

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2002 - 2740**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 K 11/00**

**A 61 K 38/15**

**A 61 P 35/00**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.02.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.02.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0002952**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.01.2003**  
(Věstník č. 1/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/GB01/00576**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/058934**

(71) Přihlašovatel:

**PHARMA MAR, S. A., Madrid, ES;**

(72) Původce:

**Albericio Fernando, Barcelona, ES;**

**Giralt Ernest, Barcelona, ES;**

**Jimenez José Carlos, Barcelona, ES;**

**Lopez Angel, Barcelona, ES;**

**Manzanares Ignacio, Madrid, ES;**

**Rodriguez Ignacio, Madrid, ES;**

**Royo Miriam, Barcelona, ES;**

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

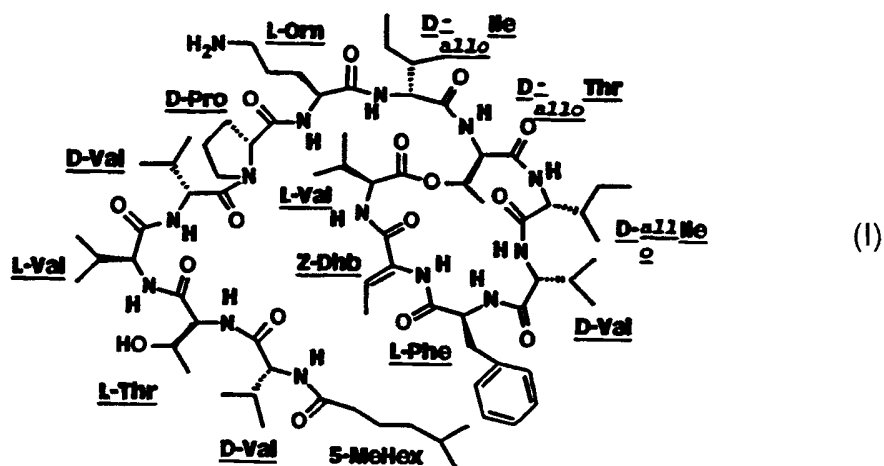
**Sloučenina, způsob přípravy sloučeniny,  
farmaceutický prostředek a způsob léčení  
rakoviny**

(57) Anotace:

Předložené řešení poskytuje postup přípravy kahalalidu F a jiných sloučenin, které kahalalid napodobují, a mají užitečnou biologickou aktivitu.

**CZ 2002 - 2740 A3**



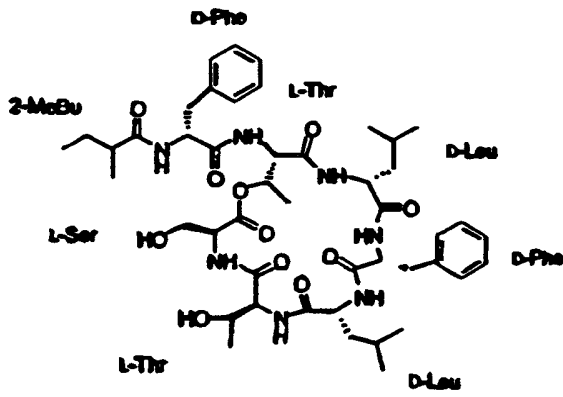


Nyní je přijímáno, a v tomto textu opět demonstrováno, že správný vzorec pro kahalalid F je obecný vzorec I.

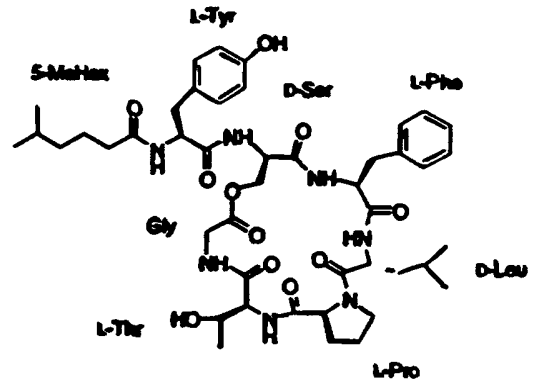
Jedná se o složitou strukturu, která obsahuje 6 aminokyselin v cyklické části a mimo tuto cyklickou část řetězec sedmi aminokyselin zakončený acylovou skupinou. Kahalalid F (obecný vzorec I) je výjimečně účinné a vzácné protinádorové činidlo mořského původu, jenže nedostatek odpovídajícího množství brzdí plány klinických pokusů.

Jsou známy jiné kahalalidové sloučeniny, například odkazujeme na práci Hamann, M. T. a kol., J. Org. Chem., 1996, „Kahalalidy: Biologicky aktivní peptidy z mořského měkkýše *Elysia rufescens* a z jeho stravy – řasy *Bryopsis sp.*, sv. 61, str. 6594-6660. Stejně jako pro kahalalid F, tento článek podává rovněž strukturu kahalalidu A a E. Kahalalid K byl popsán v J. Nat. Prod. 1999, 62, 1192 a kahalalid O byl popsán v J. Nat. Prod. 2000, 63, 152.

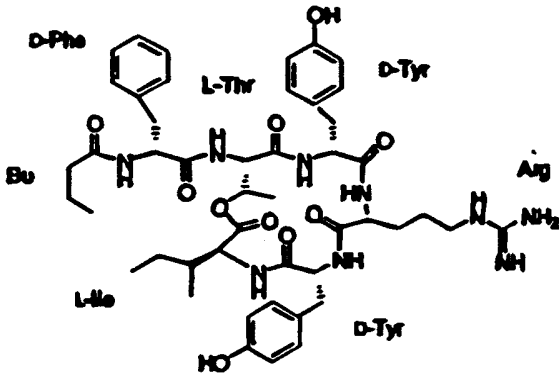
Struktura těchto dalších kahalalidových sloučenin je uvedena v následujících obecných vzorcích 1 až 11:



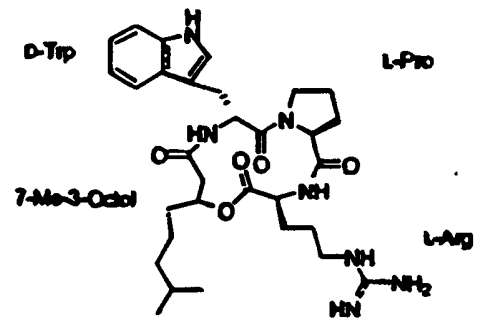
Kahalalid A (1)



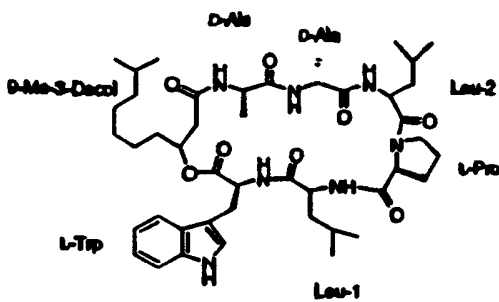
Kahalalid B (2)



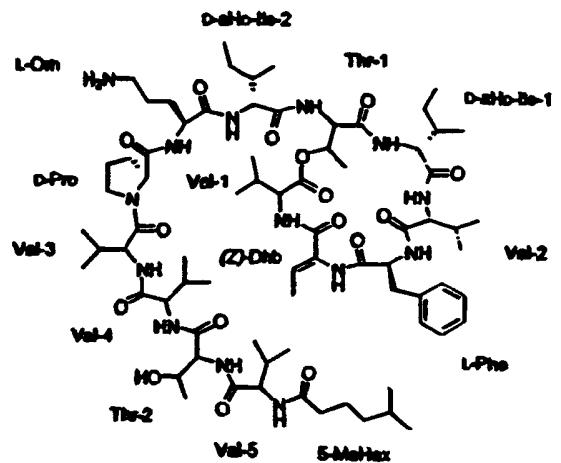
Kahalalid C (3)



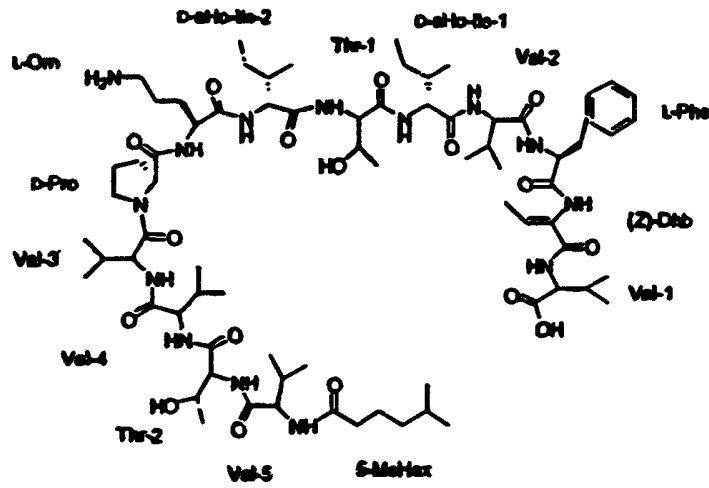
Kahalalid D (4)



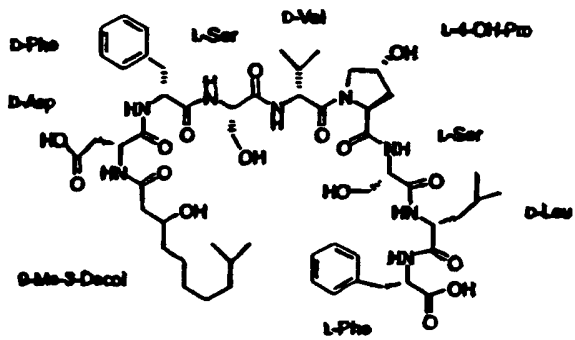
Kahalalid E (5)



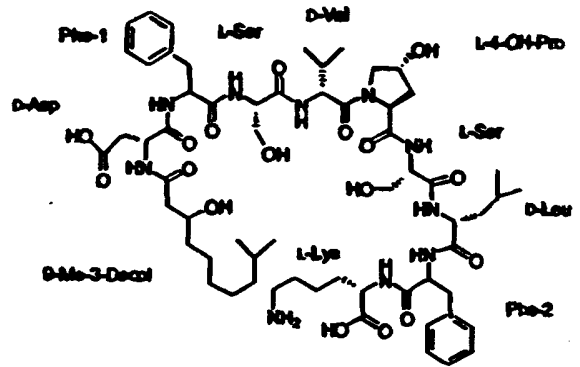
Kahalalid F (6)



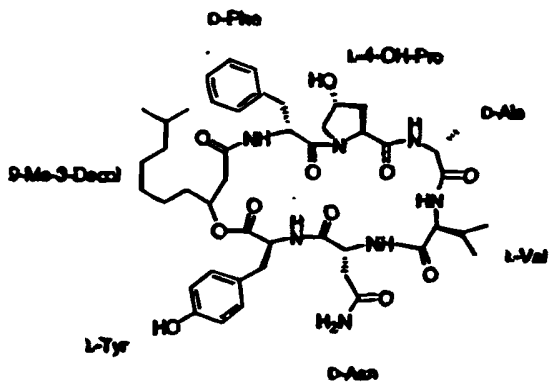
Kahalalid G (7)



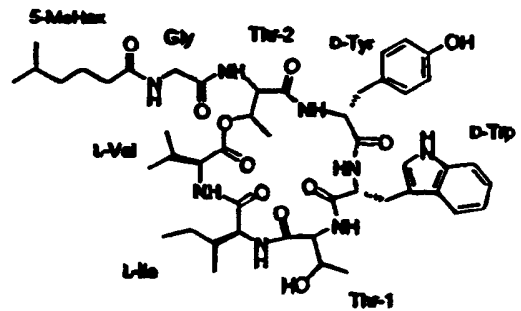
Kahalalid H (8)



Kahalalid J (9)



Kahalalid K (10)



Kahalalid O (11)



Cyklické kahalalidy obsahují aminokyselinový kruh a postranní řetězec, který je zakončen acylovou skupinou.

Kahalalidy mají řadu biologických aktivit, z nichž význačné jsou protinádorová a protituberkulózní aktivita.

### Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje napodobeniny přirozených kahalalidů. Sloučeniny se mohou odlišovat v jedné nebo více aminokyselinách a v jedné nebo více složkách postranního acylového řetězce.

Vhodné napodobeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mají alespoň jeden z následujících rysů, kterými se odlišují od původního přírodního kahalalidu:

1 až 7, případně 1 až 3, případně 1 nebo 2, případně 1 aminokyselina, která se liší od aminokyseliny původního kahalalidu;

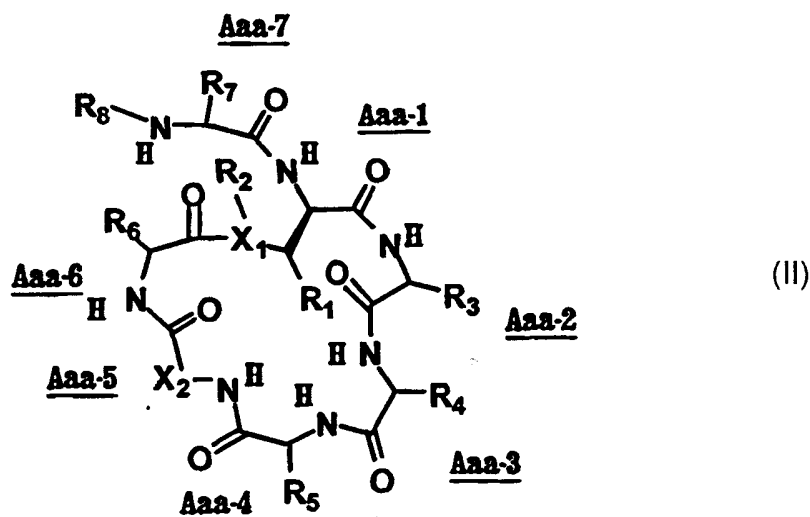
1 až 10, případně 1 až 6, případně 1 až 3, případně 1 nebo 2 další methylenové skupiny v acylové skupině postranního řetězce původní sloučeniny;

1 až 10, případně 1 až 6, případně 1 až 3, případně 1 nebo 2 vynechané methylenové skupiny v acylové skupině postranního řetězce původní sloučeniny;

1 až 6, případně 1 nebo 3 substituenty přidané nebo vynechané z acylové skupiny postranního řetězce původní sloučeniny.

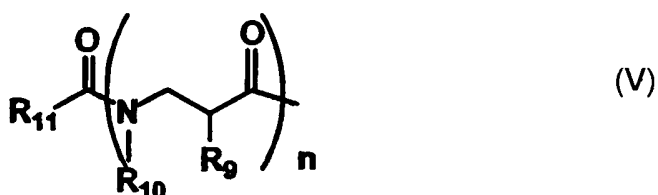
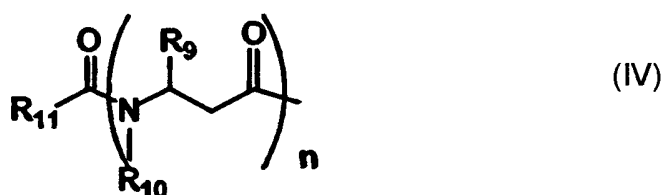
U cyklických kahalalidů se může přidání nebo vynechání aminokyseliny uskutečnit v kruhovém cyklu nebo v postranním řetězci.

Příklady předloženého vynálezu jsou sloučeniny podobné kahalalidu F, které mají obecný vzorec II:



kde Aaa<sub>1</sub>, Aaa<sub>2</sub>, Aaa<sub>3</sub>, Aaa<sub>4</sub>, Aaa<sub>6</sub> a Aaa<sub>7</sub> jsou, pokud vyhovují, nezávisle na sobě α-aminokyseliny L a D konfigurace, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> jsou nezávisle na sobě H nebo organická skupina vybraná ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu, aryllovou skupinu, arylalkylovou skupinu a jejich deriváty substituované hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou, aminoskupinou, guanidinovou skupinou, halogenovou skupinou; X<sub>1</sub> je nezávisle O, S nebo N; R<sub>2</sub> je, pokud vyhovuje, nezávisle H nebo organická skupina vybraná ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu a arylalkylovou skupinu; Aaa<sub>5</sub> je, pokud vyhovuje, nezávisle aminokyselina L nebo D konfigurace; kde X<sub>2</sub> je nezávisle organická skupina vybraná ze skupiny zahrnující alkenyl, alkylovou skupinu, aryllovou skupinu, arylalkylovou skupinu a jejich deriváty substituované hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou, nezávisle H nebo organická skupina vybraná ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu, aryllovou skupinu, arylalkylovou skupinu a jejich deriváty substituované hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou, aminoskupinou, guanidinovou skupinou, halogenovou skupinou; a R<sub>8</sub> má nezávisle následující obecné vzorce III, IV nebo V:





kde  $R_9$ ,  $R_{10}$  a  $R_{11}$  jsou nezávisle na sobě H nebo organická skupina vybraná ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu, arylovou skupinu, arylalkylovou skupinu a jejich deriváty substituované hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou, aminoskupinou, guanidinovou skupinou, karboxylovou skupinou, karboxamidovou skupinou, halogenovou skupinou;  $R_9$  a  $R_{10}$  mohou tvořit část téhož cyklu;  $R_9$  může zaujímat S nebo R konfiguraci vzhledem k uhlíku, ke kterému je připojen; a  $n$  je 0 až 6. Definice aminokyselin se také mohou měnit a dovolit prolin a analogické aminokyseliny včetně hydroxyprolinu. Obecné vzorce III, IV a V mohou být vzájemně promíchány a znázorňovat postranní řetězce vytvořené z opakujících se jednotek, uvedených ve více než jednom z těchto obecných vzorců.

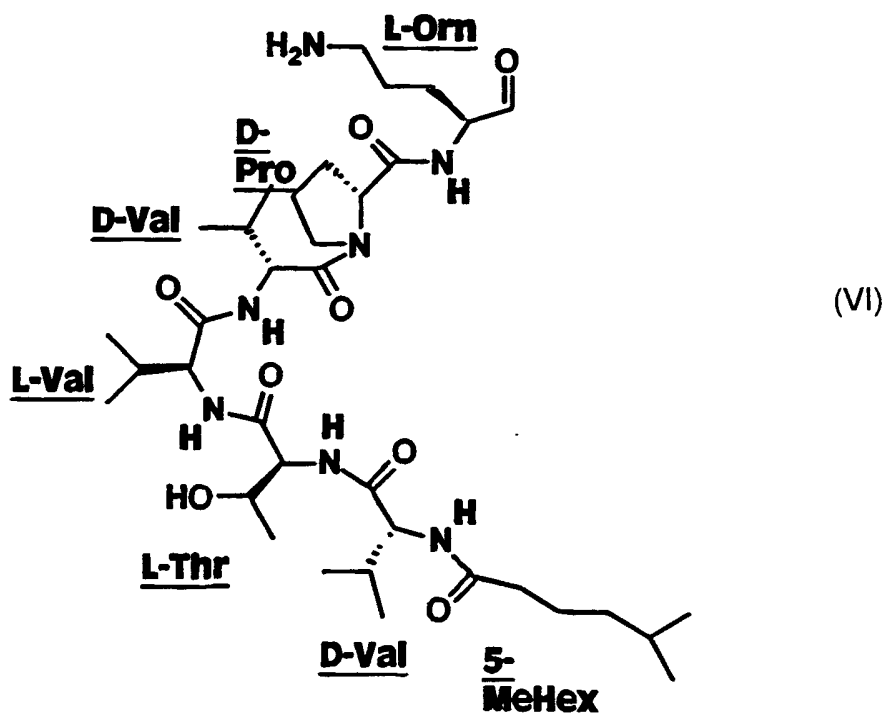
V modifikaci je jedna nebo více aminokyselin Aaa-6 a Aaa-5 z šestičlenného aminokyselinového kruhu vynecháno nebo je přidána aminokyselina Aaa-7 mezi Aaa-6 a Aaa-1, aby bylo dosaženo kruhů, které jsou složeny ze čtyř, pěti nebo sedmi aminokyselin. Výhodné je, když je kruh složen ze šesti aminokyselin.

Předložený vynález je dále zaměřen na syntetický postup přípravy kahalalidu F a podobných sloučenin.

#### Výhodná provedení

Výhodné sloučeniny jsou podobné kahalalidu F (obecný vzorec I), kde v obecném vzorci II Aaa-1 je D-allo-Thr ( $X_1 = O$ ,  $R_1 = CH_3$ ), Aaa-2 je D-allo-Ile ( $R_3 = 1$ -methylpropyl), Aaa-3 je D-Val ( $R_4 =$  isopropyl), Aaa-4 je Phe ( $R_5 =$  benzyl), Aaa-5 je Z-Dhb ( $X_2 = C=CHCH_3$  v Z konfiguraci), Aaa-6 je L-Val ( $R_6 =$  isopropyl), Aaa-7 je D-allo-

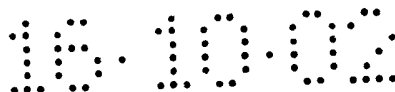
-Ile ( $R_7 = 1\text{-methylpropyl}$ ) a  $R_8$  obsahuje hexapeptidový derivát následujícího obecného vzorce VI:



Další výhodné sloučeniny jsou analogicky podobné ostatním kahalalidům a mají aminokyseliny a postranní řetězce s těmito sloučeninami společné. Odvoláváme se na známé struktury kahalalidů. Výhodná je taková sloučenina tohoto vynálezu, která napodobuje přirozený kahalalid, přičemž je na jednom nebo více místech molekuly modifikována, je do ní něco vloženo nebo něco odstraněno.

Zvláště výhodné jsou sloučeniny, které mají aminokyseliny jako jsou v přírodní cyklické kahalalidové sloučenině ale liší se postranním řetězcem, zvláště v acylové části. Takové odchylky mohou zahrnovat více nebo méně methylenových skupin, v typickém případě nejvýše změnu ve dvou methylenových skupinách a více nebo méně substituentů, jmenovitě přidání halogenu jako jsou fluorové substituenty.

Zde používaný termín „organická skupina“ označuje uhlovodíkovou skupinu, která je klasifikována jako alifatická skupina, cyklická skupina nebo kombinace alifatické a cyklické skupiny (např. arylalkylové skupiny). V kontextu předloženého vynálezu termín „alifatická skupina“ označuje nasycený nebo nenasycený, lineární



nebo rozvětvený uhlovodík. Tento termín zahrnuje například alkylové, alkenylové a alkinylové skupiny.

Termín „alkylová skupina“ označuje nasycenou lineární nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu, které zahrnují například methyl, ethyl, isopropyl, isobutyl, t-butyl, heptyl, dodecyl, oktadecyl, amyl, 2-ethylhexyl, 2-methylbutyl, 5-methylhexyl, 9-methyl-3-decyl a podobně, zvláště alkylové skupiny, které mají jednu postranní methylovou skupinu. Vhodná alkylová skupina je dlouhá a má 1 až 20 uhlíkových atomů, výhodněji 1 až 15 nebo 1 až 10 uhlíkových atomů, nebo může být krátká a má 1 až 6 nebo 1 až 3 uhlíkové atomy. Je vhodné, když skupina  $R_{11}$  má dlouhý uhlíkový řetězec a obecně všechny ostatní alkylové skupiny jsou s výhodou krátké.

Termín „alkenylová skupina“ označuje nenasycenou lineární nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu s jednou nebo více dvojnými vazbami uhlík-uhlík, jako je například vinylová skupina. Vhodná alkenylová skupina má 2 až 8 nebo 2 až 4 uhlíkové atomy.

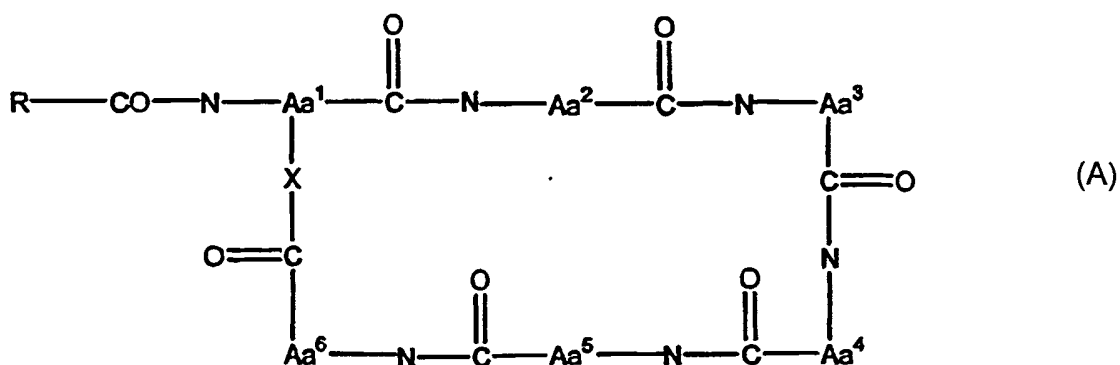
Termín „alkinylová skupina“ označuje nenasycenou lineární nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu s jednou nebo více trojnými vazbami uhlík-uhlík. Vhodná alkinylová skupina má 2 až 8 nebo 2 až 4 uhlíkové atomy.

Termín „cyklická skupina“ označuje uhlovodíkovou skupinu s uzavřeným cyklem, která je klasifikována jako alicyklická skupina, aromatická skupina nebo heterocyklická skupina. Termín „alicyklická skupina“ označuje cyklickou uhlovodíkovou skupinu, která se svými vlastnostmi podobá alifatickým skupinám a je vhodné, když má jeden nebo dva cykly se 4 až 10 uhlíkovými atomy. Termín „aromatická skupina“ nebo „arylová skupina“ označuje aromatickou uhlovodíkovou s jedním nebo mnoha cykly, a je vhodné, když má jeden nebo dva cykly se 5 až 10 uhlíkovými atomy. Termín „heterocyklická skupina“ označuje uzavřený kruhový uhlovodík, ve kterém na místě jednoho nebo více uhlíkových atomů v kruhu je jiný prvek než uhlík (např. 1 až 3 nebo více atomů dusíku, kyslíku, síry atd.), a je vhodné, když má jeden nebo dva cykly, ve kterých jsou umístěny 4 až 10 atomy.

V této technické oblasti se má za to, že velký rozsah substituce je nejen tolerován, ale často je i vhodný. U sloučenin předloženého vynálezu je substituce předpokládána. Pro zjednodušení diskuse a zavedení určité terminologie používané v této přihlášce, jsou termíny „skupina“ a „složka“ používány pro rozlišení mezi chemickými druhy, které umožňují substituci nebo které mohou být substituovány a

těmi, které ji neumožňují nebo nemohou být takto substituovány. Tedy když je pro chemický substituent použit termín „skupina“, popisovaná chemická látka obsahuje například v řetězci nesubstituovanou skupinu a skupinu s atomy O, N nebo S, rovněž tak karbonylovou skupinu nebo jiné běžné substituenty. Když je pro popis chemické sloučeniny nebo substituentu použit termín „složka“, znamená to, že se počítá pouze s nesubstituovanými chemickými látkami. Například výrazem „alkylová skupina“ je označována nikoli pouze čistý otevřený řetězec nasycených uhlovodíkových alkylových substituentů jako jsou methyl, ethyl, isopropyl, isobutyl, t-butyl a podobně, ale také alkylové substituenty nesoucí na sobě další substituenty známé v oboru, jako jsou hydroxylová skupina, alkoxylová skupina, aminoskupina, karboxylová skupina, karboxamidová skupina, halogenové atomy, kyanoskupina, nitroskupina, alkylsulfonylová skupin atd. Tedy „alkylová skupina“ zahrnuje éterové skupiny, halogenované alkyly, alkoholy, thioly, karboxyly, aminy, hydroxyalkyly, sulfoalkyly atd. Obyčejně je dáována přednost halogenovaným alkylovým skupinám. Na druhé straně výraz „alkylová složka“ je omezen pouze na zabudování čistého otevřeného řetězce nasyceného uhlovodíkového alkylového substituentu jako je methyl, ethyl, propyl, isobutyl a podobně.

Ve zvláště výhodném provedení tohoto vynálezu poskytujeme sloučeninu obecného vzorce A:



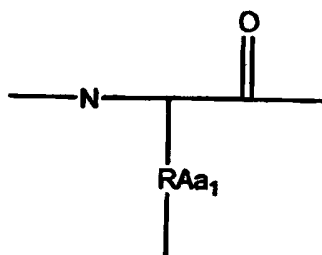
kde každý z Aa<sup>1</sup> až Aa<sup>6</sup> se sousedním –N– respektive –CO– představuje α nebo β aminokyselinu, s výhodou α aminokyselinu, X je vazebná skupina Aa<sup>1</sup>, s výhodou vybraná z aminoskupiny, hydroxylové skupiny nebo thiolové skupiny, výhodnější je hydroxylová skupina, a R je skupina volitelně zahrnující jednu nebo více α nebo β aminokyselin, s výhodou α aminokyselin. Ve variantě nemusí být –CO–Aa<sup>6</sup>–N–

přítomno, je možno aby chybělo také  $-\text{CO}-\text{Aa}^5-\text{N}-$  nebo jinou možností je, že je mezi  $\text{Aa}^6$  a  $\text{Aa}^1$  vloženo  $-\text{CO}-\text{Aa}^7-\text{N}-$ .

Aminokyseliny mohou mít L nebo D konfiguraci. Je výhodné, když je konfigurace stejná jako u odpovídající aminokyseliny v kahalalidové sloučenině, zvláště v kahalalidu F. Jedna nebo více  $\text{Aa}^1$  až  $\text{Aa}^6$  s výhodou odpovídá aminokyselině na stejné pozici v přírodním kahalalidu nebo v jeho obdobě. Ve zvláště výhodném provedení je každá aminokyselina stejná jako v kahalalidu F. Tedy výhodné jsou jako  $\text{Aa}^1$  D-allo-Thr, jako  $\text{Aa}^2$  D-allo-Ile, jako  $\text{Aa}^3$  D-Val, jako  $\text{Aa}^4$  Phe, jako  $\text{Aa}^5$  Z-Dhb, jako  $\text{Aa}^6$  L-Val.

Když jsou používány sloučeniny obdobné, pak vhodné jsou takové, které mají nahrazeny aminokyseliny a náhrada je provedena s ohledem na strukturu příslušných aminokyselin v přírodním kahalalidu, jako je kahalalid F. Náhražkami threoninu jsou serin a jeho homology a rovněž cystein a jeho homology. Náhražkami isoleucinu jsou jiné aminokyseliny s nepolárními skupinami, jako jsou alanin, valin, leucin a prolin, a rovněž jejich analogy a homology. V tomto ohledu výskyt atomů dusíku  $-\text{N}-$  v obecném vzorci A nevylučuje možnost tvorby kruhu, tak jako k tomu dochází s prolinem. Náhražkami valinu jsou isoleucin a jiné aminokyseliny s nepolárními skupinami, včetně jejich analogů a homologů. Náhražkami fenylalaninu jsou tryptofan a tyrozin. Náhražkami Dhb jsou jiné aminokyseliny s takovým alkenyldenovým substituentem, včetně aminokyselin s  $\text{C}_3$  nebo delšími postranními řetězci a rovněž jejich analogy a homology.

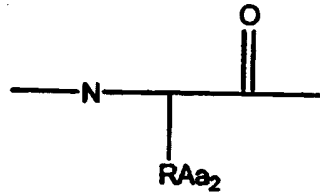
$\text{Aa}^1$  má s výhodou obecný vzorec:



kde  $\text{RAa}_1$  je postranní řetězec, obsahující vazebnou skupinu X. Příklady postranních řetězců jsou alkyl, aryl a arylalkyl, především alkyl, typicky alkyl s 1 až 4, hlavně se 2 uhlíkovými atomy. Výhodný je rozvětvený alkyl. Je vhodné, když vazebnou skupinou X je kyslík, přičemž je výhodné, když  $\text{Aa}^1$  je odvozeno od threoninu, avšak mohou být

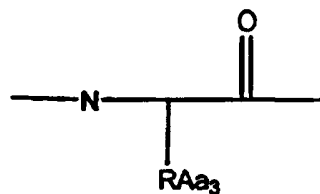
použity i jiné vazebné skupiny jako je síra nebo aminoskupina (nesubstituovaná nebo substituovaná alkylem, arylem nebo arylalkylem). Je vhodné, když skupina X je jedinou polární skupinou v  $Aa^1$ .  $Aa^1$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v D konfiguraci.

$Aa^2$  má s výhodou obecný vzorec:



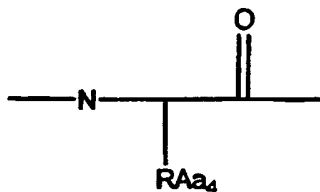
kde  $RAa_2$  je postranní řetězec jako je alkyl, aryl a arylalkyl, především alkyl, typicky alkyl s 1 až 5, hlavně se 3 uhlíkovými atomy. Výhodný je rozvětvený alkyl, jako je v isoleucinu. Je vhodné, když v  $Aa^2$  nejsou polární substituenty.  $Aa^2$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v D konfiguraci.

$Aa^3$  má s výhodou obecný vzorec:



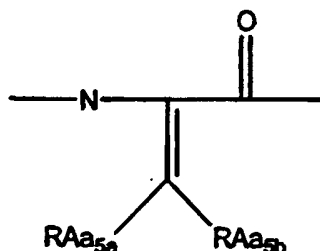
kde  $RAa_3$  je postranní řetězec jako je alkyl, aryl a arylalkyl, především alkyl, typicky alkyl s 1 až 5, hlavně se 3 uhlíkovými atomy. Výhodný je rozvětvený alkyl, jako je ve valinu. Je vhodné, když v  $Aa^3$  nejsou polární substituenty.  $Aa^3$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v D konfiguraci.

$Aa^4$  má s výhodou obecný vzorec:



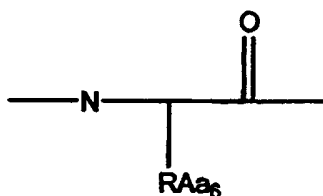
kde  $RAa_4$  je postranní řetězec jako je alkyl, aryl a arylalkyl, především arylalkyl, typicky arylalkyl s 7 až 10, hlavně se 7 uhlíkovými atomy. Výhodný je benzyl, jako je ve fenylalaninu. Je vhodné, když v  $Aa^4$  nejsou polární substituenty.  $Aa^4$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v L konfiguraci.

$Aa^5$  má s výhodou obecný vzorec:



kde každý z  $RAa_{5a}$  a  $RAa_{5b}$  je vybrán ze skupiny zahrnující vodík nebo postranní řetězce jako je alkyl, aryl a arylalkyl, především alkyl, typicky alkyl s 1 až 4, hlavně s 1 uhlíkovým atomem. S výhodou je  $RAa_{5a}$  vodík vytvářející Z konfiguraci, jako je například ve výhodné kyselině a,b-didehydro-a-aminomáselná. Je vhodné, když v  $Aa^5$  nejsou polární substituenty.  $Aa^5$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v L konfiguraci.

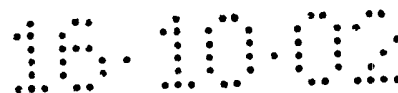
$Aa^6$  má s výhodou obecný vzorec:



kde  $RAa_6$  je postranní řetězec jako je alkyl, aryl a arylalkyl, především alkyl, typicky alkyl s 1 až 5, hlavně se 3 uhlíkovými atomy. Výhodný je rozvětvený alkyl, jako je ve valinu. Je vhodné, když v  $Aa^6$  nejsou polární substituenty.  $Aa^6$  může být racemickou směsí, L nebo D, ale je výhodné, když je v L konfiguraci.

Aminokyseliny  $Aa^1$  až  $Aa^7$  mohou být takové, jak jsou definovány pro skupiny  $Aaa-1$  až  $Aaa-7$  v obecném vzorci II.

S výhodou postranní řetězec obsahuje 5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile, nebo jeho obdobu, včetně analogů a homologů. Příklady obdobných



řetězců zahrnují takové, které mají obecný vzorec  $(R^t)_m-(\text{aminokyselina})_n-$ , kde  $m + n$  nejsou nula,  $R^t$  představuje koncovou skupinu, výhodný je alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, arylalkyl, heteroaryl, heteroalkyl, alicyklickou nebo jinou koncovou skupinu, a  $-(\text{aminokyselina})_n-$  představuje volitelný řetězec aminokyselin.

Je vhodné, když koncová alkylová skupina má 1 až 12 uhlíkových atomů, výhodnější když má č až 10 uhlíkových atomů, může být substituována a je výhodné když je rozvětvená. Mezi příklady patří butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl a další alkylové skupiny, obsahující 1 nebo více methylů nebo ethylů, nebo delší postranní skupiny, které s výhodou obsahují 1 až 6 uhlíkových atomů, především 5-methylhexyl a jiné alkylové skupiny, které jsou rozvětvené na opačném konci, než je jejich připojení ke zbytku molekuly. Mezi vhodné substituenty patří skupiny jako jsou halogenová, hydroxylová, alkoxylová, aminová, karboxylová, karboxamidová, kyanová, nitroskupina, alkylsulfonylová, alkoxylová, alkoxyalkylová, arylalkylarylová, heterocyklická, alicyklická, arylová, arylalkylová a další skupiny, které jsou zde zmíněny. Pokud je to vhodné, mohou tyto substituenty nést další substituenty, jako například tolylovou skupinu. Halogenové substituenty jsou v současné době nejvíce preferovány, zvláště 1 nebo více, jako například 1 až 3 atomy fluoru. Další koncové skupiny mohou být vybrány podle poučení v textu a zahrnují alicyklické, arylalkylové, arylové, heterocyklické nebo jiné skupiny s možnými 1 nebo více substituenty, především s 1 až 3.

Postranní řetězec R-CO-N- může na dusíku obsahovat vodík nebo substituent jako je alkylová, arylová nebo arylalkylová skupina.

Vhodné obdoby postranních řetězců používají substituované aminokyseliny, vybrané v soulase s výše uvedenými principy, přičemž pro aminokyseliny v cyklické části molekuly jsou vybírány alternativy isoleucinu, valinu a threoninu, a alternativy ornitinu zahrnují lyzin, histidin, arginin; alternativy prolinu zahrnují alanin a jiné nepolární aminokyseliny jako jsou glycin, isoleucin a jiné, dříve zmíněné aminokyseliny. V typickém případě má řetězec R 0 až 10, výhodněji 4 až 8, jako např. 5, 6 nebo 7, zejména 7 aminokyselin. Tam kde je více než 7 aminokyselin, je výhodné když tyto dodatečné aminokyseliny jsou přirozené aminokyseliny, zvláště ty, které jsou zde uvedeny.

Aminokyseliny mohou být použity buď ve formě racemické směsi nebo jako forma L nebo D. Když se aminokyseliny vyskytují v postranním řetězci R je výhodné, když se jedna nebo více z nich vyskytuje ve stejné konfiguraci, jako v přirozeném

postranním řetězci. Počítáno od cyklického hexapeptidu, aminokyselinové zbytky jsou v konfiguraci DLDDLLD. Je vhodné, když koncová alkylová skupina má 1 až 12 uhlíkových atomů, výhodněji 4 až 10 uhlíkových atomů, mohou být substituovány a je výhodné, když jsou rozvětvené. Mezi vhodné substituenty patří skupiny jako jsou halogen, hydroxylová, alkoxylová, aminová, karboxylová, karboxamidová, kyanová, nitroskupina, alkylsulfonylová a další skupiny, které jsou zde zmíněny. Halogenové substituenty jsou v současné době nejvíce preferovány.

Obecněji může být postranní řetězec R-CO-N- ve sloučeninách obecného vzorce II definován jako postranní řetězec  $R_8\text{-NH-CHR}_7\text{-CO-NH-}$ , včetně sloučenin obsahujících směsi aminokyselin, které jsou definované v obecných vzorcích III, IV a V.

Třebaže výhodné rysy byly popsány odkazem na kahalalid F, tato přihláška poskytuje jiné výhodné sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, a jsou to podle stejných principů navrhované napodobeniny jiných kahalalidů. Tudiž mohou být změněny aminokyseliny a postranní řetězce, s výhodou ale tak, aby byla zachována hydrofilně-hydrofobní rovnováha mezi polárními a nepolárními skupinami.

Sloučeniny které jsou předmětem tohoto vynálezu, mají výhodnou biologickou aktivitu, mimo jiné protinádorovou aktivitu.

Předložený vynález tedy poskytuje způsob léčení jakéhokoli savce, včetně člověka, který je postižen rakovinou, kdy tento způsob zahrnuje podání postiženému jedinci terapeuticky účinného množství sloučeniny, která je předmětem tohoto vynálezu, nebo farmaceutického prostředku, který ji obsahuje.

Předložený vynález se také týká farmaceutických přípravků, které jako svou aktivní složku obsahují sloučeninu nebo sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, a rovněž postupy jejich přípravy.

Příklady farmaceutických prostředků zahrnují jakoukoli tuhou látku (tablety, pilulky, kapsle, granule atd.) nebo tekutinu (roztoky, suspenze nebo emulze), která má vhodné složení nebo orální, místní nebo parenterální způsob podávání, a mohou obsahovat čistou sloučeninu nebo tuto sloučeninu v kombinaci s jakýmkoli nosičem nebo farmakologicky aktivními sloučeninami. Pokud jsou tyto prostředky podávány parenterálně, je potřeba, aby byly sterilní.

Podávání sloučenin nebo prostředků předloženého vynálezu může být prováděno jakýmkoli vhodným způsobem, jako je intravenózní infúze, orální přípravky, intraperitoneální a intravenózní podávání. Přednost je dávana infúzním dobám až 24

hodin, výhodněji 2 až 12 hodin a nejuvýhodněji 2 až 6 hodin. Zvláště žádoucí jsou krátké infúzní doby, které umožňují aby léčení bylo provedeno bez celonočního pobytu v nemocnici. Avšak infúze mohou trvat, pokud je to vyžadováno, 12 až 24 hodin nebo ještě déle. Infúze mohou být provedeny ve vhodných intervalech, řekněme 2 až 4 týdnů. Farmaceutické prostředky obsahující sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být dodávány lipozomem nebo zapouzdřené ve strukturách nanometrových rozměrů, formami trvalého uvolňování nebo jinými standardními způsoby podávání.

Správné dávkování sloučenin bude variovat v závislosti na určitém přípravku, na způsobu aplikace, na poloze, na hostiteli a na léčeném nádoru. V úvahu budou brány i jiné faktory jako jsou věk, tělesná hmotnost, pohlaví, strava, doba podávání, rychlost vylučování, stav hostitele, kombinace léků, citlivost reakce a vážnost choroby. Podávání může být v rámci maximálně povolené dávky prováděno kontinuálně nebo periodicky.

Sloučeniny a prostředky předloženého vynálezu mohou být použity s jinými léky a poskytnout tak kombinovanou terapii. Jiné léky mohou tvořit součást téhož prostředku nebo mohou být poskytovány jako oddělený prostředek, podávaný v téže době nebo v jiné době. Identita jiného léku není nijak zvláště omezena a mezi vhodné kandidáty patří:

- a) léky s antimitotickými účinky, speciálně ty, které jsou zaměřeny na elementy cytoskeletu, včetně modulátorů mikrotubulů, jako jsou taxanové léky (jako je taxol, paclitaxel, taxoter, dodetaxel), podofylotoxiny nebo alkaloidy z brčálu (vincristin, vinblastin);
- b) léky antimetabolity jako jsou 5-fluorouracil, cytarabin, gemcitabin, analogy purinu, jako jsou pentostatin, methotrexát;
- c) alkylační činidla jako jsou dusíkaté hořčičné sloučeniny (jako jsou cyklofosfamid nebo ifosfamid)
- d) léky které cíleně působí na DNA, jako jsou antracyklinové léky adriamycin, doxorubicin, farmorubicin nebo epirubicin;
- e) léky které cíleně působí na topoisomerázy, jako je etoposid;
- f) hormony, agonisté a antagonisté hormonů, jako jsou estrogeny, antiestrogeny (tamoxifen a podobné sloučeniny) a androgeny, flutamid, leuprorelin, goserelin, cyprotron nebo oktreetid;

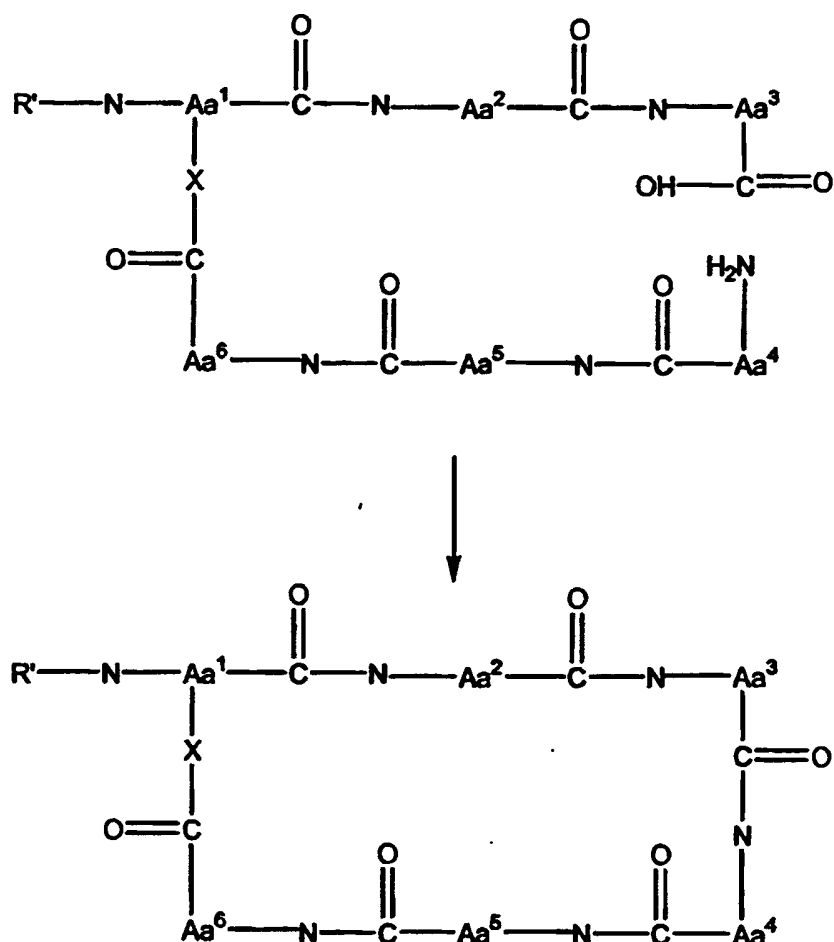
- g) léky které cíleně působí na přenos signálu v nádorových buňkách, včetně derivátů antibiotik jako je herceptin;
- h) alkylační léky jako jsou léky obsahující platinu (cis-platin, carbonplatin, oxalipatin, paraplatin) nebo nitrosomočoviny;
- i) léky potenciálně ovlivňující metastázy nádorů, jako jsou inhibitory metaloproteináz v cytoplazmě;
- j) činidla pro genovou terapii a antisense terapii;
- k) protilátková léčiva;
- l) jiné biologicky aktivní sloučeniny mořského původu, zejména ekteinascidiny jako je ekteinascidin 743 nebo didemniny jako je aplidin;
- m) analogy steroidů, zejména dexametazon;
- n) protizánětlivé léky, zejména dexametazon; a
- o) protidávivé léky, zejména dexametazon.

Předložený vynález se také týká těch sloučenin vynálezu, které se používají v léčebné metodě, a použití sloučenin při přípravě prostředku pro léčení rakoviny.

U sloučenin předloženého vynálezu se také očekává, že budou mít protituberkulózní aktivitu.

Tímto vynálezem je také poskytnut postup pro přípravu sloučenin vynálezu, včetně kahalalidu F, který obsahuje uzavření kruhu mezi Aa<sub>3</sub> a Aa<sub>4</sub>. Bylo zjištěno, že uzavření kruhu v této pozici umožní vynikající postup. Ostatní modifikace, včetně vytvoření nebo rozšíření postranního řetězce na Aa<sub>1</sub> a/nebo odstranění chránících skupin a/nebo modifikování substituentů na aminokyselinách, mohou být provedeny před a/nebo po uzavření kruhu.

Tedy proces může být znázorněn následujícím schématem:



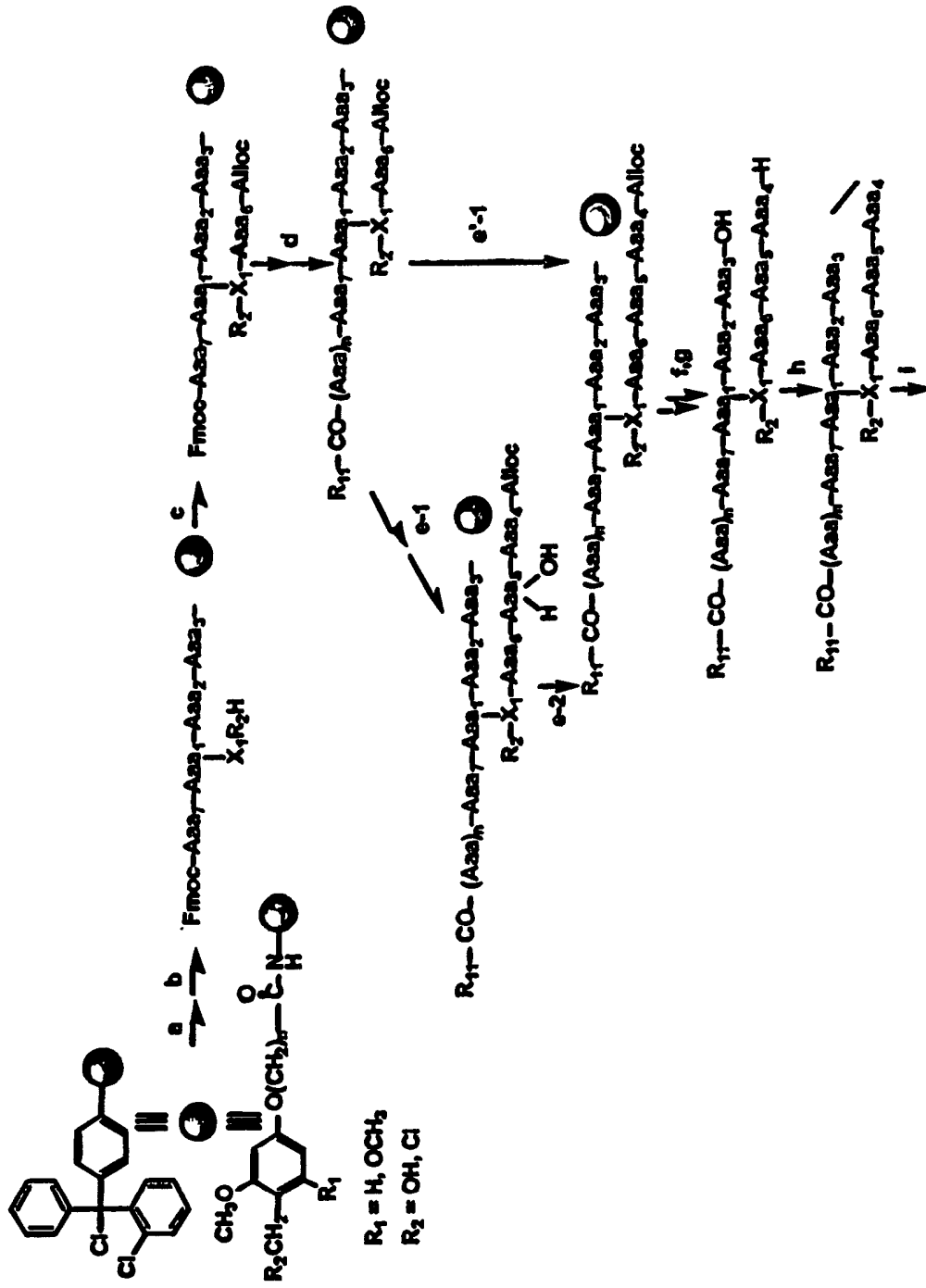
kde R' je skupina R-CO-N- nebo její prekurzor, a kde jedna nebo více aminokyselin může obsahovat chránící skupiny, a kde -COOH na Aa<sup>3</sup> a/nebo -NH<sub>2</sub> na Aa<sup>4</sup> mohou být volitelně chráněny, aktivovány nebo derivovány. Takové postupy pro používání prekurzorů nebo chránících skupin, pro aktivaci nebo derivování jsou samy o sobě zcela běžné a pro praktické provádění tohoto postupu není potřeba uvádět další podrobnosti.

Postup, který je předmětem předloženého vynálezu, může být uskutečněn z výchozích materiálů rychlým způsobem za současné kontroly optických izomerů a sterického uspořádání molekuly, přičemž se využívá výhoda metody syntézy na pevné fázi, kde je konstruovaná molekula v průběhu všech syntetických operací navázána na nerozpustném podkladu. Tedy nadbytek reagentů a rozpustných meziproductů může být odstraněn jednoduše promýváním komplexu molekula-pryskyřice pomocí vhodných rozpouštědel. Proto může být použit velký nadbytek rozpustných reagentů, aby byla během krátké doby posunuta reakční rovnováha ve směru produktů, aby byla

potlačena racemizace (pokud o to jde) a jiné druhotné reakce. Tato metoda je také přístupná pro automatizaci.

Výhodné provedení syntetického postupu, který je předmětem předloženého vynálezu, je nejlépe znázorněno na schématu 1, které je zaměřeno na vytvoření sloučenin obecného vzorce II.

Schema 1



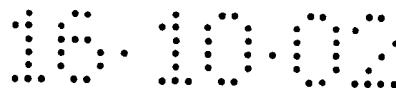


Jak je uvedeno výše na schématu 1, výhodný postup pro syntetickou přípravu kahalalidu F (obecný vzorec I), jeho derivátů a analogů, je založen na syntéze na pevné fázi (viz např. Lloyd-Williams P., a kol., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton (FL), 1997).

Postup znázorněný na schématu 1 obsahuje tyto po sobě následující kroky:

- a) připojení Fmoc-aminokyseliny ( $Aaa_3$ ) k pevnému podkladu (např. polystyren, polyethylen nanesený na polystyrenu a podobně), který obsahuje velmi kyselou nestálou skupinu nebo linker (např. chlorotryl, polyalkoxybenzyl a podobně), a vytvoří esterovou vazbu;
  - b) prodlužování peptidického řetězce třemi aminokyselinami ( $Aaa^2$ ,  $Aaa^1$  a  $Aaa^7$ ) pomocí postupu používajícího Fmoc/tBu. Pro I,  $X_1 = OH$  a je vneseno bez chránících skupin. Pokud je  $X_1 = NH_2$ , toto je vneseno s chránící skupinou Alloc;
  - c) zabudování ( $Aaa_6$ ) pomocí postupu používajícího Fmoc/tBu;
  - d) prodloužení peptidického řetězce o zbývající aminokyseliny a  $R_{11}-COOH$  až  $Aaa_7$  pomocí postupu používajícího Fmoc/tBu;
  - e-1) prodloužení peptidického řetězce o 2 aminokyseliny [ $Aaa_5 (OH,H), Aaa_4$ ] až  $Aaa_6$  pomocí postupu používajícího Fmoc/tBu. Skupina OH, připojená k  $Aaa_5$  není chráněna;
  - e-2) dehydratování na pevné fázi, čímž je získán peptid s  $Aaa_5$ ;
- nebo
- e'-1) zabudování dipeptidu Alloc- $Aaa_4$ - $Aaa_5$ -OH, který byl spojen a dehydratován v roztoku;
  - f) odstranění skupiny Alloc z  $Aaa_4$ , zatímco peptid je stále ukotven na pevném podkladu;
  - g) uvolnění peptidu s chráněným (pokud je chránění použito) postranním řetězcem z pevného podkladu;
  - h) cyklizace peptidu v roztoku;
  - i) odstranění skupin chránících postranní řetězec, které jsou nestálé vůči TFA.

Je nutno si uvědomit, že určitý výběr chránících skupin není kritický a že je možný široký výběr voleb. Například typ skupin Bzl může nahradit tBu/Boc; namísto Fmoc lze použít Boc; namísto Alloc lze použít Fmoc; namísto chlorotrylu lze použít Wangovu pryskyřici.



### Podrobný popis výhodných provedení postupu

Výhodný postup předloženého vynálezu je znázorněn na schématu 1. Jak je tam ukázáno a podrobněji diskutováno v příkladech které následují dále, tento postup může být proveden následujícím způsobem:

Fmoc-Aaa3-OH je s výhodou připojena k pryskyřici chlorotryl-polystyren, viz Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 590-593, v přítomnosti DIEA, který udržuje úroveň substituce přibližně na 0,15 až 0,5 mmol/g. Použití vyššího plnění s sebou přináší v konečném produktu přítomnost ukončených peptidů, viz Chiva, C.; Vilaseca, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *J Pept. Sci.* 1999, 5, 131-140.

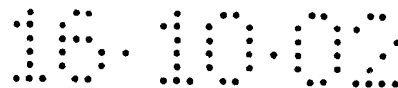
Odstranění skupiny Fmoc bylo provedeno pomocí piperidinu-DMF (2:8, objem (1 x 1 minuta, 3 x 5 minut, 1 x 10 minut). Vazba Fmoc-, Alloc-Aaa-OH a R11-COOH (5 ekvivalentů) bylo provedeno pomocí HATU-DIEA, viz Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 201-203, (5:10) v DMF po dobu 90 minut. Po spojení byl proveden ninhydrinový test a pokud byl pozitivní, vazba byla a stejných podmínek opakována, jinak bylo v postupu pokračováno. Promývání mezi deprotekcí, vazebným a opět deprotekcí krokem bylo provedeno pomocí DMF (5 x 0,5 minuty) a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 0,5 minuty), přičemž pokaždé bylo použito 10 ml roztoku na gram pryskyřice.

Připojení Alloc-Aaa6-OH (7 ekvivalentů), kdy X1 = O, bylo provedeno pomocí ekvimolárního množství DIPCDI a 0,7 ekvivalentu DMAP po dobu 2 hodin. Toto připojování bylo dvakrát opakováno.

Odstranění skupiny Alloc bylo provedeno pomocí Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 ekvivalentu) v přítomnosti PhSiH<sub>3</sub> (10 ekvivalentů) pod argonovou atmosférou, viz Gómez, -Martínez, P.; Thieriet, N.; Albericio, F.; Guibé, F. *J. Chem. Soc. Perkin I* 1999, 2871-2874.

Dehydratace byla provedena na pevné fázi pomocí EDC (ve vodě rozpustný karbodiimid, 100 ekvivalentů) v přítomnosti CuCl (60 ekvivalentů) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-DMF (10:2) po dobu 6 dní. Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, K.; Horimoto, S.; Kubo, A.; Wakamiya, T.; Shibe, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992, 65, 2227-2240.

Dipeptid Alloc-Aaa<sub>4</sub>-Aaa<sub>5</sub>-OH (5 ekvivalentů), který byl připraven v roztoku z Alloc-Aaa<sub>4</sub>-OH a H-Aaa<sub>5</sub>(OH, H)-OtBu s EDC a poté dehydratován a opracován TFA, byl spojen s HATU-DIEA (5:10) po dobu 16 hodin a ještě opakováno po dobu 3 hodin.



Použití jiných vazebných reagensů založených na HOBt, jako je HBTU nebo DIPCDI-HOBt, vedlo k neúplným inkorporacím dipeptidu.

Odštěpování chráněného peptidu z pryskyřice bylo provedeno pomocí TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) (5 x 30 sekund).

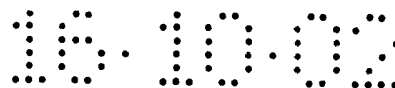
Cyklizační krok byl proveden pomocí DIPCDI-HOBt (3:3 ekviv.) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-DMF po dobu 2 hodin. Také mohou být použity jiné metody, jako je například PyBOP/DIEA (3:6 ekviv.) v DMF.

Závěrečné odstranění chránících skupin bylo provedeno pomocí TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) po dobu 1 hodiny.

### Příklady provedení vynálezu

#### Zkratky

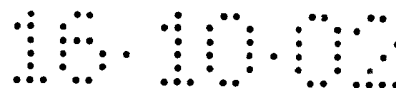
Zkratky používané pro aminokyseliny a označování peptidů odpovídají pravidlům IUPAC-IUB komise pro biochemické názvosloví, viz J. Biol. Chem. 1972, 247, 977-983. Jsou použity následující další zkratky: 4-AcBut-OH, 4 kyselina acetoxyomáselná; AcButBut.OH, kyselina 4-(4-acetoxybutanoyloxy)omáselná; ACH, kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová; Alloc, allyloxykarbonyl; Boc, terc-butyloxykarbonyl; t-Bu, terc-butyl; But-OH, kyselinaomáselná; Cl-TrtCl-pryskyřice, 2-chlorotrylchloridová pryskyřice; Dap, kyselina 2,3-diaminopropionová; 4-DiMeABut-OH, kyselina N,N-dimethyl-4-aminomáselná; 3-DiMeBut-OH, kyselina 3,3-dimethylomáselná; DHB, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová; Z-Dhb, kyselina  $\alpha,\beta$ -didehydro- $\alpha$ -aminomáselná; DIEA, N,N-diisopropylethylamin; DMF, N,N-dimethylformamid; EDC, 1-ethyl-3-(3'-dimethylamino-propyl)karbodiimid hydrochlorid; Etg, ethylglycin; ESMS, elektrosprejová hmotnostní spektrometrie; FABMS, hmotnostní spektrometrie pomocí bombardování rychlými atomy; Fmoc, 9-fluorenylmethoxykarbonyl; HATU, N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]pyridin-1-yl-methylen]-N-methylmethanaminium hexafluorofosforečnan N-oxid; HBTU, N-[(1H-benzotriazol-1-yl)](dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium hexafluorofosforečnan N-oxid; 2-Hedo-OH, kyselina 2,4-hexadienová; Hep-OH, kyselina heptanová; HOAc, kyselina octová; HOAt, kyselina 1-hydroxy-7-azabenzotriazol(3hydroxy-3H-1,2,3-triazol-[4,5-b]pyridin); HOBt, 1-hydroxybenzotriazol; IBut-OH, kyselina isomáselná; 3-MeBut-OH, kyselina 3-methylomáselná; 5-MeHex-OH, kyselina 5-methylhexanová; MeOH, methanol; 4-MePen.OH, kyselina 4-



-methylpentanová; NMM, N-methylmorfolin; 4-HOBut, kyselina 4-hydroxymáselná; (b-OH)Phe-OH, b-hydroxyfenylalanin; Lit-OH, kyselina lithocholová; Pal, kyselina palmitová; Phe-OH, a,b-didehydrofenylalanin; PyAOP, 7-azabenzotriazol-1-yl-N-oxy-tris-(pyrrolidin)fosfonium hexafluorofosforečnan; PyBOP, benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris-(pyrrolidin)fosfonium hexafluorofosforečnan; SPS, syntéza na pevné fázi; TFA, kyselina trifluoroctová; Tico-OH, kyselina tetraikosanová. Pokud není stanoveno jinak, symboly aminokyselin označují L konfiguraci.

Obecné postupy. Cl-TrtCl-pryskyřice, aminokyselinové deriváty chráněné Fmoc, HOBt, PyBOP, HATU byly od PerSeptive Biosystems (Framingham, MA), Bachem (Bubendorf, Switzerland), NovaBiochem (Läufelfingen, Switzerland). Alloc-aminokyseliny byly připraveny v podstatě tak, jak je popsáno Danglesem a kol., viz Dangles, O.; Guibé, F.; Balavoine, G.; Lavielle, S.; Marquet, A. J Org. Chem. 1987, 52, 4984-4993, a 5-MeHex-OH pomocí syntézy přes kyselinu malonovou. DIEA, DIPCDI, EDC, piperidin, TFA byly od Aldrich (Milwaukee, WI). DMF a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> byly od SDS (Peypin, Francie). Acetonitril (pro HPLC) byl od Scharlau (Barcelona, Španělsko). Všechny komerční reagenty a rozpouštědla byly použity tak, jak byly obdrženy, s výjimkou DMF a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, které byly probublány dusíkem, aby byly odstraněny těkavé kontaminující látky (DMF) a uloženy nad aktivovaným molekulárním sítem 0,4 nm (Merck, Darmstadt, Německo) (DMF) nebo CaCl<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Extrakty organických roztoků byly sušeny nad bezvodým MgSO<sub>4</sub>, a poté následovalo odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku a teploty <40 °C.

Syntéza na pevné fázi byla provedena v polypropylenových injekčních stříkačkách (20, 10 ml), ukončených porézním polypropylenovým diskem. Rozpouštědla a rozpustné reagenty byly odstraňovány odsáváním. Odstranění skupiny Fmoc bylo provedeno pomocí piperidinu-DMF (2:8 objem) (1 x 1 minuta, 3 x 5 minut, 1 x 10 minut). Promývání mezi odstraňováním chránících skupin, připojováním a opětovnými kroky odstraňování chránících skupin byly provedeny pomocí DMF (5 x 0,5 minuty) a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 0,5 minuty), pokaždé bylo použito 10 ml rozpouštědla na gram pryskyřice. Peptidová syntéza a promývání byly prováděny při teplotě 25 °C. Syntézy prováděné na pevné fázi byly kontrolovány pomocí HPLC alikvoty (přibližně 10 mg) meziproductů, získaných po odštěpení směsí TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu 60 minut z peptidyl-pryskyřice. Sloupce pro HPLC [Kromasil C<sub>18</sub> (podmínky A až F) /C4 (podmínky G,H)], sloupec pro reverzní fázi (byly od 4.6 x 250 mm, 10 mm) byly od Akzo



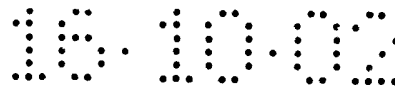
Nobel (Bohum, Sweden). Analytical HPLC byla provedena na zařízení Shimadzu obsahujícím dvě pumpy pro podávání roztoků (model LC-6A), automatický injektor (model SIL-6B), detektor proměnlivých vlnových délek (model SPD-6A), kontrolní jednotku systému (model SCL-6B) a souřadnicový zapisovač (model C-R6A). Detekce UV byla prováděna při 220 nm, a lineární gradienty od CH<sub>3</sub>CN (+0,036% TFA) do H<sub>2</sub>O (+0,045% TFA) byly prováděny při rychlosti průtoku 1,0 ml/min od: (podmínky A) 1:9 až 10:0 po dobu 30 min; (podmínky B) 3:7 až 10:0 po dobu 30 min; (podmínky C) 1:19 až 19:1 po dobu 30 min; (podmínky D) 45:55 až 90:10 po dobu 30 min; (podmínky E) 45:55 až 6:4 po dobu 30 min; (podmínky F) izokraticky 1:1; (podmínky G) 3:7 až 1:0 po dobu 30 min; (podmínky H) 1:1 až 1:0 po dobu 30 min.

MALDI-TOF- a ES-MS analýzy peptidových vzorků byly provedeny v zařízení PerSeptive Biosystems Voyager DE RP, za použití matric CHCA nebo DHB, a v spektrometru Micromass VG-quattro. Vzorky peptid-pryskyřice byly hydrolyzovány v 12 N vodném roztoku HCl-kyselina propionová (1:1) při teplotě 155 °C po dobu 1 až 3 hodin a vzorky bez peptidu byly hydrolyzovány v 6 N vodném roztoku HCl při teplotě 155 °C po dobu 3 hodin. Následující analýzy aminokyselin byly provedeny na autoanalyzátoru Beclanan System 6300. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 200 MHz) a <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz) spektroskopie byly provedeny na zařízení Bruker DMX-500 (11,7 T) a Varian Gemini 200 (4,7 T). Chemické posuny (δ) jsou vyjádřeny jako počet částí z miliónu ve směru odpovídajícímu snižování síly pole TMS. Vazebné konstanty jsou vyjádřeny v hertzech.

#### Kahalalid F (1)

##### Příklad 1: H-D-Val-O-TrtC1-pryskyřice

Cl-TrtC1-pryskyřice (1 g, 1,35 mmol/g) byla umístěna do 20 ml polypropylenových injekčních stříkaček, ukončených porézním polypropylenovým filtračním diskem. Pryskyřice byla potom promyta CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 0,5 min.) a byl přidán roztok Fmoc-D-Val-OH (92 mg, 0,27 mmol, 0,2 ekvivalentu) a DIEA (471 ml, 2,7 mmol, 2 ekvivalenty) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml) a směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Reakce byla ukončena přidáním MeOH (800 ml) a mícháním po dobu 15 minut. Fmoc-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice byla dále promývána následujícími roztoky - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 0,5 min.), DMF (3 x 0,5 min.), piperidin-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-DMF (1:9,5:9,5, 1 x 10 min.), piperidin-DMF (1:4, 1 x 15 min.), DMF (5 x 0,5 min.), isopropanol (2 x 1 min.), DMF (5 x 0,5 min.), MeOH (2



x 1 min.) a sušena ve vakuu. Účinnost vazby byla vypočtena na základě AAA (analýzy aminokyselin) a byla 0,15 mmol/g.

**Příklad 2: Fmoc-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice**

Fmoc-D-allo-Ile-OH (265 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-D-allo-Thr-OH (volná hydroxylová skupina) (256 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), a Fmoc-D-allo-Ile-OH (265 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) bylo postupně přidáno k výše získané H-D-Val-O-TrtCl-pryskyřici za použití HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) a DIEA (261ml, 1,5 mmol, 10 ekvivalentů) v DMF (2,5 ml). Ve všech případech byl po 90 minutách vazebné reakce ninhydrinový test negativní. Odstranění skupiny Fmoc a promývání byly provedeny tak, jak je popsáno v Obecných postupech. Alloc-Val-OH (211 mg, 1,05 mmol, 7 ekvivalentů) bylo připojeno k DIPCDI (163 mg, 1,05 mmol, 7 ekvivalentů) v přítomnosti DMAP (12,8 mg, 0,105 mmol, 0,7 ekvivalentu). Tato vazebná reakce byla dvakrát za stejných podmínek opakována. Na alikvot peptidyl-pryskyřice bylo působeno TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu 60 minut a HPLC (podmínky A,  $t_R$  25,9 min.) hrubého produktu získaného po odpaření ukázala >98% čistotu. ESMS, vypočteno pro C<sub>45</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>, 849,5. Zjištěno:  $m/z$  850,1 [M+H]<sup>+</sup>.

**Příklad 3: 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice**

Skupina Fmoc byla odstraněna a k výše uvedené peptidyl-pryskyřici (příklad 2) byly postupně přidány Fmoc-Orn(Boc)-OH (341 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-D-Pro-OH (253 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-D-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-Thr(tBu)-OH (298 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů), Fmoc-D-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) a 5-MeHex-OH (98 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) za použití HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) a DIEA (261ml, 1,5 mmol, 10 ekvivalentů) v DMF (2,5 ml). Ve všech případech byly po 90 minutách vazebné reakce ninhydrinový nebo chloranilový (po inkorporaci D-Val) testy negativní. Odstranění skupiny Fmoc a promývání byly provedeny tak, jak je popsáno v Obecných postupech. Na alikvot peptidyl-pryskyřice bylo působeno TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu 60 minut a HPLC (podmínky A,  $t_R$  17,2 min.) hrubého produktu získaného po odpaření ukázala >82% čistotu. ESMS, vypočteno pro C<sub>66</sub> H<sub>116</sub> N<sub>12</sub> O<sub>17</sub>, 1348,9. Zjištěno:  $m/z$  1350,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Příklad 4:** 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr-(Val-Thr-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice

Skupina Alloc byla odstraněna pomocí Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (17,3 mg, 0,015 mmol, 0,1 ekvivalentu) v přítomnosti PhSiH<sub>3</sub> (185 µl, 1,5 mmol, 10 ekvivalentů) pod argonovou atmosférou. K výše uvedené peptidyl-pryskyřici (příklad 3) byly postupně přidány Fmoc-Thr-OH (volná hydroxylová skupina) (256 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) a Alloc-Phe-OH (187 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) za použití HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 ekvivalentů) a DIEA (261 ml, 1,5 mmol, 10 ekvivalentů) v DMF (2,5 ml). Ve všech případech byl po 90 minutách vazebné reakce ninhydrinový test negativní. Odstranění skupiny Fmoc a promývání byly provedeny tak, jak je popsáno v Obecných postupech. Na alikvot peptidyl-pryskyřice bylo působeno TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu 60 minut a HPLC (podmínky A, t<sub>R</sub> 17,8 min.) hrubého produktu získaného po odpaření ukázala >70% čistotu. ESMS, vypočteno pro C<sub>79</sub>H<sub>132</sub>N<sub>14</sub>O<sub>20</sub>, 1597,0. Zjištěno: *m/z* 1598,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Příklad 5:** 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice (prostřednictvím dehydratace na pevné fázi)

Na výše uvedenou peptidyl-pryskyřici (příklad 4) bylo působeno EDC (2,88 g, 15 mmol, 100 ekvivalentů), CuCl (891 mg, 9 mmol, 60 ekvivalentů) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-DMF (10:2) (12 ml) po dobu 6 dní. Po důkladném promytí DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a DMF, byla skupina Alloc odstraněna pomocí Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (17,3 mg, 0,015 mmol, 0,1 ekvivalentu) v přítomnosti PhSiH<sub>3</sub> (185 µl, 1,5 mmol, 10 ekvivalentů) pod argonovou atmosférou. Výsledná účinnost vazby byla vypočtena na základě AAA (analýzy aminokyselin) a byla 0,11 mmol/g (92 % celkového výtěžku). Na alikvot peptidyl-pryskyřice bylo působeno TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu 60 minut a HPLC (podmínky A, t<sub>R</sub> 17,2 min.) hrubého produktu získaného po odpaření ukázala >70% čistotu. ESMS, vypočteno pro C<sub>75</sub>H<sub>126</sub>N<sub>14</sub>O<sub>17</sub>, 1495,0. Zjištěno: *m/z* 1,496,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Příklad 6:** 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH

Chráněný peptid byl odštěpen od pryskyřice (0,5 g, 55,9 µmol) pomocí směsi TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) (5 x 30 s). Spojené fitráty byly odpařeny do sucha a lyofilizovány a

bylo získáno 80,2 mg (48,5  $\mu$ mol, 87% výtěžek) sloučeniny uvedené v nadpisu, který vykazoval čistotu >70%, jak bylo zjištěno pomocí HPLC (podmínky B,  $t_R$  25.7 min.). ESMS, vypočteno pro  $C_{84}H_{142}N_{14}O_{19}$ , 1651,1. Zjištěno:  $m/z$  1652,3  $[M+H]^+$ .

#### Příklad 7: Kahalalid F (I)

Chráněný peptid byl (příklad 6) (40,0 mg, 24  $\mu$ mol) byl rozpuštěn v DMF (25 ml) a byly přidány pyBOP (37,8 mg, 73  $\mu$ mol, 3 ekvivalenty) a DIEA (25 ml, 145  $\mu$ mol, 6 ekvivalentů). Směs byla ponechána míchat po dobu 1 hodiny a potom bylo rozpouštědlo odstraněno odpařováním za sníženého tlaku. Chráněný peptid byl rozpuštěn v TFA-H<sub>2</sub>O (19:1, 5 ml) a směs byla ponechána míchat 1 hodinu. Rozpouštědlo bylo odstraněno odpařením za sníženého tlaku a potom byla přidána H<sub>2</sub>O (5 ml) a provedena lyofilizace. Hrubý produkt byl čištěn pomocí chromatografie za středního tlaku (Vydac C<sub>18</sub> 15-20  $\mu$ m, 30 nm, 240 x 24 mm), lineární gradient od 20% do 60% acetonitrilu (+0,05% TFA) ve vodě (+0,05% TFA) po dobu 5 hodin (každého rozpouštědla 300 ml), 120 ml/h, detekce při 220 nm, a byla tak získána sloučenina uvedená v nadpisu (5,0 mg, 3,4  $\mu$ mol, 14% výtěžek). MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$ , 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1478,7  $[M+H]^+$ , 1500,6  $[M+Na]^+$ , 1516,5  $(M+K)^+$ . Produkt byl eluován při HPLC společně [podmínky D ( $t_R$  12,5 min.), E ( $t_R$  17,4 min.) a F ( $t_R$  12,1 min.)] se vzorkem skutečného kahalalidu F. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) spektrum sloučeniny bylo identické s přírodním produktem (údaje uvedené v tabulce 1).

Tabulka 1

zbytek	N-H	H $\alpha$	H $\beta$	jiný
(Z)-Dhb	9,69 (s)	-	6,34 (q, J = 7,0 Hz)	1,26 (d, J = 7,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-al.lo-Ile 1	8,82 (d, J = 10,0 Hz)	4,31	1,73	1,31, 1,02, 0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>3</sub> , $\delta$ -CH <sub>3</sub> )
L-Phe	8,79 (d, J = 5,5 Hz)	4,42	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-al.lo-Thr	8,56 (d, J = 8,0 Hz)	4,53	4,96 (m)	1,07 ( $\delta$ , J = 6,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )

D-Val 3	8,10 (d, J = 8,5 Hz)	4,26	1,94	0,86 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Orn	7,95 (d, J = 8,5 Hz)	4,49	1,48 (2H)	1,67 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 2,74 (bs, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ), 7,69 ( $\epsilon$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
D-al.lo-Ile 2	7,90 (d)	4,37	1,69	1,30, 1,03, 0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>3</sub> , $\delta$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val 5	7,88 (d)	4,23	1,96	0,84 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Thr	7,82 (d, J = 8,0 Hz)	4,26	3,97 (m)	4,88 (d, J = 5,0 Hz, OH), 0,98 (d, J = 6,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val2	7,62 (d, J = 8,5 Hz)	4,46	2,17	0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,62 (d, J = 7,0 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Val 4	7,57 (d, J = 8,5 Hz)	4,28	1,98	0,80 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Val 1	6,76 (d, J = 9,0 Hz)	3,86	1,39	0,62 (d, J = 7,0 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,58 (d, J = 6,0 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Pro	-	4,36	2,03, 1,87, 1,79 ( $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 3,76 (1H, m, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ), 3,53 (1H, m, -CH <sub>2</sub> )	
5-MeHex	-	2,13 (2H)	1,47 ( $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\delta$ -CH), 1,11 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 0,82 (2 $\epsilon$ - CH <sub>3</sub> )	

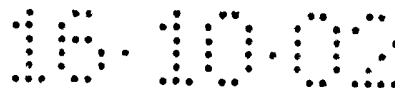
Příklad 7bis: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 7. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,4 min., podmínky B) a ESMS, vypočteno pro C<sub>75</sub>H<sub>124</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>, 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1501,3 [M+Na]<sup>+</sup>, 1,517,3 [M+K]<sup>+</sup>.

Kahalalid F (I)

Příklad 8: Alloc-Phe-Thr-OtBu

H-Thr-OtBu·HCl (3,1 g, 15 mmol, 1,3 ekvivalentu) byl rozpuštěn v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) a bylo přidáno DIEA (2,9 ml, 17 mmol, 1,5 ekvivalentu) a směs byla ponechána míchat po dobu 30 min. Potom byly přidány Alloc-Phe-OH (2,8 g, 11 mmol, 1 ekvivalent) a



EDC (2,8 g, 15 mmol, 1,3 ekvivalentu) v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 ml) a reakce byla míchána po dobu 18 hodin. Organická reakční směs byla promyta  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 25 ml), sušena ( $\text{MgSO}_4$ ) a koncentrována ve vakuu. Výsledný olej (4,12 g) byl chromatograficky čištěn [ $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - $\text{HOAc}$  (9:1:0,2)] a poskytl produkt uvedený v nadpisu (3,25 g, 8 mmol, 71% výtěžek), který byl charakterizován analytickou HPLC ( $t_R$  20,9 min, >98% čistota; podmínky C); ESMS, vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ , 406,2. Zjištěno:  $m/z$  408,0 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,1 až 7,3 (5 H, m, Ar); 6,89 (1 H, d,  $J = 8,8$  Hz, NH); 5,7 až 5,9 (1 H, m, CH allyl); 5,56 (1 H, d,  $J = 8,0$  Hz, OH); 5,2 až 5,3 (2 H, m,  $\text{CH}_2$  g-allyl); 4,52 (2 H, d,  $J = 5,4$  Hz,  $\text{CH}_2$  a-allyl); 4,45 (1 H, dd,  $J = 8,4$  Hz, 2,8 Hz, a-CH Thr); 4,22 (1 H, dq,  $J = 6,2$  Hz,  $J = 3,0$  Hz, b-CH Thr); 3,0 až 3,2 (2 H, m, b- $\text{CH}_2$  Phe); 1,47 (9 H, s, tBu); 1,15 (3 H, d,  $J = 6,6$  Hz, g- $\text{CH}_3$  Thr);  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,2 (CO), 169,5 (CO); 156,0 (CO); 136,1 (Cq, Ar); 132,5 (CH, allyl); 129,3 (CH, Ar); 128,5 (CH, Ar); 126,9 (CH, Ar); 117,7 ( $\text{CH}_2$ , allyl); 82,7 (Cq, tBu); 68,5 (b-CH Thr); 65,9 ( $\text{CH}_2$ , allyl); 58,0 (a-CH Thr); 56,2 (a-CH Phe); 38,3 (b- $\text{CH}_2$  Phe); 28,0 ( $\text{CH}_3$ , tBu); 20,8 (g- $\text{CH}_3$  Thr).

#### Příklad 9: Alloc-Phe-Z-Dhb-OtBu

Alloc-Phe-Thr-OtBu (3,25 g, 8,0 mmol), EDC (9,90 g, 52 mmol, 6,5 ekvivalentu) a  $\text{CuCl}$  (2,14 g, 22 mmol, 2,7 ekvivalentu) bylo rozpuštěno ve směsi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -bevodný DMF (65 ml, 12:1) v atmosféře  $\text{N}_2$  a směs byla ponechána míchat po dobu 2 dní v atmosféře  $\text{N}_2$ . Organické rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu a zbytek byl dán do nasyceného roztoku EDTA (100 ml), který byl extrahován EtOAc (3 x 50 ml). Spojený organický roztok byl promýván solankou (3 x 60 ml), sušen ( $\text{MgSO}_4$ ) a koncentrován ve vakuu, čímž byla získána světle žlutá pevná látka (2,8 g), která byla čištěna chromatografií [ $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - $\text{HOAc}$  (9:1:0.1)] a byl získán produkt uvedený v nadpisu (2,6 g, 6,7 mmol, 84% výtěžek), který byl charakterizován pomocí analytické HPLC ( $t_R$  23,1 min., >95% čistota; podmínky C); ESMS, vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$ , 388,2. Zjištěno:  $m/z$  389,6 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,2 až 7,4 (5 H, m, Ar); 6,69 (1 H, q,  $J = 7,4$  Hz, CH Dhb); 5,8 až 6,0 (1 H, m, CH allyl); 5,2 až 5,3 (2 H, m,  $\text{CH}_2$  g-allyl); 4,5 až 4,6 (2 H, m, a- $\text{CH}_2$  allyl); 3,1 až 3,3 (2 H, m, b- $\text{CH}_2$  Phe); 1,67 (3 H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$  Dhb); 1,47 (9 H, s, tBu);  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 168,9 (CO); 163,1 (CO); 156,0 (CO); 136,0 (Cq, Ar); 132,6, 132,3 (CH, allyl; b-CH Dhb); 129,3 (CH, Ar); 128,7 (CH, Ar); 127,0 (CH, Ar); 117,9 ( $\text{CH}_2$ , allyl); 81,7 (Cq, tBu); 66,0 ( $\text{CH}_2$ , allyl); 56,3 (a-CH Phe); 38,2 (b- $\text{CH}_2$  Phe); 28,0 ( $\text{CH}_3$ , tBu); 14,7 ( $\text{CH}_3$  Dhb).

## Příklad 10: Alloc-Phe-Z-Dhb-OH

Alloc-Phe-Z-Dhb-OtBu (2,6 g, 6,7 mmol) byl rozpuštěn v TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (90:8:2, 5,5 ml) a směs byla ponechána míchat po dobu 3 hodin. Organická reakce byla koncentrována ve vakuu a byl získán produkt uvedený v nadpisu (2,2 g, 6,6 mmol, 99% výtěžek), který byl charakterizován pomocí analytické HPLC (*t<sub>R</sub>* 17,0 min., >95% čistota; podmínky C); ESMS, vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 332,1. Zjištěno: *m/z* 333,7 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,2 až 7,3 (5 H, m, Ar); 6,84 (1 H, q, J = 7,2 Hz, CH Dhb); 5,8 až 6,0 (1 H, m, CH allyl); 5,1 až 5,3 (2 H, m, CH<sub>2</sub> g-allyl); 4,4 až 4,5 (2 H, m, a-CH<sub>2</sub> allyl); 3,2 až 3,3 (1 H, m, b-CH<sub>2</sub> Phe); 2,8 až 3,0 (1 H, m, b-CH<sub>2</sub> Phe); 1,66 (3 H, d, J = 7,4 Hz, CH<sub>3</sub> Dhb); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 173,1 (CO); 138,5 (Cq, Ar); 136,7, 134,1 (CH, allyl; b-CH Dhb); 130,3 (CH, Ar); 129,4 (CH, Ar); 127,7 (CH, Ar); 117,4 (CH<sub>2</sub>, allyl); 66,6 (CH<sub>2</sub>, allyl); 57,8 (a-CH Phe); 39,1 (b-CH<sub>2</sub> Phe); 14,1 (CH<sub>3</sub> Dhb).

## Příklad 11: 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-IleD-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice

Cl-TrtCl-pryskyřice (0,45 g, 1,35 mmol/g) byla umístěna do 10 ml polypropylenových injekčních stříkaček, ukončených porézním polypropylenovým filtračním diskem. Peptidyl-pryskyřice byl získán pomocí stejného postupu, který je popsán v příkladech 1 až 3 s tou výjimkou, že při připojování první aminokyseliny (Fmoc-D-Val-OH) k pryskyřici bylo použito 0,3 ekvivalentu namísto 0,2 ekvivalentu. Počáteční náplň, jak bylo vypočteno na základě aminokyselinové analýzy, byla 0,29 mmol/g. Jakmile byly aminokyseliny navázány, na alikvot peptidyl-pryskyřice bylo působeno TFA-H<sub>2</sub>O (9:1) po dobu for 60 minut a HPLC (podmínky B, *t<sub>R</sub>* 17,3 min.) hrubého produktu, získaného po odpaření vykazovala čistotu >80%. ESMS, vypočteno pro C<sub>66</sub>H<sub>116</sub> N<sub>12</sub>O<sub>17</sub>, 1348,9. Zjištěno: *m/z* 1350,1 [M+H]<sup>+</sup>.

## Příklad 12: 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-pryskyřice (pomocí inkorporace dipeptidu)

Na peptidyl-pryskyřici bylo kvůli odstranění skupiny Alloc působeno Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (15,1 mg, 0,013 mmol, 0,1 ekvivalentu) v přítomnosti PhSiH<sub>3</sub> (161 μl, 1,3 mmol, 10 ekvivalentu) v atmosféře Ar. Alloc-Phe-Z-Dhb-OH (217 mg, 0,65 mmol, 5 ekvivalentů) a

HATU (249 mg, 0,65 mmol, 5 ekvivalentů) byly rozpuštěny v DMF (1,25 ml) a přidány k peptidyl-pryskyřici, potom byl přidán DIEA (228  $\mu$ l, 1,3 mmol, 10 ekvivalentů) a směs byla míchána přes noc. Po promýváních bylo, pokud byl ninhydrinový test negativní, připojování opakováno se stejným množstvím chemikálií po dobu for 3 hodin. Po promýváních pomocí DMF a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , bylo na alikvot peptidyl-pryskyřice působeno TFA- $\text{H}_2\text{O}$  (9:1) po dobu 60 minut a po HPLC (podmínky B,  $t_R$  18,3 min.) vykazoval hrubý produkt, získaný po odpaření, čistotu >80%. MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $\text{C}_{79}\text{H}_{130}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$ , 1579,0. Zjištěno:  $m/z$  1,580,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1602,2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1618,2  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

**Příklad 13:** 5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH

Skupina Alloc byla z peptidyl-pryskyřice (příklad 12) odstraněna pomocí  $\text{Pd}(\text{pPh}_3)_4$  (15,1 mg, 0,013 mmol, 0,1 ekvivalentu) v přítomnosti  $\text{PhSiH}_3$  (161  $\mu$ l, 1,3 mmol, 10 ekvivalentů) v atmosféře Ar. Závěrečná náplň, jak bylo vypočteno na základě aminokyselinové analýzy, byla 0,16 mmol/g (79% výtěžek). Chráněný peptid byl z pryskyřice odštěpen (235 mg, 37,5 mmol) pomocí směsi TFA- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:99) (5 x 30 sec). Spojené filtráty byly za sníženého tlaku odpařeny dosucha a lyofylizovány, čímž bylo získáno 40,5 mg (24,5 mmol, 65%) sloučeniny uvedené v nadpise v čistotě >80%, jak bylo zjištěno pomocí HPLC (podmínky B,  $t_R$  24,3 min.). MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $\text{C}_{84}\text{H}_{142}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$ , 1651,1. Zjištěno:  $m/z$  1674,8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1690,8  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

**Příklad 14:** Kahalalid F (I)

Chráněný peptid (příklad 13) (38,5 mg, 23  $\mu$ mol) byl rozpuštěn v DMF (25 ml) a byly přidány pyBOP (36,4 mg, 70  $\mu$ mol, 3 ekvivalenty) a DIEA (24 ml, 140  $\mu$ mol, 6 ekvivalentů). Směs byla ponechána míchat po dobu 1 hodiny a potom bylo rozpouštědlo odstraněno odpařováním za sníženého tlaku. Chráněný cyklický peptid byl rozpuštěn v TFA- $\text{H}_2\text{O}$  (19:1, 5 ml) a směs byla ponechána míchat 1 hodinu. Rozpouštědlo bylo odstraněno odpařením za sníženého tlaku a potom byla přidána  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml) a provedena lyofilizace. Hrubý produkt byl čištěn tak, jak bylo popsáno v příkladu 7 a byla získána sloučenina uvedená v nadpisu (3,6 mg, 2,4  $\mu$ mol, 10% výtěžek), který byl identický s produktem získaným v příkladu 7.

5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (struktura určená pro kahalalid F Goetzem, G. a kol.,

Tetrahedron, 1999, sv. 55, str. 7739-7746)

Příklad 15: 5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (pomocí dehydratace na pevné fázi)

Experimentální postupy byly provedeny jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7 pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3, Fmoc-Val-OH byl inkorporován do D-Pro-peptidyl-pryskyřice a potom po odstranění skupiny Fmoc byl inkorporován Fmoc-D-Val-OH. Závěrečná náplň, jak bylo vypočteno na základě aminokyselinové analýzy, byla 0,106 mmol/g (87% celkový výtěžek), výtěžek štěpení byl 83%, a bylo získáno 4,7 mg sloučeniny uvedené v nadpise, což představuje 13% celkový výtěžek ve třech krocích – cyklizačním kroku, kroku odstraňování chránících skupin a purifikačním kroku. Tento produkt byl eluován v HPLC o 0,8 až 1,9 min. později než vzorek pravého kahalalidu F [podmínky D ( $t_R$  13,3 oproti 12,5 min.), E ( $t_R$  18,8 oproti 17,4 min.), a F ( $t_R$  14,0 oproti 12,1 min.)]. MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$ , 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1478,7  $[M+H]^+$ , 1500,7  $[M+Na]^+$ , 1516,6  $[M+K]^+$ .

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $d^6$ -DMSO) spektrum sloučeniny (tabulky II a III) bylo odlišné od spektra, získaného u vzorku skutečného kahalalidu F. Největší odchylka byla v tom, že získaná syntetická sloučenina vykazovala dvě konformace, což bylo způsobeno cis-trans rovnováhou mezi L-Val-D-Pro zbytky, která nebyla pozorována ani v přírodním produktu ani v isomeru získaném v příkladu 7.

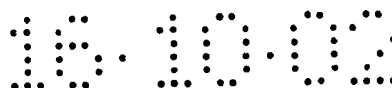
Tabulka II (hlavní, trans isomer)

zbytek	N-H	H $\alpha$	H $\beta$	jíný
(Z)-Dhb	9,67 (s)	-	6,33 (q)	1,27 (d, J = 7,0 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-al.lo-Ile 1	8,80 (d)	4,31	1,73	1,32, 0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>3</sub> , $\delta$ -CH <sub>3</sub> )
L-Phe	8,78 (d, J = 5,5 Hz)	4,43	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-al.lo-Thr	8,58 (d, J = 9,0 Hz)	4,53	4,95 (m)	1,07 (d, J = 6,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Val 3	7,97 (d, J = 8,5 Hz)	4,34	1,94	0,84 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )

L-Orn	7,77 (d, J = 8,5 Hz)	4,47	1,46 (2H)	1,66 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 2,72 (bs, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ), 7,66 ( $\epsilon$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
D-al.lo-Ile 2	7,87 (d, H= 8,5 Hz))	4,37	1,68	0,75 ( $\delta$ -CH <sub>3</sub> nebo d-CH <sub>3</sub> a $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val 5	7,90	4,22	1,95	0,85 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Thr	7,90 (d)	4,24	4,02	4,98 (OH), 1,02 (d, J = 6,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val2	7,63 (d, J = 8,5 Hz)	4,45	2,18	0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,62 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val 4	7,56 (d, J = 9,0 Hz)	4,34	2,02	0,84 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,79 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ),
L-Val 1	6,75 (d)	3,86	1,39	0,62 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Pro	-	4,30	2,03, 1,81, 1,73 ( $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 3,73 (1H, m, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ), 3,52 (1H, m, $\delta$ -CH <sub>2</sub> )	
5-MeHex	-	2,08 (1H) 2,15 (1H)	1,48 ( $\delta$ -CH <sub>2</sub> , $\delta$ -CH), 1,11 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 0,82 (2 $\epsilon$ -CH <sub>3</sub> )	

Tabulka III (vedlejší, cis isomer)

zbytek	N-H	H $\alpha$	H $\beta$	jiný
(Z)-Dhb	9,63 (s)	-	6,33 (q)	1,278 (d, J = 6,5 Hz, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-al.lo-Ile 1	8,76 (d)	4,30	1,71	1,33, 0,76 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>3</sub> , $\delta$ -CH <sub>3</sub> )
L-Phe	8,78 (d, J = 5,5 Hz)	4,43	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-al.lo- -Thr	8,58 (d, J = 9,0 Hz)	4,53	4,95 (m)	1,00 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Val 3	8,06 (d, J = 8,5 Hz)	4,11	1,81	0,71 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,60 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Orn	8,37 (d, J = 9,0 Hz)	4,62	1,52 (2H)	1,64 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 2,78 (bs, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ), 7,66 ( $\epsilon$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
D-al.lo-Ile	8,09 (d, H= 9,0 Hz))	4,42	1,64	0,77 ( $\delta$ -CH <sub>3</sub> nebo d-CH <sub>3</sub> a



2				$\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val 5	7,90	4,22	1,95	0,85 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
L-Thr	7,88 (d)	4,23	3,99	4,93 (OH), 1,02 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val2	7,63 (d, J = 8,5 Hz)	4,45	2,18	0,77 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,62 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Val 4	7,49 (d, J = 9,0 Hz)	4,34	1,94	0,79 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ), 0,73 ( $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ),
L-Val 1	6,72 (d)	3,84	1,38	0,62 (2 $\gamma$ -CH <sub>3</sub> )
D-Pro	-	4,93	2,06, 1,89, 1,75 ( $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 3,3 (m, $\delta$ -CH <sub>2</sub> )	
5-MeHex	-	2,08 (1H) 2,15 (1H)	1,48 ( $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\delta$ -CH), 1,11 ( $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ), 0,82 (2 $\epsilon$ -CH <sub>3</sub> )	

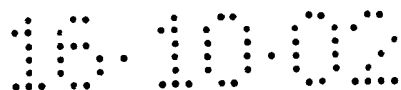
Příklad 15bis: 5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 15. Produkt byl charakterizován pomocí analytické HPLC ( $t_R$  17,6 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro C<sub>75</sub>H<sub>124</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>, 1477,9. Zjištěno: m/z 1479,3 [M+H]<sup>+</sup>; 1501,2 [M+Na]<sup>+</sup>, 1517,2 [M+K]<sup>+</sup>.

Příklad 16: 5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (pomocí inkorporace dipeptidu)

Experimentální postupy byly provedeny jak bylo popsáno v příkladech 8 až 14 pouze s tou výjimkou, že v příkladu 14, Fmoc-Val-OH byl inkorporován do D-Pro-peptidyl-pryskyřice a potom po odstranění skupiny Fmoc byl inkorporován Fmoc-D-Val-OH. Závěrečná náplň, jak bylo vypočteno na základě aminokyselinové analýzy, byla 0,16 mmol/g (79% celkový výtěžek), výtěžek štěpení byl 78%, a bylo získáno 3,4 mg sloučeniny uvedené v nadpise, což představuje 10% celkový výtěžek ve třech krocích – cyklizačním kroku, kroku odstraňování chránících skupin a purifikačním kroku. Vyčištěný produkt byl identický s produktem získaným v příkladu 15.

Hamann a kol., Kahalalid B [5-MeHex-Tyr-cyklo(D-Ser-Phe-D-Leu-Pro-Thr-Gly)]

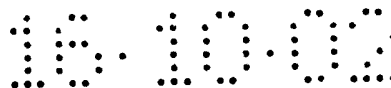


#### Příklad 17: H-Thr(tBu)-O-TrtCl-pryskyřice

Cl-TrtCl-pryskyřice (0,5 g, 1,35 mmol/g) byla umístěna do 10 ml polypropylenových injekčních stříkaček, ukončených porézním polypropylenovým filtračním diskem. Pryskyřice byla potom promyta  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 x 0,5 min.), byly přidány roztoky Fmoc-Thr(tBu)-OH (54 mg, 0,135 mmol, 0,2 ekvivalentu) a DIEA (235 ml, 1,35 mmol, 2 ekvivalenty) v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,25 ml) a směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Reakce byla ukončena přidáním MeOH (400 ml) po patnáctiminutovém míchání. Fmoc-Thr(tBu)-O-TrtCl-pryskyřice byla podrobena následujícím promýváním a opracováním:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 0,5 min.), DMF (3 x 0,5 min.), piperidin- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -DMF (1:9,5:9,5, 1 x 10 min.), piperidin-DMF (1:4, 1 x 15 min.), DMF (5 x 0,5 min.), isopropanol (2 x 1 min.), DMF (5 x 0,5 min.), MeOH (2 x 1 min.) a sušena ve vakuu. Náplň jak bylo vypočteno na základě aminokyselinové analýzy, byla 0,15 mmol/g.

#### Příklad 18: 5-MeHex-Tyr-D-Ser(Gly-H)-Phe-D-Leu-Pro-Thr-OH

Fmoc-Pro-OH (178 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů), Fmoc-D-Leu-OH (187 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů), Fmoc-Phe-OH (204 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů), Fmoc-D-Ser-OH (volná hydroxylová skupina) (173 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (243 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) a 5-MeHex-OH (69 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) byly postupně přidány k výše získanému H-Thr(tBu)-O-TrtCl-pryskyřice pomocí DIPCDI (82  $\mu\text{l}$ , 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) a HOBt (81 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) v DMF (1,25 ml). Ve všech případech kromě u D-Ser, byl po 90 minutách vazebné reakce ninhydrinový test negativní. Fmoc-D-Ser-OH (173 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) byl znovu připojován s HATU (201 mg, 0,53 mmol, 7 ekvivalentů) v přítomnosti DIEA (184  $\mu\text{l}$ , 1,06 mmol, 14 ekvivalentů) v DMF po dobu 90 min. Odstranění skupiny Fmoc a promývání byly provedeny tak, jak bylo popsáno v obecných postupech. Boc-Gly-OH (119 mg, 0,68 mmol, 9 ekvivalentů) byl připojován pomocí DIPCDI (105  $\mu\text{l}$ , 0,68 mmol, 9 ekvivalentů) v přítomnosti DMAP (8,3 mg, 68  $\mu\text{mol}$ , 0,9 ekvivalentu) po dobu 2,5 hodiny. Připojování bylo opakováno s čerstvými reagensy po dobu 1,5 hodiny. Výsledná náplň byla 0,10 mmol/g, což představuje 77% výtěžek syntézy. Nechráněný peptid byl z pryskyřice odštěpen (525 mg, 54  $\mu\text{mol}$ ) působením TFA- $\text{H}_2\text{O}$  (92:8) po dobu 2 hodin. Spojené filtráty byly za sníženého tlaku odpařeny do sucha, byla přidána  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml), roztok byl lyofilizován a byly získány 43,0



mg (48,0  $\mu\text{mol}$ , 89% výtěžek) sloučeniny uvedené v nadpisu, která vykazovala čistotu >85% a byla kontrolována pomocí HPLC (podmínky A,  $t_R$  18,5 min.). ESMS, vypočteno pro  $\text{C}_{45}\text{H}_{65}\text{N}_7\text{O}_{12}$ , 895,5. Zjištěno:  $m/z$  896,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Příklad 19: Kahalalid B [5-MeHex-Tyr-cyklo(D-Ser-Phe-D-Leu-Pro-Thr-Gly)]**

Nechráněný peptid (příklad 18) (40,5 mg, 45  $\mu\text{mol}$ ) byl rozpuštěn v DMF (48 ml) a byly přidány PyBOP (70 mg, 0,135 mmol, 3 ekvivalenty) a DIEA (47 ml, 0,271 mmol, 6 ekvivalentů). Směs byla ponechána míchat po dobu 2 hodin a potom bylo rozpouštědlo odstraněno odpařením za sníženého tlaku, byla přidána  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml) a roztok byl lyofilizován. Hrubý produkt byl čištěn pomocí chromatografie za středního tlaku (Vydac  $\text{C}_{18}$  15-20  $\mu\text{m}$ , 30 nm, 240 x 24 mm), lineární gradient od 20% do 60% acetonitrilu (+0,05% TFA) ve vodě (+0,05% TFA) po dobu 5 hodin (každého rozpouštědla 300 ml), 120 ml/h, detekce při 220 nm, a byla tak získána sloučenina uvedená v nadpisu (8,7 mg, 9,9  $\mu\text{mol}$ , 22% výtěžek). Produkt byl charakterizován pomocí HPLC (podmínky A,  $t_R$  21,6 min.) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{11}$ , 877,5. Zjištěno:  $m/z$  878,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 900,6  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 916,5  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . AAA: Gly 1,02 (1), Thr 0,95 (1), Phe 0,99 (1), Ser 1,00 (1), Pro 1,20 (1), Leu 1,00 (1), Tyr 0,87 (1).

**Příklad 20: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Etg-Val)**

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 4 a 6 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 4 byl Fmoc-Thr-OH zaměněn za Fmoc-Etg-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,8 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $\text{C}_{75}\text{H}_{126}\text{N}_{14}\text{O}_{16}$ , 1479,0. Zjištěno:  $m/z$  1480,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1502,2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1518,0  $(\text{M}+\text{K})^+$ .

**Příklad 20b: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-D-Etg-Val)**

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 4 a 6 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 4 byl Fmoc-Thr-OH zaměněn za Fmoc-Etg-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC



( $t_R$  17,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{126}N_{14}O_{16}$ , 1479,0. Zjištěno:  $m/z$  1501,0  $[M+Na]^+$ , 1517,9  $[M+K]^+$ .

**Příklad 20c:** 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-D-Thr-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 4 a 6 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 4 byl Fmoc-Thr(tBu)-OH zaměněn za Fmoc-D-Thr(tBu)-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  19,9 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{126}N_{14}O_{17}$ , 1494,9. Zjištěno:  $m/z$  1517,4  $[M+Na]^+$ , 1533,4  $[M+K]^+$ .

**Příklad 20d:** 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-D-allo-Thr-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 4 a 6 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 4 byl Fmoc-Thr(tBu)-OH zaměněn za Fmoc-D-allo-Thr-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  18,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{126}N_{14}O_{17}$ , 1494,9. Zjištěno:  $m/z$  1496,6  $[M+H]^+$ , 1518,6  $[M+Na]^+$ , 1534,6  $[M+K]^+$ .

**Příklad 20e:** 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-D-Phe-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 4 byl Fmoc-Thr-OH zaměněn za Fmoc-D/L-(b-OH)Phe-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  22,2 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{80}H_{126}N_{14}O_{16}$ , 1538,95. Zjištěno:  $m/z$  1540,3  $[M+H]^+$ , 1562,4  $[M+Na]^+$ , 1578,4  $[M+K]^+$ .

**Příklad 21:** 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-Dpa-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s těmi výjimkami, že v příkladu 2 byl Fmoc-D-allo-Thr-OH zaměněn za Fmoc-D-Dpa(Alloc)-OH a že před inkorporací Alloc-Val-



-OH, který byl inkorporován jako poslední z chráněných aminokyselin, byla Alloc skupina z Dpa odstraněna, jak je ukázáno výše. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC a ESMS, vypočteno pro  $C_{74}H_{123}N_{15}O_{15}$ , 1461,9. Zjištěno:  $m/z$  1463,3  $[M+H]^+$ .

Příklad 22: But-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za But-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  14,7 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{72}H_{118}N_{14}O_{16}$ , 1435,9. Zjištěno:  $m/z$  1459,6  $[M+Na]^+$ , 1475,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 22bis: But-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

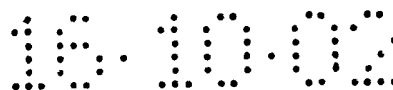
Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 22. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{72}H_{118}N_{14}O_{16}$ , 1435,9. Zjištěno:  $m/z$  1459,5  $[M+Na]^+$ , 1475,5  $[M+K]^+$ .

Příklad 23: 5-MeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 3-MeBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  15,9 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{73}H_{120}N_{14}O_{16}$ , 1449,9. Zjištěno:  $m/z$  1473,2  $[M+Na]^+$ , 1489,9  $[M+K]^+$ .

Příklad 23bis: 5-MeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 23. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,0



min., podmínky B) a ESMS, vypočteno pro  $C_{73}H_{120}N_{14}O_{16}$ , 1449,9. Zjištěno:  $m/z$  1473,3  $[M+Na]^+$ , 1489,4  $[M+K]^+$ .

Příklad 24: 3,3-DiMeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 3,3-DiMeBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,3 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$ , 1463,9. Zjištěno:  $m/z$  1487,4  $[M+Na]^+$ , 1503,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 24bis: 3,3-DiMeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 24. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,6 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$ , 1463,9. Zjištěno:  $m/z$  1487,3  $[M+Na]^+$ , 1503,3  $[M+K]^+$ .

Příklad 25: 4-MePen-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 4-MePen-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,5 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$ , 1463,9. Zjištěno:  $m/z$  1487,7  $[M+Na]^+$ , 1503,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 25bis: 4-MePen-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 25. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,8 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$ , 1463,9. Zjištěno:  $m/z$  1487,8  $[M+Na]^+$ , 1503,6  $[M+K]^+$ .



Příklad 26: Hep-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za Hep-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,5 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$ , 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1501,4  $[M+Na]^+$ , 1517,5  $[M+K]^+$ .

Příklad 26bis: Hep-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 26. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  18,9 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$ , 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1501,6  $[M+Na]^+$ , 1517,7  $[M+K]^+$ . 1463,9. Zjištěno:  $m/z$  1487,8  $[M+Na]^+$ , 1503,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 27: Pal-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za Pal-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  22,1 min., podmínky G) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{84}H_{142}N_{14}O_{16}$ , 1603,1. Zjištěno:  $m/z$  1626,9  $[M+Na]^+$ , 1642,9  $[M+K]^+$ .

Příklad 27bis: Pal-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 27. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  18,9 min., podmínky G) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$ , 1603,1. Zjištěno:  $m/z$  1626,8  $[M+Na]^+$ , 1642,8  $[M+K]^+$ .

Příklad 27a: 4-DiMeABut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 4-DiMeBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  12,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{123}N_{15}O_{16}$ , 1477,9. Zjištěno:  $m/z$  1478,6  $[M+H]^+$ , 1500,6  $[M+Na]^+$ , 1516,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 27b: 2-Hedo-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 2-Hedo-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  15,8 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{118}N_{14}O_{16}$ , 1458,9. Zjištěno:  $m/z$  1460,0  $[M+H]^+$ , 1482,0  $[M+Na]^+$ , 1497,9  $[M+K]^+$ .

Příklad 27c: 4-AcBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 4-AcBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  18,2 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{74}H_{120}N_{14}O_{18}$ , 1492,9. Zjištěno:  $m/z$  1493,7  $[M+H]^+$ , 1515,8  $[M+Na]^+$ , 1531,7  $[M+K]^+$ .

Příklad 27d: 4-HOBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za 4-HOBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,6 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{72}H_{118}N_{14}O_{17}$ , 1450,9. Zjištěno:  $m/z$  1451,6  $[M+H]^+$ , 1473,6  $[M+Na]^+$ , 1489,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 27e: Ac-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za HOAc. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{70}H_{114}N_{14}O_{16}$ , 1406,9. Zjištěno:  $m/z$  1407,8  $[M+H]^+$ , 1429,8  $[M+Na]^+$ .

Příklad 27f: TFA-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (trifluoroacetylace během cyklizačního kroku) v příkladu 27e. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  14,7 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{70}H_{111}F_3N_{14}O_{16}$ , 1460,8. Zjištěno:  $m/z$  1462,0  $[M+H]^+$ , 1484,1  $[M+Na]^+$ , 1500,0  $[M+K]^+$ .

Příklad 27g: AcButBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za AcButBut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  14,1 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{78}H_{126}N_{14}O_{20}$ , 1578,9. Zjištěno:  $m/z$  1581,2  $[M+H]^+$ , 1602,2  $[M+Na]^+$ , 1618,2  $[M+K]^+$ .

Příklad 27h: IBut-D-allo-Ile-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za Fmoc-D-allo-Ile-OH, odstranění skupiny Fmoc a acylaci pomocí Ibut-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  15,3 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{78}H_{129}N_{15}O_{17}$ , 1548,0. Zjištěno:  $m/z$  1548,8  $[M+H]^+$ , 1570,8  $[M+Na]^+$ , 1586,8  $[M+K]^+$ .



Příklad 27i: Lit-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za Lit-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  13,1 min., podmínky H) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{92}H_{150}N_{14}O_{17}$ , 1723,1. Zjištěno:  $m/z$  1724,6  $[M+H]^+$ , 1746,6  $[M+Na]^+$ , 1761,5  $[M+K]^+$ .

Příklad 27j: TFA-Lit-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (trifluoroacetylace během cyklizačního kroku) v příkladu 27i. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,1 min., podmínky H) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{94}H_{159}F_3N_{14}O_{18}$ , 1819,1. Zjištěno:  $m/z$  1820,6  $[M+H]^+$ , 1842,6  $[M+Na]^+$ , 1858,6  $[M+K]^+$ .

Příklad 27k: Tlco-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 byl 5-MeHex zaměněn za Tlco-OH. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  16,8 min., podmínky H) a ES-MS, vypočteno pro  $C_{92}H_{158}N_{14}O_{16}$ , 1715,2. Zjištěno:  $m/z$  858,2  $[M+H]^+/2$ , 1171,8  $[M+H]^+$ .

Příklad 28: H-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a experimentální postupy byly provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, pouze s tou výjimkou, že v příkladu 3 nebyl inkorporován 5-MeHex a Fmoc-D-Val byl zaměněn za Fmoc-D-Val. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  11,6 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{68}H_{112}N_{14}O_{15}$ , 1364,8. Zjištěno:  $m/z$  1388,3  $[M+Na]^+$ , 1404,3  $[M+K]^+$ .

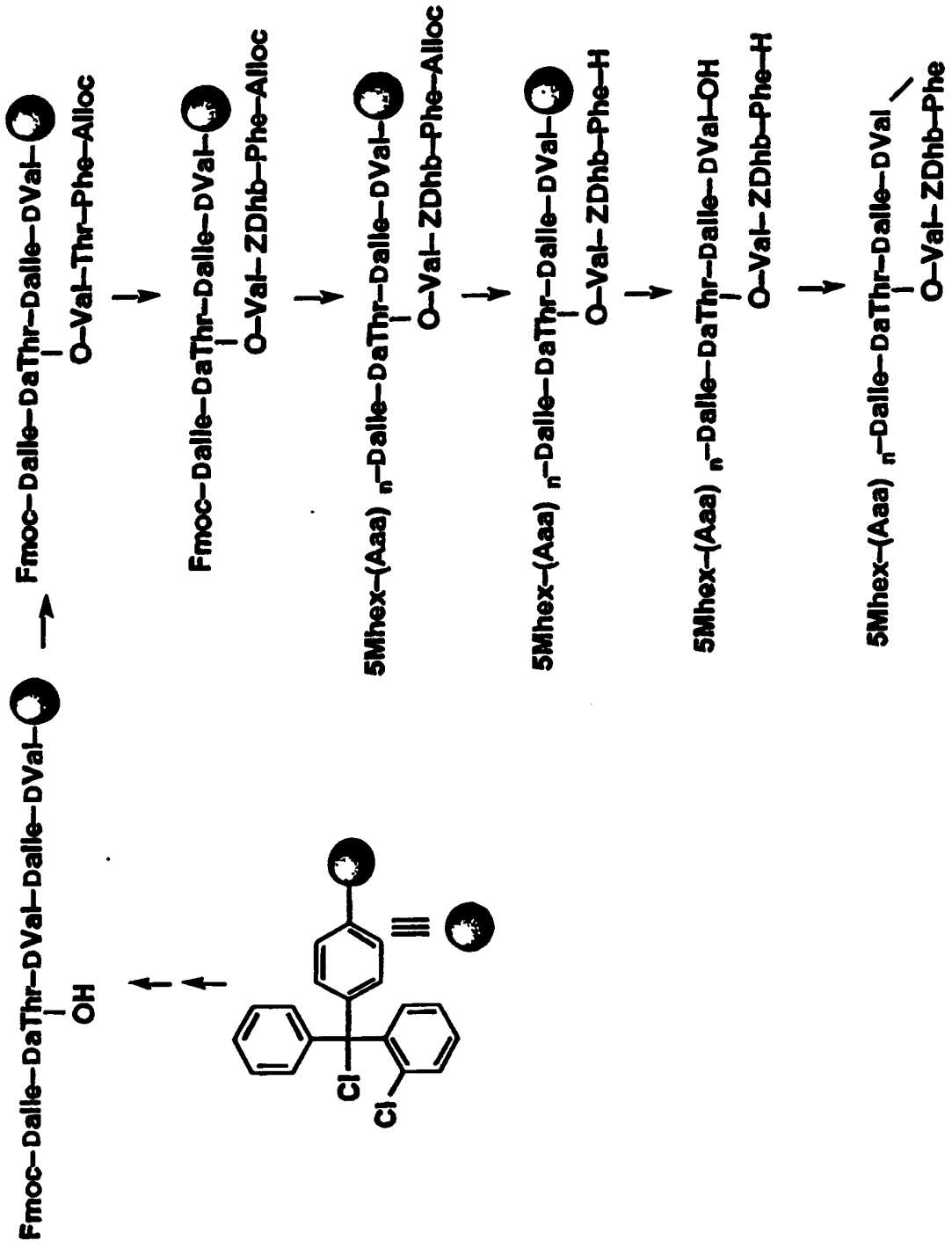
Příklad 28bis: H-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 28. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  12,9 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{68}H_{112}N_{14}O_{15}$ , 1364,8. Zjištěno:  $m/z$  1388,4  $[M+Na]^+$ , 1404,4  $[M+K]^+$ .

Příklad 29: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2.

Schéma 2



Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH nebyl inkorporován. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  23,9 min., podmínky A) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{70}H_{114}N_{12}O_{15}$ , 1362,9. Zjištěno:  $m/z$  1386,4  $[M+Na]^+$ , 1402,4  $[M+K]^+$ .

Příklad 29bis: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Byl získán jako vedlejší produkt v průběhu přípravy (racemizace během cyklizačního kroku) v příkladu 29. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  12,9 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS.

Příklad 30: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH a Fmoc-D-Pro-OH nebyly inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  20,3 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{65}H_{107}N_{11}O_{14}$ , 1265,8. Zjištěno:  $m/z$  1288,5  $[M+Na]^+$ , 1304,5  $[M+K]^+$ .

Příklad 31: 5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH a Fmoc-D-Val-OH nebyly inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  20,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{60}H_{98}N_{10}O_{13}$ , 1166,7. Zjištěno:  $m/z$  1190,9  $[M+Na]^+$ , 1206,9  $[M+K]^+$ .

Příklad 32: 5-MeHex-D-Val-Thr-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH a Fmoc-Val-OH nebyly

inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  24,6 min., podmínky A) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{55}H_{89}N_9O_{12}$ , 1067,7. Zjištěno:  $m/z$  1068,7  $[M+H]^+$ , 1090,6  $[M+Na]^+$ , 1106,5  $[M+K]^+$ .

**Příklad 33: 5-MeHex-D-Val-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-Val-OH a Fmoc-Thr(tBu)-OH nebyly inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  19,8 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{51}H_{82}N_8O_{10}$ , 966,6. Zjištěno:  $m/z$  990,7  $[M+Na]^+$ , 1007,2  $[M+K]^+$ .

**Příklad 34: 5-MeHex-D-allo-Ile-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH a Fmoc-D-Val-OH nebyly inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  22,0 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{46}H_{73}N_7O_9$ , 966,6. Zjištěno:  $m/z$  890,6  $[M+Na]^+$ , 906,6  $[M+K]^+$ .

**Příklad 35: 5-MeHex-cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Experimentální postupy byly v podstatě provedeny tak, jak bylo popsáno v příkladech 1 až 7, ale podle schématu 2. Vycházelo se z 200 mg pryskyřice a Fmoc-D-allo-Ile-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH a Fmoc-D-Val-OH nebyly inkorporovány. Produkt byl charakterizován pomocí HPLC ( $t_R$  17,1 min., podmínky B) a MALDI-TOF-MS, vypočteno pro  $C_{40}H_{62}N_6O_8$ , 754,5. Zjištěno:  $m/z$  755,7  $[M+H]^+$ , 777,7  $[M+Na]^+$ , 793,7  $[M+K]^+$ .

### Biologická aktivita

Biologická aktivita sloučenin předloženého vynálezu je předvedena na výsledcích v následujících tabulkách, které byly získány podle metodologie Berjeron a

kol., Biochem and Bioph Res. Comm., 1984, 121, 3, 848-854. Buněnými liniemi jsou P388, myší lymfom; A549, lidský plicní karcinom; HT-29, lidský karcinom tlustého střeva; MEL-28, lidský melanom; DU-145, lidský karcinom prostaty.

Tabulka sloučenin obdobných  
kahalalidu F

sloučenina	cyklus	řetězec**	molekulová hmotnost
27j	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: TFA-Lit-	1820
27i	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: lithocholoyl (Lit).	1724
27	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: palmitoyl Palm	1604
27bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: palmitoyl Palm	1604
27g	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 4-(4-acetoxybutanoyloxy)-butyryl (AcButBut-)	1579
27h	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	lBut-D-allo-Ile-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1548
20e	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-D-Phe-Val)-D-Phe: a,b-didehydrofenylalanin	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1539
20c	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Thr-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1495
27c	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 4-acetoxibutyryl (4-AcBut)	1493

20	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-L-Etg-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1479
20b	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-D-Etg-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1479
27a	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: N,N- -dimethyl-4-aminobutyryl (4- -DiMeABut)	1478
(jako Scheuer) 15	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-Val- -L-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1477
15 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-Val- -L-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1477
26	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: Heptanoyl (Hep)	1477
26 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: Heptanoyl (Hep)	1477
(Rinehart) 7	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1477
7 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo- -Ile-	1477
24	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3,3- -dimethylbutyryl (3,3- -DiMeBut)	1463
24 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3,3- -dimethylbutyryl (3,3-	1463

		-DiMeBut)	
25	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3- -methylpentanoyl (4-MePen)	1463
25 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3- -methylpentanoyl (4-MePen)	1463
27f	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: trifluoracetyl (TFA)	1461
27b	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 2,4- -hexadienoyl (Hedo)	1459
27d	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 4- -hydroxybutyryl	1451
23	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3- -methylbutyryl (3-MetBut)	1451
23b	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: 3- -methylbutyryl (3-MetBut)	1451
22	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: butyryl (But)	1435
22b	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: butyryl	1435
27c	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: acetyl	1407
28	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: nikoli mastná kyselina	1365
28 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	koncová skupina: nikoli mastná kyselina	1365
29	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-	1363
29 bis	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-	1363

31	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val- -D-allo-Ile-	1167
32	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-allo- -Ile-	1068
19	L-Phe-D-Leu-L-Pro-_-Thr-Gly- -D-Ser	5-MeHex-L-Tyr-	878
34	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-allo-IleL-Tyr-	868
35	cyklo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D- -Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-	754

\*\* Sloučeniny, u kterých je řetězec označen „koncová skupina“, mají stejný řetězec jako ve sloučenině 7, ale s uvedenou substitucí za 5-MeHex.

Tabulka cytotoxicity sloučenin obdobných kahalalidu F,  
hodnoty IC50 (μmol) pro deriváty

sloučenina	A549M	DU145M	HT29M	MEL28M	p388M
27j	5,49E-05	5,49E-05	5,49E-05	5,49E-05	2,75E-03
27i	5,80E-04	5,80E-04	2,90E-05	1,45E-04	1,45E-04
27	1,56E-04	3,12E-05	6,23E-05	6,23E-05	3,12E-05
27bis	>3,12E-03	1,56E-03	6,23E-04	6,23E-04	>3,12E-03
27g	>6,33E-04	>6,33E-04	1,58E-03	3,17E-03	>3,17E-03
27h	NA	NA	NA	NA	NA
20e	3,25E-03	6,50E-04	NA	NA	NA
20c	NA	NA	NA	NA	NA
27c	NA	NA	6,70E-04	3,35E-03	NA
20	>3,38E-03	>3,38E-03	>3,38E-03	>3,38E-03	>3,38E-03
20b	>3,38E-03	3,38E-03	3,38E-03	>3,38E-03	>3,38E-03

27a	NA	NA	NA	NA	NA
(jako Scheuer) 15	>3,29E-03	3,29E-03	3,29E-03	>3,29E-03	>3,29E-03
15 bis	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03
26	>3,39E-04	>3,39E-05	6,77E-04	1,69E-03	3,39E-03
26 bis	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-04	1,69E-03	>3,39E-03
(Rinehart) 7	>3,39E-04	1,69E-04	>3,39E-05	>3,39E-04	>3,39E-03
7 bis	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03	>3,39E-03
24	1,71E-03	3,42E-04	3,42E-04	3,42E-03	>3,42E-03
24 bis	>3,42E-03	>3,42E-03	3,42E-03	>3,42E-03	>3,42E-03
25	3,42E-03	3,42E-03	3,42E-03	>3,42E-03	>3,42E-03
25 bis	>3,42E-03	>3,42E-03	>3,42E-03	>3,42E-03	>3,42E-03
27f	NA	3,42E-03	>3,42E-03	3,42E-03	>3,42E-03
27b	3,43E-03	6,85E-04	3,43E-03	NA	NA
27d	NA	NA	NA	NA	NA
23	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03
23b	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03	>3,45E-03
22	>3,48E-03	1,74E-03	NA	NA	NA
22b	>3,48E-03	>3,48E-03	1,74E-03	>3,48E-03	>3,48E-03
27c	NA	>3,55E-03	>3,55E-03	>3,55E-03	>3,55E-03
28	>3,66E-03	>3,66E-03	>3,66E-03	>3,66E-03	>3,66E-03
28 bis	>3,66E-03	>3,66E-03	NA	NA	NA
29	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03
29 bis	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03	>3,67E-03
31	>4,28E-04	>4,28E-05	>4,28E-03	>4,28E-03	>4,28E-03
32	NA	NA	4,68E-05	4,68E-05	>4,68E-03

19	>5,69E-03	>5,69E-03	NA	NA	NA
34	NA	NA	>5,76E-03	>5,76E-03	>5,76E-03
35	>5,76E-03	>5,76E-03	>5,76E-03	>5,76E-03	>5,76E-03

## Citace

Hamann, M.T.; Scheuer, P.J. J. Am. Chem. Soc., 1993. "Kahalalide F: a Bioactive Depsipeptide from the Sacoglossan Mollusk *Elysia refescens* and the Green Alga *Bryopsis* sp.", sv. 115, str. 5825-5826.

Hamann, M.T., a kol. J. Org. Chem., 1996. "Kahalalides: Bioactive Peptides from Marine Mollusk *Elysia rufescens* and its Algal Diet *Bryopsis* sp.", sv. 61, str. 6594-6660.

García-Rocha, M., a kol. Cancer Lett., 1996. "The Antitumoral Compound Kahalalide F Acts on Cell Lysosomes", sv. 99, str. 43-50.

Hamann, M.T., a kol. J. Org. Chem., 1998. "Kahalalides: Bioactive Peptides from Marine Mollusk *Elysia rufescens* and its Algal Diet *Bryopsis* sp.", sv. 63, p. 485 (oprava J. Org. Chem., 1996, sv. 61, str. 6594-6660).

Lloyd-Williams, P., a kol. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Press, Boca Raton (FL), 1997.

Goetz, G., a kol. J. Nat. Prod., 1997. "Two Acyclic Kahalalides from the Sacoglossan Mollusk *Elysia rufescens*", sv. 60, str. 562-567.

Goetz, G., a kol. Tetrahedron, 1999. The Absolute Stereochemistry of Kahalalide F", sv. 55, str. 7739-7746.

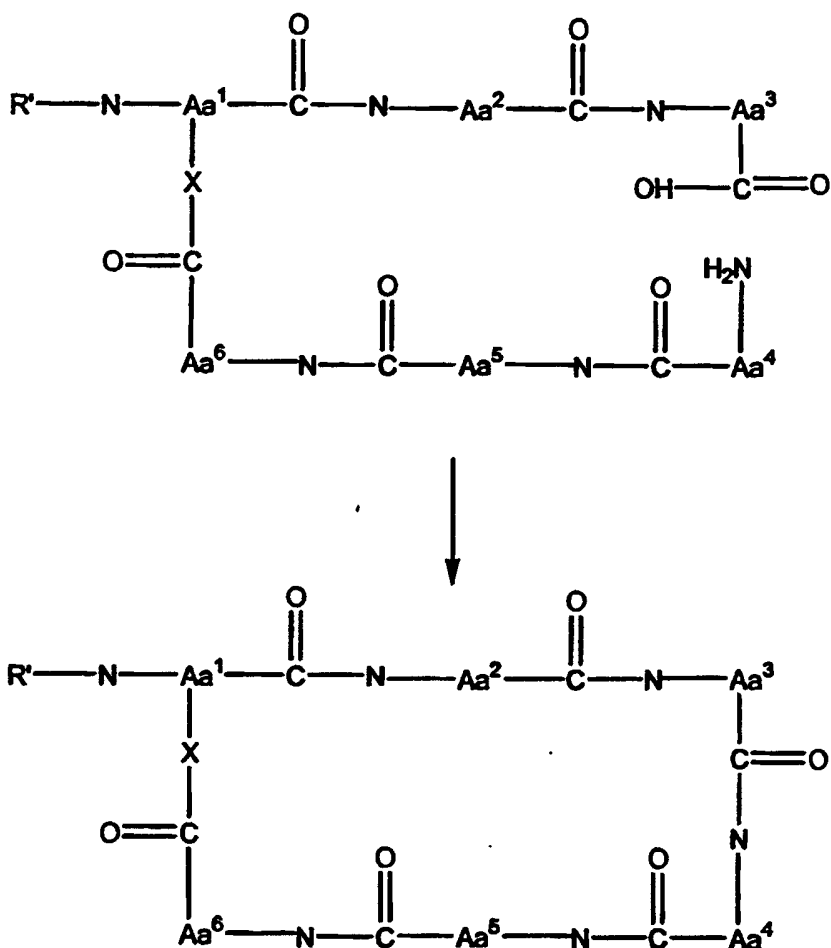
Kan, Y., a kol. J. Nat. Prod., 1999, sv. 62, str. 1169-1172.

Horgen, F.D. a kol. J. Nat. Prod., 2000, sv. 63, str. 152-154.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina napodobující přírodní kahalalid, která je biologicky aktivní sloučeninou se strukturou založenou na přírodním kahalalidu, ale lišící se v jednom nebo ve více z následujících znaků:
  - alespoň jedna aminokyselina, která není stejná jako aminokyselina v původní sloučenině;
  - alespoň jedna methylenová skupina navíc vedle methylenových skupin v acylové skupině postranního řetězce původní sloučeniny;
  - alespoň jedna methylenová skupina vynechaná v acylové skupině postranního řetězce původní sloučeniny;
  - alespoň jeden substituent přidaný do acylové skupiny postranního řetězce původní sloučeniny;
  - alespoň jeden substituent vynechaný v acylové skupině postranního řetězce původní sloučeniny.
2. Sloučenina podle nároku 1, jejíž struktura je značně podobná kahalalidu, který je vybrán ze skupiny zahrnující kahalalid A, kahalalid B, kahalalid C, kahalalid D, kahalalid E, kahalalid F, kahalalid G, kahalalid H a kahalalid J.
3. Sloučenina podle nároku 2, která napodobuje kahalalid F, ale liší se od něho v postranním řetězci.
4. Sloučenina podle nároku 3, která obsahuje alespoň jeden další substituent v postranním řetězci.
5. Sloučenina podle nároku 4, která obsahuje alespoň jeden halogenový substituent.
6. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 2 až 5, která napodobuje kahalalid F, ale liší se od něho aminokyselinou v postranním řetězci.
7. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 2 až 5, která napodobuje kahalalid F, ale liší se od něho aminokyselinou v kruhu.

8. Způsob přípravy sloučeniny napodobující kahalalid F, vyznačující se tím, že uzavírání kruhu probíhá podle následujícího schématu.



kde R' je skupina R-CO-N- nebo její prekurzor, kde jedna nebo více aminokyselin může mít chránící skupiny a kde -COOH z Aa<sup>3</sup> a/nebo -NH<sub>2</sub> z Aa<sup>4</sup> mohou být volitelně chráněny, aktivovány nebo derivovány.

9. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje sloučeninu napodobující kahalalid, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.
10. Způsob léčení rakoviny, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny napodobující kahalalid nebo kahalalid F, připravenou postupem popsáním v nároku 8.