FI000120199B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120199 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **31.07.2009**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C07D 473/34 (2006.01)
C07D 473/18 (2006.01)
C07D 473/16 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **951128**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **10.03.1995**

(24) Alkupäivä - Löpdag **10.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **15.09.1995**

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

14.03.1994 DE 4408534 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Breipohl, Gerhard, Geisenheimer Strasse 95, 60529 Frankfurt, SAKSA, (DE)
2 • Uhlmann, Eugen, Zum Talblick 31, 61479 GLASHÜTTEN, SAKSA, (DE)
3 • Knolle, Jochen, Höchster Strasse 21, 65830 Kriftel, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Substituoituja N-etyyliglysiinijohdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö PNA- ja PNA-/DNA-hybridien valmistamiseksi

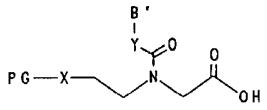
Substituerade N-etylglycinderivat, förfarande för deras framställning och deras användning för framställning av PNA- och PNA-/DNA- hybrider

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

---

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee N-etyyliglysiinijohdannaisia, joiden kaava on I:



(I),

jossa PG on heikkojen happojen suhteen labiili aminosuojaryhmä, joka on uretaanityyppiä tai trityylityyppiä, X on NH, O tai S, Y on CH_2, NH tai O, ja B' on nukleotidikemiassa tavallinen emäs, jonka eksosykliset amino- tai hydroksiryhmät on suojattu sopivilla suojaryhmillä, tai emäskorvausyhdiste, ja niiden suoloja tertiaaristen orgaanisten emästen kanssa, sekä menetelmää niiden valmistamiseksi. Kaavan I mukaisilla N-etyyliglysiinijohdannaisilla on käyttöä PNA- ja PNA-/DNA-hybridien valmistuksessa.

Uppfinningen avser N-etylglycinderivat med formeln (I), vari PG är en gentemot svaga syror labil aminoskyddsgrupp av uretantyp eller av trityltyp, X är NH, O eller S, Y är CH_2, NH eller O, och B' betecknar i nukleotidkemin sedvanliga baser, vilkas exocykliska amino- respektive hydroxigrupper skyddas av lämpliga kända skyddsgrupper, eller basersättningsföreningar och deras salter med tertiära organiska baser samt ett förfarande för deras framställning. N-etylglycinderivaten med formeln I är användbara vid framställningen av PNA och PNA-/DNA-hybrider.

Substituoituja N-etyyliglysiinijohdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö PNA- ja PNA-/ DNA-hybridien valmistamiseksi

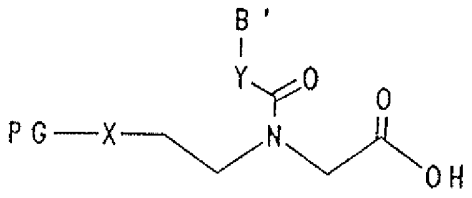
Esillä oleva keksintö koskee uusia substituoituja N-etyyliglysiinijohdannaisia, menetelmää niiden valmistamiseksi sekä niiden käyttöä PNA- ja PNA-/DNA-hybridien valmistamiseksi.

Peptidi- tai polyamidinukleiinihapot (PNA) ovat DNA-analogiyhdisteitä, joissa deoksiriboosifosfaattirunko on korvattu peptidioligomeerillä. Tähän mennessä kirjallisuudessa [esim. Michael Egholm, Peter E. Nielsen, Rolf H. Berg ja Ole Buchardt, Science 254 (1991) 1497 - 1500; Ole Buchardt, Michael Egholm, Peter E. Nielsen ja Rolf H. Berg, WO 92/20702] kuvatuissa synteeseissä käytetään monomeerin aminoryhmän tilapäiseksi suojaamiseksi happolabiilia tert-butoksikarbonyyli- (Boc-) suojaryhmää, joka lohkotaan pois keskivahvoilla hapoilla, kuten esim. trifluorietikkahappo. Oligomeerien kiinteäfaasisynteesi noudattaa tällöin tavanomaista peptidisynteesimenetelmää esim. Merrifieldin [B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2149] kuvaaman mukaisesti. PNA-oligomeerin lohkaiseminen tapahtuu tällöin voimakkaalla hapolla, tavallisesti nestemäisellä fluorivedyllä.

Toistuva käsittely trifluorietikkahapolla ja sitä seuraava pilkkominen fluorivedyllä ei sovi seka-PNA/DNA-sekvenssien synteesiin, sillä näissä olosuhteissa nukleosidisidos ei ole stabiili. Erityisesti puriininukleotidit desoksiguanosiini ja desoksiadenosiini tulevat voimakkailla hapoilla nopeasti pilkotuiksi N-glykosidisidoksesta. Lisäksi olisi tämän tapaisten molekyylien synteesiin tavallisten DNA-syntetisaattorien käyttäminen ja pitkälle menevä näissä laitteissa käytetyn kemian säilyttäminen erityisen toivottavaa. Tämä koskee myös PNA-sekvenssien valmistusta tällaisten laitteiden avulla.

Keksinnön päämäärä on tämän vuoksi antaa käyttöön glysiinijohdannaisia, jotka tekevät mahdolliseksi yksinkertaisen PNA- ja PNA-/DNA-hybridien rakentamisen sekä automaattisten syntetisaattorien käytön.

Tähän tarkoitukseen sopivia aineita ja siten keksinnön kohteena ovat yhdisteet, joiden kaava on I:



(I),

jossa

PG on heikkojen happojen suhteen labiili aminonsuojaryhmä, joka on uretaanityyppiä, kuten esim. 1-(1-adamantyyli)-1-metyylietoksikarbonyyli (Adpoc), 1-(3,5-di-tert-butyylifenyyli)-1-metyylietoksikarbonyyli (t-Bumeoc) ja 1-metyyli-1-(4-bifenyyli)etyylioksikarbonyyli (Bpoc), 3,5-dimetoksifenyyli-2-propyyli-2-oksikarbonyyli (Ddz), tai joka on trityylityyppiä, kuten trifenyylimetyyli (Trt), (4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli (Mmt), (4-metyylifenyyli)difenyylimetyyli (Mtt), di-(4-metoksifenyyli)fenyylimetyyli (Dmt) ja 9-(9-fenyyli)ksantenyyli (Pixyl),

X on NH, O tai S, edullisesti NH tai O,

Y on CH_2, NH tai O, edullisesti CH_2, ja

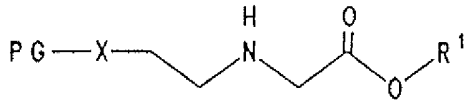
B' on nukleotidikemiassa tavallinen emäs, esimerkiksi luonnollinen emäs, kuten adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini ja urasiili, tai ei-luonnollinen emäs, kuten puriini, 2,6-diaminopuriini, 7-deatsa-adeniini, 7-deatsaguaniini, N^4N^4-etanosytosiini, N^6N^6-etano-2,6-diaminopuriini, 5-metyylisytosiini, 5-C_{3-6}-alkynyyliurasiili, 5-C_{3-6}-alkynyylisytosiini, 5-fluoriurasiili ja pseudoisosytosiini, joiden eksosykliset amino- tai hydroksiryhmät on

suojattu sopivilla tutuilla suojaryhmillä, kuten bentsoyyli-, isobutanoyyli-, asetyyli-, fenoksiasetyyli-, 4-(t-butyyli)bentsoyyli-, 4-(t-butyyli)fenoksiasetyyli-, 4-(metoksi)bentsoyyli-, 2-(4-nitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 2-(2,4-dinitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli-, difenyylikarbamoyyli- tai formamidiiniryhmä, edullisesti bentsoyyli-, isobutanoyyli-, asetyyli-, fenoksiasetyyli-, 4-(t-butyyli)bentsoyyli-, 4-(metoksi)bentsoyyliryhmä, tai myös guaniini suojattuna 2-N-asetyylin ja 6-O-defenyylikarbamoyylin yhdistelmällä, tai emäskorvausyhdiste, kuten esim. imidatsoli, triatsoli tai nitroimidatsoli,

sekä niiden suolat, edullisesti niiden suolat orgaanisten tertiaaristen emästen, kuten esim. trietyyliamiini tai pyridiini, kanssa.

Keksintö koskee myös menetelmää kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jolloin

a) yhdiste, jonka kaava on II:



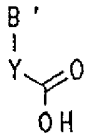
(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten patenttivaatimuksessa 1,

R^1 on vety tai esterinsuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on III:



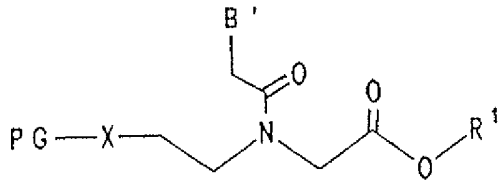
(III)

jossa

B' määritellään kuten edellä ja

Y on CH_2,

0 - 45 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa käyttäen peptidikemiassa tavallista kytkentäreagenssia, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on IV:



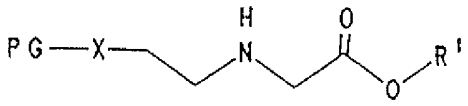
(IV)

jossa

PG, X, B' ja R^1 määritellään kuten edellä,

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan pilkkomalla esterinsuojaryhmä R^1 heikosti alkalisissa olosuhteissa alkalilipeällä tai tertiaarisilla amiiniyhdisteillä vedessä tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi, tai

b) yhdiste, jonka kaava on II:



(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on vety tai tilapäinen silyylisuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on V:

$$B' - CH_2 - CO - R^2 \qquad (V)$$

jossa

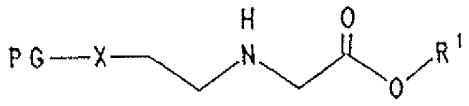
B' määritellään kuten edellä ja

R^2 on halogeeni tai aktiiviesteritähde,

0 - 40 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa, jolloin mahdollisesti voidaan suorittaa happofunktion kaavan II mukaisessa yhdisteessä ti-

lapäinen suojaaminen saattamalla reagoimaan tavallisten silylointireagenssien kanssa ja tämän tilapäisen suojaryhmän pilkkominen - sen jälkeen kun on saatettu reagoimaan kaavan V mukaisen yhdisteen kanssa - lisäämällä vettä tai alkoholeja reaktioseokseen, tai

c) yhdiste, jonka kaava on II:



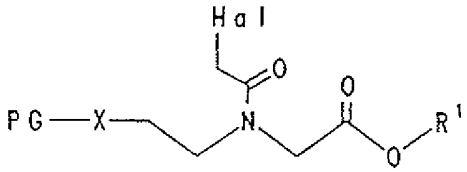
(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä ja

R^1 on esterinsuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan halogeenietikkahappojohdannaisen kanssa sopivassa liuottimessa apuemästä käyttäen, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on VI:



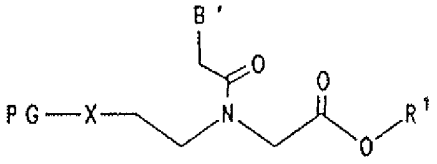
(VI),

jossa

Hal on Cl, Br tai I, ja

PG, X ja R^1 määritellään kuten edellä,

tämä välituoteyhdiste, jonka kaava on VI, muutetaan mahdollisesti suojatulla nukleoemäksellä B' ja apuemäksellä sopivassa liuottimessa yhdisteeksi, jonka kaava on IV:



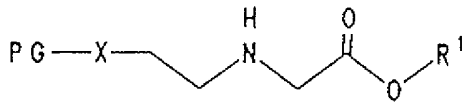
(IV)

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan pilkkomalla esterinsuojaryhmä R^1 alkalilipeällä tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa sopivassa

liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa Y on CH_2, voidaan siten saada esimerkiksi siten, että

yhdiste, jonka kaava on II:



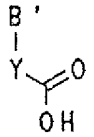
(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on vety tai esterinsuojaryhmä, kuten esim. metyyli, etyyli, butyyli tai 2-(metoksietoksi)etyyli,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on III:



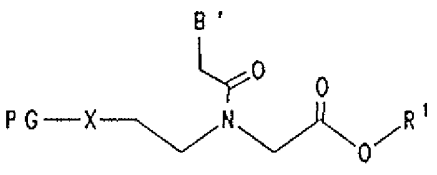
(III)

jossa

B' määritellään kuten edellä ja

Y on CH_2,

0 - 45 °C:ssa, edullisesti huoneenlämpötilassa, sopivassa liuottimessa, kuten esim. DMF, asetonitriili, dikloorimetaani tai näiden liuottimien seokset, käyttäen peptidikemiassa tavallista kytkentäreagenssia, kuten esim. karbodi-imidit, fosfoniumreagenssit, uroniumreagenssit, happohalogenidit, aktivoidut esterit, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on IV:



(IV)

jossa

PG, X, B' ja R^1 määritellään kuten edellä,

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan lohkaisemalla esterinsuojaryhmä R^1 heikosti alkalisissa olosuhteissa alkalilipeällä, kuten esim. NaOH, LiOH, KOH, tai tertiaarisilla amiiniyhdisteillä vedessä, kuten esim. trietyyliamiinilla, tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa, edullisesti huoneenlämpötilassa sopivassa liuottimessa, kuten dioksaani, vesi, tetrahydrofuraani, metanoli, vesi tai näiden liuottimien seoksissa, kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

Peptidisynteesissä tavanomaisia aktivointimenetelmiä kuvaavat esim. Houben-Weyl, "Methoden der Organischen Chemie", osa 15/2, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974, tai muita reagensseja kuten esim. BOP [B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin ja C. Selve, Tetrahedron Lett. 1975 1219 - 1222), PyBOP [J. Coste, D. Le-Nguyen ja B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990 205 - 208], BroP [J. Coste, M.-N. Dufour, A. Pantaloni ja B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990 669 - 672], PyBroP [J. Coste, E. Frerot, P. Jouin ja B. Castro, Tetrahedron Lett. 1991 1967 - 1970] ja uroniumregenssit kuten esim. HBTU [V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, Synthesis 1984 572 - 574], TBTU, TPTU, TSTU, TNTU [R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth ja D. Gillesen, Tetrahedron Lett. 1989 1927 - 1930], TOTU (EP-A-0 460 446), HATU [L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 4397 - 4398], HAPyU, TAPipU [A. Ehrlich, S. Rothemund, M. Brudel, M. Beyermann, L.A. Carpino ja M. Bienert, Tetrahedron Lett. 1993 4781 - 4784], BOI [K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara ja Y. Kiso, Tetrahedron Lett. 1992 3177 - 3180] tai happokloridit tai happofluoridit [L.A. Carpino, H.G. Chao, M. Beyermann ja M. Bienert, J. Org. Chem. 56 (1991) 2635; J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther ja G. Sennyey kirjassa E. Giralt ja D. Andreu (toim.), "Peptides 1990", Escom

Science Publishers B.V., 1991, ss. 53 - 54; J. Green ja K. Bradley, Tetrahedron 1993 4141 - 4146], 2,4,6-mesityleenisulfonyyli-3-nitro-1,2,4-triatsolidi (MSNT) [B. Blankemeyer-Menge, M. Nimitz ja R. Frank, Tetrahedron Lett. 1990 1701 - 1704], 2,5-difenyyli-2,3-dihydro-3-okso-4-hydroksitiofendioksidi (TDO) [R. Kirstgen, R.C. Sheppard, W. Steglich, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987 1870 - 1871] tai aktivoidut esterit (D. Hudson, Peptide Res. 1990 51 - 55) kuvataan kulloisessakin kirjallisuuskohdassa.

Edullisesti käytetään karbodi-imidejä, esim. disykloheksyylikarbodi-imidiä tai di-isopropyylikarbodi-imidiä. Edullisesti käytetään myös fosfoniumreagensseja, kuten esim. PyBOP tai PyBroP, uroniumreagensseja, kuten esim. HBTU, TBTU, TPTU, TSTU, TNTU, TOTU, HATU tai BOI, tai happoklorideja tai happofluorideja.

Kaavan II mukaisten yhdisteiden synteesiä varten aminoetyyliglysiini, hydroksietyyliglysiini, merkaptoetyyliglysiini tai niitä vastaava esteri varustetaan vastaavalla heikkojen happojen suhteen labiililla suojaryhmällä. Heikkojen happojen suhteen labiilin suojaryhmän liittäminen tapahtuu tällöin sinänsä kirjallisuudesta tunnetuilla, osittain modifioiduilla menetelmillä. Sopivia reagensseja ovat esim. t-Bumeoc-fluoridi, Adpoc-atsidi, Bpoc-atsidi, Ddz-(fenyyli)karbonaatti, Trt-Cl, Mtt-Cl, Mmt-Cl, Dmt-Cl, Pixyl-Cl. Tässä reaktiossa voidaan aminoetyyliglysiinin liukoisuutta parantaa samanaikaisesti suojaten happofunktio suorittamalla reaktio tavallisten silylointireagenssien, kuten esim. bis-trimetyylisilyyliasetamidin, kanssa. Tämän tilapäisen suojaryhmän lohkaiseminen pois tapahtuu sen jälkeen, kun on saatettu reagoimaan suojaryhmäreagenssien kanssa, lisäämällä vettä tai alkoholeja reaktioseokseen. Lähtömateriaalina käytetty aminoetyyliglysiini tai vastaava aminoetyyliglysiiniesteri valmistetaan kirjallisuudesta tutuilla menetelmillä [E.P. Heimer, H.E. Gallo-Torres, A.M. Felix, M. Ahmad, T.J. Lambros, F. Scheidl ja

J. Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 23 (1984) 203 - 211].

Toinen menetelmä aminoetyyliglysiinin valmistamiseksi käsittää glyoksyylihapon pelkistävän aminoinnin etyleenidiamiinilla ja sitä kuvataan patenttihakemuksessa, jonka otsikko on "Menetelmä aminoetyyliglysiinin valmistamiseksi" (HOE 94/F 061, DE-P 44 08 530.3).

2-hydroksietyyliglysiinin tai 2-merkaptoetyyliglysiinin synteesi tapahtuu esim. pelkistävästi aminoimalla glyoksyylihappoa tai glyoksyylihappoestereitä aminoetanolilla tai kysteamiinilla vedyllä käyttäen palladiumia hiilellä tai 2-merkaptoetyyliglysiinin kyseessä ollen edullisesti natriumsyanoboorihydridiä tai natriumtriasetoksiboorihydridiä pelkistimenä.

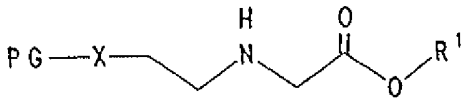
2-merkaptoetyyliglysiinistä johdettu kaavan I mukainen yhdiste voidaan saada myös siten, että ensin saatetaan reagoimaan 2-merkaptoetyyliamiini tai sen hydrokloridi etikkahapossa tai etikkahappo/vesi-seoksissa vastaavan trifenyylijohdannaisen kanssa, kuten esim. niiden halogenidit tai alkoholit. Reaktio suoritetaan happamissa olosuhteissa vastaavan trityylikationin välityksellä edullisesti 2-merkaptoetyyliamiinin rikissä. Edullisesti käytetään (4-metoksifenyyli)difenyylimetyylikloridia Mmt-ryhmän liittämiseksi tai di-(4-metoksifenyyli)fenyylimetyylikloridia Dmt-ryhmän liittämiseksi. Sitten aminoryhmä alkyloidaan reaktiolla halogeenietikkahappoesterien kanssa, edullisesti bromietikkahappoesterien kanssa, käyttäen orgaanista apuemästä kuten esim. di-isopropyylietyyliamiinia sopivassa liuottimessa, kuten esim. DMF. Tällöin syntyvä kaavan II mukainen yhdiste, jossa PG on trityylityyppiä oleva suojaryhmä, X on S ja R^1 on esterinsuojaryhmä, voidaan sitten muuttaa edellä kuvatulla tavalla vastaaviksi kaavan I mukaisiksi yhdisteiksi.

Kaavan III mukaiset nukleoemäsetikkahappojohdannaiset voidaan saada alkyloimalla vastaavia nukleoemäksiä

tai eksosyklisessä hydroksi- tai aminofunktiossa suojattuja nukleoemäksiä kloorietikkahapolla, bromietikkahapolla, jodietikkahapolla tai niiden estereillä. Mahdollisesti tällöin nukleoemäkseen liitetään selektiivisen alkyloinnin suorittamiseksi lisäksi tilapäisiä suojaryhmiä. Nukleoemästen suojaryhmänä voidaan käyttää kaikkia heikkojen happojen suhteen labiilin suojaryhmän PG kanssa yhteensopivia suojaryhmiä. Eksosykliselle aminofunktiolle käytetään edullisesti suojaryhmiä, kuten bentsoyyli-, isobutanoyyli-, asetyyli-, fenoksiasetyyli-, 4-(t-butyyli)bentsoyyli-, 4-(t-butyyli)fenoksiasetyyli-, 4-(metoksi)bentsoyyli-, 2-(4-nitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 2-(2,4-dinitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli-, difenyylikarbamoyyli- tai formamidiiniryhmää. Erityisen edullisia ovat bentsoyyli-, isobutanoyyli-, 4-(t-butyylibentsoyyli-, 2-(4-nitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 2-(2,4-dinitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli, 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli-, 4-(metoksi)bentsoyyli- tai para-(t-butyyli)fenoksiasetyyli-, para-nitrofenyyli-2-etyylioksikarbonyyliryhmät ja guaniinille 2-N-asetyylin yhdistelmä 6-O-difenyylikarbamoyyliryhmän kanssa.

Vaihtoehtoinen menetelmä kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, joissa Y on CH_2, on, että

yhdiste, jonka kaava on II:



(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on vety tai tilapäinen silyylisuojaryhmä, kuten esim. trimetyylisilyyli,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on V:

$$B' - CH_2 - CO - R^2 \qquad (V)$$

jossa

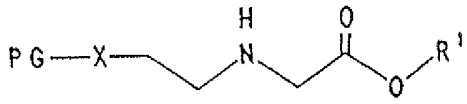
B' määritellään kuten edellä, ja

R^2 on halogeeni, kuten esim. fluori, kloori tai bromi, tai aktiiviesteritähde, kuten esim. OBt, OObt, OPfp, ONSu,

0 - 40 °C:ssa, edullisesti 20 - 30 °C:ssa, sopivassa liuottimessa kuten esimerkiksi DMF, NMP, asetonitriili, dikloorimetaani tai näiden liuottimien seokset, jolloin mahdollisesti happofunktion kaavan II mukaisessa yhdisteessä tilapäinen suojaaminen voidaan suorittaa suorittamalla reaktio tavallisten silylointireagenssien, kuten esim. bis-trimetyylisilyyliasetamidin, kanssa, ja tämä tilapäinen suojaryhmä lohkaistaan pois - sen jälkeen kun on saatettu reagoimaan kaavan V mukaisen yhdisteen kanssa - lisäämällä vettä tai alkoholeja reaktioseokseen.

Toinen vaihtoehtoinen menetelmä kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, joissa Y on CH_2, on, että

yhdiste, jonka kaava on II:



(II),

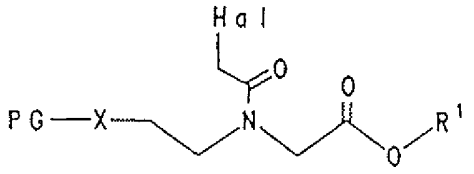
jossa

PG ja X määritellään kuten edellä ja

R^1 on esterinsuojaryhmä, kuten esim. metyyli, etyyli, butyyli, 2-(metoksietoksi)etyyli,

saatetaan reagoimaan halogeenietikkahappojohdannaisen, kuten esim. kloorietikkahappokloridi, bromietikkahappobromidi, bromietikkahappokloridi tai jodietikkahappokloridi, kanssa sopivassa liuottimessa, kuten esim. tetrahydrofuraani, dikloorimetaani tai DMF, käyttäen apuemästä, kuten esim. trietyyliamiini, N-etyylimorfoliini tai di-

isopropyylietyyliamiini, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on VI:



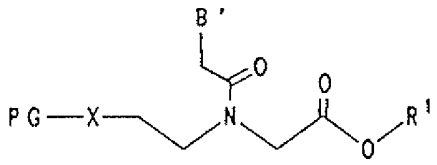
(VI),

jossa

Hal on Cl, Br, I, edullisesti Br tai Cl, aivan erityisen edullisesti Cl, ja

PG, X ja R^1 määritellään kuten edellä,

tämä kaavan VI mukainen välituoteyhdiste muutetaan reaktiolla mahdollisesti suojatun nukleoemäksen B' ja apuemäksen, esim. kaliumkarbonaatin, kanssa sopivassa liuottimessa, esim. DMF tai NMP, yhdisteeksi, jonka kaava on IV:

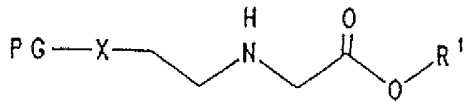


(IV)

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan lohkaisemalla esterinsuojaryhmä R^1 pois alkalilipeällä, kuten esim. NaOH, LiOH, KOH, tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa, edullisesti huoneenlämpötilassa sopivassa liuottimessa kuten dioksaani, vesi, tetrahydrofuraani, metanoli, vesi tai näiden liuottimien seokset kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa Y on O tai NH, saadaan siten, että

yhdiste, jonka kaava on II:



(III),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on esterinsuojaryhmä, kuten esim. metyyli, etyyli, butyyli, 2-(metoksietoksi)etyyli, tai tilapäinen esterinsuojaryhmä, kuten esim. trimetyylisilyyli,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on VII:

$$B' - Y - CO - R^3 \qquad (VII)$$

jossa

B' määritellään kuten edellä,

Y on O tai NH, ja

R^3 on Cl, ONp, ONSu,

0 - 40 °C:ssa, edullisesti 20 - 30 °C:ssa, sopivassa liuottimessa, kuten DMF, asetonitriili tai dikloorimetaani tai näiden liuottimien seokset, minkä jälkeen esterinsuojaryhmä R^1 lohkaistaan pois alkalilipeällä, kuten esim. NaOH, LiOH, KOH, tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa, edullisesti huoneenlämpötilassa, sopivassa liuottimessa kuten dioksaani, vesi, tetrahydrofuraani, metanoli, vesi tai näiden liuottimien seokset.

Lähtömateriaaliksi viimemainittuun reaktioon tarvittavat N-amino- tai N-hydroksinukleoemäkset saadaan tutuilla menetelmillä, kuten kuvaavat esim. K. Kohda, I. Kobayashi, K. Itano, S. Asano, Y. Kawazoe [Tetrahedron 49 (1993) 3947 - 3958], minkä jälkeen ne muutetaan fosgeenilla tai kloorimuurahaishappoestereillä kaavan VII mukaisiksi karbamaateiksi tai karbonaateiksi.

Aminohapoista käytetyt lyhenteet vastaavat peptidikemiassa tavallista kolmikirjainkoodia kuten kuvataan julkaisussa Europ. J. Biochem. 138 (1984) 9. Muut käytetyt lyhenteet luetellaan alla.

Aeg	N-(2-aminoetyyli)glysyyli, -NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CO-
Aeg(A^{MeOBz})	N-(2-aminoetyyli)-N-((9-(N^6-4-metoksibentsoyyli)adenosyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg(C^{Bz})	N-(2-aminoetyyli)-N-((1-(N^4-bentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg(C^{MeOBz})	N-(2-aminoetyyli)-N-((1-(N^4-4-metoksibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg(C^{tBuBz})	N-(2-aminoetyyli)-N-((1-(N^4-4-tert-butyylibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg(G^{iBu})	N-(2-aminoetyyli)-N-((9-(N^2-isobutanoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg-($G^{2\text{-}Ac,4\text{-}Dpc}$	N-(2-aminoetyyli)-N-((9-(N^2-asetyyli-O^4-difenyylikarbamoyyli)guanosyyli)glysyyli
Aeg(Im)	N-(2-amino)etyyli-N-((1-imidatsolyyli)-asetyyli)glysyyli
Aeg($Im^{4\text{-}nitro}$)	N-(2-amino)etyyli-N-((1-(4-nitro)imidatsolyyli)asetyyliglysyyli
Aeg(T)	N-(2-aminoetyyli)-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysyyli
Aeg(Triaz)	N-(2-amino)etyyli-N-((1-(1,2,4)triatsolyyli)asetyyli)glysyyli
Bnpeoc	2,2-[bis(4-nitrofenyyli)]etoksikarbonyyli)
Boc	tert-butoksikarbonyyli
BOI	2-(bentsotriatsol-1-yyli)oksi-1,3-dimetyyli-imidatsolidiniumheksafluorifosfaatti
BOP	bentsotriatsolyyli-1-oksi-tris(dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaatti

BroP	bromi-tris(dimetyyliamino)fosfoniumheksa-fluorifosfaatti
BSA	N,O-bis(trimetyylisilyyli)asetamidi
But	tert-butyyli
Bz	bentsoyyli
Bzl	bentsyyli
Cl-Z	4-klooribentsyylioksikarbonyyli
CPG	Controlled Pore Glass (kontrolloitu huokoslasi)
DBU	1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni
DCM	dikloorimetaani
Ddz	3,5-dimetoksifenyyli-2-propyyli-2-oksikar-bonyyli
DMF	dimetyyliformamidi
Dmt	di(4-metoksifenyyli)fenyylimetyyli
Dnpeoc	2-(2,4-dinitrofenyyli)etoksikarbonyyli
Dpc	difenyylikarbamoyyli
FAM	fluoreseiinitähde
Fm	9-fluorenyylimetyyli
Fmoc	9-fluorenyylimetyylioksikarbonyyli
H-Aeg-OH	N-(2-aminoetyyli)glysiini
HAPyU	O-(7-atsabentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-bis(tetrametyleeni)uroniumheksafluorifosfa atti
HATU	O-(7-atsabentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti
HBTU	O-(bentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetra-metyyliuroniumheksafluorifosfaatti
HOBt	1-hydroksibentsotriatsoli
HONSu	N-hydroksisukkinimidi
HOObt	3-hydroksi-4-okso-3,4-dihydrobentsotriat-siini
iBu	isobutanoyyli
MeOBz	4-metoksibentsoyyli
Mmt	4-metoksitrifenyylimetyyli

Moz	4-metoksibentsyylioksikarbonyyli
MSNT	2,4,6-mesityleenisulfonyyli-3-nitro1,2,4-triatsolidi
Mtt	4-(metyylifenyyli)difenyylimetyyli
NBA	nitrobentsyylialkoholi
NMP	N-metyylipyrrolidiini
Oeg	N-(2-oksietyyli)glysyyli, $-O-CH_2-CH_2-NH-CH_2CO-$
Pixyl	9-(9-fenyyli)ksantenyyli
PyBOP	bentsotriatsolyyli-1-oksitripyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
PyBroP	bromitripyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
TAPipU	O-(7-atsabentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-bis(pentametyleeni)uroniumtetrafluoriboraatti
TBTU	O-(bentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti
tBu	tert-butyyli
tBuBz	4-tert-butyylibentsoyyli
TDBTU	O-(3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-bentsotriatsin-3-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti
TDO	2,5-difenyyli-2,3-dihydro-3-okso-4-hydroksitiofendioksidi
Teg	N-(2-tioetyyli)glysyyli, $-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CO-$
TFA	trifluorietikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
TNTU	O-[(5-norborneeni-2,3-dikarboksimido]-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti

TOTU	O-[(syano(etoksikarbonyyli)metyleeni)-amino]-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti
TPTU	O-(1,2-dihydro-2-okso-1-pyridyyli)-1,1,3,3'-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti
Trt	trityyli
TSTU	O-(N-sukkinimidyyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti
Z	bentsyylioksikarbonyyli
MS(ES^+)	elektronisuihkumassaspektri (positiivinen ioni)
MS(ES^-)	elektronisuihkumassaspektri (negatiivinen ioni)
MS(DCI)	desorptio-kemiallinen ionisaatiomassaspektri
MS(FAB)	nopea atomipommitusmassaspektri

Esimerkkejä

Esimerkki 1

N-(hydroksietyyli)glysiinin valmistus (H-Oeg-OH)

46 g glyoksyylihappo-monohydraattia liuotetaan 1 000 ml:aan vettä, minkä jälkeen samalla jäähdyttäen ja sekoittaen liuokseen lisätään 30,2 ml 2-aminoetanolia. Seokseen lisätään 10 g katalyyttiä (10 % Pd/C) ja hydrataan autoklaavissa 10 baarin vetypaineessa ja huoneenlämpötilassa. Jatkotyöstämiseksi katalyytti suodatetaan imulla eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Jäännös tislataan kahdesti pienen määrän tolueenia kanssa. Tätä raakatuotetta käsitellään 250 ml:lla kuumaa metanolia, se suodatetaan lämpimänä imulla eroon, pestään pienellä määrällä metanolia ja kuivataan sitten eksikaattorissa.

Saanto: 49,56 g

Sp.: 178 - 180 °C, haj.

R_f: 0,36 (n-butanoli/etikkahappo/vesi/etyyliasetaatti, 1:1:1:1)

MS (DCI): 120 $(M + H)^+$.

Esimerkki 2

N-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)-N-(hydroksietyyli)glysiinin synteesi (H-Oeg(Fmoc)-OH)

10,08 g natriumvetykarbonaattia liuotetaan 150 ml:aan vettä, minkä jälkeen lisätään 7,15 g N-(hydroksietyyli)glysiiniä samalla sekoittaen. Noin 5 minuutin kuluttua saadaan kirkas liuos, johon lisätään tipoittain 20,22 g Fmoc-ONSu:ta 300 ml:ssa dioksaania samalla hyvin sekoittaen. Seosta sekoitetaan vielä 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa ja se jätetään yöksi 4 °C:seen seisomaan. Liuos suodatetaan ja suodos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin. Jäännös lietetään 100 ml:aan vettä ja pH säädetään 2:een lisäämällä pieninä erinä kaliumvetysulfaattiliuosta. Sitten seosta uutetaan kolmasti 150 ml:lla etyyliasetaattia, orgaaninen faasi pestään neljästi 50 ml:lla vettä ja kuivataan natriumsulfaatilla. Kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännökseen lisätään 200 ml di-isopropyylieetteriä ja trituroidaan, jolloin tapahtuu kiteytyminen. Seos jätetään yöksi seisomaan, sakka suodatetaan eroon ja uudelleenkiteytetään etyyliasetaatti/di-isopropyylieetteristä. Näin saatu tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 15,8 g

Sp.: 114 - 116 °C, haj.

R_f = 0,62 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1)

MS (ES^+): 342 $(M + H)^+$.

Esimerkki 3

N-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)-N-(4-metoksifenyylidifenyylimetoksietyyli)glysiinin synteesi (Mmt-Oeg(Fmoc)-OH)

14,74 g N-(fluorenyylimetoksikarbonyyli)-N-(hydroksietyyli)glysiiniä liuotetaan 160 ml:aan pyridiiniä ja lisätään 13,31 g 4-metoksifenyylidifenyylimetyylikloridia. Seosta sekoitetaan 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa ja se jätetään yöksi 4 °C:seen seisomaan. Sitten liuotin haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa eroon ja jäännös lietetään 300 ml:aan etyyliasetaattia ja uutetaan kolmasti 30 ml:lla kyllästettyä bikarbonaattivesiliuosta. Sitten pestään vielä kolmasti 30 ml:lla vettä ja orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla. Kuivausaine suodatetaan eroon, suodos haihdutetaan noin 70 ml:n tilavuudeksi ja samalla sekoittaen lisätään tipoittain 700 ml di-isopropyylieetteriä. Saostunut tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 19,95 g

R_f: 0,45 (etyyliasetaatti/metanoli/trietyyliamiini, 60:40:1)

MS (FAB/MeOH/NBA): 658,3 $(M + 2Na)^+$.

Esimerkki 4

N^4-(4-metoksibentsoyyli)sytosiini

Esimerkki 4a

Sytosiinia (11,1 g) suspendoidaan kuivaan pyridiiniin (250 ml). Sitten lisätään tipoittain ruiskulla 4-metoksibentsoyylikloridia (17,06 g). Muodostuu lähes kirkas liuos, josta saostuu noin 10 minuutissa sakka. Seosta sekoitetaan vielä noin 1,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sakka suodatetaan eroon. Sakka on haluttu tuote.

Saanto: 20,5 g

MS (ES^+): 246 $(M + H)^+$

R_f: 0,77 (dikloorimetaani/isopropanoli, 8:2).

Esimerkki 4b

Sytosiinia (2,8 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (100 ml) ja lisätään trietyyliamiinia (2 ml). Sitten lisätään ruiskulla tipoittain 4-metoksibentsoehappoanhydridiä (7,2 g). Muodostuu lähes kirkas liuos, josta saostuu jon-

kin ajan kuluttua sakka. Sekoitetaan vielä noin 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sakka suodatetaan eroon. Sakka on haluttu tuote.

Saanto: 5,9 g

MS (ES^+): 246 $(M + H)^+$

R_f: 0,77 (dikloorimetaani/isopropanoli, 8:2).

Esimerkki 5

N^4-(4-metoksibentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiini

N^4-(4-metoksibentsoyyli)sytosiinia (12,25 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (250 ml) ja lisätään natriumhydridiä (1,25 g) pieninä erinä. Seosta kuumennetaan vähän aikaa 60 °C:ssa, kunnes vedyn kehitys on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa ruiskulla tipoittain bromietikkahappometyyliesteriä (4,75 ml). Seosta sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään pieni määrä hiilidioksidia metanolissa. Liuotin haihdutetaan tyhjössä pois ja jäljelle jääneeseen jäännökseen lisätään dikloorimetaania, minkä jälkeen se suodatetaan eroon. Suodatusjäännös pestään vielä pienellä määrällä vettä ja kuivataan sitten tyhjössä.

Saanto: 12,86 g

Sp.: 219 °C

MS (ES^+): 318 $(M + H)^+$

R_f: 0,71 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1).

Esimerkki 6

N^4-(4-metoksibentsoyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiini

N^4-(4-metoksibentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiinia (12,5 g) suspendoidaan veteen (100 ml) ja 0 °C:ssa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N vesiliuosta kontrolloiden pH:ta (pH 12), kunnes metyyliesteri on saippuoitunut. Reaktion edistymistä seurataan TLC:llä. Sitten reaktioliuos suodatetaan ja suodoksen pH säädetään 3:ksi lisäämällä 2 M kaliumvetysulfaattiliuosta, jolloin tuote

saostuu. Sakka suodatetaan eroon, se pestään pienellä määrällä kylmää vettä ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 11,5 g

Sp.: 270 - 275 °C, haj.

MS (ES^+): 304 $(M + H)^+$

R_f: 0,53 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1).

Esimerkki 7

N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)sytosiini

Sytosiinia (11,1 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (250 ml) ja lisätään trietyyliamiinia (15,4 ml). Sitten lisätään ruiskulla tipoittain 4-tert-butyylibentsoyylikloridia (18,6 ml). Seosta sekoitetaan vielä noin 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään lisää 4-tert-butyylibentsoyylikloridia (3,7 ml). Edelleen 2 tunnin kuluttua reaktio keskeytetään lisäämällä pieni määrä metanolia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännökseen lisätään dikloorimetaania ja vettä. Tällöin saostuva kiinteä aine on haluttu aine. Sakka suodatetaan eroon ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 15,7 g

MS (DCI): 272 $(M + H)^+$

R_f: 0,55 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 8

N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiini

N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)sytosiinia (14,96 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (250 ml), lisätään natriumhydridiä (1,32 g) pieninä erinä ja sekoitetaan seosta 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, kunnes vedyn kehittyminen on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa ruiskulla tipoittain bromietikkahappometyyliesteriä (5,2 ml). Sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään metanolia (10 ml). Liuotin haihdutetaan tyhjössä pois ja jäljelle jäänyt jäännös ositetaan dikloorimetaaniin ja veteen. Orgaaninen faasi pestään vedellä, se kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan suodatuk-

sen jälkeen tyhjössä kuiviin. Näin saatu raakatuote uudelleenkiteytetään isopropanolista ja kuivataan sitten tyhjössä.

Saanto: 8,0 g

Sp.: 189 - 193 °C, haj.

MS (DCI): 344 $(M + H)^+$

R_f: 0,72 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 9

N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiini

N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiinia (8,0 g) liuotetaan dioksaanin (50 ml) ja veden (10 ml) seokseen ja samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N vesiliuosta (pH 11 - 12). Kun metyyliesterin saippuoituminen on päättynyt TLC-kontrollin perusteella reaktioliuoksen pH säädetään 3:ksi 2 M kaliumvetysulfaattiliuoksella. Saostunut sakka suodatetaan eroon imulla. Raakatuote liuotetaan natriumkarbonaattiliuokseen ja saostetaan toistamiseen lisäämällä 2 M kaliumvetysulfaattiliuosta. Tuote suodatetaan eroon imulla, se pestään pienellä määrällä vettä ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 6,62 g

Sp.. 285 °C, haj.

MS (DCI): 330 $(M + H)^+$

R_f: 0,2 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 10

N^4-(bentsoyyli)-sytosiini

Sytosiinia (5,55 g) suspendoidaan kuivaan pyridiiniin (100 ml). Sitten lisätään ruiskulla tipoittain bentsoyylikloridia (6,4 ml). Muodostuu lähes kirkas liuos, josta noin 5 minuutissa saostuu sakka. Sekoitetaan vielä noin 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, lisätään sitten metanolia (100 ml) ja haihdutetaan seos tyhjössä kuiviin. Jäännöstä sekoitetaan isopropanolissa, se suodatetaan

eroon, pestään pienellä määrällä metanolia ja dietyylieetteriä ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 10,1 g

Sp.: < 305 °C

MS (DCI): 216 $(M + H)^+$.

Esimerkki 11

N^4-(bentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiini

N^4-(bentsoyyli)sytosiinia (4,3 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (60 ml) ja lisätään natriumhydridiä (0,48 g) pieninä erinä. Seosta lämmitetään vähän aikaa 40 °C:ssa, kunnes vetykehitys on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa tipoittain ruiskulla bromietikkahappometyyliesteriä (2,1 ml). Sekoitetaan vielä 2,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään metanolia (10 ml). Liuotin haihdutetaan tyhjössä pois ja jäljelle jääneeseen jäännökseen lisätään dikloorimetaania ja suodatetaan sitten. Suodatusjäännös pestään vielä pienellä määrällä vettä ja kuivataan sitten tyhjössä.

Saanto: 6,45 g

Sp.: 234 °C

MS (DCI): 288 $(M + H)^+$

R_f: 0,85 (etyyliasetaatti/metanoli, 8:2).

Esimerkki 12

N^4-(bentsoyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiini

N^4-(bentsoyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiinia (5,85 g) liuotetaan seokseen, jossa on dioksaania (80 ml) ja vettä (40 ml), ja samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N vesiliuosta (11,25 ml) (pH 11 - 12). Kun metyyliesterin saippuoituminen on päättynyt TLC-kontrollin perusteella, reaktioliuoksen pH säädetään 3:ksi lisäämällä 2 M kaliumvetysulfaattiliuosta. Saostunut sakka suodatetaan imulla eroon. Tämä raakatuote liuotetaan natriumkarbonaattiliuokseen ja saostetaan sitten toistamiseen lisäämällä 2 M kaliumvetysul-

faattiliuosta. Tuote suodatetaan imulla eroon, se pestään pienellä määrällä vettä ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 5,84 g

Sp.: 283 - 286 °C, haj.

MS (ES^+): 274 $(M + H)^+$

R_f: 0,15 (etyyliasetaatti/metanoli, 8:2).

Esimerkki 13

N^4-(tert-butyylioksikarbonyyli)sytosiini

Sytosiinia (11,1 g) suspendoidaan kuivaan pyridiiniin (250 ml). Sitten lisätään di-tert-butyylidikarbonaattia (21,8 g) ja 1 spaatelinkärjellinen 4-dimetyyliaminopyridiiniä. Seosta sekoitetaan 6 tunnin ajan 60 °C:ssa, jolloin muodostuu paksu sakka. Reaktioliuos jäähdytetään ja sakka suodatetaan imulla eroon. Sakkaa sekoitetaan lämpimässä vedessä, se suodatetaan imulla eroon ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 10,26 g

MS (DCI): 212 $(M + H)^+$

R_f: 0,6 (dikloorimetaani/metanoli, 6:4).

Esimerkki 14

N^4-(tert-butyylioksikarbonyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiini

N^4-(tert-butyylioksikarbonyyli)sytosiinia (1,6 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (30 ml), natriumhydridiä (0,19 g) lisätään pieninä erinä ja seosta sekoitetaan 1,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, kunnes vetykehitys on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa ruiskulla tipoittain bromietikkahappometyyliesteriä (0,84 ml). Seosta sekoitetaan vielä 5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään metanolia (1 ml). Liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäljelle jäänyttä jäännöstä puhdistetaan pylväskromatografisesti silikageelissä käyttäen dikloorimetaania eluenttina. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin.

Saanto: 1,1 g

MS (DCI): 284 $(M + H)^+$

R_f: 0,5 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5).

Esimerkki 15

N^4-(tert-butyylioksikarbonyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiini

N^4-(tert-butyylioksikarbonyyli)-N^1-metoksikarbonyylimetyylisytosiinia (4,2 g) suspendoidaan veteen (30 ml), ja 0 °C:ssa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N vesiliuosta pH:ta kontrolloiden (pH 12), kunnes metyyliesteri on saippuoitunut. Reaktion etenemistä seurataan TLC:n avulla. Sitten reaktioliuoksen pH säädetään 3:ksi lisäämällä etikkahappoa ja liuotin tislataan tyhjössä eroon. Raakatuotteen puhdistaminen tapahtuu pylväskromatografisesti silikageelissä käyttäen eluenttina dikloorimetaani/ metanoli/trietyyliamiinia, 8:1:1. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin.

Saanto: 3,5 g

Sp.: 95 - 98 °C, haj.

MS (FAB/NBA): 270,2 $(M + H)^+$

R_f: 0,35 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 8:1:1).

Esimerkki 16

N^6-(4-metoksibentsoyyli)adeniini

Adeniinia (13,5 g) suspendoidaan kuivaan pyridiiniin (250 ml). Sitten lisätään tipoittain ruiskulla 4-metoksibentsoyylikloridia (17,06 g). Seosta sekoitetaan 3 tunnin ajan 100 °C:ssa, minkä jälkeen se jätetään yöksi huoneenlämpötilaan seisomaan. Sitten reaktioliuokseen lisätään metanolia, minkä jälkeen liuotin tislataan eroon tyhjössä. Jäännös haihdutetaan vielä kahdesti kuiviin yhdessä pienen määrän tolueenia kanssa, minkä jälkeen sitä sekoitetaan kuumassa isopropanolissa. Seoksen annetaan jäähtyä hitaasti, saostunut tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 22,2 g

Sp.: 212 - 214 °C

MS (ES^+): 270 $(M + H)^+$

R_f: 0,67 (dikloorimetaani/isopropanoli, 8:2).

Esimerkki 17

N^6-(4-metoksibentsoyyli)-N^9-metyylioksikarbonyyli-metyyliadeniini

N^6-(4-metoksibentsoyyli)adeniinia (8,01 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (150 ml), lisätään natriumhydridiä (0,75 g) pieninä erinä ja sekoitetaan seosta 0,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, kunnes vetykehitys on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa ruiskulla tipoittain bromietikkahappometyyliesteriä (2,85 ml). Seosta sekoitetaan vielä 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään pieni määrä hiilidioksidia metanolissa. Liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäljelle jääneeseen jäännökseen lisätään dikloorimetaani/vettä, minkä jälkeen se suodatetaan eroon. Suodatusjäännös pestään vielä pienellä määrällä vettä ja kuivataan sitten tyhjössä.

Saanto: 4,03 g

MS (ES^+): 342 $(M + H)^+$

R_f: 0,76 (etyyliasetaatti/metanoli, 8:2).

Esimerkki 18

N^6-(4-metoksibentsoyyli)-N^9-karboksimetyyliadeniini

N^6-(4-metoksibentsoyyli)-N^9-metyylioksikarbonyyli-metyyliadeniinia (1,71 g) suspendoidaan veteen (40 ml) ja 0 °C:ssa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N liuosta pH:ta kontrolloiden (pH 11,2), kunnes metyyliesteri on saippuoitunut. Reaktion etenemistä seurataan TLC:n avulla. Sitten reaktioliuos suodatetaan ja suodoksen pH säädetään 3:ksi lisäämällä 2 M kaliumvetysulfaattiliuosta, jolloin tuote saostuu. Sakka suodatetaan eroon, se pestään pienellä määrällä kylmää vettä ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 1,52 g

Sp.: 222 - 223 °C; haj.

MS (ES^+): 328 $(M + H)^+$

R_f: 0,2 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1).

Esimerkki 19

N^2-(isobutanoyyli)guaniini

Guaniinia (3,02 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (40 ml) ja lisätään trietyyliamiinia (1,45 ml). Sitten lisätään ruiskulla tipoittain isovoihappokloridia (2,12 g). Seosta sekoitetaan 3 tunnin ajan 100 °C:ssa, minkä jälkeen reaktioliuokseen lisätään metanolia ja sitten liuotin tislataan tyhjössä eroon. Jäännöstä sekoitetaan kuumassa isopropanolissa, saostunut tuote suodatetaan eroon ja kuivataan tyhjössä.

Saanto: 2,67 g

R_f: 0,45 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1).

Esimerkki 20

N^2-(isobutanoyyli)-N^9-metyylioksikarbonyylimetyyliguaniini

N^2-(isobutanoyyli)guaniinia (4,42 g) suspendoidaan kuivaan DMF:ään (50 ml), lisätään natriumhydridiä (0,5 g) pieninä erinä ja sekoitetaan seosta 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, kunnes vetykehitys on päättynyt. Sitten lisätään huoneenlämpötilassa ruiskulla tipoittain bromietikkahappometyyliesteriä (1,9 ml). Seosta sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään pieni määrä hiilidioksidia metanolissa. Liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäljelle jäänyttä jäännöstä puhdistetaan pylväskromatografisesti silikageelissä käyttäen eluenttina dikloorimetaani/metanolia, 95:5. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin.

Saanto: 2,35 g

MS (DCI): 294 $(M + H)^+$

R_f: 0,58 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 21

N^2-(isobutanoyyli)-N^9-karboksimetyyliguaniini

N^2-(isobutanoyyli)-N^9-metyylioksikarbonyylimetyyliguaniinia (9,68 g) suspendoidaan veteen (100 ml) ja 0 °C:ssa lisätään tipoittain natronlipeän 2 N vesiliuosta pH:ta kontrolloiden (pH 11), kunnes metyyliesteri on saippuoitunut. Reaktion etenemistä seurataan TLC:llä. Sit-

ten reaktioliuos suodatetaan, suodoksen pH säädetään 3:een lisäämällä 2 M kaliumvetysulfaattiliuosta ja uutetaan etyyliasetaatilla. Orgaaninen faasi heitetään pois. Vesifaasi haihdutetaan tyhjössä noin 20 ml:n tilavuuteen ja sille asetetaan kerrokseksi etyyliasetaattia. Hitaasti erottuva sakka suodatetaan imulla eroon ja kuivataan.

Saanto: 1,35 g

MS (ES^+): 342 $(M + H)^+$

R_f: 0,34 (n-butanoli/etikkahappo/vesi, 3:1:1).

Esimerkki 22

N-(4-metoksifenyylidifenyylimetyyliaminoetyyli)-glysiinin metyyliesterin valmistus (Mmt-Aeg-OMe)

14,76 g N-(aminoetyyli)glysiinimetyyliesteri-dihydrokloridia (H-Aeg-OMe.2HCl) suspendoidaan 300 ml:aan DMF:ää ja samalla sekoittaen lisätään 30,2 ml trietyyliamiinia. Seos jäähdytetään noin 4 °C:seen ja samalla hyvin sekoittaen lisätään hitaasti tiputtamalla 22,23 g Mmt-Cl:ää liuotettuna 100 ml:aan dikloorimetaania. Seosta sekoitetaan vielä 2,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan eroon, lisätään liuokseen 10 ml metanolia ja haihdutetaan suodos tyhjössä kuiviin. Jäännöksellä suoritetaan kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen seosta dietyylieetteri/petrolieetteri/trietyyliamiini, 200:100:3. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin.

Saanto: 18,82 g öljyä, joka seisomaan jätettynä kiteytyy hitaasti

R_f: 0,16 (dietyylieetteri/petrolieetteri, 2:1, jossa on 1 % trietyyliamiinia)

MS (FAB/MeOH/NBA/LiCl): 411,2 $(M + Li)^+$.

Esimerkki 23

Synteesiohje N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiinin valmistamiseksi (Mmt-Aeg(T)-OH)

1,21 g (3 mmol) Mmt-Aeg-OMe:tä liuotetaan 20 ml:aan THF:ää, minkä jälkeen samalla jäähdyttäen ja hyvin sekoittaen lisätään hitaasti tipoittain 0,24 ml klooriasetyylikloridia liuotettuna 10 ml:aan THF:ää samanaikaisesti 0,42 ml:n trietyyliamiinia liuotettuna 10 ml:aan THF:ää kanssa. Sitten seoksen annetaan vielä reagoida 30 minuutin ajan, saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan imulla eroon ja lisätään liuokseen 30 ml kuivaa DMF:ää. Sitten THF haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa pois ja liuokseen lisätään Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe:tä DMF:ssä sekä sitten peräkkäin 0,756 g (6 mmol) tymiiniä ja 1,66 g (12 mmol) hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. Tätä seosta sekoitetaan 48 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liukenematon aines suodatetaan imulla eroon. Liuotin poistetaan ja jäännös ositetaan veteen ja etyyliasetaattiin. Etyyliasetaattifaasiin jäänyt raakatuote saippuoidaan liuottimen poistamisen jälkeen seoksessa dioksaani/metanoli/vesi lisäämällä 35 ml 0,2 N NaOH:ta. Liuotin poistamalla saatua jäännöstä puhdistetaan sitten kromatografisesti silikageelissä käyttäen dikloorimetaani/MeOH/trietyyliamiinia (100:10:1). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin. Jäljelle jää 0,81 g väritöntä vaahtoa.

R_f: 0,29 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1)

MS (ES^-): 1112,0 $(2M - H)^-$; 553,3 $(M - H)^-$.

Esimerkki 24

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(T)-OMe)

1,00 g (2,48 mmol) N-((4-metoksifenyyli)-difenyylimetyyli)aminoetyyli-glysiinimetyyliesteriä liuo-

tetaan 5 ml:aan DMF:ää. Tähän liuokseen lisätään 0,404 g (2,48 mmol) 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia ja 0,632 ml (4,96 mmol) 4-etyylimorfoliinia. Sitten lisätään tipoittain liuos, jossa on 0,456 g (2,48 mmol) N-1-karboksimetyylitymiiniä 5 ml:ssa DMF:ää, ja sitten 0,46 ml (3,0 mmol) N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä. Reaktioseosta sekoitetaan 20 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös liuotetaan etyyliasetaattiin. Tämä liuos pestään kahdesti vedellä ja kyllästetyllä kaliumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan sitten kuiviin. Näin saatua raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä, jota on tasapainoitettu seoksella dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini (100:1:1), käyttäen gradienttia 1 - 5 % metanolia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin, jolloin saadaan 1,28 g tuotetta värittömänä vaahtona.

MS (FAB): 571,2 $(M + H)^+$

R_f: 0,28 (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5).

Esimerkki 25

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(T)-OH)

Tuote edellisestä reaktiosta liuotetaan seokseen, jossa on 10 ml dioksaania ja 2 ml vettä. Liuos jäähdytetään 0 °C:seen ja lisätään tipoittain 1 N natronlipeäliuosta, kunnes saavutetaan pH-arvo 11. 2 tunnin reaktioajan jälkeen reaktio on päättynyt ja liuoksen pH säädetään 5:ksi lisäämällä varovaisesti 2 N $KHSO_4$-liuosta. Liuosta uutetaan kolmasti etyyliasetaatilla, yhdistetyt orgaaniset faasit kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Näin saatua raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä käyttäen gradienttia 5 - 10 % metanolia ja 1 % trietyyliamiinia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Haihduttamalla ensin yhdessä pyridiinin

ja sitten tolueenin kanssa poistetaan vielä läsnä oleva ylimääräinen trietyyliamiini. Saadaan 1,065 g tuotetta värittömänä vaahtona.

MS (ES^-): 1112,0 $(2M - H)^-$; 555,3 $(M - H)^-$

R_f: 0,28 (CH_2Cl_2/MeOH, 8:2).

Esimerkki 26

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-bentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(C^{Bz})-OMe)

1,10 g N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyliglysiini-metyyliesteriä (2,72 mmol) liuotetaan 5 ml:aan DMF:ää ja 0,444 g (2,72 mmol) 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia sekä 0,94 ml 4-etyylimorfoliinia (5,45 mmol) lisätään. Lisätään suspensio, jossa on 0,744 g (2,72 mmol) N^4-bentsoyyli-N^1-karboksimetyylisytosiinia 20 ml:ssa DMF:ää ja sitten 0,51 ml (3,27 mmol) N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä. Reaktioseosta sekoitetaan 20 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten liuotin haihdutetaan tyhjössä pois ja jäännös liuotetaan etyyliasetaattiin. Tämä liuos pestään kahdesti vedellä ja kerran kyllästetyllä keittosuolaliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Näin saatua raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä, jota on tasapainoitettu seoksella dikloorimetaani/metanoli/-trietyyliamiini (100:1:1), käyttäen gradienttia 1 - 2 % metanolia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Saadaan 0,96 g tuotetta kellanvalkoisena vaahtona.

MS (ES^-): 658,6 $(M - H)^-$

R_f: 0,37 (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5).

Esimerkki 27

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-bentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg-(C^{Bz}-OH)

2,26 g (3,43 mmol) N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-bentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteriä liuotetaan 50 ml:aan dioksaania. Liuos jäähdytetään 0 °C:seen ja siihen lisätään tipoittain 34,4 ml 1 N natronlipeäliuosta. 10 minuutin kuluttua pH säädetään 5:een lisäämällä tipoittain 1 N $KHSO_4$-liuosta, saostuneet suolat suodatetaan eroon ja pestään pienellä määrällä dioksaania. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja jäännös haihdutetaan kahdesti metanolin ja dikloorimetaanin kanssa. Näin saatua raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä käyttäen gradienttia 5 - 10 % metanolia ja 1 % trietyyliamiinia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Haihduttamalla yhdessä pyridiinin ja sitten tolueenin kanssa poistetaan vielä läsnä oleva ylimääräinen trietyyliamiini. Saadaan 1,306 g tuotetta lähes valkoisena vaahtona.

MS (ES^-): 644,3 $(M - H)^-$

R_f: 0,68 (CH_2Cl_2/MeOH, 8:2).

Esimerkki 28

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)-glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(C^{tBuBz})-OMe)

1,00 g (2,48 mmol) N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyliglysiini-metyyliesteriä liuotetaan 5 ml:aan DMF:ää. Tähän liuokseen lisätään peräkkäin 0,403 g (2,48 mmol) 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia ja 0,63 ml (4,96 mmol) 4-etyylimorfoliinia. Sitten lisätään suspensio, jossa on 0,740 g (2,48 mmol) N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiinia 5 ml:ssa DMF:ssä, ja sen jälkeen 0,47 ml N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä. Seosta sekoitetaan 20 tunnin

ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen se haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Jäännös liuotetaan etyyliasetaattiin, liuos pestään vedellä, kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, se kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Raakatuotetta puhdistetaan silikageelikolonnissa, jota on tasapainoitettu seoksella dikloorimetaani/etyyliasetaatti/trietyyliamiini (50:50:1), käyttäen eluenttina dikloorimetaani/etyyliasetaattia (1:1). Yhdistetyt, tuotetta sisältävät fraktiot haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Tuote saadaan kellanvalkoisena vaahtona saannon ollessa 1,635 g.

MS (FAB/MeOH, NBA, LiCl): 722,5 $(M + Li)^+$

R_f: 0,31 (CH_2Cl_2/etyyliasetaatti, 1:1).

Esimerkki 29

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)-glysiini (Mmt-Aeg(C^{tBuBz})-OH)

1,63 g (2,28 mmol) N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-(4-tert-butyylibentsoyyli)-sytosyyli)asetyyli)-glysiinimetyyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 10 ml dioksaania ja 1 ml vettä, minkä jälkeen 0 °C:ssa samalla sekoittaen lisätään tipoittain 4,56 ml 1 N NaOH-liuosta. 2 tunnin kuluttua pH säädetään 5:ksi lisäämällä tipoittain 1 N $KHSO_4$-liuosta, saostuneet suolat suodatetaan eroon ja pestään pienellä määrällä dioksaania. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja jäännös haihdutetaan kahdesti kuiviin yhdessä metanolin ja dikloorimetaanin kanssa. Näin saatua raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä käyttäen gradienttia 2 - 10 % metanolia ja 1 % trietyyliamiinia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Vielä läsnä oleva ylimääräinen trietyyliamiini poistetaan haihduttamalla kuiviin yhdessä ensin pyridiinin ja sitten tolueenin kanssa. Saadaan 0,831 g tuotetta lähes valkoisena vaahtona.

MS (ES^-): 700,7 $(M - H)^-$

R_f: 0,28 (CH_2Cl_2/MeOH, 9:1); 0,63 (CH_2Cl_2/MeOH, 7:3).

Esimerkki 30

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyylioksi)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Oeg(T)-OH)

0,5 g (1,28 mmol) N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyylioksi)etyyliglysiiniä suspendoidaan 10 ml:aan DMF:ää ja lisätään tipoittain 0,47 ml (1,92 mmol) BSA:ta. Sitten lisätään peräkkäin 0,7 ml (5,1 mmol) trietyyliamiinia ja 0,26 g (1,28 mmol) kloorikarboksimetyylitymiiniä. Reaktioliuosta sekoitetaan 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään vielä 65 mg (0,32 mmol) kloorikarboksimetyylitymiiniä ja sekoitetaan vielä 16 tunnin ajan. Sen jälkeen liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja raakatuotetta puhdistetaan silikageelikolonnissa käyttäen gradienttia 5 - 15 % metanolia ja 1 % trietyyliamiinia dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Saatu ruskehtava öljy liuotetaan pieneen määrään dikloorimetaania, minkä jälkeen tuote saostetaan lisäämällä dietyylieetteriä. Tuote saadaan lähes valkoisena jauheena.

Saanto: 0,219 g

MS (ES^-): 556,3 $(M - H)^-$

R_f: 0,54 (CH_2Cl_2/MeOH, 8:2).

Esimerkki 31

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-(4-metoksibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(C^{MeOBz})-OMe)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyliglysiinimetyy-liesteriä (4,00 g, 9,9 mmol) liuotetaan DMF:ään (50 ml). Tähän liuokseen lisätään peräkkäin 4-etyylimorfoliinia (3,44 ml), 3,4-dihydroksi-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia (1,62 g), N^4-(4-metoksibentsoyyli)-N^1-karboksimetyylisytosiinia (3,00 g, 9,9 mmol) ja N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä (1,87 ml). Re-

aktioseosta sekoitetaan 48 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäännös lietetään etyyliasetaattiin. Tätä liuosta uutetaan kahdesti vedellä ja kerran kyllästetyllä kaliumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Puhdistaminen tapahtuu pylväskromatografisesti silikageelissä, jota on tasapainoitettu edeltäpäin 1 % trietyyliamiinia sisältävällä dikloorimetaanilla. Eluointi suoritetaan käyttäen gradienttia 0 - 2 % metanolia 1 %:n trietyyliamiinia sisältävässä dikloorimetaanissa. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä pieneen tilavuuteen. Tällöin saostuva disykloheksyyliurea suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Haluttu yhdiste saadaan vaaleankeltaisena vaahtona.

Saanto: 6,72 g

MS (FAB/MeOH, NBA, LiCl): 696,3 $(M + Li)^+$

R_f: 0,59 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 32

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(N^4-(4-metoksibentsoyyli)sytosyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(C^{MeOBz})-OH)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyli-N-((1-(N^4-(4-metoksibentsoyyli))sytosyyli)asetyyli)glysiini-metyyliesteriä (6,60 g, 9,6 mmol) liuotetaan seokseen, jossa on dioksaania (50 ml) ja vettä (50 ml), ja lisätään 0 °C:ssa tipoittain natronlipeän 1 M vesiliuosta (15 ml) kahdessa erässä. 2 tunnin reaktioajan jälkeen liuos neutraloidaan lisäämällä ioninvaihtajaa (Dowex AG 50WX4, pyridiniummuoto). Ioninvaihtaja suodatetaan eroon ja pestään dioksaanin vesiliuoksella ja metanolilla. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja jäännöstä puhdistetaan pylväskromatografisesti silikageelissä eluoiden 10 % metanoli/dikloorimetaanilla (1 % trietyyliamiinia). Tuote saadaan kellanvalkoisena vaahtona. Etyyliasetaatista uudelleenkiteyttämällä sadaan väritön jauhe.

Saanto: 4,00 g

MS (ES^-): 674,1 $(M - H)^-$

R_f: 0,39 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1).

Esimerkki 33

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^2-(isobutanoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(G^{iBu})-OMe)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyli-glysiinimetyyliesteriä (1,45 g, 3,59 mmol) liuotetaan DMF:ään (7 ml). Tähän liuokseen lisätään peräkkäin 4-etyylimorfoliinia (1,24 ml, 7,17 mmol), 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia (0,585 g, 3,59 mmol), N^2-(isobutanoyyli)-N^9-karboksimetyyliguaniinia (1,00 g, 3,59 mmol) ja N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä (0,67 ml, 4,31 mmol). Reaktioseosta sekoitetaan 48 tunnin ajan 4 °C:ssa. Sitten liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäännös lietetään etyyliasetaattiin. Tätä liuosta uutetaan kahdesti vedellä ja kerran kyllästetyllä kaliumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Jäljelle jäänyt keltainen vaahto liuotetaan pieneen määrään etyyliasetaattia ja jäähdytetään jäillä vielä läsnä olevan disykloheksyyliurean saostamiseksi. Suodatuksen jälkeen suodos haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Puhdistaminen suoritetaan pylväskromatografisesti silikageelissä, jota on tasapainoitettu edeltäpäin dikloorimetaani/etyyliasetaatilla, 1:1, joka sisältää 1 %:n trietyyliamiinia. Eluointi suoritetaan dikloorimetaani/etyyliasetaatilla, 1:1. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Haluttu yhdiste saadaan vaaleankeltaisena vaahtona.

Saanto: 1,181 g

MS (FAB/MeOH, NBA, LiCl): 678,3 $(M + 2Li-H)^+$; 672,3 $(M + Li)^+$

R_f: 0,13 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5).

Esimerkki 34

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^2-(isobutanoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(G^{iBu})-OH)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^2-(isobutanoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteriä (1,15 g, 1,72 mmol) liuotetaan dioksaaniin (10 ml) ja lisätään 2,5 tunnin aikana 0 °C:ssa tipoittain natronlipeän 1 N vesiliuosta (10,32 ml) 5 eränä. Edelleen 2 tunnin reaktioajan huoneenlämpötilassa jälkeen liuoksen pH säädetään lisäämällä tipoittain kaliumvetysulfaatin 2 M vesiliuosta 5:ksi. Saostuneet suolat suodatetaan eroon ja pestään pienellä määrällä dioksaania. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja jäännös haihdutetaan kahdesti yhdessä sekä etanolin että dikloori/metanolin, 1:1, kanssa kuiviin. Puhdistaminen suoritetaan pylväskromatografisesti silikageelissä eluoiden käyttäen gradienttia 10 - 20 % metanolia dikloorimetaanissa (jossa on 1 % trietyyliamiinia). Tuote saadaan valkoisena vaahtona.

Saanto: 1,229 g

MS (ES^-): 650,3 $(M - H)^-$

R_f: 0,25 (dikloorimetaani/metanoli, 8:2).

Esimerkki 35

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^6-(4-metoksibentsoyyli)adenosyyli)asetyyli)glysiini-metyyliesteri (Mmt-Aeg(A^{MeOBz})-OMe)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli)aminoetyyli-glysiini-metyyliesteriä (1,24 g, 3,06 mmol) liuotetaan DMF:ään (7 ml). Tähän liuokseen lisätään peräkkäin 4-etyylimorfoliinia (1,06 ml, 6,12 mmol), 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriatsiinia (0,498 g, 3,06 mmol), N^{6-}(4-metoksibentsoyyli)-N^9-karboksimetyyli-adeniinia (1,00 g, 3,06 mmol) ja N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä (0,58 ml, 3,67 mmol).

Reaktioseosta sekoitetaan 48 tunnin ajan 4 °C:ssa. Sitten liuotin haihdutetaan tyhjössä eroon ja jäännös lie-

tetään etyyliasetaattiin. Tätä liuosta uutetaan kahdesti vedellä ja kerran kyllästetyllä kaliumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Jäljelle jäänyt keltainen vaahto liuotetaan pieneen määrään etyyliasetaattia ja jäähdytetään jäillä vielä läsnä olevan disykloheksyyliurean saostamiseksi. Tämä suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Puhdistaminen suoritetaan pylväskromatografisesti silikageelissä, jota on edeltäpäin tasapainoitettu dikloorimetaani/etyyliasetaatilla, 1:1, joka sisältää 1 %:n trietyyliamiinia. Eluointi suoritetaan dikloorimetaani/etyyliasetaatilla, 1:1. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä kuiviin. Haluttu yhdiste saadaan vaaleankeltaisena vaahtona.

Saanto: 1,752 g

MS (FAB/MeOH, NBA, LiCl): 720,3 $(M + Li)^+$

R_f: 0,21 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5).

Esimerkki 36

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^6-(4-metoksibentsoyyli)adenosyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(A^{MeOBz})-OH)

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(9-(N^6-(4-metoksibentsoyyli)adenosyyli)asetyyli)glysiini-metyyliesteriä (1,70 g, 2,38 mmol) liuotetaan dioksaaniin (10 ml) ja liuokseen lisätään 2,5 tunnin aikana 0 °C:ssa tipoittain natronlipeän 1 M vesiliuosta (10,32 ml) 5 eränä. Edelleen 2 tunnin reaktioajan huoneenlämpötilassa jälkeen liuoksen pH säädetään 5:ksi lisäämällä tipoittain kaliumvetysulfaatin 2 M vesiliuosta. Saostuneet suolat suodatetaan eroon ja pestään pienellä määrällä dioksaania. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja jäännös haihdutetaan kahdesti kuiviin sekä etanolin että dikloorimetaani/metanolin, 1:1, kanssa. Puhdistaminen tapahtuu pylväskromatografisesti silikageelissä eluoiden käyttäen gradienttia 10 - 20 % metanolia dikloo-

rimetaanissa (jossa on 1 % trietyyliamiinia). Tuote saadaan valkoisena vaahtona.

Saanto: 1,619 g

MS (ES^-): 698,3 $(M - H)^-$

R_f: 0,10 (dikloorimetaani/metanoli, 8:2).

Esimerkki 37

Tyminyylietikkahappo (valmistusmenetelmä kuten kuvaavat L. Kosynkina, W. Wang ja T. Chyau Liang, Tetrahedron Lett. 1994 5173 - 5176)

37,8 g tymiiniä liuotetaan liuokseen, jossa on 64,5 g kaliumhydroksidia 200 ml:ssa vettä. Sitten 40 °C:ssa samalla hyvin sekoittaen lisätään tipoittain liuos, jossa on 62,5 g bromietikkahappoa 100 ml:ssa vettä, 70 minuutissa. Seosta sekoitetaan vielä tunnin ajan 40 °C:ssa, sen annetaan jäähtyä 20 °C:seen ja liuoksen pH säädetään 5,5:ksi lisäämällä kons. kloorivetyhappoa. Seoksen annetaan seistä 1,5 tunnin ajan 0 °C:ssa, saostunut reagoimatta jäänyt tymiini suodatetaan imulla eroon, minkä jälkeen suodoksen pH säädetään 2,0:ksi lisäämällä kons. kloorivetyhappoa, jolloin tuote saostuu. Seoksen annetaan seistä vielä 1 tunnin ajan 0 °C:ssa, minkä jälkeen sakka suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 52,19 g

R_f: 0,23 (etyyliasetaatti/metanoli/jääetikka, 75:20:5)

MS (DCI): 185 $(M + H)^+$.

Esimerkki 38

Tyminyylietikkahappometyyliesteri

31,5 g tymiiniä suspendoidaan 800 ml:aan kuivaa DMF:ää ja lisätään 69,4 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. Seosta ravistellaan 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen siihen lisätään 23,1 ml bromietikkahappometyyliesteriä. Seosta ravistellaan argon-suojakaasussa yön yli, minkä jälkeen sakka suodatetaan eroon, se pestään DMF:llä ja haihdutetaan suodos tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännöstä trituroidaan perusteellises-

ti seoksessa, jossa on 240 ml vettä ja 19 ml 2 N HCl:ää, huhmaressa, minkä jälkeen sakka suodatetaan imulla eroon ja pestään vedellä. Näin saatu, vielä kostea raakatuote uudelleenkiteytetään 450 ml:sta metanolia.

Saanto: 25,5 g

R_f: 0,78 (etyyliasetaatti/metanoli/jääetikka, 80:10:5)

MS (DCI): 199,1 $(M + H)^+$.

Esimerkki 39

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Aeg(T)-OMe)

19,84 g Mmt-Aeg-OMe:tä liuotetaan 450 ml:aan THF:ää, minkä jälkeen samalla hyvin jäähdyttäen ja hyvin sekoittaen lisätään ensin 6,82 ml trietyyliamiinia ja sitten 3,92 ml klooriasetyylikloridia liuotettuna 60 ml:aan THF:ää hitaasti tipoittain. Noin 2/3:n klooriasetyylikloridiliuoksen tiputettavsta määrästä jälkeen lisätään vielä 3,41 ml trietyyliamiinia. Kun klooriasetyylikloridin lisääminen on päättynyt, seoksen anetaan reagoida vielä 1 tunnin ajan, saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan imulla eroon ja liuokseen lisätään 400 ml kuivaa DMF:ää. Sitten THF haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa eroon ja tämä Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe:n liuos DMF:ssä lisätään jo yön yli esireagoineeseen seokseen, jossa on 12,36 g tymiiniä ja 27,16 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia 200 ml:ssa kuivaa DMF:ää. Tämän seoksen annetaan reagoida vielä 16 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liukenematon aines suodatetaan imulla eroon. Suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin ja jäännös ositetaan veteen ja etyyliasetaattiin. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla, minkä jälkeen kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 80 ml:n tilavuuteen. Tämä seos sekoitetaan sitten seokseen, jossa on 600 ml pet-

rolieetteriä ja 200 ml dietyylieetteriä, jolloin tuote saostuu.

Saanto: 25 g

R_f: 0,34 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:5:1).

Esimerkki 40

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(T)-OH)

5,7 g Mmt-Aeg(T)-OMe:tä suspendoidaan 25 ml:aan vettä ja lisätään peräkkäin 13,9 ml trietyyliamiinia ja 12,5 ml dioksaania. Syntyneen kirkkaan liuoksen annetaan seistä 72 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liuotin tislataan pyöröhaihduttimessa tyhjössä pois. Jäännös tislataan vielä kolmasti pienen määrän tolueenia kanssa. Jäännös lietetään seokseen, jossa on 20 ml sekä dioksaania että etyyliasetaattia, pieni määrä liukenematonta ainesta suodatetaan eroon ja suodos sekoitetaan 500 ml:aan eetteriä, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Saostunut tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 4,1 g

R_f: 0,28 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1).

Esimerkki 41

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg(T)-OH)

5,7 g Mmt-Aeg(T)-OMe:tä liuotetaan seokseen, jossa on 80 ml vettä, 20 ml metanolia ja 13,9 ml trietyyliamiinia. Syntyneen kirkkaan liuoksen annetaan reagoida 24 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liuotin tislataan eroon tyhjössä pyöröhaihduttimessa. Jäännös tislataan vielä kolmasti pienen määrän tolueenia kanssa. Jäännös lietetään seokseen, jossa on sekä 20 ml dioksaania että etyyliasetaattia, pieni määrä liukenematonta ainesta suodateaan eroon ja suodos sekoitetaan 500 ml:aan eetteriä, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Saostunut tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 4,8 g

R_f: 0,28 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1).

Esimerkki 42

N-((2-hydroksi)etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)-glysiini (H-Oeg(T)-OH)

2,76 g tyminyylietikkahappoa liuotetaan 15 ml:aan kuivaa DMF:ää ja 4,92 g TOTU:a ja 2,08 ml trietyyliamiinia lisätään. Seosta sekoitetaan 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen se lisätään hitaasti tiputtamalla liuokseen, jossa on 3,57 g (2-hydroksietyyli)glysiiniä, 10 ml vettä, 10 ml DMF:ää ja 4,16 ml trietyyliamiinia. Seosta sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen siihen lisätään 20 ml asetonitriiliä, jolloin hydroksietyyliglysiiniylimäärä saostuu. Sakka suodatetaan eroon imulla ja suodos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin. Jäännös lietetään veteen, pH säädetään 1,5:ksi 1 N kloorivetyhapolla ja uutetaan etyyliasetaatilla. Vesifaasin pH säädetään 5:ksi lisäämällä kyllästettyä natriumvetykarbonaattiliuosta ja haihdutetaan pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännökseen lisätään 250 ml etanolia ja tällöin saostunut natriumkloridi suodatetaan imulla eroon. Suodos haihdutetaan kuiviin ja raakatuotetta puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä eluoiden dikloorimetaani/metanoli/etyyliasetaatilla, 10:2:1, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin.

Saanto: 2,39 g

R_f: 0,17 (dikloorimetaani/metanoli/etyyliasetaatti, 10:2:1, jossa on 1 % trietyyliamiinia)

MS (DCI): 286 $(M + H)^+$.

Esimerkki 43

N-(2-(di-(4-metoksifenyyli)fenyyli)metyylioksi)-etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiini (Dmt-Oeg(T)-OH)

1,76 g H-Oeg(T)-OH:ta liuotetaan 30 ml:aan DMF:ää, 3,41 trietyyliamiinia lisätään ja 0 °C:ssa lisätään tipoittain liuos, jossa on 4,16 g Dmt-Cl:ää 30 ml:ssa dikloorimetaania, 20 minuutin kuluessa. Seosta sekoitetaan vielä 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin. Raakatuotetta puhdistetaan silikageelissä eluoiden dikloorimetaani/metanoli/etyyliasetaatilla, 10:2:1, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin.

Saanto: 3,2 g

R_f: 0,29 (dikloorimetaani/metanoli/etyyliasetaatti, 10:2:1, jossa on 1 % trietyyliamiinia)

MS (ES^+ + LiCl): 594,3 $(M + Li)^+$; 600,4 $(M + 2Li - H)^+$.

Esimerkki 44

N-(2-(di-(4-metoksifenyyli)fenyyli)metyylitio)-etyyli-N-((1-tyminyyli)asetyyli)glysiinin valmistus (Dmt-Teg(T)-OH)

Esimerkki 44a

Dmt-S-CH_2-CH_2-NH_2

10,17 g Dmt-Cl:ää liuotetaan 100 ml:aan etikkahappoa ja 4,43 g 2-merkaptoetyyliamiinihydrokloridia liuotettuna 70 ml:aan vettä lisätään. Seosta sekoitetaan vielä 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen seos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa noin 50 ml:n tilavuuteen. Sitten lisätään 200 ml vettä ja liuoksen pH säädetään 2 N NaOH-liuoksella 10:ksi, jolloin aine saostuu. Seosta uutetaan kolmasti 100 ml:lla etyyliasetaattia, yhdistetyt orgaaniset faasit pestään kyllästetyllä NaCl-liuoksella ja kuivataan natriumsulfaatilla. Kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä

kuiviin. Näin saatua raakatuotetta käytetään sitä enempää puhdistamatta seuraavassa reaktiossa.

Saanto: 14,75 g.

Esimerkki 44b

Dmt-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$CO_2C_2H_5$

12,56 g Dmt-S-CH_2-CH_2-NH_2:ta (raakatuote kohdasta 44a) liuotetaan 100 ml:aan kuivaa DMF:ää ja samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa lisätään peräkkäin 4,6 ml trietyyliamiinia ja 3,66 ml bromietikkahappoetyyliesteriä. Seosta sekoitetaan vielä 3 tunnin ajan, pieni määrä sakkaa suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännös lietetään 150 ml:aan etyyliasetaattia, pestään 4 kertaan kulloinkin 40 ml:lla vettä, kuivataan orgaaninen faasi natriumsulfaatilla ja haihdutetaan suodos kuivausaineen eroon suodatuksen jälkeen tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Näin saatua raakatuotetta käytetään sitä enempää puhdistamatta seuraavassa reaktiossa.

Saanto: 12,92 g.

Esimerkki 44c

Dmt-Teg(T)-OEt

5,95 g Dmt-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$CO_2C_2H_5$:tä liuotetaan 50 ml:aan kuivaa DMF:ää ja liuokseen lisätään peräkkäin 2,36 g tyminyylietikkahappoa, 4,45 ml trietyyliamiinia ja 4,2 g TOTU:ta. Seosta sekoitetaan 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa ja se jätetään yöksi seisomaan. Sitten reaktioseos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin, jäännös lietetään 150 ml:aan etyyliasetaattia, pestään 5 kertaan kulloinkin 10 ml:lla kyllästettyä natriumvetykarbonaattiliuosta ja kahdesti 10 ml:lla vettä ja kuivataan orgaaninen faasi natriumsulfaatilla. Kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan kuiviin tyhjössä pyöröhaihduttimessa. Saadaan öljyinen raakatuote, jota käytetään sitä enempää puhdistamatta seuraavassa reaktiossa.

Saanto: 8,06 g.

Esimerkki 44d

Dmt-Teg(T)-OH

8,06 g Dmt-Teg(T)-OEt:tä liuotetaan seokseen, jossa on 80 ml dioksaania ja 40 ml vettä, ja saippuoidaan lisäämällä pieninä erinä kaikkiaan 13 ml 2 N natronlipeäliuosta. Sitten liuos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 50 ml:ksi ja uutetaan neljästi 50 ml:lla etyyliasetaattia. Sitten vesifaasin pH säädetään 5:ksi lisäämällä 2 N kloorivetyhappoa ja uutetaan 4 kertaan 50 ml:lla etyyliasetaattia. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestään kahdesti 30 ml:lla vettä ja kuivataan natriumsulfaatilla. Kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 30 ml:n tilavuuteen. Lisätään vähän trietyyliamiinia ja sekoitetaan liuosta 300 ml:ssa di-isopropyylieetteriä, jolloin tuote saostuu. Lisäpuhdistukseksi suoritetaan kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen vaihegradienttia 0 - 5 % metanolia dikloorimetaanissa (1 % trietyyliamiinia kaikissa eluenteissa). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin.

Saanto: 2,38 g

R_f: 0,38 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1)

MS (FAB/NBA + LiCl): 610,2 $(M + Li)^+$; 616,2 $(M + 2Li - H)^+$.

Esimerkki 45

2-N-asetyyli-4-O-difenyylikarbamoyyli-9-metoksikarbonyylimetyyliguaniini

15,52 g 2-N-asetyyli-4-O-difenyylikarbamoyyliguaniinia [valmistetaan kuten kuvaavat R. Zou ja M.J. Robins, Can. J. Chem. 65 (1987) 1436 - 1437] suspendoidaan 200 ml:aan kuivaa DMF:ää ja lisätään 13,6 ml di-isopropyylietyyliamiinia, minkä jälkeen seosta lämmitetään vähän aikaan, kunnes on muodostunut kirkas liuos. Sitten lisätään 4,04 ml bromietikkahappometyyliesteriä ja liuosta

sekoitetaan yön yli. Sitten liuotin poistetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa ja jäännös liuotetaan 200 ml:aan metanolia. Tämä liuos lisätään tipoittain samalla voimakkaasti sekoittaen 600 ml:aan vettä, jolloin tuote saostuu. Näin saatu raakatuote suodatetaan imulla eroon, se pestään vedellä, liuotetaan jälleen metanoliin ja haihdutetaan kuiviin, minkä jälkeen jäännöstä trituroidaan etyyliasetaatissa. Saatu tuote suodatetaan imulla eroon, se pestään etyyliasetaatilla ja eetterillä ja kuivataan sitten tyhjössä. Emänesteestä saadaan haihduttamalla ja jäännöstä jälleen etyyliasetaatissa trituroimalla lisää tuotetta.

Saanto: 13,2 g

MS (ES^+): 461,3 $(M + H)^+$

R_f: 0,79 (2-butanoni/pyridiini/vesi/etikkahappo, 70:15:15:2).

Esimerkki 46

2-N-asetyyli-4-O-difenyylikarbamoyyli-9-karboksimetyyliguaniini

7,54 g 2-N-asetyyli-4-O-difenyylikarbamoyyli-9-metoksikarbonyylimetyyliguaniinia liuotetaan seokseen, jossa on 20 ml metanolia, 80 ml dioksaania ja 40 ml vettä, ja saippuoidaan pH:ssa 13 kaikkiaan 18 ml:lla 1 N NaOH-liuosta. Sitten liuoksen pH säädetään 6:ksi lisäämällä 1 N kloorivetyhappoa ja haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 50 ml:n tilavuuteen. 400 ml:n vettä lisäämisen jälkeen seoksen pH säädetään 3:ksi lisäämällä 1 N kloorivetyhappoa, jolloin tuote saostuu. Tuote suodatetaan imulla eroon, se pestään vedellä ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 5,92 g

MS (ES^+): 447,2 $(M + H)^+$

R_f: 0,48 (2-butanoni/pyridiini/vesi/etikkahappo, 70:15:15:2).

Esimerkki 47

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((9-(N^2-asetyyli-O^4-difenyylikarbamoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteri (Mmt-Arg($G^{2-Ac,4-Dpc}$)-OMe)

3,57 g 2-N-asetyyli-4-O-difenyylikarbamoyyli-9-karboksimetyyliguaniinia liuotetaan 120 ml:aan kuivaa DMF:ää ja liuokseen lisätään peräkkäin 3,23 g Mmt-Aeg-OMe:tä, 2,62 g TOTU:ta ja pieninä erinä 4,08 ml diisopropyylietyyliamiinia. Seosta sekoitetaan 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa ja se jätetään yöksi seisomaan. Sitten liuotin tislataan tyhjössä pyöröhaihduttimessa eroon ja jäännös ositetaan 160 ml:aan etyyliasetaattia ja 20 ml:aan vettä. Orgaanista faasia uutetaan kolmasti kulloinkin 20 ml:lla vettä, se kuivataan natriumsulfaatilla, kuivausaine suodatetaan eroon ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäljelle jäänyttä jäännöstä trituroidaan useaan kertaan dietyylieetterissä, tällöin sakkana saostunut tuote suodatetaan eroon imulla ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 5,53 g

R_f: 0,63 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:5:1).

Esimerkki 48

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((9-(N^2-asetyyli-O^4-difenyylikarbamoyyli)guanosyyli)asetyyli)glysiini (Mmt-Aeg($G^{2-Ac,4-Dpc}$)-OH)

4,99 g Mmt-Aeg($G^{2-Ac,4-Dpc}$)-OMe:tä liuotetaan seokseen, jossa on 50 ml dioksaania ja 10 ml vettä, ja saippuoidaan lisäämällä pieninä erinä kaikkiaan 15 ml 0,5 N NaOH-liuosta. Sitten liuoksen pH säädetään 9:ksi lisäämällä 0,5 N HCl-liuosta ja liuotin haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa eroon. Jäännös tislataan vielä kerran pienen määrän tolueenia kanssa, minkä jälkeen jäännös liuotetaan 30 ml:aan metanolia. Tätä liuosta sekoitetaan 300 ml:ssa dietyylieetteriä (johon on lisätty 1 % trietyyliamiinia), jolloin tuote saostuu. Edelleen jonkin verran keltaista sakkaa trituroidaan dietyylieetterissä, se suo-

datetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa. Jatkopuhdistus suoritetaan kromatografisesti silikageelissä käyttäen vaihegradienttia (4 - 16 %) metanoli/etyyliasetaatti (1:1) dikloorimetaanissa, jolloin kaikki liuottimet sisältävät 1 %:n trietyyliamiinia. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin.

Saanto: 2,68 g

R_f: 0,18 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:7,5:1)

MS (ES^+ + LiCl): 819,4 $(M + H)^+$; 825,3 $(M + Li)^+$.

Esimerkki 49

1-asetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiini

1-asetyylitymiini

75 g tymiiniä suspendoidaan 375 ml:aan asetanhydridiä ja suspensiota keitetään palautusjäähdyttäen 45 minuutin ajan. Sitten seos jäähdytetään 0 °C:seen, jolloin tuote saostuu. Sakka suodatetaan eroon imulla ja sitä sekoitetaan 375 ml:ssa etyyliasetaattia. Sakka suodatetaan imulla eroon, se pestään pienellä määrällä dietyylieetteriä ja kuivataan.

Saanto: 89,1 g

Sulamispiste: 187 - 189 °C

R_f: 0,67 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5).

Esimerkki 50

3-bentsyylioksimetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiini

3-bentsyylioksimetyylitymiini

52,0 g 1-asetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiiniä suspendoidaan 300 ml:aan DMF:ää, lisätään 47,5 ml trietyyliamiinia ja jäähdytetään sitten 0 °C:seen. Hyvin sekoitettuun liuokseen lisätään hitaasti tipoittain 100 ml bentsyylikloorimetyylieetteriä 50 ml:ssa DMF:ää tässä lämpötilassa. Seosta sekoitetaan vielä 1 tunnin ajan, ja se jätetään yöksi seisomaan huoneenlämpötilaan. Sitten reaktioseos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin,

jäännös lietetään 450 ml:aan metanolia ja 300 ml:aan metyyliamiinin 40-%:ista vesiliuosta ja keitetään 1,5 tunnin ajan palautusjäähdyttäen. Sitten liuos haihdutetaan kuiviin ja jäännöstä sekoitetaan liuoksessa, jossa on 10,8 g natriumvetykarbonaattia 600 ml:ssa vettä. Saostunut tuote suodatetaan imulla eroon, se pestään vedellä ja etanolilla ja uudelleenkiteytetään etanolista.

Saanto: 46,66 g

Sulamispiste: 119 - 120 °C

R_f: 0,38 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5).

Esimerkki 51

3-bentsyylioksimetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappoetyyliesteri

3-bentsyylioksimetyyli-1-etoksikarbonyylimetyylitymiini

4,97 g natriumhydridiä lisätään 150 ml:aan THF:ää, minkä jälkeen lisätään tipoittain 45,04 g 3-bentsyylioksimetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiiniä liuotettuna 550 ml:aan THF:ää N_2-suojakaasussa 0 °C:ssa ja sitten 21,42 ml bromietikkahappoetyyliesteriä 700 ml:ssa THF:ää tässä lämpötilassa. Sitten seoksen annetaan reagoida vielä 5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen lisätään varovaisesti vettä. Orgaaninen faasi erotetaan ja vesifaasia uutetaan vielä 4 kertaan dikloorimetaanilla. Yhdistetyt orgaaniset faasit kuivataan magnesiumsulfaatilla, haihdutetaan kuiviin ja sekoitetaan jäännöstä heptaanissa.

Saanto: 52,4 g

R_f: 0,15 (dikloorimetaani/metanoli, 95:5)

MS (FAB, NBA): 319,1 $(M + H)^+$.

Esimerkki 52

2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappoetyyliesteri

Tyminyylietikkahappoetyyliesteri

25 g 3-bentsyylioksimetyyli-2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappoetyyliesteriä liuotetaan 1 000

ml:aan dikloorimetaania, seos jäähdytetään -70 °C:seen ja tässä lämpötilassa lisätään tipoittain samalla hyvin sekoittaen 375 ml booritrikloridin 1 M liuosta dikloorimetaanissa. Seoksen annetaan reagoida vielä 3 tunnin ajan tässä lämpötilassa, minkä jälkeen -70 - -60 °C:ssa lisätään tipoittain 320 ml metanolia. 1 tunnin kuluttua lisätään 197,05 ml trietyyliamiinia ja seoksen annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan. Sitten lisätään vielä vähän vettä ja seos haihdutetaan pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännös lietetään etyyliasetaattiin ja pestään vedellä. Orgaaninen faasi kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan sitten kuiviin.

Saanto: 12 g

R_f: 0,45 (dikloorimetaani/metanoli, 9:1)

MS (DCI): 199 $(M + H)^+$.

Esimerkki 53

2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappo

Tyminyylietikkahappo

10 g 2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappoetyyliesteriä liuotetaan 130 ml:aan dioksaani/vettä (1:1), minkä jälkeen lisätään 60 ml 1 N LiOH-liuosta ja sekoitetaan yön yli huoneenlämpötilassa. Sitten seos haihdutetaan pieneen tilavuuteen, vesifaasi pestään eetterillä, minkä jälkeen sen pH säädetään 2:ksi, jolloin tuote saostuu. Tuote suodatetaan eroon ja saadaan 4,9 g tuotetta. Emänesteestä saadaan pentanolilla uuttamalla ja heptaani/eetteristä saostamalla vielä 1,5 g tuotetta.

Saanto: 6,4 g

R_f: 0,30 (dikloorimetaani/metanoli, 3:2)

MS (DCI): 185 $(M + H)^+$.

Esimerkki 54

N-1-kloorikarboksimetyylitymiini

Tyminyylietikkahappokloridi

Esimerkki 54a

2 g 2,4-dihydroksi-5-metyylipyrimidiinietikkahappoa sekoitetaan 3 tunnin ajan 15 ml:ssa tionyylikloridia

60 °C:ssa, kunnes kaasunkehitystä ei enää tapahdu. Sitten ylimääräinen tionyylikloridi haihdutetaan pois tyhjössä pyöröhaihduttimessa ja jäännös tislataan vielä kolmasti pienen määrän tolueenia kanssa. Näin saatua tuotetta käytetään sellaisenaan seuraavassa reaktiossa.

Saanto: 2,4 g

MS (DCI): 203 $(M + H)^+$.

Esimerkki 54b

N-1-karboksimetyylitymiiniä (3,0 g, 16,3 mmol) suspendoidaan tionyylikloridiin (90 ml). Suspensiota kuumennetaan 1,5 tunnin ajan 70 °C:ssa, minkä jälkeen se jätetään 16 tunniksi huoneenlämpötilaan seisomaan. Ylimääräinen tionyylikloridi poistetaan tyhjössä ja jäännös haihdutetaan kolmeen kertaan yhdessä tolueenin kanssa. Saatua tuotetta trituroidaan kahdesti n-heksaanissa ja se kuivataan tyhjössä, jolloin yhdiste saadaan vaaleanoranssina jauheena.

Saanto: 3,30 g

MS (DCl; dikloorimetaani): 203 $(M - H)^+$

R_f: 0,10 (dikloorimetaani/metanoli, 7:3).

Esimerkki 55

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-imidatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesterin valmistus (Mmt-Aeg(Im)-OMe)

4,68 g Mmt-Aeg-Ome:tä liuotetaan 150 ml:aan THF:ää, minkä jälkeen lisätään hitaasti tipoittain ja samalla jäähdyttäen ja hyvin sekoittaen 0,95 ml klooriasetyylikloridia liuotettuna 15 ml:aan THF:ää samanaikaisesti 3,3 ml:n trietyyliamiinia 10 ml:aan THF:ää liuotettuna kanssa. Sitten seoksen annetaan reagoida vielä 45 minuutin ajan, saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan imulla eroon ja liuokseen lisätään 150 ml kuivaa DMF:ää. Sitten THF haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa eroon ja Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe:n liuokseen DMF:ssä lisätään peräkkäin 1,62 g imidatsolia ja 6,55 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. 16 tunnin kuluttua

ei-liukoinen suola suodatetaan imulla eroon ja suodokseen lisätään toistamiseen 1,62 g imidatsolia ja 6,55 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. Tämän seoksen annetaan reagoida edelleen 16 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liukenematon aines suodatetaan imulla eroon. Suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin ja jäännös ositetaan veteen ja etyyliasetaattiin. Orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan sitten kuivausaineen eroon suodatuksen jälkeen kuiviin. Jäännös lietetään dikloorimetaaniin ja saostetaan sekoittamalla seoksessa dietyylieetteri/petrolieetteri, 4:1. Edelleen jonkin verran kellertävä sakka kiinteytyy liuottimen pois dekantoinnin ja trituroinnin eetterissä jälkeen.

Saanto: 3,96 g

R_f: 0,39 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:5:1).

Esimerkki 56

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-imidatsolyyli)asetyyli)glysiinin valmistus (Mmt-Aeg(Im)-OH)

1,79 g N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-imidatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 50 ml dioksaania ja 25 ml vettä, ja saippuoidaan lisäämällä 5,25 ml 1 N NaOH-liuosta. Sitten liuoksen pH säädetään 8:ksi lisäämällä 1 N HCl-liuosta ja se haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännös tislataan vielä kahdesti pienen määrän tolueenia kanssa, minkä jälkeen sitä puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä eluoiden seoksella dikloorimetaani/metanoli/etyyliasetaatti, 100:10:5, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin.

Saanto: 1,70 g

R_f: 0,27 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:20:1)

MS (ES^+): 499,3 $(M + H)^+$.

Seuraavaksi kuvataan muita synteesejä, joissa on klooriasetyylivälivaihe:

Esimerkki 57

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-(klooriasetyyli)glysiinimetyyliesterin DMF-liuoksen valmistus (Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe)

34,85 g Mmt-Aeg-OMe:tä liuotetaan 900 ml:aan THF:ää, minkä jälkeen lisätään hitaasti tipoittain samalla jäähdyttäen ja hyvin sekoittaen 6,9 ml klooriasetyylikloridia liuotettuna 110 ml:aan THF:ää ja samanaikaisesti 24 ml trietyyliamiinia liuotettuna 110 ml:aan THF:ää. Sitten seoksen annetaan reagoida vielä 1 tunnin ajan, saostunut trietyyliamiinihydrokloridi suodatetaan imulla eroon ja liuokseen lisätään 600 ml kuivaa DMF:ää. Sitten THF haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa pois. Saatu Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe-liuos DMF:ssä jaetaan.

Esimerkki 58

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(4-nitro)imidatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyylieste-rin valmistus (Mmt-Aeg($Im^{4\text{-nitro}}$)-OMe)

Yhteen puolikkaaseen edellä valmistettua Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe:n liuosta DMF:ssä lisätään 9,75 g hienoksi jauhettua 4-nitroimidatsolia ja 23,85 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. Seoksen annetaan reagoida edelleen 16 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen liukenematon aines suodatetaan imulla eroon. Suodos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin ja jäännös ositetaan veteen ja etyyliasetaattiin. Orgaaninen faasi pestään kolmasti kulloinkin 50 ml:lla vettä, se kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan sitten kuivausaineen eroon suodatuksen jälkeen tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 60 ml:an tilavuudeksi. Tämä liuos sekoitetaan sitten seokseen, jossa on 400 ml petrolieetteriä ja 200 ml dietyylieetteriä, jolloin tuote saostuu. Tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 19,8 g

R_f: 0,40 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:5:1)

MS (ES^+): 558,3 $(M + H)^+$.

Esimerkki 59

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(4-nitro)imidatsolyyli)asetyyli)glysiinin valmistus (Mmt-Aeg($Im^{4\text{-nitro}}$)-OH)

5,37 g N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(4-nitro)imidatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 20 ml metanolia, 80 ml vettä ja 13,9 ml trietyyliamiinia. Kirkkaan liuoksen annetaan seistä 48 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Tällöin lähtömateriaali on saippuoitunut ja liuos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännös tislataan vielä kahdesti pienen määrän tolueenia kanssa. Jäännös lietetään seokseen, jossa on 20 ml sekä dioksaania että etyyliasetaattia, pieni määrä ei-liukoista ainesta suodatetaan eroon ja suodos sekoitetaan 500 ml:aan eetteriä, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Saostunut tuote suodatetaan eroon, se pestään pienellä määrällä eetteriä ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 4,21 g

R_f: 0,24 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1)

MS (ES^+): 543,2 (M^+).

Esimerkki 60

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(1,2,4)-triatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesterin valmistus (Mmt-Aeg(Triaz)-OMe)

Toiseen puolikkaaseen edellä valmistettua Mmt-Aeg(klooriasetyyli)-OMe:n liuosta DMF:ssä lisätään 5,96 g hienoksi jauhettua 1,2,4-triatsolia ja 23,85 g hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia. Tämän seoksen annetaan reagoida vielä 16 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen ei-liukoinen aines suodatetaan imulla eroon. Suodos

haihdutetaan pyöröhaihduttimessa tyhjössä kuiviin ja jäännös ositetaan veteen ja etyyliasetaattiin. Orgaaninen faasi pestään kolmasti kulloinkin 50 ml:lla vettä, se kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan sitten kuivausaineen eroon suodatuksen jälkeen tyhjössä pyöröhaihduttimessa noin 60 ml:n tilavuuteen. Tämä liuos sekoitetaan sitten 400 ml:n petrolieetteriä ja 200 ml:n dietyylieetteriä seokseen, jolloin tuote saostuu. Tuote suodatetaan imulla eroon ja kuivataan eksikaattorissa.

Saanto: 17,4 g

R_f: 0,63 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:5:1).

Esimerkki 61

N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(1,2,4-triatsolyyli)asetyyli)glysiinin valmistus (Mmt-Aeg(Triaz)-OH)

5,13 g N-((4-metoksifenyyli)difenyylimetyyliamino)etyyli-N-((1-(1,2,4)-triatsolyyli)asetyyli)glysiinimetyyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 10 ml dioksaania, 10 ml metanolia, 80 ml vettä ja 13,9 ml trietyyliamiinia. Kirkkaan liuoksen annetaan seistä huoneenlämpötilassa 48 tunnin ajan. Tällöin lähtömateriaali on saippuoitunut ja liuos haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin. Jäännös tislataan vielä kahdesti pienen määrän tolueenia kanssa. Jäännös lietetään seokseen, jossa on 20 ml sekä dioksaania että etyyliasetaattia, pieni määrä eiliukoista ainesta suodatetaan eroon ja suodos sekoitetaan 500 ml:aan eetteriä, jossa on 1 % trietyyliamiinia. Saostunutta tuotetta (4,02 g) puhdistetaan kromatografisesti silikageelissä käyttäen vaihegradienttia (2 - 15 %) metanoli/etyyliasetaatti (1:1) dikloorimetaanissa, jolloin kaikissa liuottimissa on 1 % trietyyliamiinia. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä pyöröhaihduttimessa kuiviin.

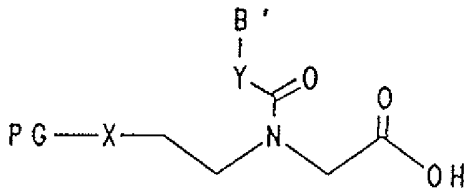
Saanto: 3,25 g

R_f: 0,27 (dikloorimetaani/metanoli/trietyyliamiini, 100:10:1)

MS (ES^+): 500,2 $(M + H)^+$.

Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on I:



(I),

jossa

PG on heikkojen happojen suhteen labiili aminonsuojaryhmä, joka on uretaanityyppiä ryhmästä 1-(1-adamantyyli)-1-metyylietoksikarbonyyli (Adpoc), 1-(3,5-di-tert-butyylifenyyli)-1-metyylietoksikarbonyyli (t-Bumeoc) ja 1-metyyli-1-(4-bifenyyli)etyylioksikarbonyyli (Bpoc), tai trityylityyppiä ryhmästä trifenyylimetyyli (Trt), (4-metoksifenyyli)difenyylimetyyli (Mmt), (4-metyylifenyyli)-difenyylimetyyli (Mtt), di-(4-metoksifenyyli)fenyylimetyyli (Dmt) ja 9-(9-fenyyli)ksantenyyli (Pixyl), ja

X on NH, O tai S,

Y on CH_2, NH tai O, ja

B' on luonnollinen nukleoemäs kuten adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini ja urasiili, tai ei-luonnollinen nukleoemäs kuten puriini, 2,6-diaminopuriini, 7-deatsa-adeniini, 7-deatsaguaniini, N^4N^4-etanosytosiini, N^6N^6-etano-2,6-diaminopuriini, 5-metyylisytosiini, 5-C_{2-6}-alkynyyliurasiili, 5-C_{2-6}-alkynyylisytosiini, 5-fluoriurasiili ja pseudoisosytosiini, joiden eksosykliset amino- tai hydroksiryhmät on suojattu sopivilla tutuilla suojaryhmillä, tai imidatsoli, triatsoli tai nitroimidatsoli.

mukaan lukien sen suolat.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, jonka kaava on I, t u n n e t t u siitä, että

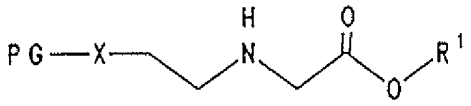
X on NH tai O,

Y on CH_2, ja

B' on luonnollinen nukleoemäs ryhmästä adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini ja urasiili, tai ei-luonnollinen nukleoemäs ryhmästä puriini, 2,6-diaminopuriini, 7-deatsa-adeniini, 7-deatsaguaniini, N^4N^4-etanosytosiini, N^6N^6-etano-2,6-diaminopuriini, 5-metyylisytosiini, 5-C_{3-6}-alkynyyliurasiili, 5-C_{3-6}-alkynyylisytosiini, 5-fluoriurasiili ja pseudoisosytosiini, joiden eksosykliset amino- tai hydroksiryhmät on suojattu bentsoyyli-, isobutanoyyli-, asetyyli-, fenoksiasetyyli-, 4-(t-butyyli)bentsoyyli-, 4-(t-butyyli)fenoksiasetyyli-, 4-(metoksi)bentsoyyli-, 2-(4-nitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 2-(2,4-dinitrofenyyli)etyylioksikarbonyyli-, 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli-, difenyylikarbamoyyli- tai formamidiinisuojaryhmällä, ja myös guaniinin kyseessä ollen on suojattu 2-N-asetyylin ja 6-O-difenyylikarbamoyylin yhdistelmällä, tai imidatsoli, triatsoli tai nitroimidatsoli.

3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on I, jossa Y on CH_2, t u n n e t t u siitä, että

a) yhdiste, jonka kaava on II:



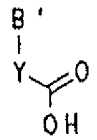
(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten patenttivaatimuksessa 1,

R^1 on vety tai esterinsuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on III:



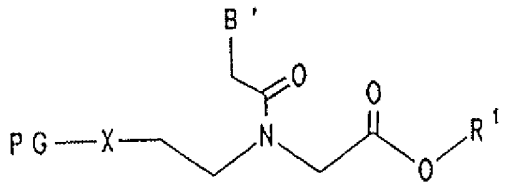
(III)

jossa

B' määritellään kuten edellä ja

Y on CH_2,

0 - 45 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa käyttäen peptidikemiassa tavallista kytkentäreagenssia, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on IV:



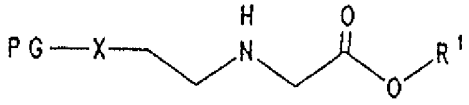
(IV)

jossa

PG, X, B' ja R^1 määritellään kuten edellä,

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan pilkkomalla esterinsuojaryhmä R^1 heikosti alkalisissa olosuhteissa alkalilipeällä tai tertiaarisilla amiiniyhdisteillä vedessä tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi, tai

b) yhdiste, jonka kaava on II:



(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on vety tai tilapäinen silyylisuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on V:

$$B' - CH_2 - CO - R^2 \qquad (V)$$

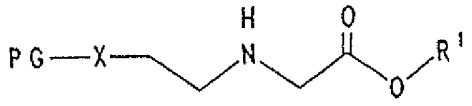
jossa

B' määritellään kuten edellä ja

R^2 on halogeeni tai aktiiviesteritähde,

0 - 40 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa, jolloin mahdollisesti voidaan suorittaa happofunktion kaavan II mukaisessa yhdisteessä tilapäinen suojaaminen saattamalla reagoimaan tavallisten silylointireagenssien kanssa ja tämän tilapäisen suojaryhmän pilkkominen - sen jälkeen kun on saatettu reagoimaan kaavan V mukaisen yhdisteen kanssa - lisäämällä vettä tai alkoholeja reaktioseokseen, tai

c) yhdiste, jonka kaava on II:



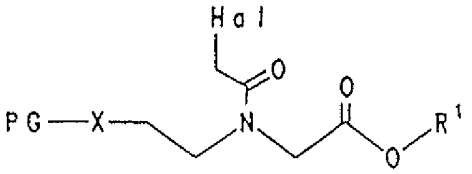
(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä ja

R^1 on esterinsuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan halogeenietikkahappojohdannaisen kanssa sopivassa liuottimessa apuemästä käyttäen, jolloin saadaan yhdiste, jonka kaava on VI:



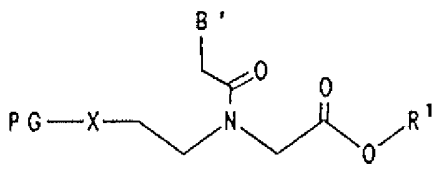
(VI),

jossa

Hal on Cl, Br tai I, ja

PG, X ja R^1 määritellään kuten edellä,

tämä välituoteyhdiste, jonka kaava on VI, muutetaan mahdollisesti suojatulla nukleoemäksellä B' ja apuemäksellä sopivassa liuottimessa yhdisteeksi, jonka kaava on IV:

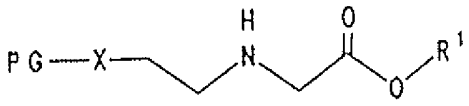


(IV)

minkä jälkeen tämä yhdiste muutetaan pilkkomalla esterinsuojaryhmä R^1 alkalilipeällä tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on I, jossa Y on O tai NH, t u n n e t t u siitä, että

yhdiste, jonka kaava on II:



(II),

jossa

PG ja X määritellään kuten edellä, ja

R^1 on esterinsuojaryhmä tai tilapäinen esterinsuojaryhmä,

saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on VII:

$$B' - Y - CO - R^3 \qquad (VII)$$

jossa

B' määritellään kuten edellä,

Y on O tai NH, ja

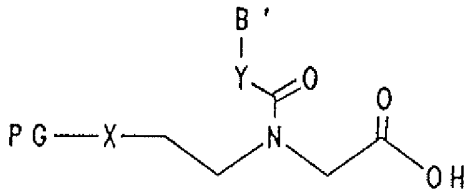
R^3 on Cl, ONp tai ONSu,

0 - 40 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa, minkä jälkeen esterinsuojaryhmä R^1 lohkaistaan alkalilipeällä tai myös entsymaattisesti esteraasien tai lipaasien avulla 0 - 50 °C:ssa sopivassa liuottimessa tai näiden liuottimien seoksessa.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisten kaavan I yhdisteiden käyttö PNA- ja PNA-/DNA-hybridien valmistamiseksi.

Patentkrav

1. Förening, kännetecknad av att dess formel är I:



(I),

där

PG är en i förhållande till svaga syror labil aminoskyddsgrupp, som är av uretantyp från gruppen 1-(1-adamantyl)-1-metyletoxikarbonyl (Adpoc), 1-(3,5-di-tert-butylfenyl)-1-metyletoxikarbonyl (t-Bumeoc) och 1-metyl-1-(4-bifenyl)etyloxikarbonyl (Bpoc), eller av trityltyp från gruppen trifenylmetyl (Trt), (4-metoxifenyl)difenylmetyl (Mmt), (4-metylfenyl)-difenylmetyl (Mtt), di-(4-metoxifenyl)fenylmetyl (Dmt) och 9-(9-fenyl)xantenyl (Pixyl), och

X är NH, O eller S,

Y är CH_2, NH eller O, och

B' är en naturlig nukleobas såsom adenin, cytosin, guanin, tymin och uracil, eller en icke-naturlig nukleobas såsom purin, 2,6-diaminopurin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, N^4N^4-etanocytosin, N^6N^6-etano-2,6-diaminopurin, 5-metylcytosin, 5-C_{2-6}-alkynyluracil, 5-C_{2-6}-alkynylcytosin, 5-fluoruracil och pseudoisocytosin, vilkas exocykliska amino- eller hydroxigrupper är skyddade med lämpliga kända skyddsgrupper eller imidazol, triazol eller nitroimidazol

inklusive dess salter.

2. Förening enligt patentkrav 1 med formeln I, kännetecknad av att

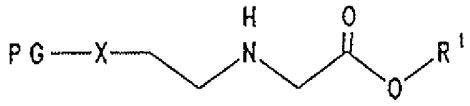
X är NH eller O,

Y är CH_2, och

B' är en naturlig nukleobas från gruppen adenin, cytosin, guanin, tymin och uracil, eller en icke-naturlig nukleobas från gruppen purin, 2,6-diaminopurin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, N^4N^4-etanocytosin, N^6N^6-etano-2,6-diaminopurin, 5-metylcytosin, 5-C_{3-6}-alkynyluracil, 5-C_{3-6}-alkynylcytosin, 5-fluoruracil och pseudoisocytosin, vilkas exocykliska amino- eller hydroxigrupper har skyddats med en bensoyl-, isobutanoyl-, acetyl-, fenoxiacetyl-, 4-(t-butyl)bensoyl-, 4-(t-butyl)fenoxiacetyl-, 4-(metoxi)-bensoyl-, 2-(4-nitrofenyl)etyloxikarbonyl-, 2-(2,4-dinitrofenyl)etyloxikarbonyl-, 9-fluorenylmetoxikarbonyl-, difenylkarbamoyl- eller formamidinskyddsgrupp, och även när guanin är i fråga har skyddats med en kombination av 2-N-acetyl och 6-O-difenylkarbamoyl, eller imidazol, triazol eller nitroimidazol.

3. Förfarande för framställning av en förening enligt patentkrav 1 eller 2 med formeln I, där Y är CH_2, kännetecknat av att

a) en förening med formeln II:



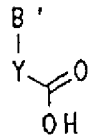
(II),

där

PG och X definieras såsom i patentkrav 1,

R^1 är väte eller en esters skyddsgrupp,

bringas att reagera med en förening med formeln III:



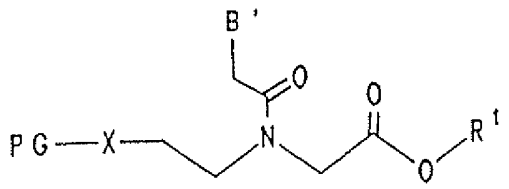
(III)

där

B' definieras såsom ovan och

Y är CH_2,

vid 0 - 45 °C i ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel genom användning av en inom peptidkemin vanlig kopplingsreagens, varvid erhålls en förening med formeln IV:



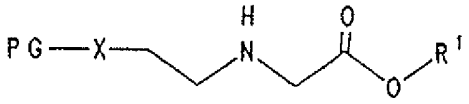
(IV)

där

PG, X, B' och R^1 definieras såsom ovan,

varefter denna förening ändras genom spjälkning av esterns skyddsgrupp R^1 under svagt alkaliska förhållanden med alkalilut eller tertiära aminföreningar i vatten eller också enzymatiskt med hjälp av esteraser eller lipaser vid 0-50 °C i ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel till en förening enligt formel I, eller

b) en förening med formeln II:



(II),

där

PG och X definieras såsom ovan, och

R^1 är väte eller en tillfällig silylskyddsgrupp,

bringas att reagera med en förening med formeln V

$$B' - CH_2 - CO - R^2 \qquad (V)$$

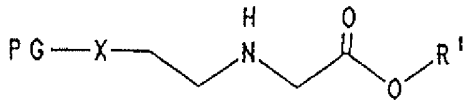
där

B' definieras såsom ovan och

R^2 är halogen eller en aktiv esterrest,

vid 0 - 40 °C i ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel, varvid man eventuellt kan utföra ett tillfälligt skydd av syrafunktionen i föreningen enligt formel II genom att bringa den att reagera med vanliga silyleringsreagenser och spjälkning av denna tillfälliga skyddsgrupp efter att man har bringat den att reagera med föreningen enligt formel V genom tillsättning av vatten eller alkoholer i reaktionsblandningen, eller

c) en förening med formeln II:



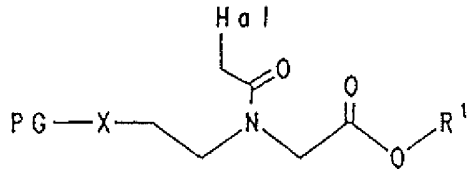
(II),

där

PG och X definieras såsom ovan och

R^1 är en esters skyddsgrupp,

bringas att reagera med ett halogenättiksyraderivat i ett lämpligt lösningsmedel genom användning av en hjälpbas, varvid erhålls en förening med formeln VI:



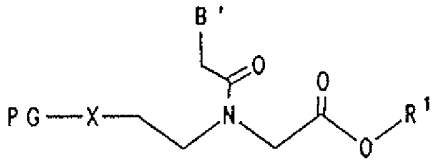
(VI),

där

Hal är Cl, Br eller I, och

PG, X och R^1 definieras såsom ovan,

denna mellanproduktförening med formeln VI ändras med den eventuellt skyddade nukleobasen B' och en hjälpbas i ett lämpligt lösningsmedel till en förening med formeln IV:

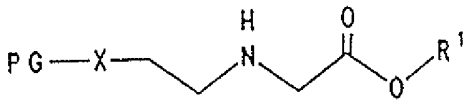


(IV)

varefter denna förening ändras genom spjälkning av esterns skyddsgrupp R^1 med alkalilut eller också enzymatiskt med esteraser eller lipaser vid 0 - 50 °C i ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel till en förening enligt formel I.

4. Förfarande för framställning av en förening enligt patentkrav 1 eller 2 med formeln I, där Y är O eller NH, kännetecknat av att

en förening med formeln II:



(II),

där

PG och X definieras såsom ovan och

R^1 är en esters skyddsgrupp eller en tillfällig esters skyddsgrupp,

bringas att reagera med en förening med formeln VII:

$$B' - Y - CO - R^3 \qquad \text{(VII)}$$

där

B' definieras såsom ovan,

Y är O eller NH, och

R^3 är Cl, ONp eller ONSu,

vid 0 - 40 °C i ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel, varefter en esters skyddsgrupp R^1 spjälks med alkalilut eller också enzymatiskt med hjälp av esteraser eller lipaser vid 0 - 50 °C i

ett lämpligt lösningsmedel eller en blandning av dessa lösningsmedel.

5. Användning av föreningar enligt patentkrav 1 eller 2 med formeln I för framställning av PNA- och PNA-/DNA-hybrider.