašalintas impulsine chromatografija arba perkristalizavus iš acetonitrilo).

35

$\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ Paskaič., %: C, 60,47; H, 7,61.
Rasta, %: C, 60,45; H, 7,68.

¹H BMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

0,63 (6H, d, J 6,9 Hz, CH₃), 0,96 (6H, d, J 6,9 Hz, CH₃), 2,16 (2H, m, CH), 3,58 (2H, t, J 3,5Hz, CH), 3,65 (6H, s, OCH₃), 3,71 (6H, s, OCH₃), 4,23 (2H, dd, CH), 6,48 (2H, s, H-3, H-4).

¹³C MR (75 MHz, CDCl₃) δ:

16,56, 18,85, 31,46, 34,59, 51,94, 52,41, 56,04, 60,48, 125,80, 137,65, 161,57, 164,43.

b) Dimetil-(S,S)-α,α'-diamino-2,5-tiofen-dipropionatas

2,5-Bis[(2R,5S)-(-)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil]metil)-tiofenas (1,007 g, 2,113 mmol) suspenduotas dioksano (20 ml, HCl (0,7 ml, 8,5 mmol, 12M) ir vandens (20 ml) mišinyje. Po 4 valandų aplinkos temperatūroje pridėtas dietilo eteris (30 ml). Eterio fazė nuleista, vandens fazė pašarminta konc. NH₃ (pH 10). Po to ekstrahuota chloroformu (3x30 ml). Sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti (MgSO₄), ir tirpikliai pašalinti. Valino metilo esteris išskirtas distiliacija iš kolbos į kolbą (0,5 mmHg, 50°C, 1,5 h).

25

Išeiga 0,555 g (92%) gelsvo aliejaus.

C₁₂H₁₆N₂O₄S Paskaič. %: C, 50,33; H, 6,34.

Rasta %: C, 50,79; H, 6,53.

¹H BMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

30

1,60 (4H, pls, NH₂), 3,16 (4H, m, CH₂), 3,70 (2H, m, CH), 3,73 (6H, s, OCH₃), 6,68 (2H, s, H-3, H-4).

¹³C BMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

35

35,26, 52,02, 55,52, 126,32, 138,19, 174.85.

c) (S,S)- α,α' -Diamino-2,5-tiofen-dipropiono rūgštis.2HCl

5 Dimetil(S,S)- α,α' -diamino-2,5-tiofeno-dipropionatas (531 mg, 1,854 mmol) veikiamas 6N HCl (30 ml), esant 70°C, 20 valandų. Tirpalas išgarintas ir likęs vanduo zeotruopintas benzolu (2x30 ml).

10 Gauti truputį rusvi kristalai, 613 mg (100%).

^1H BMR (300 MHz, D₂O) δ :

3,35 (4H, d, J 5,9, CH₂), 4,16 (2H, t, J 5,8 Hz, CH),
15 4,65 (8H, s, NH₃), 6,78 (2H, s, H-3, H-4).

^{13}C BMR (75 MHz, D₂O) δ :

29,96, 54,07, 128,61, 135,89, 171,35.

20

d) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-2,5-tiofen-dipropiono rūgštis

(S,S)- α,α' -Diamino-2,5-tiofenodipropiono rūgštis di-
25 hidrochloridas (590 mg, 1,78 mmol) suspenduotas hek-
sametildisilazane (15 ml) ir trimetilsililo chloride
(1 ml) deflegmavosi per naktį. Tirpalas išgarintas,
esant sumažintam slėgiui, likutis ištirpintas sausame
dichlormetane (15 ml). Tirpalas atšaldytas iki 0°C ir
30 lašinant pridėtas 9-fluorenilmetiloksi-karbonilo chlo-
ridas (1,055g, 4,08 mmol) dichlormetane (5 ml) azoto
atmosferoje. Šaldanti vonia pašalinta po 1 valandos, o
mišinys maišomas per naktį aplinkos temperatūroje azoto
atmosferoje. Tirpiklis pašalintas, o junginys iš-
35 tirpintas THF (5 ml), ir pridėta 1N HCl (5 ml). Vandens
fazė pašalinta po 2 valandų ir perplauta chloroformu
(3x20 ml). Sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti

(MgSO₄) ir tirpikliai pašalinti. Gautas produktas išvalytas impulsine chromatografija, panaudojant dichlorometaną/metanoli/acto rūgštį (10:1:0,1) kaip eliuentą.

5 Geltoni kristalai: 0,557 g (44%). Lyd.t. 249°C (skyla).

¹H BMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ:

10 2,90-4,20 (14H, m, 4 x CH₂, 4 x CH, 2 x NH), 6,69 (2H, s, H-3, H-4), 7,20-8,00 (16H, m, 16 x CH).

¹³C BMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ:

15 21,47, 31,50, 109,50, 120,20, 121,56, 127,50, 129,15, 137,71, 139,83, 143,00, 172,00.

5 PAVYZDYS

20 (S,S)-α,α'-Diamino-cis-1,2-ciklopropan-dipropiono rūgštis

a) cis-1,2-Bis(bromometil)ciklopropanas

Į atšaldytą (0°C) trifenilfosfino (10,8 g, 41,16 mmol) suspensiją acetonitrile (70 ml) lėtai pridėta bromo 25 (6,6 g, 41,16 mmol). Šaldanti vonia pašalinta ir lašinant pridėtas cis-1,2-bis(hidroksimetil)ciklopropano (2,0 g, 19,6 mmol) tirpalas acetonitrile (5 ml). Šis mišinys maišomas aplinkos temperatūroje 1 valandą, nuosėdos nufiltruotos ir filtratas sukonzentruotas vakuume. Likutis ištirpintas eteryje (70 ml), nufiltruotas, sukonzentruotas ir perdistiliuotas vakuume (12 mbar, 30 vir.t. 135-155°C).

Išeiga 3,463 g (71%).

35

¹H BMR (CDCl₃) δ:

0,44 (kv, J 5,8 Hz, 1H), 1,18 (m, 1H), 1,66 (m, 2H),
3,50 (m, 4H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

5

16,66, 22,68, 33,46.

**b) cis-1,2-Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izo-
propil-5-pirazinil]metil-ciklopropanas**

10

n-Butillitis heksane (1,6N, 5,483 ml, 8,774 mmol) lėtai pridėtas į atšaldytą (-78°C) (2R)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izopropilpirazino (1,862 g, 8,774 mmol) tirpalą THF (30 ml), ir maišymas tęsėsi 30 minučių. Po šio laikotarpio lėtai pridėtas cis-1,2-bis-(bromo-
15 metil)ciklopropano tirpalas bevandeniame THF (10 ml), ir mišiniui leista įgyti aplinkos temperatūrą per naktį. Reakcija nuslopinta, pridėjus fosfato buferio pH 7 (30 ml), ir mišinys dukart ekstrahuotas eteriu (30 ml
20 kiekvieną kartą). Sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti (MgSO_4), išgarinti iki sausumo, ir produktas išskirtas impulsine chromatografija (heksanas/etilo eteris 8:1).

25 Išeiga 0,609 g, 28%.

^1H BMR (CDCl_3) δ :

30 -0,15 (kv, J 5,85 Hz, 1H), 0,5 (m, 1H), 0,65 (d, 6H),
0,99 (d, 6H), 1,22 (dvt, 12H), 1,51 (m, 2H), 1,92 (m,
2H), 2,23 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 3,98-4,19 (m, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

35 10,51, 10,90, 11,08, 14,37, 16,55, 17,03, 19,02, 19,12,
31,41, 31,59, 32,54, 33,31, 33,70, 46,78, 55,83, 56,15,

60,26, 60,38, 60,52, 60,55, 60,68, 61,03, 162,87,
163,03, 163,26, 163, 38.

5 **c) Dietilo(S,S)- α,α' -diaminoamino-cis-1,2-ciklopropan-
dipropionatas**

Druskos rūgštis (1N, 3,51 ml) pridėta į cis-1,2-
bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izopropil-5-pi-
10 razinil)metil]-ciklopropano (430 mg, 0,876 mmol) tir-
palą dioksane (3,5 ml). Mišinys maišomas aplinkos tem-
peratūroje 1 valandą, paskui dioksanas pašalintas va-
kuume. Likutis du kartus ekstrahuotas chloroformu (15 ml
kiekvieną kartą), idėjus 1,5 ml koncentruoto amoniako,
sujungti ekstraktai išdžiovinti ($MgSO_4$), išgarinti ir
15 valino esteris buvo išskirtas vakuumine destiliacija
(55°C, 0,03 mbar).

Išeiga 238 mg, 99,7%.

20 1H BMR ($CDCl_3/D_2O$) δ :

-0,15 (kv, 1H), 0,68 (m, 1H), 0,79 (m, 2H), 1,22 (t, J
7,2 Hz, 6H), 1,36 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 3,41 (m, 2H),
4,10 (kv, J 7,2 Hz, 4H).

25

^{13}C BMR ($CDCl_3/D_2O$) δ :

10,72, 11,37, 11,44, 13,88, 33,74, 54,56, 54,79, 60,36,
60,38, 175,39, 175,672.

30

**d) Dietil(S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetiloksidikarbonil-
amino)-cis-1,2-ciklopropan-dipropionatas**

Fmoc-chloridas (678 g, 2,622 mmol) ir 1N $NaHCO_3$ tir-
35 palas (3 ml) iš eilės pridėti į dietil(S,S)- α,α' -
diaminoamino-cis-1,2-ciklopropan-dipropionato (238 mg,
0,874 mmol) tirpalą dioksane (4 ml), esant aplinkos

temperatūrai. Dioksano pašalinimas po 30 minučių maišymo, po to likučio, likusio po CHCl_3 išgarinimo, ekstrahavimas chloroformu (30 ml) ir impulsinė chromatografija (heksanas/etilo acetatas 4/1-2/1) davė pavadinime nurodytą junginį.

Išeiga 483 mg, 77,1%.

^1H BMR (CDCl_3) δ :

10

-0,10 (pl s, 1H), 0,77 (pl s, 3H), 1,28 (t, 6H), 1,56 (m, 2H), 2,03 (m, 2H), 4,23 (m, 6H), 4,41 (m, 6H), 5,46 (m, 2H), 7,25-7,77 (m, 16H).

15 ^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

11,05, 11,24, 14,13, 31,77, 31,82, 47,16, 54,11, 54,28, 61,49, 66,93, 119,93, 125,01, 126,99, 127,65, 141,26, 143,72, 143,86, 155,69, 172,11, 172,28.

20

FAB-MS: MH+717,4

e) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetilokarbonilamino)-cis-1,2-ciklopropan-dipropiono rūgštis

25

Dietil(S,S)- α,α' -bis(9-fluorenilmetilokarbonilamino)-cis-1,2-ciklopropan-dipropionato (497 mg, 0,693 mmol) tirpalas dioksane (5 ml) šildomas iki 90°C su 6N HCl (3 ml) 26 valandas. Dioksanas pašalintas vakuume, o vandens likutis buvo du kartus ekstrahuotas chloroformu (20 ml kiekvieną kartą). Tirpiklis išgarintas po išdžiovinimo (MgSO_4), o likutis išvalytas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 10/10/1). Frakcijos, turinčios produktą, buvo surinktos, sukonzentruotos į mažą tūrį vakuume ir liofilizuotos, davė pavadinime nurodytą junginį - baltus miltelius.

35

Išeiga 280 mg, 61,2%.

^1H BMR (DMSO- d_6 /D $_2$ O) δ :

5 -0,04 (m, 1H), 0,56 (m, 1H), 0,82 (m, 2H), 1,41 (m, 1H), 1,60 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,25 (m, 6H), 7,27-7,88 (m, 16H).

^{13}C BMR (DMSO- d_6 /D $_2$ O) δ :

10

10,88, 12,35, 13,13, 30,15, 30,59, 47,02, 54,84, 66,02, 120,43, 125,63, 127,44, 128,02, 136,68, 141,04, 144,10, 144,15, 156,43, 156,49, 174,00, 174,12.

15 FAB-MS:MH+661.3

6 PAVYZDYS

(S,S)- α,α' -Diamino-cis-1,2-ciklobutan-dipropiono rūgštis

20

a) cis-1,2-Bis-(bromometil)ciklobutanas

Į atšaldytą (0°C) trifenilfosfino (2,664 g, 10,16 mmol) suspensiją acetonitrile (15 ml) lėtai pridėtas bromas (1,623 g, 10,16 mmol). Šaldanti vonia pašalinta ir cis-1,2-bis(hidroksimetil)ciklobutanas (562 mg, 4,838 mmol) acetonitrile (5 ml) pridėtas lašinant. Šis mišinys maišomas aplinkos temperatūroje 1 valandą, po to tirpiklis pašalintas vakuume ir sutrintas su eteriu (30 ml). Nuosėdos pašalintos filtravimu, filtratas sukonzentruotas ir nukreiptas vakuuminei destiliacijai (Kugelrohr, 0,3 mbar, vir.t.110°C).

30

Išeiga: 628 mg, 53,6%.

35

^1H BMR (CDCl $_3$) δ :

1,71 (s, 2H), 2,10 (s, 2H), 2,83 (s, 2H), 3,44 (m, 2H),
3,58 (m, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

5

23,72, 33,69, 39,45.

**b) cis-1,2-Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izo-
propil-5-dihidropirazinil]metil-ciklobutanas**

10

n-Butillitis heksane (1,6N, 4,92 ml, 7,87 mmol) lėtai pridėtas į atšaldytą (-78°C) (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino (1,449 g, 7,865 mmol) tirpalą THF (30 ml) ir maišymas tęsėsi 30 minučių. Po to, cis-1,2-bis-bromometil-ciklobutano (906 mg, 3,745 mmol) tirpalas vandeniniame THF (4 ml) lėtai pridėtas, ir tirpalui leista įgyti aplinkos temperatūrą. Reakcija nuslopinta, pridėtant fosfato buferį pH 7 (30 ml), ir mišinys ekstrahuotas du kartus eteriu (30 ml kiekviena karta). Sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti (MgSO_4), išgarinti iki sausumo, ir produktas atskirtas impulsine chromatografija (heksanas/etilo eteris 8/1).

15

20

Išeiga: 517 mg, 30%.

25

^1H BMR (CDCl_3) δ :

0,60 (d, 6H), 0,98 (d, 6H), 1,63 (m, 4H), 1,85 (m, 4H),
2,17 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 3,75-3,67 (m, 12H), 3,80-
3,94 (m, 4H).

30

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

16,35, 16,40, 19,02, 24,84, 25,54, 31,30, 31,36, 33,87,
34,22, 34,72, 34,81, 51,96, 52,04, 52,16, 54,22, 54,75,
60,23, 60,36, 162,73, 163,20, 164,19.

35

c) Dietil(S,S)- α,α' -diaminoamino-cis-1,2-ciklobutan-dipropionatas

Druskos rūgštis (1N, 4,61 ml), pridėta į cis-1,2-
5 bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izopropil-5-dihidropirazinimetil-ciklobutano (517 mg, 1,152 mmol) tirpalą dioksane (5 ml), mišinys maišomas aplinkos temperatūroje 1 valandą,, po to dioksanas pašalintas vakuume. Likutis dukart ekstrahuotas chloroformu (15 ml
10 kiekvieną kartą), pridėjus 1,5 ml koncentruoto amoniako, sujungti ekstraktai išdžiovinti ($MgSO_4$), išgairinti ir valino esteris išskirtas vakuumine destiliacija (55°C, 0,03 mbar). Aliejingas likutis susideda iš gryno pavadinime nurodyto junginio.

15

Išeiga: 293 mg, 98,5%.

 1H BMR ($CDCl_3$) δ :

20 1,36 (pl s, 4H), 1,50 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 2,43 (m, 2H), 3,24 (m, 2H), 3,59 (m, 6H).

 ^{13}C BMR ($CDCl_3$) δ :

25 24,02, 24,80, 33,54, 33,86, 35,07, 35,67, 51,56, 51,68, 52,47, 53,03, 176,25, 176,59.

d) Dietil(S,S)- α,α' -bis(9-fluorenilmetiloksikarbonil-amino)-cis-1,2-ciklobutan-dipropionatas

30

Fmoc-chloridas (880 mg, 3,402 mmol) ir 1N $NaHCO_3$ -tirpalas (3 ml) iš eilės pridėti į dietil(S,S)- α,α' -diaminoamino -cis-1,2-ciklobutan-dipropionato (293 mg, 1,134 mmol) tirpalą dioksane (4 ml). Dioksano pašalinimas po 30 minučių maišymo ir ekstrahavimo chloroformu (30 ml), po to $CHCl_3$ išgairinimo, impulsinė
35

chromatografija (heksanas/etilo acetatas 4/1-2/1) davė pavadinime nurodytą junginį.

Išeiga: 572 mg, 71,8%.

5

^1H BMR (CDCl_3) δ :

1,77 (m, 4H), 2,00 (m, 6H), 2,25 (m, 2H), 3,74 (m, 6H),
4,10-4,50 (m, 6H), 5,10-5,20 (m, 2H), 7,27-7,77 (m,
10 16H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

24,38, 24,95, 33,01, 33,18, 33,68, 33,78, 47,15, 52,19,
15 52,30, 52,40, 52,65, 66,93, 119,92, 125,01, 126,98,
127,65, 141,25, 143,67, 143,79, 155,63, 155,91, 172,84,
173,16.

**e) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-
20 cis-1,2-ciklobutan-dipropiono rūgštis**

Diethyl(S,S)- α,α' -(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-
cis-1,2-ciklobutan-dipropionato (572 mg, 0,814 mmol)
tirpalas dioksane (5 ml) pašildytas iki 65°C su 6N HCl
25 (3 ml) 20 valandų. Dioksanas pašalintas vakuume, o
vandens likutis buvo du kartus ekstrahuotas chloroformu
(20 ml kiekvieną kartą). Tirpiklis išgarintas po džio-
vinimo (MgSO_4) ir likutis išvalytas impulsine chro-
matografija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis
30 10/10/1). Frakcijos, turinčios produktą, buvo surink-
tos, sukonzentruotos į mažą tūrį vakuume ir liofiliz-
uotos, davė pavadinime nurodytą junginį kaip baltus
miltelius.

35 Išeiga 316 mg, 57,5%.

^1H BMR ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$) δ :

1,42-2,0 (m, 6H), 2,40 (m, 2H), 3,6 (pls 2H), 3,82 (m, 2H), 4,25 (m, 6H), 7,26-7,90 (m, 16H).

^{13}C BMR (DMSO- d_6 /D $_2$ O) δ :

5

23,58, 24,77, 31,00, 32,12, 33,62, 46,98, 51,84, 53,08, 65,83, 120,37, 125,55, 127,36, 127,94, 141,00, 144,01, 144,05, 144,11, 156,27, 156,43, 174,13, 174,55,

10 **7 PAVYZDYS**

(S,S)- α,α' -Diamino-trans-1,4-cikloheksan-diacto rūgštis

15 **a) trans-1,4-Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil-cikloheksanas**

Į (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino (2,76 g, 15 mmol) ir 1,3-dimetil-2-imidazolidono (6,87 g, 60 mmol) tirpalą THF lašinant pridėta (48 ml) 1,6M n-BuLi 9,6 ml, 15,3 mmol). Po 1 valandos 1,4-trans-dibromcikloheksano (1,82 g, 7,5 mmol) tirpalas THF pridėtas lašinant. Mišiniui leista įgyti aplinkos temperatūrą per naktį ir reakcija nuslopinta su 1M fosfato buferiu (pH=7). Mišinys atskiestas dietilo eteriu (100 ml) bei vandeniui (20 ml) ir sluoksniai atskirti. Vandeninis sluoksnis ekstrahuotas dar du kartus eteriu (2x150 ml) ir sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti (MgSO $_4$), nufiltruoti, sukonzentruoti ir išvalyti impulsine chromatografija (silikagelis, heksanas: eteris = 2:1). 30 Produktas iš sujungtų frakcijų perkristalizuotas iš MeOH (100 ml).

Išeiga: 2,774 g (6,18 mmol, 82,4%).

35 ^1H BMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ :

3,91 (t, 2H, J 3,6 Hz), 3,86 (kv, 2H, J 3,0 Hz), 3,69
 (s, 6H), 3,68 (s, 6H), 2,67 (d, sept, 2H, J 3,0, 6,9
 Hz), 1,78-1,54 (m, 8H), 1,05 (d, 6H, J 6,9 Hz), 1,78-
 1,54 (m, 8H), 1,05 (d, 6H, J 6.9 Hz), 0,97 (m, 2H),
 5 0,66 (d, 6H);

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3) δ :

163,23, 163,15, 60,30, 59,95, 52,24, 41,30, 31,40,
 10 28,91, 26,17, 19,03, 16,38.

FAB-MS m/z 449 ($\text{M}^+ + 1$).

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4$ (448,60). Paskaič., %: C, 64,26; H, 8,98, N, 12,49;
 Rasta %: C, 64,20; H, 9,04; N, 12,37.

15 **b) Dimetil(S,S)- α,α' -diamino-trans-1,4-cikloheksan-di-
 acto rūgštis**

Junginys iš a) stadijos (1,00 g, 2,23 mmol) ištirpintas
 dioksane (17,8 ml) ir pridėta 0,5 M HCl (17,8 ml,
 20 8,92 mmol), mišinys maišomas aplinkos temperatūroje
 12 valandų. Dioksanas pašalintas, aspiratoriaus vakuum-
 me, likutis atskiestas vandeniu ir ekstrahuotas eteriu
 (3x30 ml). Sujungti CHCl_3 sluoksniai išdžiovinti
 (MgSO_4), nufiltruota ir koncentruota. Likutis idėtas į
 25 Kugelrohr'o įrenginį ir metilo valinatas išskirtas
 esant 0,1 tor. ir 25-50°C.

Išeiga: 530 mg (2,05 mmol, 92%).

30 ^1H BMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

3,68 (9s, 6H), 3,26 (d, 2H, J 5,1Hz), 1,72-1,54 (m,
 6H), 1,26-1,19 (m, 2H), 1,13-1,06 (m, 2H);

35 ^{13}C BMR (75 MHz CDCl_3) δ :

175,83, 59,22, 51,74, 41,64, 29,10, 27,17.

c) (S,S)- α,α' -Diamino-trans-1,4-cikloheksan-diaceto rūgštis

5 Aukščiau paminėto junginio (442 mg, 1,71 mmol) tirpalas
6M HCl (10 ml) šildomas iki 50°C 14 valandų. Po to, kai
mišiniui buvo leista įgyti aplinkos temperatūrą,
lengvai garuojantys junginiai buvo išgarinti rotaciniu
garintuvu, o likutis ištirpintas (nevisiškai) vande-
10 nyje. Buvo pridėta etanolio ir mišinys paliktas per
naktį šaldytuve. Nuosėdos nufiltruotos, perplautos
eteriu ir išdžiovintos.

Išeiga: 378 mg (1,25 mmol, 72,9%).

15

^1H BMR (300 MHz, D_2O , DCl) δ :

3,63 (m, 2H), 1,68-1,43 (m, 6H), 1,90 (dd, 2H), 0,89
(dd, 2H).

20

^{13}C BMR (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$) δ :

170,77, 56,96, 37,30, 26,90, 26,71.

25 FAB-MS m/z 231 ($\text{M}^+ - 72$);

$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ (258,31).

**d) (S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetiloksidikarbonilamino)-
30 trans-1,4-cikloheksan-diaceto rūgštis**

Į aminorūgšties iš c) stadijos (420 mg, 1,38 mmol)
tirpalą vandenyje (4 ml) ir dioksane (4 ml) įdėtas
FmocCl (1,43 g, 5,54 mmol) tirpalas dioksane (3 ml), po
35 to 1 M NaOH (8,31 ml, 8,31 mmol). Mišinys maišomas per
naktį. Gauta skysta masė ekstrahuota dietilo eteriu
(2x3 ml). Vandeningis sluoksnis parūgštinamas 6M HCl ir

ekstrahuotas CHCl_3 (3x30 ml). CHCl_3 - fazė buvo sukonzentruota ir išvalyta impulsine chromatografija (sili-kagelis, heksanas: etilo acetatas: acto rūgštis = 10:10:1).

5

Išeiga: 648 mg (0,96 mmol, 69,5%).

^1H BMR (300 MHz, DMSO) δ :

10 7,87 (d, 4H, J 7,5Hz), 7,73 (d, 4H, J 7,5 Hz), 7,41 (t, 4H, J 7,5Hz), 7,33 (t, 4H, J 7,5 Hz), 4,30-4,20 (m, 6H), 3,86 (t, 2H), 1,75-1,55 (m, 6H), 1,25-0,95 (m, 4H).

15 ^{13}C (DMSO) δ :

173,60, 156,64, 144,29, 144,17, 141,10, 128,02, 127,45, 125,77, 120,48, 66,05, 59,35, 47,10, 29,14, 27,90, 21,51.

20

FAB-MS m/z 677 ($\text{M}^+ + 1$).

$\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8$ (676,76). Paskaič. %: C, 70,99; H, 5,96; N, 4,14;

Rasta %: C, 68,90; H, 6,08; N, 3,99.

8 PAVYZDYS

25

(S,S)- α,α' -Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-1,4-benzendiacto rūgštis

30

a) (S,S)- β,β' -Diokso- β,β' -bis(4-benzil-2-okso-3-oksazolidinil) 1,4-dietilbenzenas

35

(4S)-4-benzil-2-oksazolidono (1,086 g, 6,13 mmol) ir trifenilmetano (indikatorius) (2,5 mg) tirpalas sausame THF (10 ml) maišomas, esant -78°C argono atmosferoje, ir lašinant paveikiama 1,6 M nBuLi (3,83 ml, 6,13 mmol)

kol išlieka apelsino spalva. Įdėjimo metu temperatūra palaikoma tarp -65°C ir -78°C . Vėl atšaldžius iki -78°C , tirpalas paveiktas 1,4-benzendiacetilo chloridu (0,75 g, 3,25 mmol) 2 minutes. Gautas mišinys pašildytas iki 5 25°C , paveiktas 10 ml prisotintu vandeniniu natrio bikarbonatu ir maišomas, esant 25°C , 30 minučių. Mišinys ekstrahuotas trimis dichlormetano porcijomis. Dichlormetano ekstraktai sujungti, perplauti 5% vandeniniu natrio karbonatu, perplauti sūrymu, išdžiovinti 10 (MgSO_4) ir išgarinti. Gautas produktas išvalytas impulsine chromatografija, naudojant heksano: etilo acetato = 1:2 eliuentą.

Išeiga (balta kieta medžiaga): 698 mg (45%).

15

^1H BMR (200 MHz, CDCl_3) δ :

2,77, (dd, J 9,4 13,3 Hz, CHHPh), 3,28 (dd, J 3,2 13,3Hz, CHHPh), 4,18-4,22 (m, CH_2O), 4,31 (s, CH_2CO), 20 4,64-4,72 (m, CHN), 7,35-7,13 (m, 14H, aromat.).

^{13}C BMR (50 MHz, CDCl_3) δ :

37,70, 41,20, 55,20, 66,00, 126,90, 128,50, 129,00, 25 132,10, 134,70, 152,90, 170,50.

b) (S,S,S,S)- α,α' -Diazido- β,β' -diokso- β,β' -bis(4-benzil-2-okso-3-oksazolidinil)-1,4-dietilbenzenas

30 Iš anksto atšaldytas (-78°C) (S,S)- β,β' -diokso- β,β' -bis(4-benzil-2-okso-3-oksazolidinil)-1,4-dietilbenzeno (1,4 g, 2,73 mmol) tirpalas sausame THF (25 ml) įdėtas per piltuvėlį į iš anksto atšaldytą (-78°C) 0,5 M kalio bis(trimetilsilil)amido (12 ml, 6,01 mmol) tirpalą toluene, atskiestą sausu THF (30 ml). Po 30 minučių gautas kalio enoliato tirpalas paveiktas (per piltuvėlį 35 -78°C temperatūros 2,4,6-triizopropilbenzensulfonilo

azido (trisislazido) (2,02 g, 6,55 mmol) tirpalu sausame THF (15 ml). Pamaišius tirpalą 2 minutes, reakcija nuslopinta, pridedant ledinės acto rūgšties (0,983 g, 16,38 mmol). Skysta masė nedelsiant sušildyta iki 25°C vandens vonioje ir maišoma, esant šiai temperatūrai, 1,5 valandos. Po to reakcijos skysta masė padalinta tarp 200 ml sūrymo ir 250 ml etilo acetato. Vandens fazė plauta du kartus po 100 ml etilo acetato. Sujungti organiniai ekstraktai plauti atskiestu vandeniniu natrio bikarbonatu, išdžiovinti natrio sulfatu ir sukoncentruoti vakuume. Gautas produktas išvalytas impulsine chromatografija, naudojant iš pradžių kaip eliuentą heksaną:etilo acetatą = 2:1, po to etilo acetatą. Produktas paskui išvalytas impulsine chromatografija, eliuuojant pirma su heksanu: etilo acetatu = 2:1, po to heksanu: etilo acetatu = 1:2.

Išeiga (blyškiai geltona stiklinė puta): 698 mg (43%).

¹H BMR (200 MHz, CDCl₃) δ:

2,88 (dd, J 9,4 13,3 Hz, CHHPh), 3,41 (dd, J 3,2 13,3 Hz, CHHPh), 4,17-4,20 (m, CH₂O), 4,64-4,73 (m, CHN), 6,13 (s, CHN₃), 7,21-7,42 (m, 10H, aromat.), 7,50 (s, 4H, aromat.).

¹³C BMR (50 MHz, CDCl₃) δ:

37,90, 41,20, 55,80, 63,10, 66,60, 127,20, 128,70, 128,90, 129,00, 133,70, 134,10, 152,00, 168,20.

c) (S,S)-α,α'-Diazido-1,4-benzendiactio rūgštis

LiOH·H₂O (0,222 g, 5,29 mmol) tirpalas H₂O (8 ml) sulašintas esant 0°C į (S,S,S,S)-α,α'-diazido-β,β'-diokso-β,β'-bis(4-benzil-2-okso-3-oksazolidinil)-1,4-di-
 etilbenzeno (0,683 g, 1,15 mmol) tirpalą THF (16 ml).

Tirpalas maišomas 1 valandą, esant 0°C. Po to pridėtas atskiestas natrio karbonato tirpalas, ir oksazolidonas ekstrahuotas etilo acetatu. Organinis ekstraktas plautas du kartus atskiestu vandeniniu natrio karbonato
5 tirpalu. Sujungti vandeniniai ekstraktai rūgštinami vandeniniu kalio hidrosulfato tirpalu, ir produktas išekstrahuotas etilo acetatu (2x). Tirpalas išdžiovintas natrio sulfatu ir išgarintas. Likutis panaudotas kitoje stadijoje be tolesnio valymo.

10

Išeiga: 206 mg (65%).

¹H BMR (200 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ: 4,93 (s, CH), 7,40 (s, Ph).

15

¹³C BMR (50 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ: 67,50, 126,60, 134,0, 170,1.

d) (S,S)-α,α'-Diamino-1,4-benzendiacto rūgštis

20

10% Pd/c (70 mg) pridėta į (S,S)-α,α'-diazido-1,4-benzendiacto rūgštis (180 mg, 0,65 mmol) tirpalą etanolyje: acto rūgštyje = 8:1 (12 ml). Gauta skysta reakcijos masė nufiltruota per Celitą, ir Celito filtro
25 nuosėdos plautos keliomis etanolio porcijomis. Tirpiklis pašalintas vakuume acto rūgštis pašalinta azeotropiniu destiliavimu su toluenu. Balta kieta medžiaga užpilta etilo acetatu, nufiltruota ir išdžiovinta vakuume.

30

Išeiga: 99 mg (68%).

¹H BMR (200 MHz, D₂O) δ: 5,16 (s, CH), 7,48 (s, arom.).

e) (S,S)- α,α' -bis-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-
1,4-benzendiacto rūgštis

α,α' -Diamino-1,4-benzendiacto rūgštis (45 mg, 0,2 mmol)
5 suspensija heksametildisilazano (5 ml) ir trimetil-
chlorsilano (0,5 ml) mišinyje maišoma, argono at-
mosferoje 100°C temperatūroje per naktį. Reakcijos
mišinys atšaldytas ir sililinio reagentų perteklius
pašalintas vakuume. Likutis ištirpintas sausame di-
10 chlormetane (5 ml) ir atšaldytas ledo/vandens vonioje.
Buvo pridėtas 9-fluorenilmetoksikarbonilo chlorido (109 g,
0,42 mmol) tirpalas sausame dichlormetane (2 ml) ir
reakcijos mišinys maišomas argono atmosferoje 3 va-
landas. Dichlormetanas išgarintas, o likutis ištir-
15 pintas THF (4 ml) ir vandens (0,5 ml) mišinyje. Mišinys
maišomas 30 minučių, tada išgarintas. Likutis ištir-
pintas etilo acetate ir kelis kartus plautas vandeniu.
Organinė fazė išdžiovinta ($MgSO_4$), nufiltruota ir iš-
garinta. Gautas produktas išvalytas impulsine chroma-
20 tografija, panaudojant etilo acetatą: acto rūgštį -
95:5 kaip eliuentą.

Išeiga (blyškiai geltona kieta medžiaga): 48 mg (40%).

25 1H BMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ :

4,20-4,50 (m, CH ir CH_2), 4,88 (s, CHN), 7,20-8,0 (m,
20H), aromat.).

30 ^{13}C BMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 46,8, 65,5, 77,7, 119,9,
127,0, 127,8, 128,1, 128,5, 136,7, 140,5, 143,7, 155,9,
172,8.

9 PAVYZDYS

Peptido sintezė: (pGlu-Glu-Asp)₂ -[(m)-Xyl](Lys)₂

5 Peptidas yra sintezuojamas, naudojant Labortec peptidu
sintezatorių. Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin polimeras (1,0 g,
0,6 mmol; Bachem A.G. pakeitimas 0,6 mmol/g) pakrau-
namas į 100 ml reakcijos kolbą. Fmoc-[(m)-Xyl] (160 ml,
10 0,23 mmol), DCC (290 mg, 1,4 mmol) ir HOBt (211 mg,
1,4 mmol) DMF'e (200 ml) pridedamas į polimerą, ir re-
akcijai leidžiama vykti 9 valandas. Papildomai pri-
dedama DCC (1,4 mmol) ir HOBt (1,4 mmol) ir reakcijai
leidžiama vykti dar 2 valandas. Tada polimeras plau-
namas CH₂Cl₂, 30% MeOH/CH₂Cl₂ ir DMF. Polimero laisvos
15 amino grupės acetilinamos, naudojant Ac₂O/DMF (3x per 1
valandą; neigiamas Kaiserio testas).

Likusi sintezė atliekama pagal standartinę metodiką,
panaudojant Fmoc-Asp(OtBu)-Opfp (1,33 g, 2,3 mmol),
20 Fmoc-Glu(OtBu)-Opfp (1,35 g, 2,3 mmol) ir pGlu-pen-
tachlorfenilo esterį (0,86 g, 2,3 mmol). HOBt (350 mg,
2,3 mmol) pridedamas kiekvienoje prijungimo stadijoje,
kuri vyksta 1 valandą. Jungimosi pabaiga yra nustatoma
neigiamu Kaiser'io testu. Po jungimosi su Fmoc-ami-
25 norūgštimi, polimeras išplaunamas DMF, apsauginė grupė
atskeliamą 20% piperidinu/DMF, ir polimeras vėl
plaunamas DMF. Po galutinio jungimosi, polimeras plau-
namas MeOH/CH₂Cl₂ ir CH₂Cl₂. Išdžiovinto polimero-
peptido svoris yra 1 g. Peptidas atskeliamas nuo poli-
30 mero TFA: CH₂Cl₂ 1:1, tirpalas išdžiovintas užšaldant,
likutis ištirpintas vandenyje, nufiltruotas (0,45 μ),
ir filtratas išdžiovintas užšaldant. Tolimesniam gryni-
nimui 100 mg šio produkto ištirpinama vandenyje (0,5 ml)
ir nukreipiama preparatyvinei HPLC, panaudojant 2,1 x
35 15 cm Beckman'o Ultrasphere ODS kolonėlę ir tirpalus A
0,1% TFA /H₂O, B 0,1% TFA/MeCN:H₂O 40:60. Gradientas yra
0-15% B, 120 minučių, srauto greitis 5 ml/minutę.

Gaunama 19 mg gryno peptido (>95%) po surinktų homogeninių frakcijų išdžiovinimo užšaldant.

10 PAVYZDYS

5

Peptidų kietos fazės sintezė

Kietos fazės peptido sintezė atliekama iš esmės pagal fluorenilmetoksikarbonilo (Fmoc-poliamido sintezės principus (Atherton & Sheppard, Solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford: IL R Press at Oxford University Press, 1989). Panaudojamos prekyboje turimos dervos; periodine sinteze arba rankomis, arba naudojant pusiau automatinį instrumentą (Labortec peptidų sintezatorių 5P 60) šios buvo polistireno su rūgšties labiliais (Wang, J., Am. Chem. Soc., 95, 1328-1333, 1973) arba rūgšties hiperlabiliais ryšio agentais (Merger et al., Tetrahedron Letters 29, 4004-4008, 1988). Alternatyviai, peptidai sukonstruoti automatinio būdu ant dervų, naudojamų procese (Atherton et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1151-2, 1981), panaudojant LKB Biolynx 4170 automatizuotą peptidų sintezatorių. Buvo išigytytos sintetinės dervos, kurios jau turėjo apsaugotą reikalingą C-galinę Fmoc-aminorūgšties liekaną. Grandinės pailginimas pasiektas įvairiai su šoninės grandinės apsaugotais Fmoc-aminorūgšties pentafluorofenilo esteriais (Kisfaludy & Schoen, Synthesis, 325-327, 1983), panaudojant aktyvaciją su dicikloheksilkarbodiimidu (DDC)/1-hidroksibenzotriazolu (HOBt) (Koenig & Geiger, Chem. Ber. 103, 2034-2040, 1970) arba naudojant sujungimo PyBOP (Coste et. al., Tetrahedron Lett., 31 205, 208, 1990). Lizino šoninės grandinės amino grupė buvo apsaugota t-butiloksikarbonilu glutamino ir asparagino rūgšties šoninės grandinės karboksilo grupės buvo apsaugotos kaip t-butilo esteriai.

35

Sintezės dervos, nešančios reikalingą N-deblokuotą C-galinę liekaną, buvo acilintos puse ekvivalento, Fmoc-apsaugota diaminodikarboksilo rūgštimi, pridėdant DCC ir HOBt. Reakcijai pasibaigus, reagentų perteklius buvo nuplautas. Peptidilo derva paveikta dar kartą DDC/HOBt, kad būtų pritvirtintos karboksilo grupės, kurios galėjo likti laisvos. Po šios stadijos derva nuplauta metanoliu dezaktyvuoti bet kurias karboksilo grupes, kurios negali susijungti su derva surišančiomis amino grupėmis. Pagaliau, perteklius amino grupių acetilinamas. Peptido sintezė toliau tęsiama kaip paprastai.

Po reikalingų sekų ant kietos fazės pilno sukonstravimo, peptidai išskaidyti iš sintezės dervų su kartu atliekamu šoninių grandinių deblokavimu, panaudojant trifluoroacto rūgštį, į kurią buvo pridėti tinkami priemaišas sugeriantys chemikalai. (King et al., Int. J. Peptide protein Res., 36, 255-268, 1990). Po išgryninimo, peptidai išskirti nusodinant dietilo eteriu ir išdžiovinant. Gryninimas atliktas preparatyvine priešingos fazės skystine chromatografija.

1 Lentelė

Bendros struktūros peptidų (Pyr-Glu-Asp)₂-tiltelio liekana-(Lys-OH)₂ analizės duomenys

5

Tiltelio liekanos tipas ^a	HPLC metodas ^b (užlaikymo, laikas min.)	Grynumas ^c (%)	FAB-MS [M+ H] ⁺
1,2-Benzendipropionatas	0-30-20 (20)	98	1219.1
1,3-Benzendipropionatas	0-30-20 (19)	96	1219.8
1,4-Benzendipropionatas	10-40-20 (18)	95	1219
2,5-Tiofendipropionatas	0-30-20 (18)	98	1225.3
cis-1,2-Ciklopropandi- propionatas	0-30-20 (15)	100	1183.5
cis-1,2-Ciklobutandipro- pionatas			
trans-1,4-Cikloheksandi- propionatas	0-30-20 (14)	99	1197.8
1,4-Bebzendiacetatas			

^a Nurodo į pavyzdžius

10 ^b Metodai yra išreikšti kaip mobilios fazės A gradientai per laiką, pvz., 10-40-20 reiškia gradientą, prasidedantį prie 10 ir besibaigiantį prie 40% B per 20 minučių. Mobilios fazės: A) 0,1% TFA; B) 0,1% TFA 40-tyje % MeCN. Kolonėlė: Vydac TP54, C18, 0,46X25 cm, 5 μm dalelės, 100 Å pora; srautas 1 ml /min.

15

^c Nurodo į HPLC chromatogramos pikų integravimą (α = 215nm).

2 Lentelė

Bendros struktūros peptidų (Pyr-Glu-Asp)₂-tiltelio liekana-(Lys-OH)₂ amino rūgšties analizės duomenys

5

Tiltelio liekanos tipas ^a	Asp rasta (teoriškai)	Glu rasta (teoriškai)	Lys rasta (teoriškai)
1,2-Benzendipropionatas			
1,3-Benzendipropionatas			
1,4-Benzendipropionatas	1,0 (1)	2,16 (2)	0,93 (1)
2,5-Tiofendipropionatas			
cis-1,2-Ciklopropandi- propionatas			
cis-1,2-Ciklobutandipro- pionatas			
trans-1,4-Cikloheksandi- propionatas	1,0 (1)	2,12 (2)	0,81 (1)
1,4-Bebzendiacetatas			

^a Nurodo į pavyzdžius

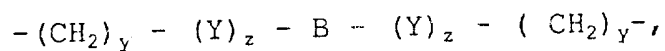
10

15

20

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidiniai junginiai, susidedantys iš dviejų vienos
 grandinės homoreguliuojančių peptidų, sujungtų kartu
 5 divalente jungiančia tilteliu grupe -A-, kuri yra
 terminaliai prijungta prie aminorūgščių Cα atomų neter-
 minalinėse ekvivalentiškose vietose kiekviename iš mi-
 nėtų peptidų, kur nėra Cα atomų, prijungtų prie grupės
 -A- nuosavų α-šoninių grandinių, kur minėta divalentė
 10 jungianti tilteliu grupė -A- yra



(kurioje

15 kiekvienas y yra nepriklausomai 0, 1 arba 2;

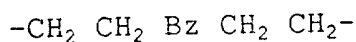
kiekvienas z yra nepriklausomai 0 arba 1;

kiekvienas Y yra nepriklausomai O, S arba NR, kur R
 reiškia vandenilį arba C-prijungtą organinę grupę;

20 B reiškia karbociklinį arba heterociklinį žiedą, pa-
 sirinktinai turintį vieną arba du heteroatomus ir
 pasirinktinai mono-, di- arba tri-pakeistą grupę -OR^A,
 -NR^AR^A, -COOR^A arba halogeno atomu; ir

25 kiekvienas R^A nepriklausomai reiškia vandenilio atomą
 arba alkilo, alkanoilo arba alkoksialkilo grupes, kurių
 kiekviena taip pat gali būti hidroksilinta).

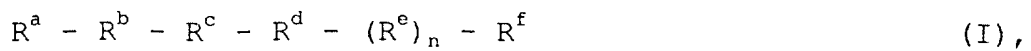
2. Peptidiniai junginiai pagal 1 punktą, b e s i s k i -
 30 r i a n t y s t u o , k a d m i n ė t a d v i v a l e n t ė j u n g i a n t i
 tilteliu grupė -A- yra



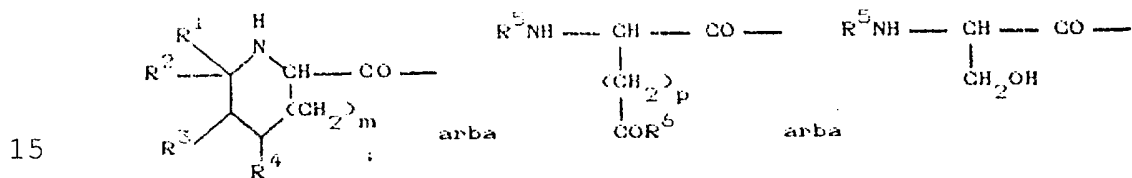
35 (kurioje Bz reiškia benzeno žiedą, kuris pasirinktinai
 yra mono-, di- arba tri-pakeistas grupė -OR^A, NR^AR^A,

-COOR^A arba halogeno atomu, kur R^A yra toks, kaip apibrėžta 1 punkte).

3. Peptidiniai junginiai pagal bet kurį iš 1 ir 2 punktų, b e s i s k i r i a n t y s t u o, kad minėti vienos grandinės homoreguliuojantys peptidai yra (I) formulės

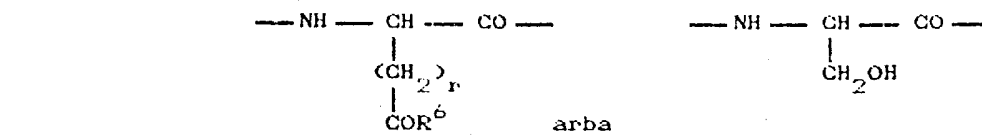


10 kurioje R^a reiškia



20 R^b reiškia

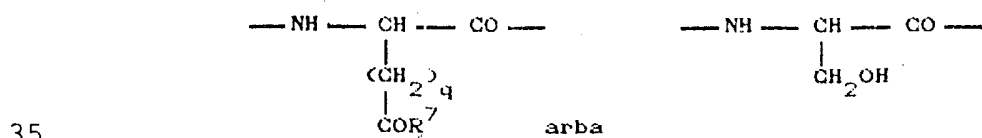
20



25

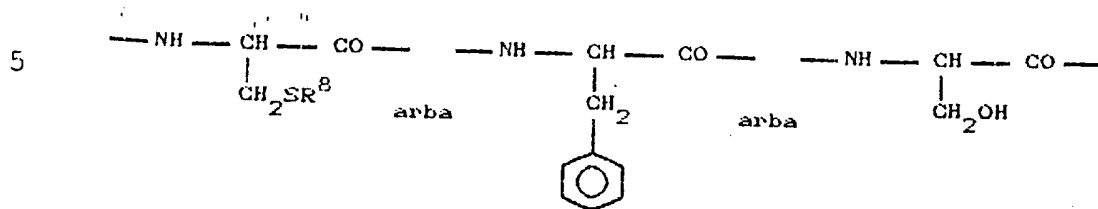
30 R^c reiškia

30



35

R^d reiškia



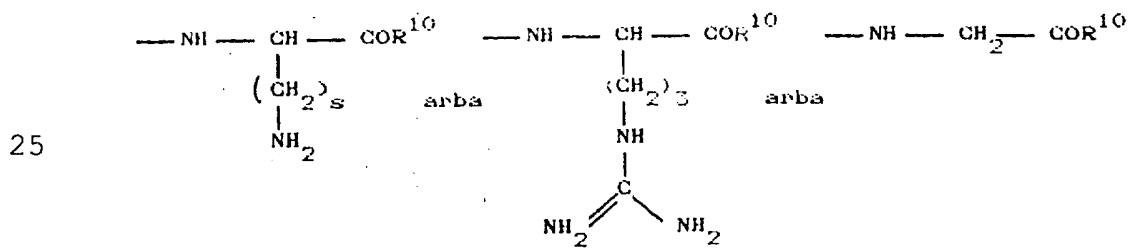
10

R^e reiškia



R^f reiškia

20



30 (kuriose

n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

p, q ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2;

s reiškia 3 arba 4;

R¹ ir R² abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia okso grupę;

5 R³ ir R⁴ abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia jungtį anglis-anglis;

R⁵ yra vandenilis arba acilo grupė;

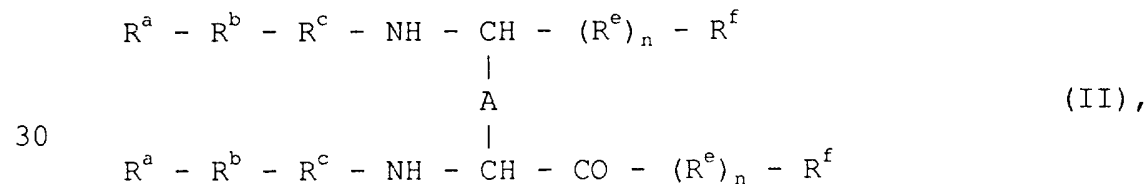
10 kiekvienas R⁶ ir R⁷ nepriklausomai reiškia hidroksilo grupę arba amino grupę, bet tinkamesnės yra hidroksilo grupės;

15 R⁸ reiškia vandenilį; C₂₋₆ alkilo grupę; C₇₋₂₀ aralkilo grupę, kuri gali turėti vieną arba daugiau hidroksilo, amino arba metoksi pakaitalų; arba metaboliškai labiliają S-apsauginę grupę;

R⁹ reiškia vandenilį, arba metilo grupę; ir

20 R¹⁰ reiškia hidroksilo arba amino grupę, aminorūgštis glutamino liekaną arba peptidą, turintį N-galinį glutamino fragmentą).

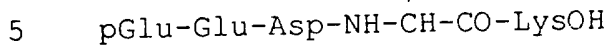
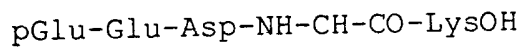
25 4. Peptidiniai junginiai pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t y s t u o , k a d a p r a š o m i (II) formule



kurioje -A- yra tokia, kaip apibrėžta 1 punkte, o R^a, R^b, R^c, R^e, R^f ir n yra tokie, kaip apibrėžti 3 punkte.

35

5. Peptidiniai junginiai pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t y s t u o , k a d a p r a š o m i formule



kurioje -A- yra tokia, kaip apibrėžta 1 punkte.

6. Farmacinė kompozicija, kuri sudaryta iš peptidinio junginio ir farmaciškai tinkamo nešiklio arba užpildo, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad peptidinis junginys yra junginys pagal bet kuri iš 1-5 punktų.

7. Peptidiniai junginiai pagal bet kuri iš 1-5 punktų, skirti naudoti mielopoezės arba kaulų čiulpų regeneravimo stimuliacijai.

8. Peptidinių junginių pagal bet kuri iš 1-5 punktų gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

20

a) bis-laktimo eterį metalina ir po to alkilina, kad gautų bis-laktimo dipeptido eterį;

25

b) a) stadijos bis-laktimo dipeptidini eterį hidrolizuoja, kad gautų tiltelinę α, α' -diaminorūgštį;

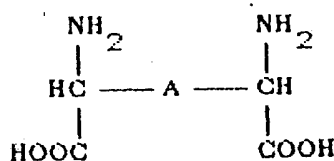
c) likusias aminorūgštis įveda į peptido grandinę; ir

d) vykdo bet kurios apsauginės grupės deblokavimą.

30

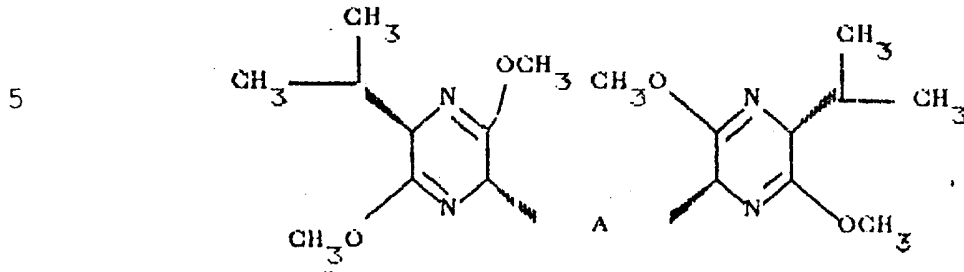
9. Tiltelinės α, α' -diaminorūgštys formulės

35



kurioje -A- yra tokia, kaip apibrėžta 1 punkte.

10. Bis-laktimo dipeptidiniai eteriai formulės



10

kurioje -A- yra tokia, kaip apibrėžta 1 punkte.