(19) 

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 963451 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963451

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 5/06 (2006.01)
C07K 5/062 (2006.01)
C07K 5/065 (2006.01)
C07K 5/078 (2006.01)
C07K 5/097 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 5/02 (2006.01)
C07C 257/18 (2006.01)
C07D 207/16 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **03.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.09.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **03.03.1995 PCT/US1995/002558**

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

04.03.1994 US 206553 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • AstraZeneca AB, Kvarnbergagatan 12, 151 85 Södertälje, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Smith, Gerald Floyd, Indianapolis, IN 46217, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Wiley, Michael Robert, Indianapolis, IN 46268, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Schacht, Aaron Leigh, Indianapolis, IN 46278, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • Shuman, Robert Theodore, Greenwood, IN 46142, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Antitromboottisia aineita
Antitrombotiska ämnen

Antitromboottisia aineita

Tämä keksintö koskee trombiinin inhibiittoreita, jotka ovat hyödyllisiä antikoagulantteja nisäkkäissä. Se koskee erityisesti peptidijohdannaisia, joilla on korkea antitromboottinen aktiivisuus, antikoagulanttiaktiivisuus ja oraalinen biologinen hyötyosuus.

Veren hyytymisen, tromboosin, tapahtumasarjan laukaisee monimutkainen proteolyyttinen ketjureaktio, joka johtaa trombiinin muodostumiseen. Trombiini poistaa proteolyyttisesti aktivaatiopeptidejä fibrinogeenin, joka on liukoinen veriplasmassa, Aα-ketjuista ja Bβ-ketjuista, mikä aloittaa liukenemattoman fibriinin muodostumisen.

Antikoagulaatio saadaan nykyisin aikaan antamalla hepariineja ja kumariineja.

Koagulaation ja tromboosin parenteraalinen farmakologinen torjunta perustuu trombiinin inhibitioon hepariineja käyttämällä. Hepariinit toimivat epäsuorasti trombiinin suhteen kiihdyttämällä endogeenisen antitrombiini III:n (trombiinin pääasiallisen fysiologisen inhibiittorin) inhiboivia vaikutuksia. Koska antitrombiini III:n tasot vaihtelevat plasmassa ja koska pintaan sitoutunut trombiini vaikuttaa olevan resistentti tälle epäsuoralle mekanismille, hepariinit voivat olla tehoton hoito. Koska koagulaatiomääritysten uskotaan olevan liittyneenä tehokkuuteen ja turvallisuuteen, hepariinitasoja täytyy seurata koagulaatiomäärityksillä (erityisesti APTT-määrityksellä ("activated partial thromboplastin time")). Kumariinit estävät trombiinin muodostumista tukkimalla translaation jälkeisen gammakarboksylaation protrombiinin ja muiden tämäntyyppisten proteiinien synteesissä. Niiden toimintamekanismin vuoksi kumariinien vaikutus voi kehittyä vain hitaasti, 6 - 24 tuntia antamisen jälkeen. Lisäksi ne eivät ole selektiivisiä antikoagulantteja. Kumariinit vaati-

vat myös seurantaa koagulaatiomäärityksillä (erityisesti protrombiiniaika (PT) -määrityksellä).

Mielenkiinto pieniin synteettisiin peptideihin, joita proteolyyttiset entsyymit tunnistavat samalla tavalla kuin luonnollisia substraatteja, on hiljattain kasvanut. Tripeptidialdehydit, kuten D-Phe-Pro-Arg-H, Boc-D-Phe-Pro-Arg-H ja D-MePhe-Pro-Arg-H, Bajusz ym., J. Med. Chem., 33, 1729-1735 (1990) osoittavat tehokasta suoraa trombiinin inhibitiota. On raportoitu varhaisia kliinisiä tutkimuksia, jotka osoittavat, että D-MePhe-Pro-Arg-H-sulfaatti on antikoagulantti ihmisessä, katso Simoons ym., Circulation, 90, I-231, Abstr. 1241 (1994). Monet tutkijat ovat syntetisoineet analogeja yrittäessään kehittää farmaseuttisia agensseja, esimerkiksi Shuman ym., J. Med. Chem., 36, 314-319 (1993). US-patentti nro 4 346 078 opettaa sarjan antikoagulanttipeptidejä, jotka sisältävät agmatiini (1-amino-4-guanidinobutaani) -ryhmän. Agmatiinijohdannaisia ja niille sukua olevia yhdisteitä esitetään myös PCT-patenttihakemuksessa WO 93/11 152, samoin kuin EP-patenttihakemuksessa numero 601 459, julkaistu 15. kesäkuuta 1994. Sellaiset yhdisteet eroavat edellisestä sarjasta siinä, että agmatiiniyhdisteistä puuttuu karbonyyliosa, joka löytyy samanlaisista yhdisteistä, jotka sisältävät Arg-ryhmän.

Vaikka hepariinit ja kumariinit ovat tehokkaita antikoagulantteja, ja mitään lääkettä ei ole vielä ilmaantunut tunnettujen tripeptidialdehydien joukosta, ja huolimatta siitä, että tämä yhdisteluokka on jatkuvasti lupaava, on olemassa tarve antikoagulanteille, jotka toimivat selektiivisesti trombiinin suhteen, ja riippumatta antitrombiini III:sta, niillä on inhibitorinen vaikutus lyhyen ajan sisällä antamisesta, edullisesti suun kautta, ja ne eivät häiritse verihyytymien hajoamista, mikä vaaditaan homeostaasin ylläpitämiseksi.

Tämä keksintö kohdistuu havaintoon, että tämän keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka määritellään jäljempänä, ovat tehokkaita trombiinin inhibiittoreita, joilla on suuri biologinen hyötyosuus suun kautta antamisen jälkeen. Lisäksi tietyillä tämän keksinnön mukaisilla yhdisteillä voi myös ilmetä tekijän Xa inhibitiota, joka on osallisena koagulaatioketjureaktiossa.

Vastaavasti tämän keksinnön ensisijainen tavoite on tarjota uusia peptidijohdannaisia, jotka ovat tehokkaita trombiinin inhibiittoreita ja hyödyllisiä antikoagulantteina.

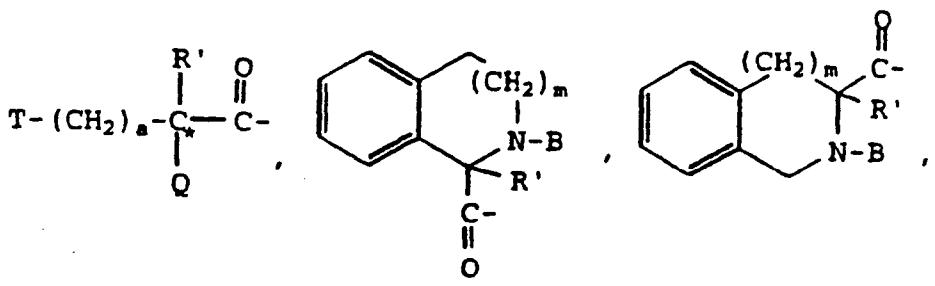
Toiset tavoitteet, piirteet ja edut ovat ammattimiehille ilmeisiä seuraavasta selityksestä ja patenttivaatimuksista.

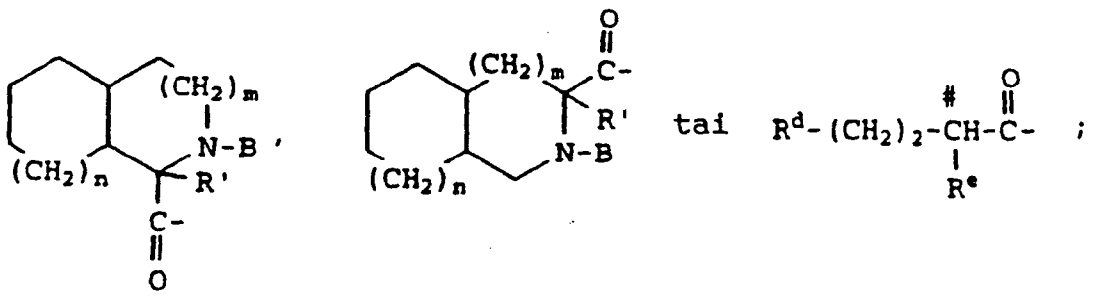
Tämä keksintö tarjoaa trombiinia inhiboivan yhdisteen, jolla on kaava I:

$$X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH2)_r\text{-}G \qquad I$$

jossa

X on prolinyyli, homoprolinyyli, $R^m\text{-}(CH_2)_g\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}C(O)\text{-}$,





tai

;

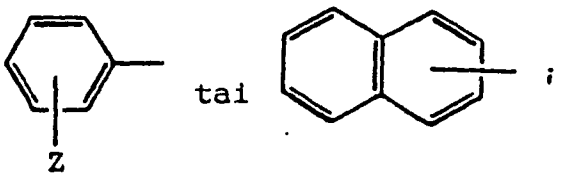
jossa

R^d on karboksi tai metyylisulfonyyli,

R^e on NHR^c, $NHCOR^c$ tai $NHCOOR^c$, jossa

R^c on C_{1-10}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai C_{3-8}-sykloalkyyli-C_{1-6}-alkyyliradikaali, jossa on 4 - 10 hiiliatomia,

T on C_{3-8}-sykloalkyyli, C_{1-8}-alkyyli,



;

a on 0, 1 tai 2, ja

Q on -OH, C_{1-4}-alkoksi tai -NH-A,

A on vety, C_{1-4}-alkyyli, $R''SO_2$-, $R''OC(O)$-, $R''C(O)$-, $R^nC(O)$- tai $-(CH_2)_g-R^m$,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R" on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluorialkyyli, $-(CH_2)_d-R^m$, tai substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitu bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

R^m on $-COOR^b$, $-SO_2(C_{1-4}$-alkyyli), $-SO_3H$, $-P(O)(OR^b)_2$ tai tetratsol-5-yyli,

R^n on $-COOR^b$ tai tetratsol-5-yyli,

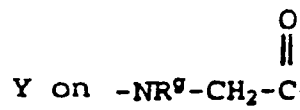
kukin R^b on toisistaan riippumatta vety tai C_{1-4}-alkyyli,

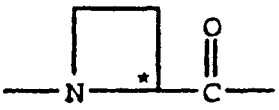
d on 1, 2 tai 3,

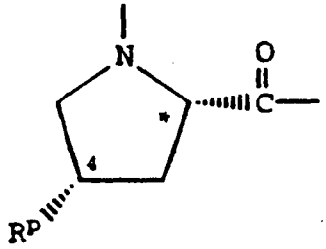
m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

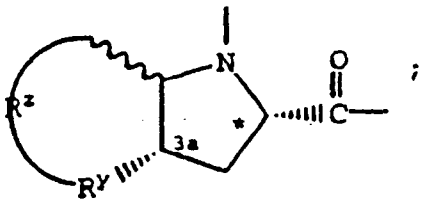
Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,

Y on  ,

 ,



tai

 ;

jossa

R^g on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$, tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samoja tai erilaisia ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

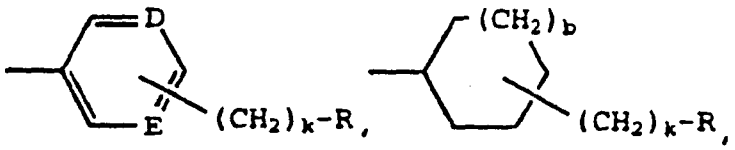
R^y on $-CH_2-$, -O-, -S- tai -NH-, ja

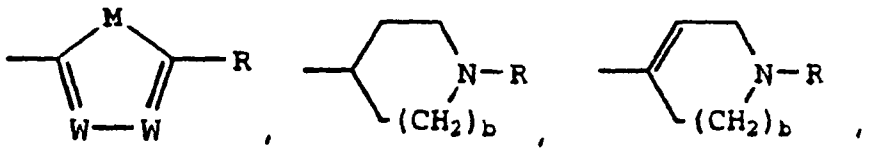
R^z on sidos, tai yhdessä R^y:n ja kolmen yhdistävän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen

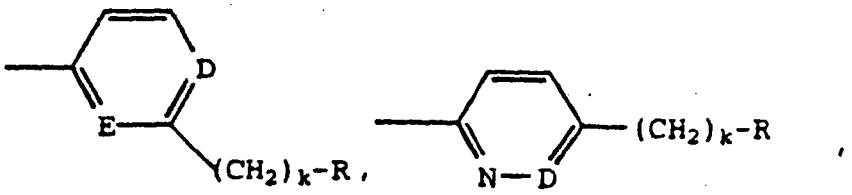
renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla -O-, -S- tai -NH-,

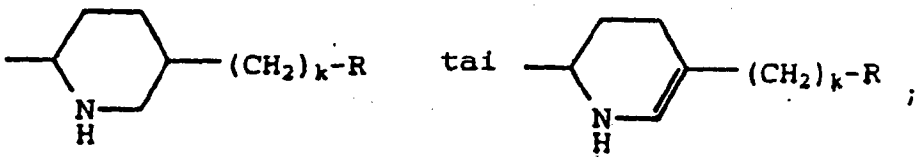
r on 1, 2 tai 3, ja

G on $-(CH_2)_s-R$, jossa s on 0 - 5, $-CH=CH-(CH_2)_t-R$, jossa t on 0 - 3, tai G on









jossa D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

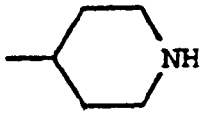
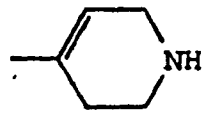
k on 0 tai 1,

b on 0 tai 1,

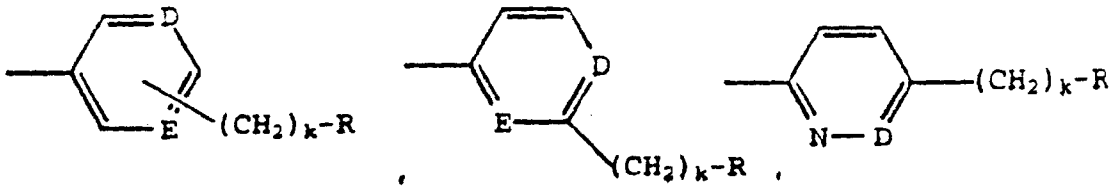
M on S, O tai NH,

kumpikin W on toisistaan riippumatta N tai CH, ja

R on $-NH_2$, $-C(=NH)-NH_2$, $-C(=NOH)-NH_2$ tai $-NH-C(=NH)-NH_2$,

tai G on  tai  ,

ja jossa yksi - kaikki seuraavien rakennekaavojen:

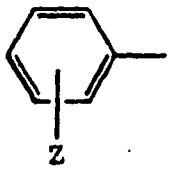


aromaattisten tai heteroaromaattisten renkaiden muuten substituoimattomista hiiliatomeista voi sisältää fluorisubstituentin;

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan,

tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävän solvaatin,

edellyttäen, että A ei ole vety tai t-butyylioksikarbonyyli, kun G on $-(CH_2)_4-NH-C(NH)NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^P on vety) ja T on

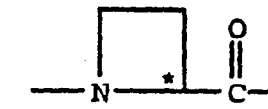


;

ja edellyttäen lisäksi, että R ei ole amino tai guanidino, kun r = 1 ja s = 0,

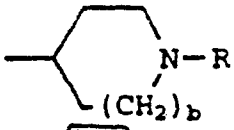
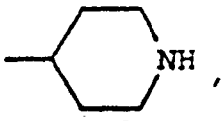
ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole vety, C_{1-4}-alkyyli, metyylisulfonyyli tai $-(CH_2)g-R^m$, kun G on $-(CH_2)_4-R$,

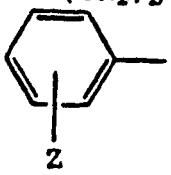
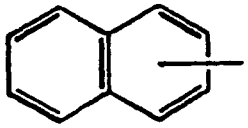
jossa R on $-C(=NH)-NH_2$ tai $-NH-C(=NH)-NH_2$,

Y on  , substituoimaton prolinyyli (R^P on vety) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^P on OH), R' on vety, T on sykloheksyyli ja Q on -NH-A,

ja edellyttäen lisäksi, että $R''SO_2$ ei ole aryylisulfonyyli, kun G on $-(CH_2)_4-R$, jossa R on $-NH-C(=NH)-NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^P on vety) tai 4-metyylitioprolinyyli (R^P on $-SCH_3$), ja Q on -NH-A,

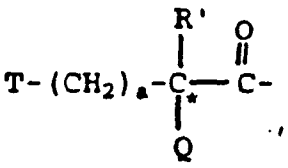
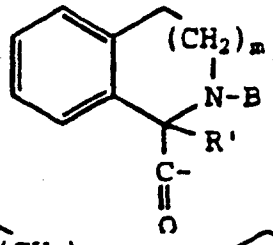
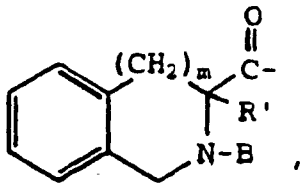
ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole R"SO_2-, kun G on

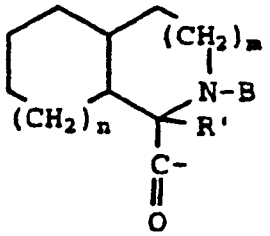
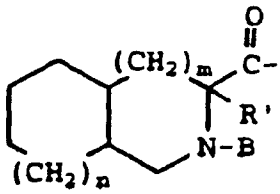

tai

, T on C_{1-8}-alkyyli,


tai

, ja Q on NH-A.

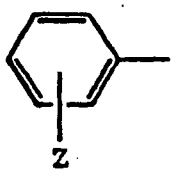
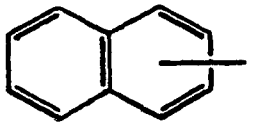
Edellä mainittujen kaavan I mukaisten yhdisteiden erityinen ryhmä koostuu niistä kaavan I mukaisista yhdisteistä, joissa

X on prolinyyli, homoprolinyyli,


,

,

,


tai

;

T on C_{3-8}-sykloalkyyli, C_{1-8}-alkyyli,


tai

;

a on 0 tai 1,

Q on -OH, C_{1-4}-alkoksi tai -NH-A,

A on vety, C_{1-4}-alkyyli, R"SO_2-, R"OC(O)-, R"C(O)- tai -$(CH_2)_g$-COOH,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

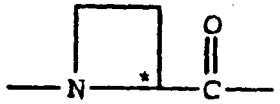
R" on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluorialkyyli, $-(CH_2)_d$-COOH, tai substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samoja tai erilaisia ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitu bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

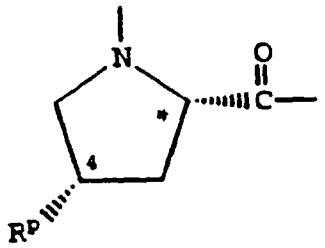
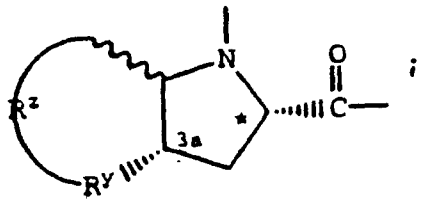
d on 1, 2 tai 3,

m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,

Y on $-NR^g-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-$,  ,

 tai  ;

jossa

R^g on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$, tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilai-

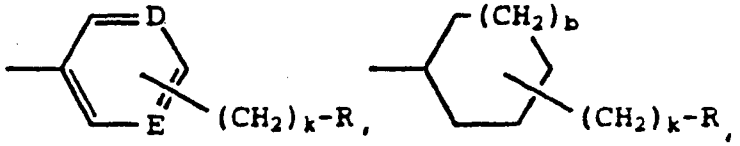
set ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

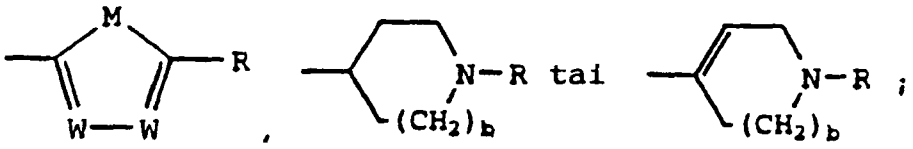
R^y on $-CH_2-$, $-O-$, $-S-$ tai $-NH-$, ja

R^z on sidos, tai yhdessä R^y:n ja kolmen yhdistävän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla $-O-$, $-S-$ tai $-NH-$,

r on 1 tai 2, ja

G on $-(CH_2)_s-R$, jossa s on 0 - 5, $-CH=CH-(CH_2)_t-R$, jossa t on 0 - 3,





jossa

D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

k on 0 tai 1,

b on 0 tai 1,

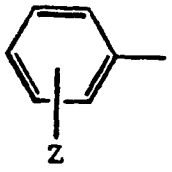
M on S, O tai NH,

kukin W on toisesta riippumatta N tai CH, ja

R on $-NH_2$, $-C(=NH)-NH_2-$, $-C(=NOH)-NH_2$ tai $-NH-C(=NH)-NH_2$,

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävästä suolasta, tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävästä solvaatista,

edellyttäen, että A ei ole vety tai t-butyylioksikarbonyyli, kun G on $-(CH_2)_s-NH-C(NH)NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) ja T on



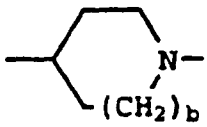
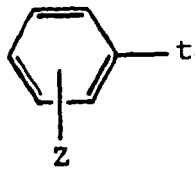
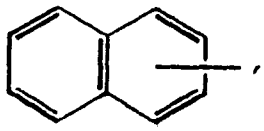
ja edellyttäen lisäksi, että R ei ole amino tai guanidino, kun r = 1 ja s = 0,

ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole vety, C_{1-4}-alkyyli, metyylisulfonyyli tai $-(CH_2)_g-COOH$, kun G on

$-(CH_2)_s-R$, jossa R on $-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$ tai $-NH-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$,

Y on  , substituoimaton prolinyyli (RP on vety) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^P on OH), R' on vety, T on sykloheksyyli ja Q on -NH-A,

ja edellyttäen lisäksi, että $R"SO_2$ ei ole aryylisulfonyyli, kun G on $-(CH_2)_s-R$, jossa R on $-NH-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^P on vety) tai 4-metyylitioprolinyyli (R^P on $-SCH_3$) ja Q on -NH-A,

ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole $R"SO_2-$, kun G on  , T on C_{1-8}-alkyyli,  tai  ,

ja Q on -NH-A.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden lisäksi tämä keksintö tarjoaa farmaseuttisia formulaatioita, jotka sisältävät kaavan I mukaisen yhdisteen yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimennusaineen tai apuaineen kanssa.

Tämä keksintö tarjoaa myös sellaisen menetelmän tromboosin inhibitioon nisäkkäissä, jolle on tunnusmerkillistä, että hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle annetaan antitromboottinen annos kaavan I mukaista yhdistettä.

Tämä keksintö tarjoaa lisäksi sellaisen menetelmän trombiinin inhibitioon, jolle on tunnusmerkillistä, että

hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle anetaan trombiinia inhiboiva annos kaavan I mukaista yhdistettä.

Tämä keksintö koskee trombiinin uusia inhibiittoreita, farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät yhdisteitä vaikuttavina aineina, ja yhdisteiden käytön antikoagulantteina sellaisten tromboembolisten tautien estämistä ja hoitoa varten, kuten esimerkiksi laskimon veritulppa, keuhkoembolia, valtimon veritulppa, erityisesti sydänlihaksen iskemia, sydäninfarkti ja aivoverisuonitukos, yleiset tilat, joissa veri voi hyytyä liikaa ja paikalliset tilat, joissa veri voi hyytyä liikaa, kuten ne, jotka seuraavat angioplastiaa ja sepelvaltimon ohitusleikkauksia, ja yleinen kudosvaurio, kun se koskee tulehdusprosessia.

Termi "alkyyli" itsessään tai osana toista substituenttia tarkoittaa suoraketjuista tai haarautunutta alkyyliradikaalia, jossa on tietty määrä hiiliatomeja, kuten metyyli, etyyli, n-propyyli, isopropyyli, n-butyyli, t-butyyli, isobutyyli ja sec-butyyli. Termi "perfluorialkyyli" itsessään tai osana toista substituenttia tarkoittaa suoraketjuista tai haarautunutta alkyyliradikaalia, jossa on tietty määrä hiiliatomeja, jossa kukin vetyatomi korvataan fluoriatomilla, kuten trifluorimetyyli, perfluorietyyli, perfluori-n-propyyli, perfluori-isopropyyli, perfluori-n-butyyli, perfluori-t-butyyli, perfluori-isobutyyli ja perfluori-sec-butyyli.

Termi "C_{3-8}-sykloalkyyli" viittaa tyydyttyneisiin alisyklisiin renkaisiin, joissa on 3 - 8 hiiliatomia, kuten syklopropyyli, metyylisyklopropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 4-metyylisykloheksyyli, sykloktyyli ja vastaavat.

Termi "alkoksi" tarkoittaa suoraketjuista tai haarautunutta alkyyliradikaalia, jossa on tietty määrä hiiliatomeja sitoutuneena kantaosaan happiatomilla. Termi "halogeeni" tarkoittaa klooria, fluoria, bromia tai jodia.

Termi "asetyyli" tarkoittaa CH_3-C(O)-. Termi "t-butyylioksikarbonyyli" tarkoittaa $(CH_3)_3C$-O-C(O)- ja se lyhennetään "Boc". Termi "bentsyylioksikarbonyyli" tarkoittaa $C_6H_5CH_2$-O-C(O)- ja se lyhennetään "Cbz".

Termi "5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas" tarkoittaa mitä tahansa 5- tai 6-jäsenistä rengasta, joka tuottaa stabiilin rakenteen, joka sisältää yksi tai kaksi typpiatomia, yhden rikkiatomin, yhden happiatomin, yhden typpi- ja yhden rikkiatomin, tai yhden typpi- ja yhden happiatomin. 5-jäsenisellä renkaalla on yksi tai kaksi kaksoissidosta ja 6-jäsenisellä renkaalla on kaksi tai kolme kaksoissidosta. Sellaisiin heterosyklisiin järjestelmiin kuuluvat furyyli, tienyyli, pyrrolyyli, pyratsolyyli, oksatsolyyli, isoksatsolyyli, tiatsolyyli, isotiatsolyyli, pyranyyli, pyridinyyli, pyrimidinyyli, pyratsinyyli, oksatsinyyli ja tiatsinyyli.

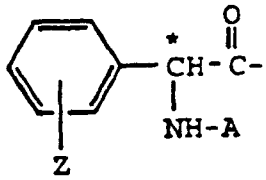
Termi "9- tai 10-jäseninen heterosyklinen rengas" tarkoittaa mitä tahansa bisyklistä ryhmää, jossa mikä tahansa edellä mainittu 5- tai 6-jäseninen rengas on fuusioitu bentseenirenkaaseen tai toiseen edellä määriteltyyn 6-jäseniseen heterosykliseen renkaaseen, joka tuottaa stabiilin rakenteen. Näihin heterosyklisiin järjestelmiin kuuluvat indolyyli, bentsotienyyli, bentsofuryyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli, bentsopyratsolyyli, kinolinyyli, isokinolinyyli, bentsimidatsolyyli ja bentsotiatsolyyli.

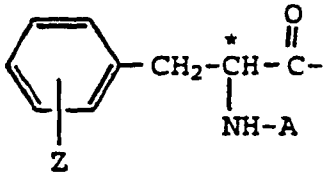
On ymmärrettävä, että monet edellä mainitut heterosykliset renkaat voivat esiintyä tautomeerisinä muotoina. Kaikki sellaiset muodot sisältyvät tämän keksinnön suojapiiriin.

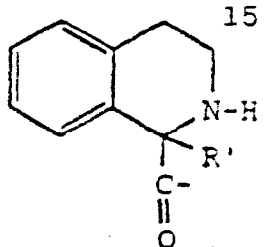
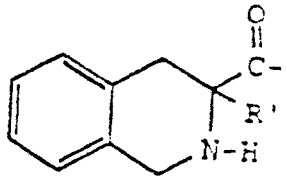
Kaikki aromaattiset tai heteroaromaattiset ryhmät, jotka on lueteltu Ar:n tai R":n määrittelyssä, ovat toisistaan riippumatta substituoimattomia tai substituoituja yhdellä tai kahdella substituentilla, jotka tuottavat stabiilin rakenteen ja jotka voivat olla toisistaan riippu-

matta halogeeni, hydroksyyli, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, amino($-NH_2$), mono(C_{1-4}-alkyyli)amino, $-(CH_2)_jCOOH$, merkapto, $-S(O)_h(C_{1-4}$-alkyyli), $-NHS(O)_h(C_{1-4}$-alkyyli), $-NHC(O)(C_{1-4}$-alkyyli), $-S(O)_hNH_2$, $-S(O)_hNH(C_{1-4}$-alkyyli) tai $-S(O)_hN(C_{1-4}$-alkyyli$)_2$, h on 0, 1 tai 2 ja j on 0, 1, 2, 3 tai 4. Yksi erityisen edullinen sellainen arvo substituentille R"(C)O- on 1-metyyli-indol-2-oyyli.

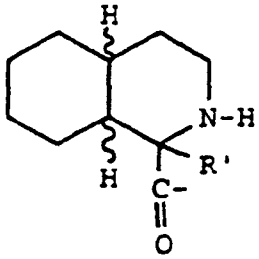
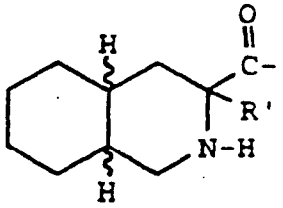
Kaavan I esityksessä ryhmän X funktionaalinen karbonyyliryhmä on kiinnittynyt ryhmän Y funktionaaliseen amiiniryhmään. Y:n funktionaalinen karbonyyliryhmä on sitten kiinnittynyt kaavassa I piirrettyyn aminoryhmään.

Ryhmään  , jossa Z ja A ovat molemmat vety, viitataan tässä ajoittain nimellä fenyyliglysyyli ja sen lyhenne on Phg. Yhdisteisiin, joissa A on esim. metyyli, viitataan nimellä N^{α}-metyyli-fenyyliglysyyliryhmä ja ne lyhennetään MePhg. Substituoituihin yhdisteisiin, joissa Z on muuta kuin vety, viitataan substituenttiryhmän tyypin ja aseman perusteella, esim. 3'-kloorifenyyliglysyyli tai Phg(3-Cl).

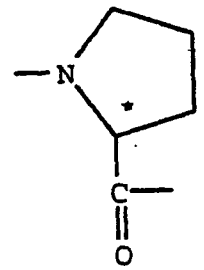
Ryhmään  , jossa Z ja A ovat molemmat vety, viitataan tässä ajoittain nimellä fenyylialanyyli ja sen lyhenne on Phe. Yhdisteisiin, joissa A on esim. metyyli, viitataan nimellä N^{α}-metyyli-fenyylialanyyliryhmä ja ne lyhennetään MePhe. Substituoituihin yhdisteisiin, joissa Z on muu kuin vety, viitataan substituenttiryhmän tyypin ja aseman perusteella, esim. 3'-kloorifenyylialanyyli tai Phe(3-Cl).

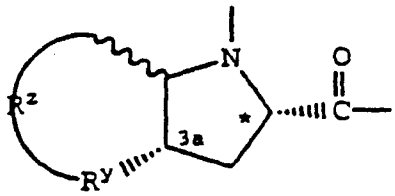
Ryhmiin  ja  , kun R'

on vety, viitataan tässä ajoittain nimillä 1- ja vastaavasti 3-tetrahydro-isokinoliinikarbonyyli ja ne lyhennetään 1-Tiq ja vastaavasti 3-Tiq.

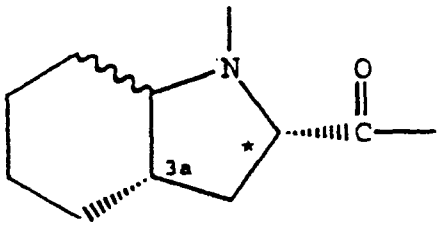
Ryhmiin  ja  , kun R'

on vety, viitataan tässä ajoittain nimillä 1- ja vastaavasti 3-perhydro-isokinoliinikarbonyyli ja ne lyhennetään 1-Piq ja vastaavasti 3-Piq. Kuten aaltoviivoilla osoitetaan, on olemassa näiden substituenttien monia erilaisia rengasfuusioisomeerejä - tämä keksintö ottaa lukuun minkä tahansa yksittäisen isomeerin ja sen yhdistelmät.

Ryhmiin  ja  viitataan nimillä prolinyyli ja vastaavasti atsetidiini-2-karbonyyli, ja ne lyhennetään Pro ja vastaavasti Azt.

Ryhmä  edustaa tyydyttynyttä bisyklistä järjestelmää, joka on tyyppiä 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 tai 8,5. Stereokemia 3a:ssa on cis-karbonyylin suhteen; toinen sillanpääsidos voi olla joko cis tai trans paitsi, että 4,5 ja 5,5-järjestelmien täytyy olla cis-asemassa sillanpään suhteen. R^y:n ja R^z:n määritelmät edellyttävät, että vaihteleva rengas, joka sisältää kolme esitettyä hiiliatomia, on tyydyttynyt karbosyklinen 4 - 8 atomin

järjestelmä. Jokainen renkaan atomi voi olla hiili, tai yksi renkaan atomi voi olla heteroatomi, joka voi olla -O-, -S- tai -NH-. Tämä määritelmä käsittää edullisen osan, joka on peräisin oktahydroindoli-2-karboksyylihaposta, lyhenne "Ohi", jota esittää kaava

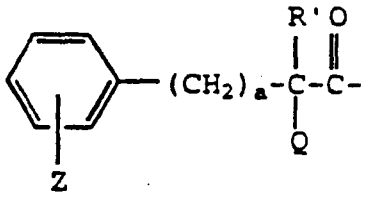


Tämän osan monet erilaiset cis- tai trans-muodot otetaan lukuun tässä keksinnössä.

Asteriskit radikaalissa Y osoittavat kiraalisen keskuksen, joka on (L). Asteriski radikaalissa X osoittaa kiraalisen keskuksen, joka on (D) tai (DL), # radikaalissa X osoittaa kiraalisen keskuksen, joka on (L).

Lisäksi diastereoisomeerejä voi olla olemassa riippuen alkyylisubstituenttien haarautumisesta. Tämän keksinnön mukaisiin yhdisteisiin kuuluvat kahden tai useamman diastereoisomeerin seokset, samoin kuin kukin yksittäinen isomeeri.

Tämän keksinnön mukaisiin edullisiin yhdisteisiin kuuluvat ne kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on

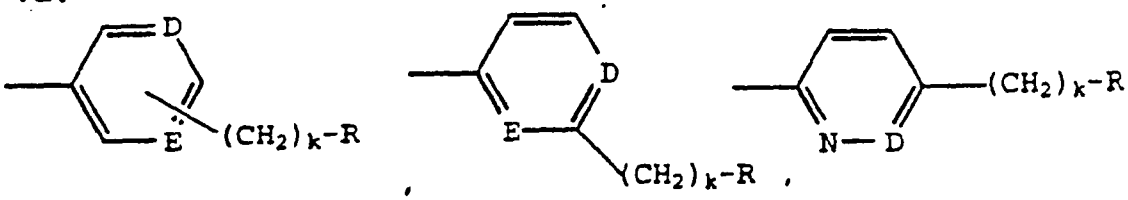


homoprolinyyli, 1- tai 3-Tiq, tai 1- tai 3-Piq, ja Y on prolinyyli ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ja solvaatit. Erityisesti edullisia ovat kaikki yhdisteet, joissa Q on NHA ja A on vety tai sulfonamidi (esim. A = R"SO_2-), R' on vety, Z on vety ja B on vety. Edullisia

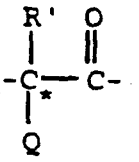
ovat myös ne yhdisteet, joissa R on guanidino- tai erityisesti amidinoryhmä.

Yksi erityisen edullinen substituenttien yhdistelmä on se, jossa G on R-substituoitu fenyyli (se on: D=E=CH, k = 0), erityisen edullinen on se missä G on 4-amidinofenyyliryhmä.

Edullinen näiden yhdisteiden ryhmä, joissa yksi - kaikki muuten substituoimattomista hiiliatomeista aromaattisissa tai heteroaromaattisissa renkaissa, joilla on kaava:

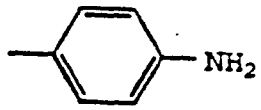


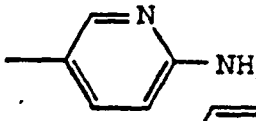
sisältää fluorisubstituentin, on sellainen, jossa mikään fluorisubstituentti ei ole α- tai γ-asemassa D:n tai E:n suhteen, kun D tai E on N.

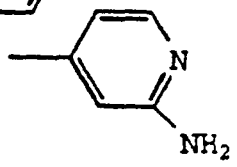
Toinen tämän keksinnön mukaisista edullisista yhdisteistä käsittää ne edellä määritellyt kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on  , jossa T on syklo-heksyyli, a on 1, R' on vety ja Q on -NH-A. Yksi erityinen alaryhmä on se, jossa A on vety. Toinen erityinen alaryhmä on se, jossa A on $R"SO_2$, erityisesti, kun R" on etyyli. Kolmas erityinen alaryhmä on se, jossa A on $-(CH_2)_g-COOH$, edullisesti g on 1.

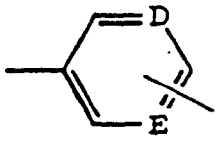
Erityisiin Y:n arvoihin kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa X, r ja G ovat edellä olevan määritelmän mukaisia, kuuluvat (L)-prolinyyli (Pro), (S)-cis-oktahydro-1H-indoli-2-karbonyyli (Ohi) ja N-(2-fenyylietyyli)-glysyyli [$N-(PhCH_2CH_2)Gly$].

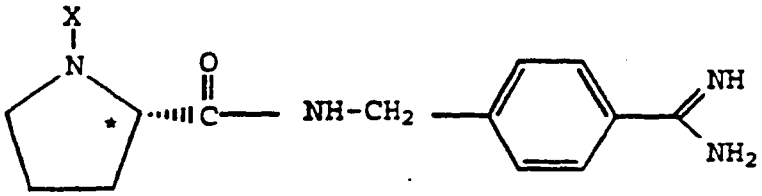
Kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa R on $-NH_2$, on edullista, että X:n ja Y:n arvot valitaan edellä määriteltyjen joukosta ja r:n ja G:n arvot valitaan seuraavista:

a) r on 1 ja G on  , jossa anilinorengas voi sisältää yhden tai kaksi fluorisubstituenttia,

b) r on 1 ja G on  , ja

c) r on 1 tai 2 ja G on  .

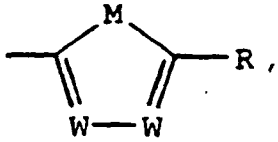
Yksi erityisen edullinen kaavan I mukaisten yhdisteiden ryhmä on se, jossa Y on (L)-prolinyyli, r on 1 ja G:llä on arvo  , jossa kukin D ja E on CH, k on 0 ja R on amidino, ja joka voidaan esittää kaavalla Ia



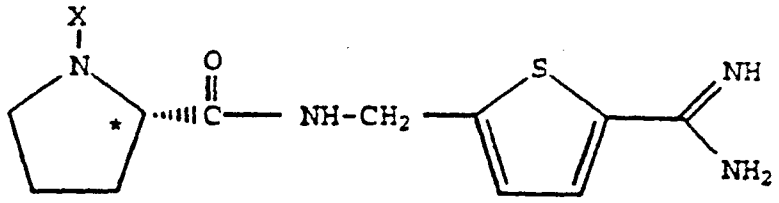
Ia

jossa bentsamidiinirengas on substituoimaton tai se voi sisältää yhden tai kaksi fluorisubstituenttia, edullisesti meta-asemassa amidinoradikaalin suhteen, ja X:llä on mikä tahansa edellä määritelty arvo.

Erityisempi arvo kaavan Ia mukaiselle yhdisteelle on se, jossa bentsamidiinirengas on substituoimaton.

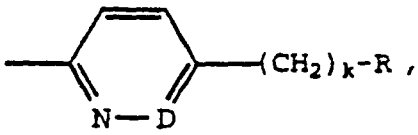
Toinen erityisen edullinen kaavan I mukaisten yhdisteiden ryhmä on sellainen, jossa Y on (L)-prolinyyli, r on 1 ja G:llä on arvo  , jossa M on S, kum-

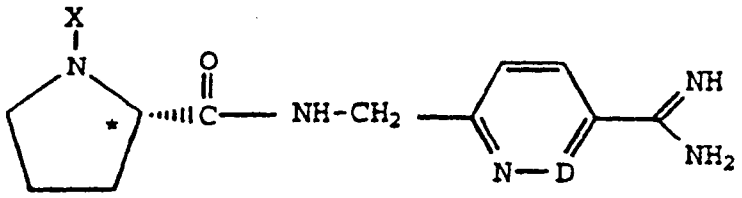
pikin W on CH ja R on amidino, ja joka voidaan esittää kaavalla Ib:



Ib

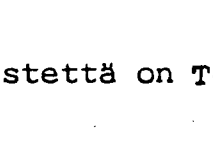
jossa X:llä on mikä tahansa edellä määritelty arvo.

Toinen edullinen kaavan I mukaisten yhdisteiden ryhmä on sellainen, jossa Y on (L)-prolinyyli, r on 1 ja G:llä on arvo  , jossa D on N tai CH, k on 0 ja R on amidino, ja joka voidaan esittää kaavalla Ic



Ic

jossa X:llä on mikä tahansa edellä määritellyistä arvoista ja D on N tai CH.

Edullinen arvo X:lle silmällä pitäen kaavan Ia, Ib tai Ic mukaista yhdistettä on  , jossa R' on vety, a on 1, T on sykloheksyyli tai fenyyli ja Q on -NH-A. Erityisemmin A on vety, etyylisulfonyyli tai karboksimetyyli. Yksi erityisen edullinen arvo X:lle on N-karboksimetyyli-D-sykloheksyylialanyyli. Toinen edullinen arvo X:lle on N-karboksimetyyli-D-fenyylialanyyli.

Tämän keksinnön kaavan I mukaisia spesifisiä yhdisteitä kuvataan esimerkeissä. Edullinen laji, jota voidaan käyttää farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana tai solvaattina, voidaan valita niistä, jotka esitetään esimer-

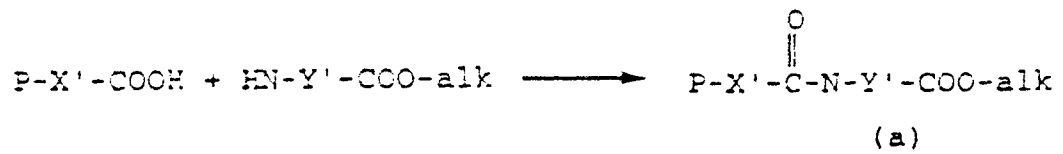
keissä 15, 18, 23, 44, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 56, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 80, 86, 87, 88 ja 92. Edullisempi laji voidaan valita niiden yhdisteiden joukosta, jotka esitetään esimerkeissä 45, 46, 48, 51, 65, 70, 71 ja 72. Yksi edullisimmista lajeista sen odottamattoman ylivertaisten ominaisuuksien perusteella on esimerkki 48. Toinen erinomaisen edullinen laji on esimerkki 65.

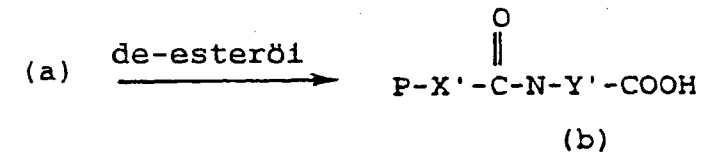
Kuten edellä on mainittu, keksintö käsittää edellä esitetyn kaavan I mukaisten yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Tämän keksinnön mukainen erityinen yhdiste voi sisältää yhden tai useamman riittävän emäksisen funktionaalisen ryhmän ja reagoida vastaavasti epäorgaanisten tai orgaanisten happojen minkä tahansa määrän kanssa, jolloin muodostuu farmaseuttisesti hyväksyttävä suola. Hapot, joita käytetään yleisesti happoadditiosuolojen muodostamiseen, ovat epäorgaanisia happoja, kuten suolahappo, bromivetyhappo, jodivetyhappo, rikkihappo, fosforihappo ja vastaavat, ja orgaanisia happoja, kuten p-tolueenisulfonihappo, metaanisulfonihappo, oksaalihappo, p-bromifenyylisulfonihappo, hiilihappo, meripihkahappo, sitruunahappo, bentsoehappo, etikkahappo ja vastaavat. Esimerkkejä sellaisista farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista ovat täten sulfaatti, pyrosulfaatti, bisulfaatti, sulfiitti, bisulfiitti, fosfaatti, monovetyfosfaatti, divetyfosfaatti, metafosfaatti, pyrofosfaatti, kloridi, bromidi, jodidi, asetaatti, propionaatti, dekanoaatti, kaprylaatti, akrylaatti, formaatti, isobutyraatti, kaproaatti, heptanoaatti, propiolaatti, oksalaatti, malonaatti, sukkinaatti, suberaatti, sebasaatti, fumaraatti, maleaatti, butyyni-1,4-dioaatti, heksyyni-1,6-dioaatti, bentsoaatti, klooribentsoaatti, metyylibentsoaatti, dinitrobentsoaatti, hydroksibentsoaatti, metoksibentsoaatti, ftalaatti, sulfonaatti, ksyleenisulfonaatti, fenyyliasetaatti, fenyylipropionaatti, fenyylibutyraatti, sitraatti, laktaatti, gamma-hydroksibutyraatti, glykollaatti, tart-

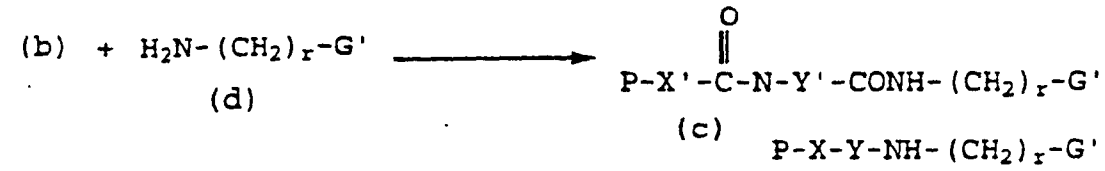
raatti, metaanisulfonaatti, propaanisulfonaatti, naftaleeni-1-sulfonaatti, naftaleeni-2-sulfonaatti, mandelaatti ja vastaavat. Edullisia farmaseuttisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja ovat ne, jotka on muodostettu sellaisten mineraalihappojen kanssa kuten suolahappo, bromivetyhappo ja rikkihappo.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden tiedetään muodostavan hydraatteja ja solvaatteja soveliaiden liuottimien kanssa. Edullisiin liuottimiin solvaattimuotojen valmistusta varten kuuluvat vesi, alkoholit, tetrahydrofuraani, DMF ja DMSO. Edullisia alkoholeja ovat metanoli ja etanoli. Muita soveliaita liuottimia voidaan valita liuotinmolekyylin koon perusteella. Pienet liuotinmolekyylit ovat edullisia edistettäessä vastaavan solvaatin muodostumista. Solvaatti tai hydraatti muodostuu tyypillisesti jälleenkiteyttämisen tai suolan muodostumisen aikana. Yksi hyödyllinen kirjallisuusviite solvaattien suhteen on Sykes, Peter, A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry, 6. laitos (1986, John Wiley & Sons, New York). Tässä käytettynä termi "solvaatti" käsittää hydraattimuodot, kuten monohydraatit ja dihydraatit.

Kaavan I mukaiset yhdisteet muodostetaan tunnetuilla peptidien liittämismenetelmillä. Yhden sellaisen menetelmän mukaisesti happo P-X'-COOH, jossa -X'-(C(O)- on -X-, sillä on sama merkitys kuin kaavaa I silmällä pitäen on määritelty, ja P on tarvittaessa aminosuojaryhmä, liitetään karboksisuojattuun Y-yhdisteeseen, jolloin muodostetaan dipeptidi (a). Y-rakenneosan karboksia suojaava esteriryhmä poistetaan sitten (suojaryhmä poistetaan tai de-esteröidään) ja dipeptidin (b) vapaa happomuoto liitetään suojattuun reagenssiin (d). Edellä mainittua reaktiosarjaa havainnollistaa seuraava kaavio 1:







jossa G' on sama kuin G paitsi, että R on -CN, -NHP,



-C-NHP tai -NH-C-NHP, kukin P edustaa tarvittaessa aminosuojaryhmää, P' on H tai P, alk on alempi alkyyli tai jokin samanlainen karboksyylihapon suojaryhmä, ja -Y'- on sama kuin Y, niin että funktionaaliset amino- ja karboksiryhmät ovat nähtävillä, eli -Y- on sama kuin -N-Y'-(C(O)-.

Jos se on läsnä, syaaniryhmä G':ssä muutetaan R:n arvoksi, ja (c):ssä olevat suojaryhmät poistetaan sinänsä tunnetulla tavalla, kuten hydraus metallikatalysaattorin päällä, jolloin saadaan kaavan I mukaiset yhdisteet.

P-X'-COOH-yhdisteen liittäminen yhteen HN-Y'-COO-alk:n kanssa suoritetaan suojaamalla ensin mahdollisen aminohapon aminoryhmä. Käytetään tavanomaisia aminon suojaryhmiä, joita käytetään yleisesti aminoryhmän tilapäistä suojausta tai tukkimista varten.

Aminosuojaryhmä viittaa sellaisiin aminoryhmän substituentteihin, joita käytetään yleisesti tukkimaan tai suojaamaan funktionaalinen aminoryhmä, samalla kun yhdisteen muut funktionaaliset ryhmät saatetaan reagoimaan. Esimerkkeihin sellaisista aminon suojaryhmistä kuuluvat formyyliryhmä, trityyliryhmä, ftaali-imidoryhmä, trikloo-

riasetyyliryhmä, klooriasetyyli-, bromiasetyyli- ja jodiasetyyliryhmät, uretaanityyppiset suojaryhmät kuten bentsyylioksikarbonyyli, t-butoksikarbonyyli, 4-fenyylibentsyylioksikarbonyyli, 2-metyylibentsyylioksikarbonyyli, 4-metoksibentsyylioksikarbonyyli, 4-fluoribentsyylioksikarbonyyli, 4-klooribentsyylioksikarbonyyli, 3-klooribentsyylioksikarbonyyli, 2-klooribentsyylioksikarbonyyli, 2,4-diklooribentsyylioksikarbonyyli, 4-bromibentsyylioksikarbonyyli, 3-bromibentsyylioksikarbonyyli, 4-nitrobentsyylioksikarbonyyli, 4-syaanibentsyylioksikarbonyyli, 2-(4-ksenyyli)isopropoksikarbonyyli, 1,1-difenyyli-et-1-yylioksikarbonyyli, 1,1-difenyyliprop-1-yylioksikarbonyyli, 2-fenyyliprop-2-yylioksikarbonyyli, 2-(p-toluyyli)prop-2-yylioksikarbonyyli, syklopentanyylioksikarbonyyli, 1-metyylisyklopentanyylioksikarbonyyli, sykloheksanyylioksikarbonyyli, 1-metyylisykloheksanyylioksikarbonyyli, 2-metyylisykloheksanyylioksikarbonyyli, 2-(4-toluyylisulfonyyli)etoksikarbonyyli, 2-(metyylisulfonyyli)etoksikarbonyyli, 2-(trifenyylifosfino)etoksikarbonyyli, 9-fluorienyylimetoksikarbonyyli ("FMOC"), 2-(trimetyylisilyyli)-etoksikarbonyyli, allyylioksikarbonyyli, 1-(trimetyylisilyylimetyyli)prop-1-enyylioksikarbonyyli, 5-bentsisoksalyylimetoksikarbonyyli, 4-asetoksibentsyylioksikarbonyyli, 2,2,2-trikloorietoksikarbonyyli, 2-etynyyli-2-propoksikarbonyyli, syklopropyylimetoksikarbonyyli, 4-(desyylioksi)bentsyylioksikarbonyyli, isobornyylioksikarbonyyli, 1-piperidyylioksikarbonyyli ja vastaavat; bentsoyylimetyylisulfonyyliryhmä, 2-(nitro)-fenyylisulfenyyliryhmä, difenyylifosfiinioksidiryhmä ja vastaavat aminosuojaryhmät. Käytetyn aminosuojaryhmän laji ei ole kriittisen tärkeä, niin kauan kuin derivatisoitu aminoryhmä on stabiili olosuhteiden suhteen, joita käytetään molekyylin muissa asemissa myöhemmin tapahtuvissa reaktioissa, ja se voidaan poistaa soveliaassa kohdassa hajottamatta jäljellä olevaa osaa molekyylistä. Edullisia aminon suojaryhmiä ovat bentsyy-

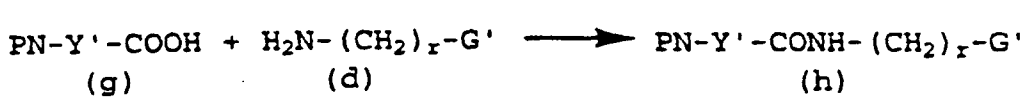
lioksikarbonyyli, allyylioksikarbonyyli, t-butoksikarbonyyli ja trityyliryhmät. Samanlaiset aminosuojaryhmät, joita käytetään kefalosporiini-, penisilliini- ja peptidialalla, ovat myös edellä mainittujen termien sisällä. Lisäesimerkkejä ryhmistä, joihin viitataan edellä mainituilla termeillä, kuvaavat J. W. Barton teoksessa "Protective Groups in Organic Chemistry", toim. J. G. W. McOmie, Plenum Press, New York, N.Y., 1973, kappale 2, ja T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1981, kappale 7. Tähän liittyvä termi "suojattu amino" määrittää aminoryhmän, joka on substituoitu edellä mainitulla aminosuojaryhmällä.

Liittämisreaktion suorittamisessa käytetään esterisuojaryhmää HN-Y'-COOH:lle, joka voidaan poistaa olosuhteissa, joissa aminosuojaryhmä säilyy ehjänä. Asyloivan hapon P-X'-COOH aminosuojaryhmä säilyy täten paikallaan aminoryhmän suojausta varten seuraavan amiiniin (d) liittämisen aikana, jolloin muodostuu (c).

Karboksia suojaava esteriryhmä tässä selitysosassa käytettynä viittaa yhteen karboksyylihapporyhmän esterijohdannaisista, joita käytetään yleisesti tukkimaan tai suojaamaan karboksyylihapporyhmä, samalla kun saatetaan reagoimaan muita yhdisteen funktionaalisia ryhmiä. Esimerkkejä sellaisista karboksyylihapon suojaryhmistä ovat C_{1-4}-alkyyli, bentsyyli, 4-nitrobentsyyli, 4-metoksibentsyyli, 3,4-dimetoksibentsyyli, 2,4-dimetoksibentsyyli, 2,4,6-trimetoksibentsyyli, 2,4,6-trimetyylibentsyyli, pentametyylibentsyyli, 3,4-metyleenidioksibentsyyli, bentshydryyli, 4,4'-dimetoksibentshydryyli, 2,2',4,4'-tetrametoksibentshydryyli, t-butyyli, t-amyyli, trityyli, 4-metoksitrityyli, 4,4'-dimetoksitrityyli, 4,4',4"-trimetoksitrityyli, 2-fenyyliprop-2-yyli, trimetyylisilyyli, t-butyylidimetyylisilyyli, fenasyyli, 2,2,2-trikloorietyyli, β-(trimetyylisilyyli)etyyli, β-(di(n-butyyli)metyylisilyyli)etyyli, p-tolueenisulfonyylietyyli, 4-nitrobentsyy-

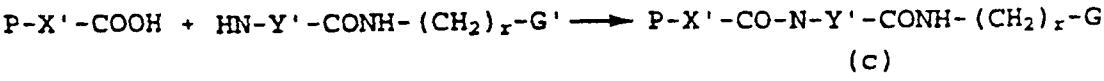
lisulfonyylietyyli, allyyli, sinnamyyli, 1-(trimetyylisilyylimetyyli)-prop-1-en-3-yyli ja vastaavat osat. Käytetyn karboksin suojaryhmän laji ei ole kriittisen tärkeä niin kauan kuin derivatisoitu karboksyylihappo on stabiili seuraavan reaktion (seuraavien reaktioiden) olosuhteissa molekyylin muissa asemissa ja se voidaan poistaa soveliaassa kohdassa rikkomatta molekyylin jäljellä olevaa osaa. Erityisesti on tärkeää, ettei karboksisuojattua molekyyliä alisteta vahvoille nukleofiilisille emäksille pelkistävissä olosuhteissa, joissa käytetään voimakkaasti aktivoituja metallikatalysaattoreita kuten Raneyn nikkeliä. (Sellaiset ankarat poisto-olosuhteet pitää myös välttää, kun poistetaan jäljempänä pohdittavia aminon suojaryhmiä.) Lisäesimerkkejä näistä ryhmistä löytyy E. Haslamilta, "Protective Groups in Organic Chemistry", toim. J. G. W. McOmie, Plenum Press, New York, N.Y., 1973, kappale 5, ja T. W. Greeneltä, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1981, kappale 5.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa myös syntetisoimalla ensin HN-Y'-CONH$(CH_2)_r$-G'-amidiesiastemuoto ja saattamalla se sitten reagoimaan suojatun X-osan kanssa. Yhden sellaisen menetelmän mukaisesti (d) valmistetaan ja liitetään PN-Y'-COOH:n (g) kanssa kuten alla esitetään, jolloin saadaan amidi (h).



jossa P on aminosuojaryhmä kuten bentsyylioksikarbonyyli (Cbz) -ryhmä, t-butoksikarbonyyli (Boc), p-tolueenisulfonyyli ja vastaavat. Käytetty aminosuojaryhmä on edullisesti poistettavissa hydraamalla tai käsittelemällä laimealla hapolla (esim. trifluorietikkahapolla) tai vahvalla hapolla (esim. HCl). Esimerkkejä muista soveliaista aminon suojaryhmistä tarjotaan teoksessa "Protective Groups in Organic Synthesis", toinen laitos, T.W. Greene ja Peter G.

M. Wuts, kappale 7, sivu 309-405 (1991), julkaisijat John Wiley & Sons, Inc. Boc tai muu sovelias suojaryhmä poistetaan Y-tähteen aminotypestä, joka sitten asyloidaan halutun aminohapon asyyliryhmällä, jolloin saadaan jäljempänä esitettävä dipeptidi.

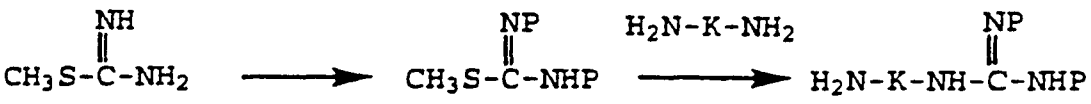


Syaaniryhmä, jos se on läsnä G':ssä, muutetaan ja (c):ssä olevat suojaryhmät poistetaan aikaisemmin kuvatulla tavalla.

P-X'-COOH-yhdisteen liittäminen suoritetaan suojaamalla ensin mahdollinen aminohapon aminoryhmä. Käytetään tavanomaisia aminon suojaryhmiä, joita käytetään yleensä aminoryhmän tilapäiseen suojaamiseen tai tukkimiseen. Esimerkkejä sellaisista suojaryhmistä kuvataan edellä.

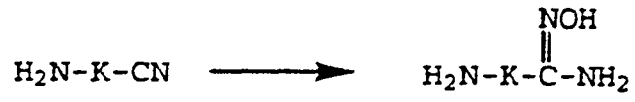
Edellä kuvatut liittämisreaktiot suoritetaan kylmässä, edullisesti lämpötilassa, joka on välillä noin -20 °C ja noin 15 °C. Liittämisreaktiot suoritetaan inertissä orgaanisessa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidi, dimetyyliasetamidi, tetrahydrofuraani, metyleenikloridi, kloroformi ja vastaavat yleiset liuottimet, tai sellaisten liuottimien seoksessa. Yleensä käytetään vedettömiä olosuhteita silloin, kun liittämisreaktiossa käytetään asyloivan hapon aktiivista esteriä.

Välituotteet (d) ja (g) valmistetaan orgaanisen kemian standarditekniikoilla, jotka esitetään yhteenvetona seuraavissa kaavioissa:









jossa -K-R on $-(CH_2)_r-G$.

Edellä esitettyjen sarjojen mukaisesti voidaan valmistaa suojattuja guanidiineja suojaamalla kahdesti S-metyyli-isotiourea. Edullinen suojaryhmä on t-butyylioksikarbonyyli (Boc) -ryhmä, joka voidaan tuoda antamalla S-metyyli-isotiourean reagoida di-t-butyylidikarbonaatin läsnä ollessa. Usein käytetään S-metyyli-isotiourean happosuolamuotoa, joka voidaan vapauttaa vapaan hapon muotoon *in situ* liuottamalla suola veteen ja käsittelemällä emäksen vesiliuoksella. Di-t-butyylidikarbonaatti tuodaan sitten reaktioon veteen sekoittuvassa liuottimessa, kuten t-butanolissa, jolloin saadaan kahdesti suojattu S-metyyli-isotiourea. Haluttu kahdesti suojattu guanidiini muodostetaan sitten käsittelemällä soveliaalla diamiinilla $H_2N-K-NH_2$ ei-reaktiivisessa liuottimessa tai liuottimien yhdistelmässä. Tyypillisesti käytetään tehokkaasti liuottimia, jotka sekoittuvat veteen, kuten dimetyyliformamidia, tai vettä, tai näiden seoksia. Sellainen reaktio on yleensä mennyt loppuun noin 3 - 72 tunnissa. Tuloksena oleva suojattu guanidiini voidaan sitten liittää edellä kuvatulla tavalla, jolloin saadaan kaavan I mukaisten yhdisteiden suojattuja välituotteita, joissa R on $-NH-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$.

Sellaisten kaavan I mukaisten yhdisteiden tapauksessa, joissa R on $-NH_2$, välituote on kerran suojattu diamiini. Useimmissa tapauksissa tämä välituote voidaan valmistaa yksinkertaisesti antamalla suojaamattoman diamiinin reagoida yhden molaarisen ekvivalentin kanssa suojaavaa reagenssia. Toiset menetelmät lopullisen amiinin (R on

$-NH_2$) tuomiseen ovat ilmeisiä orgaanisille kemisteille. Amiini voidaan saada jostain toisesta muusta funktionaalisesta esiasteryhmästä, esim. nitroryhmästä tai syaaniryhmästä. Nitroryhmän tapauksessa muuntaminen aminoryhmäksi saadaan yleensä aikaan niillä substraateilla, joissa nitroryhmä on kiinnittynyt suoraan aromaattiseen renkaaseen, erityisesti fenyyliryhmään. Sellaisissa tapauksissa nitrofenyyliryhmä pelkistetään vastaavaksi funktionaaliseksi aniliiniryhmäksi sinänsä tunnetulla tavalla. Yksi erityisen tehokas menetelmä on nitroyhdisteen käsittely natriumhydrosulfiitilla ei-reaktiivisessa liuottimessa, kuten etanoli, vesi tai näiden seos. Kun nitroyhdiste kuumennetaan palautusjäähdytyksessä vesi/etanoli-seoksessa natriumhydrosulfiitin läsnä ollessa, pelkistys menee yleensä loppuun useiden tuntien aikana. Syaaniryhmä voidaan samoin pelkistää, kun se on soveliasta, sellaisen pelkistimen läsnä ollessa kuten litiumaluminiumhydridi, boraanin läsnä ollessa sellaisessa liuottimessa kuten tetrahydrofuraani, tai metallilla edistetyllä natriumboorihydridin pelkistyksellä.

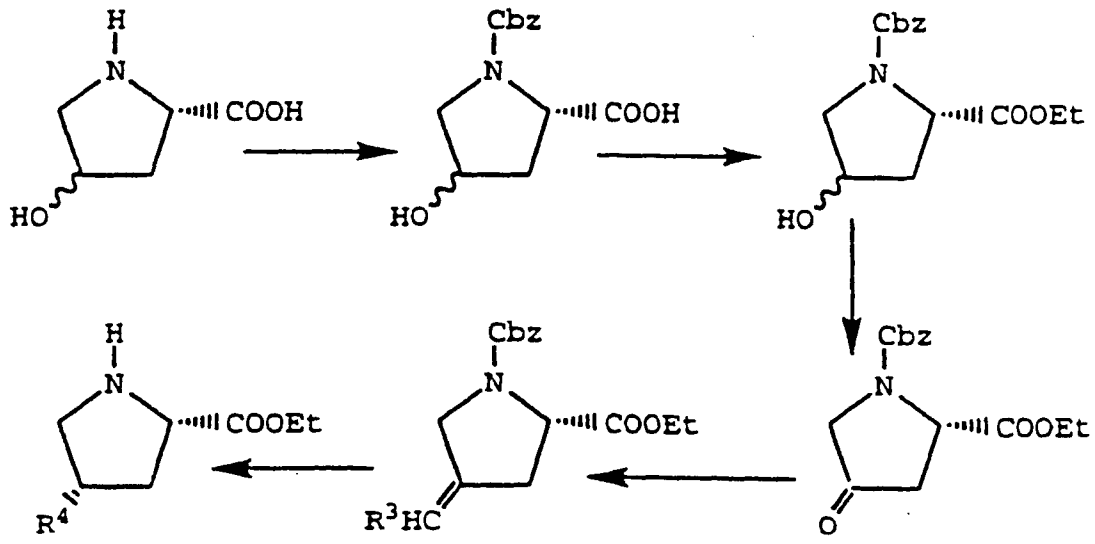
Tämän keksinnön mukaiset amidiinit (R on $-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$) voidaan myös valmistaa nitriiliesiastemuodosta. Tämä muuntaminen voidaan saada aikaan sinänsä tunnetulla tavalla. Tämän muuntamisen tekemiseksi edullinen ja tehokas keino on vetysulfidin käyttö pyridiinin ja trietyyliamiinin seoksessa, mitä seuraa käsittely asetonilla ja metyylijodidilla, ja lopuksi ammoniumasetaatilla metanolissa. Tämän muuntamisen aikaansaamiseksi voidaan myös vaihtoehtoisesti käyttää nitriilin kuumentamista hydroksyyliamiinihydrokloridin ja sellaisen emäksisen kuten N,N-di-isopropyylietyyliamiinin kanssa hydroksyyliryhmän sisältävässä liuottimessa, kuten etanolissa, mitä seuraa katalyyttinen hydraus (esim. hydrogenolyysi palladoidun hiilen yläpuolella).

Tämä menettely tarjoaa hydroksiamidiinin (R on $-\overset{\overset{NOH}{\|}}{C}-NH_2$) välituotteena, joka voidaan haluttaessa eristää.

Toiset yhdisteet, joita käytetään lähtömateriaaleina tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden synteesissä, ovat hyvin tunnettuja, ja siinä määrin kuin niitä ei ole kaupallisesti saatavilla, ne voidaan helposti syntetisoida sinänsä tunnetulla tavalla.

4-substituoidut proliinit (R^P on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$), joita käytetään tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistuksessa, ovat kaikki cis-configuraatiossa 4-substituentti suhteessa karbonyyliosaan. Välituotteet tämän funktionaalisen ryhmän tuomiseksi kaavan I mukaisiin yhdisteisiin tehdään standarditekniikoin.

4-substituoidut proliinijohdannaiset, joissa R^P-ryhmä sisältää metyleeniryhmän proliinirenkaaseen kiinnittyvässä kohdassa, voidaan valmistaa esimerkiksi seuraavalla tavalla:



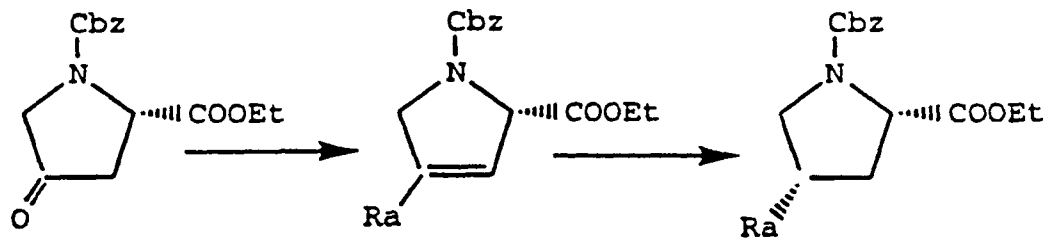
jossa $R^4 = R^3CH_2 = R^P$-ryhmä, joka sisältää metyleeniryhmän proliinirenkaaseen kiinnittyvässä kohdassa.

4-hydroksiproliini (sekä cis- että trans-muodot ovat kaupallisesti saatavilla) suojataan ensin aminosuo-

jaryhmällä - Cbz-ryhmä on erityisen hyödyllinen tässä reaktiosarjassa. Tuloksena oleva välituote esteröidään sitten (metyyli- tai erityisesti etyyliesterit ovat erityisen mukavia) ja hapetetaan sitten, jolloin saadaan vastaava ketoni. Tämä hapetus saadaan aikaan millä tahansa hapetusolosuhteilla, kuten Jonesin hapetus tai pyridiniumkloorikromaatti; erityisen hyödyllinen tätä muuntamista varten on pyridiniumkloorikromaatin käyttö kuivassa, eireaktiivisessa liuottimessa kuten dikloorimetaani. Kun sen annetaan reagoida 8 - 16 tunnissa, tämä reaktio on yleensä mennyt loppuun, kun se suoritetaan huoneenlämpötilassa. Tämän käyttökelpoisen ketonivälituotteen annetaan sitten reagoida soveliaan Wittigin reagenssin kanssa, jolloin saadaan haluttu olefiini. Sovelias R^p-substituoitu trifenyylifosfoniumhalogenidi lisätään tyypillisesti kuivaan inerttiin liuottimeen (esim. tetrahydrofuraaniin), joka sisältää vahvan emäksen (esim. kalium-t-butoksidin). Ketoni tuodaan ja huoneenlämpötilassa kuluneen noin kolmen tunnin kuluttua haluttu olefiinivälituote voidaan eristää. Jotta saataisiin hyviä olefiinin saantoja, on edullista, että käytetään 0,4 - 0,6 molaarista ylimäärää Wittigin reagenssia ketonin suhteen. Olefiini pelkistetään sitten halutuksi R^p-substituoiduksi proliiniksi standardinomaisilla pelkistystekniikoilla. Katalyyttinen hydraus on helpoin menetelmä tämän muuntamisen suorittamiseksi laboratoriossa. Olefiinin hydraus katalysaattorin läsnä ollessa (esim. 5-prosenttinen palladoitu hiili) inertissä liuottimessa kuten etanolissa on tehokas ilmanpaineessa. Niiden välituotteiden tapauksessa, joissa aminosuojaryhmä on Cbz, hydraus poistaa myös suojaryhmän, mikä tarjoaa yhdisteen, jota voidaan käyttää P-X'-COOH:hon liittämistä varten. Kuten ammattimiehet ymmärtävät, tämä menettely ei ole tehokas sellaisten yhdisteiden valmistamiseksi, joissa R^p-ryhmä on kiinnittynyt proliinirenkaaseen heteroatomin välityksellä tai ovat aromaattinen rengas. Niinpä edellä

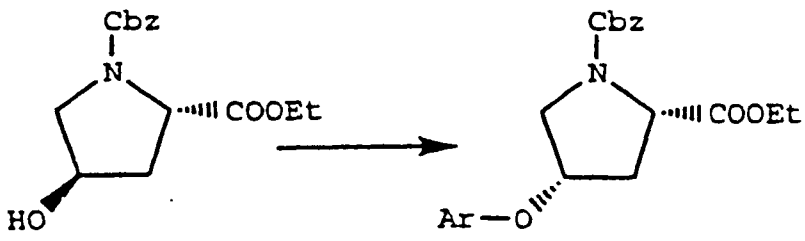
mainitussa kaaviossa R^3 on alkyyli, aralkyyli (esim. bentsyyli), (sykloalkyyli)alkyyli jne.

Tähän liittyvä menetelmä näiden välituotteiden valmistamiseksi esitetään yhteenvetona seuraavassa kaavassa:



Edellä esitetty reaktiokaava on vaihtoehto edellä kuvatulle Wittigin reaktiolle ja se on hyödyllinen valmistettaessa yhdisteitä, joille Wittigin reagensseja ei voida valmistaa. Niinpä sellaisten välituotteiden valmistamiseksi, joissa Ra on alkyyli, fenyyli ja vastaava, pyrrolidinoni-välituotteen annetaan reagoida soveliaan Grignardin reagenssin kanssa. Tyypillisesti käytetään pientä molaarista ylimäärää Grignardin reagenssia, tavallisesti matalissa lämpötiloissa (esim. -80 - 60 °C), inertissä liuottimessa, jolla on alhainen jäätymispiste, kuten tetrahydrofuraanissa. Reagenssien lisäyksen jälkeen reaktioseoksen annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen reaktio on yleensä täydellinen useiden tuntien kuluttua. Tuloksena oleva välituote dehydratoidaan esimerkiksi käsittelemällä trifluorietikkahapolla. 3,4-dehydrovälituote pelkistetään sitten halutuksi cis-välituotteeksi käyttämällä samoja pelkistäviä olosuhteita kuin edellä on kuvattu olefiinivälituotteen pelkistystä silmällä pitäen.

Välituotteita, joissa hetero-"L"-ryhmä on happi ja kiinnittyy suoraan proliinirenkaaseen (se on: p = 0), voidaan valmistaa käyttämällä Mitsunobun reaktiota (Mitsunobu, Synthesis, 1 (1981)):

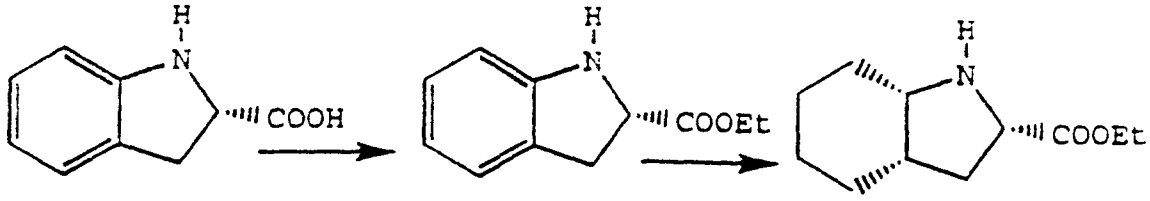


Tässä reaktiossa trans-hydroksipyrrolidinikarboksyylihapon esteri saatetaan reagoimaan trifenyylifosfiinin kanssa sellaisessa liuottimessa kuten tetrahydrofuraani Ar-O-H:n läsnä ollessa. Seos jäähdytetään noin 0 °C:n lämpötilaan ja atsodikarboksyylihapon dietyyliesteri lisätään. Huoneenlämpötilaan lämmittämisen jälkeen reaktio alkukäsitellään niin, että saadaan haluttu cis-välituote. Vaikka edellä mainittu kaava kuvaa reaktion yhdisteille, joissa L = -O-, p = q = 0 ja T = Ar, tämä sarja on hyödyllinen valmistettaessa muita yhdisteitä, joissa p = 0 ja L on -O-.

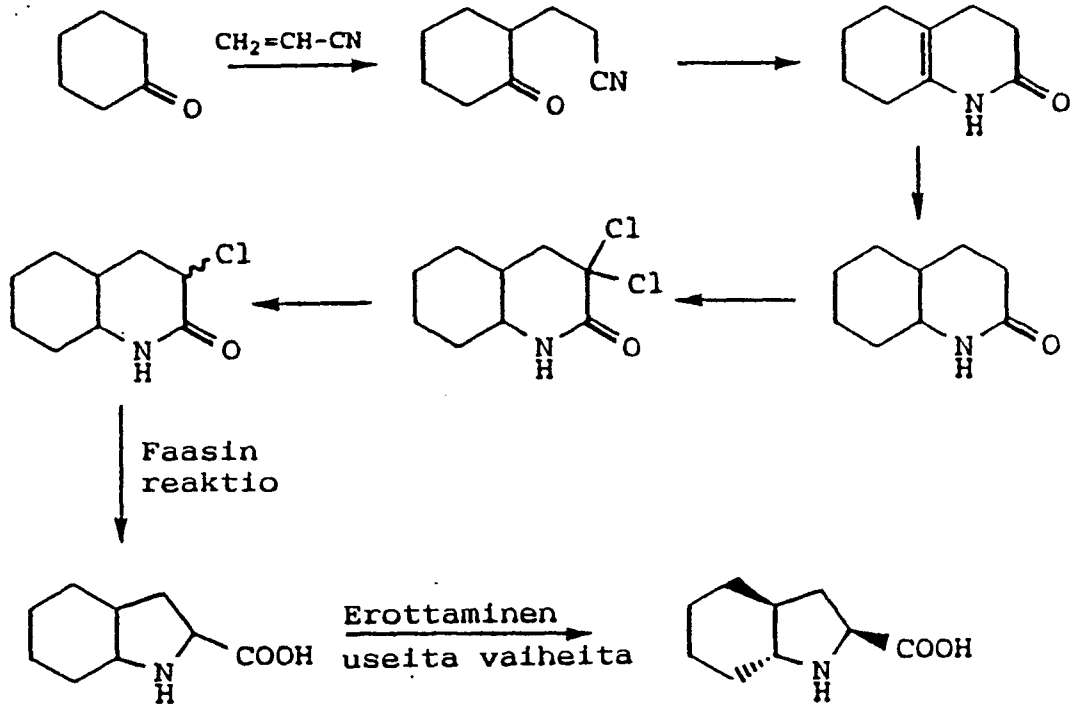
Välituotteita, joissa L on rikki ja kiinnittyy suoraan renkaaseen, voidaan valmistaa muuttamalla ensin hydroksiryhmä tosylaatiksi tai toiseksi vastaavaksi lähteväksi ryhmäksi ja syrjäyttämällä sitten tiolaattianionilla (katso esim. Krapcho ym., J. Med. Chem., 31, 1148-1160 (1988), Smith ym., J. Med. Chem., 31, 875-855 (1988)).

Välituotteita, joissa L on typpi ja kiinnittyy suoraan renkaaseen, voidaan valmistaa muuttamalla ensin hydroksiryhmä tosylaatiksi tai toiseksi vastaavaksi lähteväksi ryhmäksi ja syrjäyttämällä sitten atsidilla. Atsidi voidaan pelkistää käyttämällä tunnettuja menetelmiä ja sitten alkyloida, jolloin saadaan haluttu funktionaalinen ryhmä (katso esim. Smith ym., J. Med. Chem., 31, 875-855 (1988)).

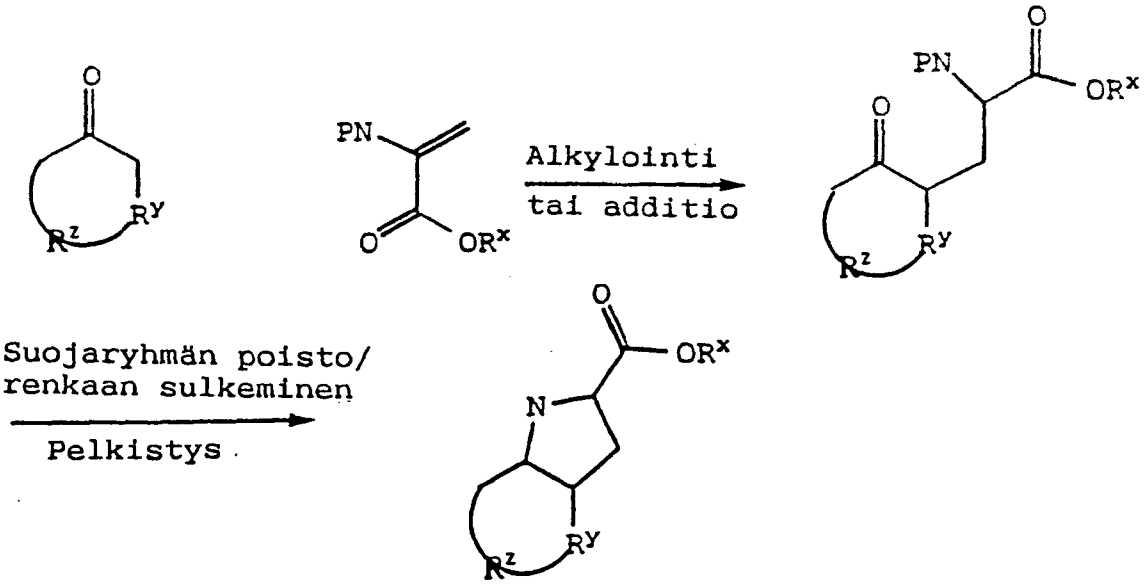
Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät funktionaalisen cis-Ohi-ryhmän, valmistetaan valmistamalla (S)-indoliini-karboksyylihapon etyyliesteri vastaavasta haposta (katso Vincent ym., Drug Design and Discovery, Vol. 9, s. 11 - 28 (1992)) ja pelkistämällä tämä välituote hydraamalla 5-prosenttisen palladoidun hiilen yllä etanolissa, jolloin saadaan oktahydroindoli-2-karboksyylihapon esteri, johon yleensä viitataan nimellä Ohi-esteri, kuten jäljempänä yhteenvetona esitetään.



Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät funktionaalisen trans-OH-ryhmän, valmistetaan Vincentin ym. menetelmällä, Drug Design and Discovery, Vol. 9, s. 11 - 28 (1992). Tämä esitetään jäljempänä esitetyssä reaktiokaaviossa:



Tämän keksinnön mukainen yhdiste, joka sisältää bisyklisen järjestelmän (heteroatomin kanssa tai ilman) voidaan valmistaa Teetzin ym. menetelmällä, Tetrahedron Letters, 25, 4479 (1984). Yleisesti



jossa P on suojaryhmä ja R^x on alkyyli.

Välituotteet funktionaalisen N-substituoidun glysiiniryhmän (Y) tuomiseen, jota käytetään tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamisessa, tehdään standarditekniikoin.

Esimerkiksi halogeenietikkahapon esteri, kuten bromietikkahapon t-butyyliesteri, voidaan muuttaa halutuksi substituoiduksi käsittelemällä soveliaalla primäärisellä amiinilla:

$$BrCH_2COO\text{-t-butyyli} + R^9NH_2 \longrightarrow HNR^9CH_2COO\text{-t-butyyli}$$

Bromietikkahapon t-butyyliesterin annetaan reagoida soveliaan amiinin kanssa joko sellaisenaan tai edullisesti ei-reaktiivisessa liuottimessa kuten alkoholissa. On edullista käyttää amiinin molaarista ylimäärää, jotta reaktio saadaan pakotettua loppuun. Reaktioseos sisältää myös edullisesti ei-reaktiivisen hapon sieppaajan, kuten ainakin molaarisen ekvivalentin trietyyliamiinia. Vaikka reaktantit yhdistetään yleensä jäähdytettynä (esim. 0 °C), reaktion annetaan tavallisesti lämmetä huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen reaktio on yleensä mennyt loppuun 24 tunnissa. Vaikka bromiasetaatti onkin edullinen, muita halogee-

niasetaatteja, kuten jodiasetaatteja ja klooriasetaatteja, voidaan käyttää tätä muuntamista varten. Muita esteriryhmiä voidaan käyttää samalla tavalla. t-butyyliesteri on edullinen, koska se voidaan myöhemmin poistaa helposti käsittelemällä anisolilla ja trifluorietikkahapolla.

Toinen menetelmä näiden välituotteiden valmistamiseksi esitetään yhteenvetona seuraavassa kaaviossa:

$$R^{o}\text{-CHO} + H_2NCH_2COOEt \longrightarrow R^{o}\text{-CH=NCH}_2COOEt \longrightarrow R^{o}\text{-CH}_2\text{-NHCH}_2COOEt$$

jossa $R^{o}\text{-CH}_2$- on R^{g}-ryhmä, jossa on substituoimaton metyleeniryhmä, joka on glysiiniryhmään kiinnittymiskohdan vieressä.

Edellä mainitussa reaktiokaavassa sovelias aldehydi sekoitetaan glysiiniesterin kanssa ei-reaktiivisessa liuottimessa, kuten metanoli tai etanoli. Jos käytetään glysiiniesterin suolamuotoa, emäksen, kuten kaliumhydroksidin, molaarinen ekvivalentti voidaan lisätä aminoesterin vapaan emäksen muodostumisen sallimiseksi. Aldehydin ja glysiiniesterin reaktio muodosti välituotteena olevan Schiffin emäksen, joka voidaan sitten pelkistää *in situ* käsittelemällä pelkistävän agenssin kanssa kuten natriumsyaaniboorihydridin kanssa. Schiffin emäksen muodostuminen tapahtuu tavallisesti alle tunnissa, pelkistys on yleensä mennyt loppuun 10 - 15 tunnin kuluttua. Metyyli- tai etyyliesterit ovat erityisen hyödyllisiä, koska nämä ryhmät voidaan poistaa (vapauttaa) käsittelemällä litiumhydroksidilla dioksaanin vesiliuoksessa. Soveliaan ketonin käyttö aldehydin R^{o}-CHO sijasta johtaa sellaisten välituotteiden valmistukseen, joissa glysiiniamiiniin kiinnittynyt metyleeniryhmä on substituoitu.

Vaihtoehtoisesti, ja erityisesti niitä yhdisteitä silmällä pitäen, joissa R^{g} on Ar (se on: ilman väliin tulevaa alkyyliryhmää), on edullista valmistaa välituote P-X'-CONHAr standarditekniikoilla (esim. saattamalla P-X'-

COOH:n aktivoitu muoto reagoimaan $ArNH_2$:n kanssa) ja saattamalla tämä välituote reagoimaan sitten halogeenietikkahapon alkyyliesterin kanssa kuten edellä kuvataan, jolloin saadaan P-X'-CONHAr-CH_2-COO-alk, joka voidaan sitten edelleen muuntaa tavallisella tavalla.

Monet tämän keksinnön mukaiset lopulliset yhdisteet tai näiden välituotteet voidaan muuttaa toisikseen standarditekniikoilla. Esimerkiksi aryyliyhdisteet, jotka on substituoitu nitrolla, voidaan pelkistää (esim. natriumhydrosulfiitin läsnä ollessa ei-reaktiivisessa liuottimessa, kuten etanolissa, vedessä tai näiden seoksessa). Kun nitroyhdiste kuumennetaan palautusjäähdytyksessä vesi/etanoliseoksessa natriumhydrosulfiitin läsnä ollessa, pelkistys on yleensä mennyt loppuun muutamassa tunnissa. Tuloksena oleva amiini voi olla läsnä lopputuotteessa: jos amiini on läsnä välituotteessa, voi olla suotavaa muuttaa se lopulliseksi halutuksi muodokseen (esim. asylointi, jolloin saadaan asyloitu amiini) tai suojata sivureaktioiden välttämiseksi tämän jälkeisten kemiallisten menetelmien aikana. Jos vapaa amiini on haluttu yhdiste, Cbz-suojaryhmä on erityisen hyödyllinen tässä suhteessa. Muut tämäntyyppiset muuntamiset ja toisikseen muuttamiset ovat ilmeisiä ammattimiehille.

Kuten ammattimiehet ymmärtävät, edellä mainitut muuntamiset voidaan suorittaa edellä mainituilla lähtömateriaaleilla, tai useimmissa tapauksissa ne voidaan saada aikaan myös di- tai tripeptidivälituotteilla, jotka sisältävät saman vastaavan funktionaalisen ryhmän. Jälkimmäisissä tapauksissa tarve, tai sen puute, suojata eri ryhmät voidaan poistaa; vastaavasti mukana olevien kemiallisten menetelmien järjestys ja tyyppi sanelevat suojaryhmien tarpeen ja tyypin, samoin kuin järjestyksen, jolla synteesi saadaan tehtyä. Kuten ammattimiehet myös ymmärtävät, voidaan valita muitakin suojaryhmiä niin kauan kuin ne palvelevat tarkoitusta suojata funktionaalinen ryhmä tätä

seuraavien kemiallisten menetelmien aikana, mutta ne voidaan myös poistaa soveliaissa olosuhteissa ja soveliaassa järjestyksessä mikä mahdollistaa tätä seuraavat muuntamiset. Esimerkiksi edellä esitetyssä kaaviossa 1 G' käsittää substituentit, joissa R on -CN: tämä nitriiliryhmä voidaan muuntaa amidiiniksi tai pelkistää amiiniksi, joka voidaan mahdollisesti vielä valmistaa tämän keksinnön mukaisiksi guanidiineiksi.

Keksinnön mukaiset yhdisteet eristetään parhaiten happoadditiosuolojen muodossa. Kaavan I mukaisten yhdisteiden suolat, jotka on muodostettu sellaisten happojen kanssa, kuten ne jotka on edellä mainittu, ovat hyödyllisiä farmaseuttisesti hyväksyttävinä suoloina antitrombottisten aineiden antamista varten ja valmistettaessa näiden agenssien formulaatioita. Muita happoadditiosuoloja voidaan valmistaa ja käyttää peptidien eristyksessä ja puhdistuksessa. Esimerkiksi näin voidaan käyttää suoloja, jotka on muodostettu sulfonihappojen kanssa, kuten metaanisulfonihappo, n-butaanisulfonihappo, p-tolueenisulfonihappo ja naftaleenisulfonihappo.

Kaavan I mukainen yhdiste valmistetaan:

a) poistamalla yhtaikaisesti tai peräjälkeen sellaisen vastaavan yhdisteen suojaryhmä(t) P, jolla on kaava II

$$(P)X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r\text{-}G(P) \qquad II$$

jossa (P)X on radikaali X, jossa voi olla kiinni yksi tai useampi suojaryhmä P, jotka toisistaan riippumatta voivat olla aminosuojaryhmä sellaiselle kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa X:ään sisältyy emäksinen NH-rakenneosa, ja karboksisuojaryhmä P sellaiselle kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa X:ään sisältyy karboksitähde, ja G(P) on radikaali G, jossa voi olla kiinni yksi tai useampia toisistaan riippumattomia aminosuojaryhmiä P, tai

b) sellaista kaavan I mukaista yhdistettä varten, jossa R on $-C(=NH)-NH_2$ tekemällä hydrogenolyysi vastaavalle kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa R on (rakennekaava $-C(=NOH)-NH_2$, ja sen jälkeen kun tarvitaan kaavan I mukaisen yhdisteen suola, muodostetaan suola farmaseuttisesti hyväksyttävän hapon kanssa.

Voi olla edullista suorittaa prosessi b) yhtaikaa prosessin a) kanssa. Sellaisen kaavan I mukaisen yhdisteen tapauksessa, jossa hapon suojaryhmä on t-butyyliesteri ja/tai aminosuojaryhmät on t-butyylioksikarbonyyli, suojaryhmä(t) voidaan poistaa käsittelemällä vahvalla hapolla, kuten trifluorietikkahapolla tai vedettömällä suolahapolla inertissä liuottimessa, kuten dioksaanilla tai dikloorimetaanilla, anisolin läsnä ollessa. Sellaisen kaavan I mukaisen yhdisteen tapauksessa, jossa hapon suojaryhmä on bentsyyliesteri ja/tai aminosuojaryhmä on bentsyylioksikarbonyyli, suojaryhmä(t) voidaan poistaa hydrogenolyysillä, joka suoritetaan mukavasti suolahapon etanoliliuoksessa palladoidun hiilen ollessa katalysaattorina.

Edullinen menetelmä kaavan I mukaisten yhdisteiden puhdistamiseksi, jolloin samalla valmistetaan haluttu stabiili suolamuoto, on kuvattu US-patentissa 5 250 660. Menetelmän mukaisesti stabiilit sulfaatit tai hydrokloridit saadaan puhdistamalla preparatiivisesti C_{18}-käänteisfaasikromatografialla, jossa vesipohjainen komponentti käsittää rikkihapon tai suolahapon, pH 2,5, ja asetonitriili on orgaaninen komponentti. Happaman eluentin pH säädetään välille noin pH 4 - noin 6, anioninvaihtohartsilla hydroksyylimuodossa, esim. Bio-Rad AG-1X8. pH:n säädön jälkeen tripeptidisulfaatin tai hydrokloridisuolan liuos lyofilisoidaan, jolloin saadaan puhdas suola kuivassa jauhemuodossa. Esimerkissä prosessista, epäpuhdas D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$-sulfaatti voidaan liuottaa veteen ja liuos

ladataan Vydac C18 RP HPLC 5 cm x 50 cm:n pylvääseen. Käytetään 10 tunnin pituista gradienttia 2 - 10 % B (A = 0,01 % H_2SO_4, B = asetonitriili). Monia fraktioita kerätään ja ne yhdistetään, jotka sisältävät tuotteen analyyttisen RPHPLC-määrityksen mukaan. Yhdistettyjen fraktioiden pH säädetään arvoon 4,0 - 4,5 AG-1X8-hartsilla hydroksidimuodossa (Bio-Rad, 3300 Ragatta Blvd., Richmond, CA 94804). Liuos suodatetaan ja suodos lyofilisoidaan, jolloin saadaan puhdas D-,L-diamidi sulfaattisuolan muodossa.

Radikaalin X diastereomeerien optisesti aktiiviset isomeerit ajatellaan myös osaksi tätä keksintöä. Sellaisia optisesti aktiivisia isomeerejä voidaan valmistaa vastaavista optisesti aktiivisista esiastemuodoistaan edellä mainituilla menetelmillä, tai erottamalla raseemiset seokset. Tämä erottaminen voidaan suorittaa derivatisoimalla kiraalisella reagenssilla, jota seuraa kromatografia, tai toistetulla kiteytyksellä. Kiraalisen apuaineen poisto standardimenetelmin tuottaa tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden tai niiden edeltäjien oleellisesti optisesti puhtaita isomeerejä. Lisää erottamisia koskevia yksityiskohtia voidaan hankkia Jacquesin ym. teoksesta Enantiomers, Racemates, and Resolutions, John Wiley & Sons, 1981.

Yhdisteet, joita käytetään lähtömateriaaleina tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden synteesissä, ovat hyvin tunnettuja, ja siinä määrin kuin niitä ei ole kaupallisesti saatavilla, ne voidaan syntetisoida sinänsä tunnetulla tavalla.

Seuraavat esimerkit tarjotaan keksinnön jatkokuvaamista varten ja esimerkkien tarjoamiseksi vertailua varten, eikä niitä pidä ymmärtää sen rajoituksiksi.

Tässä selitysosassa käytetyillä lyhenteillä on seuraavat merkitykset.

Aminohappotähteet: Arg = arginyyli, Glu = glutamyyli, Gly = glysyyli, Pro = prolyyli, hPro = homoprolyyli, Azt = atsetidiini-2-karbonyyli, Phg = fenyyliglysyyli,

Phe = fenyylialanyyli, hPhe = homofenyylialanyyli, 1-Tiq = 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karbonyyli, 3-Tiq = 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-3-karbonyyli, Cha = β-sykloheksyylialanyyli, hCa = α-amino-γ-sykloheksyylibutyryyli, NMT = N-metyyli-indol-2-oyyli, Ohi = cis-oktahydroindol-2-oyyli, 1-Piq = perhydro-isokinoliini-1-karbonyyli, 3-Piq = perhydroisokinoliini-3-karbonyyli, Met = metionyyli, Met(O_2) = S,S-dioksometionyyli.

Agm = agmatiini

Boc = t-butyylioksikarbonyyli

Bn = bentsyyli

Cbz = bentsyylioksikarbonyyli

DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi

DMF = dimetyyliformamidi

Et = etyyli

DMSO = dimetyylisulfoksidi

EtOAc = etyyliasetaatti

Et_2O = dietyylieetteri

EtOH = etanoli

Fmoc = 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli

FAB-MS = nopea-atomipommitusmassaspektri

FD-MS = kenttädesorptiomassaspektri

IS-MS = ionisuihkumassaspektri

HRMS = korkean resoluution massaspektri

HOBT = 1-hydroksibentsotriatsolihydraatti

IR = infrapunaspektri

RPHPLC = korkean suorituskyvyn käänteisfaasinestekromatografia

Ph = fenyyli

TFA = trifluorietikkahappo

THF = tetrahydrofuraani

TLC = ohutlevykromatografia

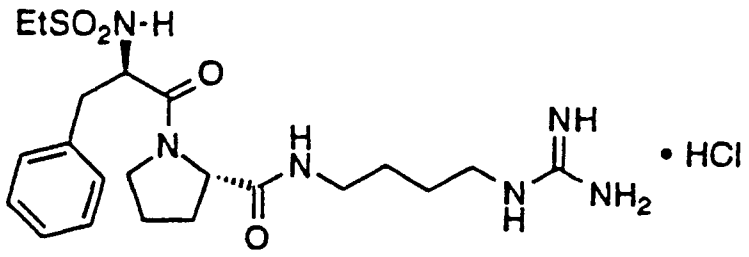
RPHPLC:lle käytettiin seuraavia parametreja: liuotin A: suolahapon 0,05-prosenttinen vesiliuos (1,5 ml väkevää suolahappoa 3 litrassa vettä); liuotin B: asetonit-

riili; gradientti: kuten määritelty kussakin esimerkissä; menetelmä 1: pylväs: Vydac C_{18} - 2,5 cm x 25 cm, virtausnopeus: 5 ml/minuutti; menetelmä 2: pylväs Vydac C_{18} - 5 cm x 25 cm, virtausnopeus: 10 ml/minuutti; menetelmä 3: Vydac C_{18} - 2,5 cm x 50 cm, virtausnopeus: 10 ml/minuutti.

Ellei toisin ilmaista, pH-säädöt ja esikäsittely tehdään hapon tai emäksen vesiliuoksilla.

Esimerkeissä, siellä missä ^{1}H-NMR esitetään, reaktion tuottama tuote karakterisoitiin protoni-NMR:llä, jotta saatiin vahvistettua, että ilmaistu tuote oli saatu; IR ilman tuloksia osoittaa samaten, että saatiin tyydyttävä infrapunaspektri. HRMS:ää käytettiin vahvistamaan sellaisten yhdisteiden tarkka massa, joita varten ei saatu tyydyttävää alkuaineanalyysiä kuvatun menetelmän tuotteelle; havaitun ionin (esim. MH^+) alkuainekoostumus osoitetaan.

Esimerkki 1



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-Agm·HCl

A) Boc-D-Phe-Pro-OBn:n valmistus

Liuokseen, jossa on Boc-D-Phe-OH (89,1 g, 336 mmol), Pro-OBn-hydrokloridi (81,2 g, 336 mmol), HOBT (50 g, 370 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (176 ml, 1,008 mmol) 0 °C:n lämpötilassa dikloorimetaanissa (600 ml), lisättiin 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidihydrokloridi (71 g, 370 mmol). Kun oli sekoitettu 18 tuntia, seos laimennettiin dietyylieetterillä (1 l) ja pestiin peräjälkeen kolme kertaa 1 N sitruunahapolla (250 ml), kerran vedellä (250 ml), kolme kertaa kyl-

lästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (250 ml) ja kerran kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 140 g (92,5 %:n saanto) vaaleankeltaista vaahtoa.

FD-MS, m/e 452 (M^+)

^{1}H-NMR

B) D-Phe-Pro-OBn·TFA:n valmistus

Boc-D-Phe-pro-OBn:n (68 g, 150 mmol) sekoituksessa olevaan dikloorimetaaniliuokseen (50 ml) 0 °C:n lämpötilassa lisättiin anisoli (20 ml), jota seurasi trifluorietikkahappo (400 ml). 3 tunnin sekoittamisen jälkeen liuottimet haihdutettiin *in vacuo* ja paksu öljymäinen jäännös liuotettiin dietyylieetteriin (1,5 l) ja pidettiin jääkaappilämpötilassa (72 tuntia). Valkoinen sakka suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä (300 ml) ja kuivattiin, jolloin saatiin 59,4 g (85 %:n saanto) valkoista jauhetta.

^{1}H-NMR

C) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OBn:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli D-Phe-Pro-OBn·TFA (12 g, 25,7 mmol) ja trietyyliamiini (7 ml, 50,2 mmol) dikloorimetaanissa (200 ml) -78 °C:n lämpötilassa, lisättiin etaanisulfonyylikloridia (2,65 ml, 28,3 mmol) tipoittain additiosuppilon kautta. Reaktioastia lämmitettiin 0 °C:n lämpötilaan ja sen jälkeen kun oli sekoitettu 4 tuntia, lisättiin vesi (10 ml). Orgaaninen faasi pestiin kolme kertaa 1 N suolahapolla (100 ml), kerran kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella (100 ml) ja sitten liuotin poistettiin *in vacuo*. Tuote puhdistettiin flashkromatografialla piidioksidigeelissä, ajoliuoksena etyyliasetaatti/heksaani (6:4). Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 6,62 g (58 %:n saanto) keltaista öljyä, joka jähmettyi.

^{1}H-NMR

FD-MS m/e 445 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{28}N_2O_5S$:lle:

Laskettu: C 62,14, H 6,35, N 6,30

Havaittu: C 61,87, H 6,37, N 6,18.

D) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OH:n valmistus

$EtSO_2$-D-Phe-Pro-OBn:n (4,5 g, 10,1 mmol) sekoituksessa olevaan p-dioksaaniliuokseen (150 ml) lisättiin litiumhydroksidimonohydraatin (2,1 g, 50,5 mmol) liuos vedessä (75 ml). 16 tunnin sekoituksen jälkeen liuoksen tilavuus pienennettiin puoleen *in vacuo* ja liuos laimennettiin vedellä (300 ml) ja 0,1 N NaOH:lla (100 ml). Vesifaasi pestiin sitten kahdesti dietyylieetterillä (250 ml), happamoitettiin kiinteällä sitruunahapolla ja uutettiin sitten kolmasti etyyliasetaatilla (150 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset pestiin kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella (200 ml), kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 3,6 g (90 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

FD-MS, m/e 355 (M^+)

Analyysi $C_{16}H_{22}N_2O_5S$:lle:

Laskettu: C 54,22, H 6,26, N 7,90

Havaittu: C 54,40, H 6,42, N 7,85.

E) N,N'-di-Boc-S-metyyli-isotiourean valmistus

Di-t-butyylidikarbonaatin (100 g, 458 mmol) sekoituksessa olevaan liuokseen t-butanolissa (300 ml) lisättiin bis-S-metyyli-isotioureasulfaatin (32,7 g, 117 mmol) vesiliuos (150 ml), mitä seurasi natriumhydroksidin (19,2 g, 480 mmol) vesiliuos (150 ml). 48 tunnin sekoituksen jälkeen seos konsentroitiin noin kolmannekseen alkuperäisestä tilavuudesta *in vacuo* ja laimennettiin dietyylieetterillä (500 ml). Orgaaninen faasi pestiin kerran vedellä (250 ml), kolme kertaa 1 N sitruunahapolla (250 ml) ja vielä kerran vedellä (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin

in vacuo, jolloin saatiin 42 g (62 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

F) N^g,$N^{g'}$-di-Boc-agmatiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 1,4-butaanidiamiini (23 g, 258 mmol) dimetyyliformamidi:vedessä (2:1) (300 ml), lisättiin N,N'-di-Boc-S-metyyli-isotiourean (15 g, 52 mmol) liuos dimetyyliformamidissa (100 ml) additiosuppilon välityksellä. Sen jälkeen kun oli sekoitettu 2 tuntia, liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin 1 N sitruunahappoon (250 ml), laimennettiin vedellä (250 ml) ja pestiin etyyliasetaatilla (250 ml). Etyyliasetaattifaasi takaisinuutettiin 1 N sitruunahapolla (100 ml) ja yhdistetyt vesifaasit tehtiin emäksiseksi natriumkarbonaatilla, kyllästettiin kiinteällä natriumkloridilla ja uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla (250 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset pestiin kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella (200 ml), kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 12,5 g (73 %:n saanto) sakeaa siirappia.

^{1}H-NMR

G) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-Agm(Boc)$_2$:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli N^g,$N^{g'}$-di-Boc-agmatiini (2 g, 6 mmol) dikloorimetaanissa (30 ml), lisättiin $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OH (2,1 g, 6 mmol), HOBT (810 mg, 6 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (1,6 g, 12 mmol), mitä seurasi 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidihydrokloridi (1,4 g, 73 mmol). 20 tunnin sekoituksen jälkeen liuos laimennettiin etyyliasetaatilla (300 ml) ja pestiin kolme kertaa 1 N sitruunahapolla (150 ml), kerran vedellä (150 ml) ja kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös ajettiin kromatografiassa piidioksidigeelissä, ajoliuoksena portaittainen gradientti etyyliase-

taatti:heksaani (1:4) - etyyliasetaatti. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 2,4 g (60 %:n saanto) sakeaa öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 668 (MH^+)

H) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-Agm·HCl:n valmistus

$EtSO_2$-D-Phe-Pro-Agm(Boc)$_2$:n (1,6 g, 2,4 mmol) sekoitettava suspensio anisolissa (1 ml) liuotettiin trifluorietikkahappoon (20 ml) ja annettiin sekoittua 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Liuotin poistettiin sitten *in vacuo* ja jäännös partitioitiin veden (100 ml) ja dietyylieetterin (50 ml) välillä. Vesifaasi pestiin taas dietyylieetterillä (50 ml) ja konsentroitiin sitten osittain ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 1,4 g epäpuhdasta trifluoriasetaattisuolaa. Puolet tästä materiaalista liuotettiin sitten veteen ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1; 98/2 (A/B), nousu 50/50:een (A/B), 60 minuuttia), jolloin saatiin 490 mg (81 %:n saanto) valkoista jauhetta.

^{1}H-NMR

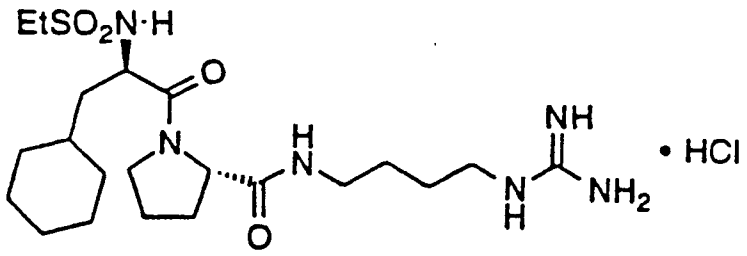
FD-MS, m/e 467 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{34}N_6O_4S·HCl·H_2O$:lle:

Laskettu: C 48,41, H 7,16, N 16,13, Cl 6,80

Havaittu: C 48,01, H 6,81, N 16,15, Cl 6,97.

Esimerkki 2



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-Agm·HCl

A) Boc-D-Cha-Pro-OBn:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, Boc-D-Cha-Pro-OBn kuvattiin Boc-D-Cha-OH:sta ja Pro-OBn·HCl:stä 91-prosenttisella saannolla (109 g).

FD-MS, m/e 458 (M^+)

B) D-Cha-Pro-OBn·TFA:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-B kuvattu, valmistettiin D-Cha-Pro-OBn·TFA (116 % teoreettisesta saannosta, 130 g).

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 359 (M^+)

C) $EtSO_2$-D-Cha-Pro-OBn:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-C kuvattu, valmistettiin $EtSO_2$-D-Cha-Pro-OBn (20-prosenttinen saanto, 2,3 g)

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 450 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{34}N_2O_5S$:lle:

Laskettu: C 61,31, H 7,61, N 6,22

Havaittu: C 61,55, H 7,59, N 6,28.

D) $EtSO_2$-D-Cha-Pro-OH:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-D kuvattu, valmistettiin $EtSO_2$-D-Cha-Pro-OH (48-prosenttinen saanto, 0,78 g)

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 361 (M^+)

E) $EtSO_2$-D-Cha-Pro-Agm$(Boc)_2$:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 400 mg (40 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Cha-Pro-Agm$(Boc)_2$:ta $EtSO_2$-D-Cha-Pro-OH:sta ja N^g-$N^{g'}$-di-Boc-Agm:sta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 674 (MH^+)

F) $EtSO_2$-D-Cha-Pro-Agm·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin $EtSO_2$-D-Cha-Pro-Agm·HCl (45-prosenttinen saanto, 100 mg). Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 50/50:een (A/B), 60 minuuttia).

^{1}H-NMR

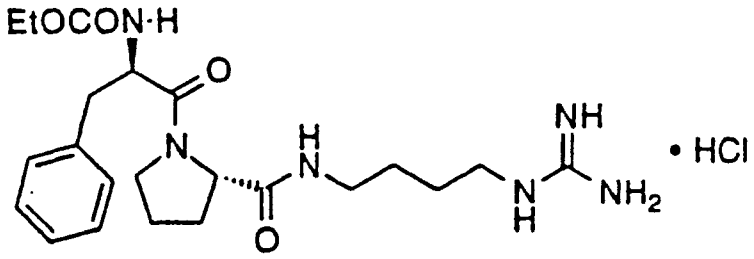
FD-MS, m/e 473 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{40}N_6O_4S \cdot 1,2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 47,20, H 8,15, N 15,73, Cl 7,96

Havaittu: C 47,47, H 7,84, N 16,10, Cl 7,80.

Esimerkki 3



EtOCO-D-Phe-Pro-Agm·HCl

A) EtOCO-D-Phe-Pro-OH:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin ne, jotka kuvattiin esimerkeissä 1-C ja 1-D, käyttäen etyylikloori formiaattia etaanisulfonyylikloridin sijasta, valmistettiin 6,59 g (92 %:n saanto) EtOCO-D-Phe-Pro-OH:ta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 335 (M^+)

Analyysi $C_{17}H_{22}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 61,07, H 6,63, N 8,38

Havaittu: C 60,88, H 6,72, N 8,14.

B) EtOCO-D-Phe-Pro-Agm·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, 2,1 g (54 %:n saanto) EtOCO-D-

Phe-Pro-Agm(Boc)$_2$:ta valmistettiin EtOCO-D-Phe-Pro-OH:sta ja N^g-$N^{g'}$-di-Boc-Agm:sta. Sitten valmistettiin menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, 390 mg (77 %:n saanto) EtOCO-D-Phe-Pro-Agm·HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 50/50:een (A/B), 60 minuuttia).

^{1}H-NMR

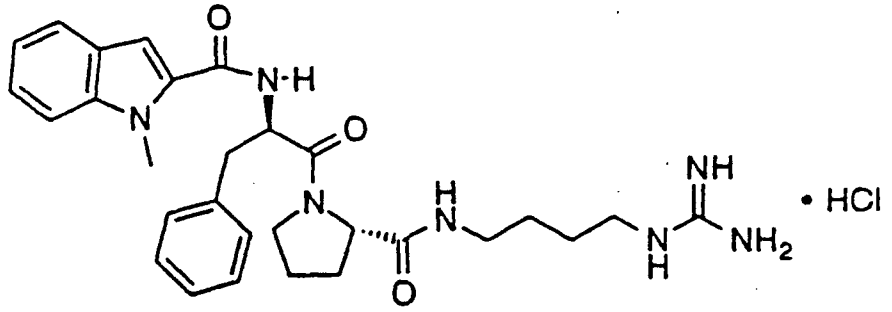
FD-MS, m/e 447 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{34}N_6O_4 \cdot 0,9HCl \cdot 0,2TFA \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,70, H 7,22, N 16,15, Cl 6,13

Havaittu: C 51,73, H 7,20, N 16,54, Cl 6,36.

Esimerkki 4



NMI-D-Phe-Pro-Agm·HCl

(N-[(1-metyyli-1H-indol-2-yyli)karbonyyli]-D-fenyylialanyyli-N-[4-[(aminoiminometyyli)amino]butyyli]-L-prolinamidi-monohydrokloridi)

A) NMI-D-Phe-Pro-OH:n valmistus

N-metyyli-indoli-2-karboksyylihapon (2,6 g, 14,9 mmol) liuokseen kuivassa tetrahydrofuraanissa (45 ml) lisättiin pentafluorifenolia (3 g, 16,5 mmol), mitä seurasi 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidi (3,2 g, 16,5 mmol). Seoksen annettiin sekoittua palautusjäähdytyksessä 3,5 tuntia ja jäähtyä sitten huoneenlämpötilaan. Tähän seokseen lisättiin liuos, jossa oli D-Phe-Pro-OBn·TFA (7 g, 14,9 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (4 g, 30 mmol) tetrahydrofuraanissa (25 ml). Sen jälkeen

kun oli sekoitettu vielä 2 tuntia, liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (500 ml), sitten pestiin kolme kertaa 0,1 N natriumbisulfaatin vesiliuoksella (250 ml) ja kolme kertaa 1 N kaliumkarbonaatin vesiliuoksella (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 6,5 g amorfista kiinteää ainetta (halutun tuotteen seos, kontaminoitunut pentafluorifenolilla). Tämä epäpuhdas tuote hydrolysoitiin sitten menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-D kuvattu, jolloin saatiin 3,8 g (62 %:n saanto) harmahtavaa kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 419 (M^+)

B) NMI-D-Phe-Pro-Agm·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 900 mg (20 %:n saanto) NMI-D-Phe-Pro-Agm(Boc)$_2$:ta. Menetelmällä, joka on oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin sitten 144 mg (31 %:n saanto) NMI-D-Phe-Pro-Agm·HCl:ää. Epäpuhdas tuote liuotettiin jääetikkaan ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 90/10 (A/B), nousu 40/60:een (A/B), 80 minuuttia).

^{1}H-NMR

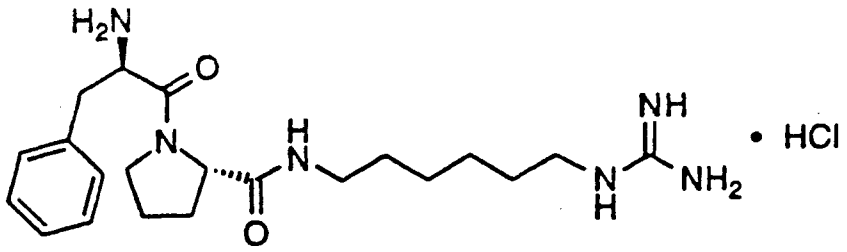
FD-MS, m/e 532 (M^+)

Analyysi $C_{29}H_{37}N_7O_3 \cdot 0,9HCl \cdot 0,6TFA \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 56,46, H 6,29, N 15,27, Cl 4,97

Havaittu: C 56,77, H 6,58, N 15,35, Cl, 5,28.

Esimerkki 5



D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_6$NHC(NH)NH_2·HCl

A) Boc-D-Phe-Pro-OH:n valmistus

Liuokseen, jossa oli Boc-D-Phe-Pro-OBn (145 g, 320 mmol) p-dioksaanissa (660 ml), lisättiin litiumhydroksidimonohydraatin (54 g, 1 280 mmol) liuos vedessä (330 ml) voimakkaasti sekoittaen. 4 tunnin kuluttua liuos konsentroitiin *in vacuo* noin yhteen neljäsosaan alkuperäisestä tilavuudesta ja laimennettiin vedellä (350 ml) ja 0,1 N natriumhydroksidilla (100 ml). Vesifaasi pestiin kolme kertaa dietyylieetterillä (250 ml) ja happamoitettiin sitten pH-arvoon 3 kiinteällä sitruunahapolla, mikä sai aikaan sakan muodostumisen. Kiinteä aine suodatettiin, pestiin kahdesti vedellä ja kuivattiin sitten voimakkaassa alipaineessa, jolloin saatiin 91 g (78 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 363 (M^+)

B) N^g,$N^{g'}$-di-Boc-6-aminoheksyyliguanidiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-F kuvattu, valmistettiin 4,7 g (66 %:n saanto) N^g,$N^{g'}$-di-Boc-6-aminoheksyyliguanidiinia 1,6-heksaanidiamiinista.

C) Boc-D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_6$NHC(NBoc)NH(Boc):n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,3 g (62 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_6$NHC(NBoc)NH(Boc):ia Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja N^g,$N^{g'}$-di-Boc-6-aminoheksyyliguanidiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 703 (M^+)

D) D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_6$NHC(NH)NH_2·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin noin 100 mg D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_6$NHC(NH)NH_2·HCl:ää.

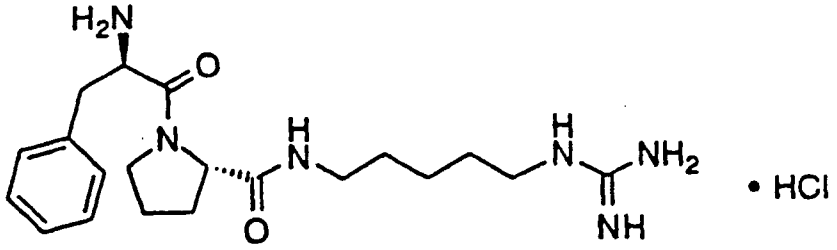
FD-MS, m/e 389 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{34}N_6O_2 \cdot 0,9HCl \cdot 0,9TFA \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,97, H 6,95, N 15,34

Havaittu: C 49,60, H 7,13, N 15,23.

Esimerkki 6



D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_5$NHC(NH)NH_2·HCl

A) N^g-$N^{g'}$-di-Boc-5-aminopentyyliguanidiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-F kuvattu, valmistettiin 1,73 g (72 %:n saanto) N^g-$N^{g'}$-di-Boc-5-aminopentyyliguanidiinia 1,5-pentaanidiamiinista.

FD-MS, m/e 345 (M^+)

^{1}H-NMR

B) Boc-D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_5$NHC(NBoc)NH(Boc):n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,9 g (92 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_5$NHC(NBoc)NH(Boc):a Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja N^g,$N^{g'}$-di-Boc-5-aminopentyyliguanidiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 689 (M^+)

C) D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_5$NHC(NH)NH_2·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin noin 100 mg D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_5$NHC(NH)NH_2·HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 40/60:een (A/B), 40 minuuttia).

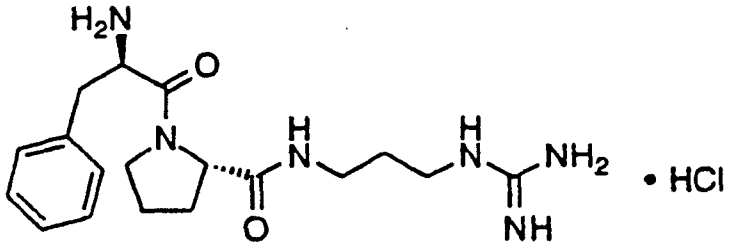
FD-MS, m/e 389 (M^+)

Analyysi $C_{20}H_{32}N_6O_2 \cdot 0,9HCl \cdot 0,9TFA \cdot 0,7H_2O$:lle:

Laskettu: C 48,71, H 6,79, N 15,63

Havaittu: C 48,34, H 6,68, N 16,01.

Esimerkki 7



D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_3$NHC(NH)NH_2·HCl

A) Boc-D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_3$NHC(NBoc)NH(Boc):n valmistus

Liuokseen, jossa oli 1,3-diaminopropaania (2,2 g, 30 mmol) dimetyyliformamidissa (25 ml), lisättiin liuos, jossa oli N,N'-di-Boc-S-metyyli-isotioureaa (2,9 g, 10 mmol) dimetyyliformamidissa (25 ml). 1 tunnin sekoituksen jälkeen seos laimennettiin dikloorimetaanilla (400 ml) ja

pestiin kahdesti kyllästetyn natriumbikarbonaatin vesiliuoksen ja kyllästetyn natriumkloridin vesiliuoksen seoksella (200 ml) ja kerran kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin osittain *in vacuo* noin 200 ml:n tilavuuteen.

Tähän liuokseen lisättiin sitten Boc-D-Phe-Pro-OH (3,6 g, 10 mmol), HOBT (1,3 g, 10 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (1,3 g, 10 mmol), mitä seurasi 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidi·HCl (2,1 g, 11 mmol). 16 tunnin sekoittamisen jälkeen liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (250 ml). Orgaaninen faasi pestiin kolme kertaa 1 N sitruunahapolla (200 ml), kerran vedellä (100 ml), kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (200 ml) ja kerran kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös ajettiin sitten piidioksigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti etyyliasetaatti/heksaani (1:4) etyyliasetaatti. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) konsentroitiin, jolloin saatiin 2,6 g (40 %:n saanto) paksua väritöntä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 661 (M^+)

B) D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_3$NHC(NH)NH_2·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin 460 mg (71 %:n saanto) D-Phe-Pro-NH(CH_2)$_3$NHC(NH)NH_2·HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 40/60:een (A/B), 40 minuuttia).

^{1}H-NMR

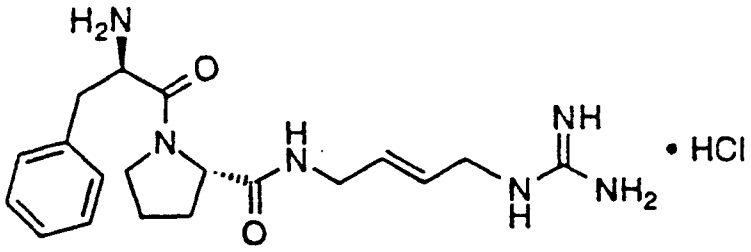
FD-MS, m/e 361 (M^+)

Analyysi $C_{18}H_{28}N_6O_2$·HCl·1,1TFA·1,1H_2O:lle:

Laskettu: C 44,66, H 6,20, N 15,47

Havaittu: C 44,69, H 6,10, N 15,19.

Esimerkki 8



D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-CH=$CHCH_2NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) N^g-$N^{g'}$-di-Boc-4-amino-trans-2-butenyyliguanidiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-F kuvattu, valmistettiin 2,4 g (42 %:n saanto) N^g-$N^{g'}$-di-Boc-4-amino-trans-2-butenyyliguanidiinia 1,4-diamino-trans-2-buteenista.

B) Boc-D-Phe-pro-$NHCH_2$-trans-CH=$CHCH_2NHC(NBoc)$-NHBoc:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 2,7 g (55 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-CH=$CHCH_2NHC(NBoc)NHBoc$:ia Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja N^g,$N^{g'}$-di-Boc-4-amino-trans-2-butenyyliguanidiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 673 (M^+)

C) D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-CH=$CHCH_2NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

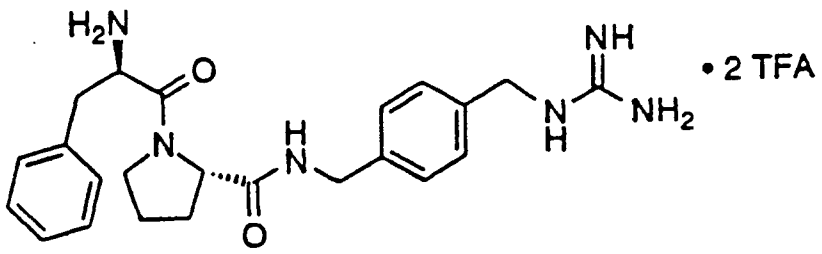
Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin noin 100 mg D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-CH=$CHCH_2NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 40/60:een (A/B), 40 minuuttia).

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 373 (M^+)

Analyysi $C_{19}H_{28}N_6O_2 \cdot HCl \cdot 0,5TFA \cdot 2,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 47,01, H 6,81, N 16,45
Havaittu: C 47,36, H 6,53, N 16,70.

Esimerkki 9



D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NH)NH$_2$ · 2TFA

A) p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NBoc)NHBoc:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-F kuvattu, valmistettiin 2,3 g (42 %:n saanto) p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NBoc)NHBoc:a p-ksyleenidiamiinista.

^{1}H-NMR

B) Boc-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NBoc)NHBoc:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 2,8 g (63 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NBoc)NHBoc:ia Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NBoc)NHBoc:sta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 723 (M^+)

C) D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$CH$_2$NHC(NH)NH$_2$ · 2TFA:n valmistus

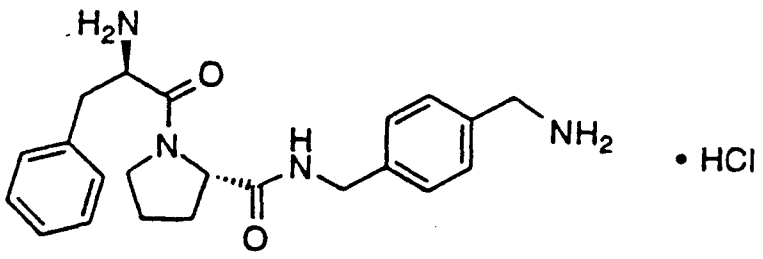
Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin 725 mg (81 %:n saanto) otsikon mukaista bis-TFA-suolaa, eikä sitä puhdistettu edelleen RPHPLC:llä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 423 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{30}N_6O_2 \cdot 2,1TFA \cdot H_2O$:lle:
Laskettu: C 48,05, H 5,05, N 12,36
Havaittu: C 48,06, H 4,85, N 12,28.

Esimerkki 10



D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$

A) N-Boc-p-(aminometyyli)bentsyyliamiinin valmistus

p-ksyleenidiamiinin (10 g, 73 mmol) sekoituksessa olevaan liuokseen dimetyyliformamidi/vesi-liuoksessa (1:1, 100 ml) lisättiin di-t-butyylidikarbonaatti (8 g, 37 mmol). 20 tunnin sekoituksen jälkeen seos konsentroitiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin dietyylieetterin (200 ml) ja 1 N sitruunahapon (200 ml) välillä. Vesifaasi pestiin taas dietyylieetterillä (200 ml) ja tehtiin sitten emäksiseksi kiinteällä natriumbikarbonaatilla ja kyllästettiin kiinteällä natriumkloridilla. Vesifaasi uutettiin sitten neljä kertaa etyyliasetaatilla (200 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 2,1 g (24 %:n saanto) paksua öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 237 (MH^+)

Analyysi $C_{13}H_{20}N_2O_2$:lle:

Laskettu: C 66,07, H 8,53, N 11,85

Havaittu: C 66,33, H 8,44, N 12,11.

B. Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH$Boc:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,1 g (63 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-$C_6H_4CH_2NH$Boc:ia Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja N-Boc-p-(aminometyyli)bentsyyliamiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 581 (M^+)

Analyysi $C_{32}H_{44}N_4O_6$:lle:

Laskettu: C 66,19, H 7,64, N 9,65

Havaittu: C 65,99, H 7,63, N 9,42.

C. D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin noin 100 mg D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 40/60:een (A/B), 40 minuuttia).

^{1}H-NMR

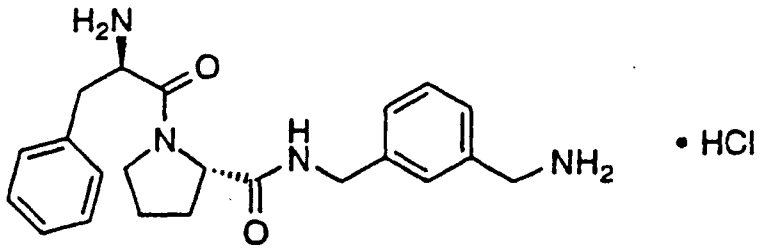
FD-MS, m/e 381 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{28}N_4O_2 \cdot HCl \cdot 1,1TFA \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,87, H 5,77, N 10,00

Havaittu: C 51,78, H 5,88, N 10,28.

Esimerkki 11



D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$

A) N-Boc-m-(aminometyyli)bentsyyliamiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava esimerkissä 10-A kuvatun kanssa, valmistettiin 2,6 g (30 %:n saanto) N-Boc-m-(aminometyyli)bentsyyliamiinia m-ksyleenidiamiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 237 (MH^+)

Analyysi $C_{13}H_{20}N_2O_2$:lle:

Laskettu: C 66,07, H 8,53, N 11,85

Havaittu: C 65,81, H 8,48, N 11,98.

B. Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CH_2NHBoc$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,6 g (95 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CH_2NHBoc$:ia Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja N-Boc-m-(aminometyyli)bentsyyliamiinista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 581 (M^+)

C) D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin noin 100 mg D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

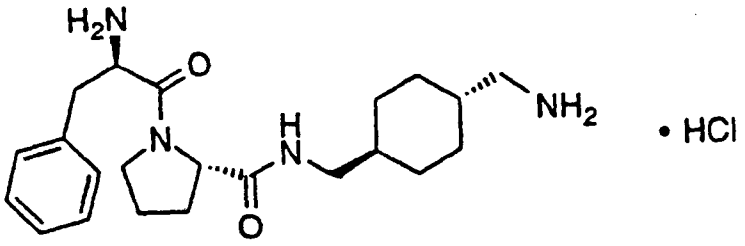
FD-MS, m/e 381 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{28}N_4O_2 \cdot HCl \cdot TFA \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,51, H 5,87, N 10,21

Havaittu: C 52,13, H 6,21, N 10,48.

Esimerkki 12



D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-4-(aminometyyli)sykloheksaani·HCl

A)N-Boc-trans-4-(aminometyyli)sykloheksaanikarboksyylihapon valmistus

Liuokseen, jossa oli trans-4-(aminometyyli)sykloheksaanikarboksyylihappoa (50 g, 318 mmol) 1 N natriumhydroksidissa (334 ml, 334 mmol) ja t-butanolissa (400 ml), lisättiin liuos, jossa oli di-t-butyylidikarbonaattia (73 g, 334 mmol) tetrahydrofuraanissa (50 ml). 20 tunnin sekoituksen jälkeen liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin veden (500 ml) ja dietyylieetterin

(250 ml) välillä. Vesifaasi pestiin uudelleen dietyylieetterillä (250 ml) ja sitten happamoitettiin kiinteällä sitruunahapolla, mikä johti valkoisen sakan muodostumiseen. Kiinteä aine suodatettiin, pestiin kahdesti vedellä (100 ml) ja kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin 48 g (59 %:n saanto) valkoista jauhetta.

^{1}H-NMR

B) $HOCH_2$-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)sykloheksaanin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli N-Boc-trans-4-(aminometyyli)sykloheksaanikarboksyylihappoa (15 g, 58 mmol) tetrahydrofuraanissa (150 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin N-metyylimorfoliini (5,9 g, 58 mmol). 30 minuutin sekoittamisen jälkeen natriumboorihydridi (6,5 g, 175 mmol) lisättiin ja sitten metanoli (300 ml) lisättiin additiosuppilon välityksellä 5 minuutin aikana. Seoksen annettiin sekoittua 1 tunnin ajan ja sitten liuottimet poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (500 ml) ja pestiin kahdesti 1 N sitruunahapolla (250 ml), kerran vedellä (100 ml), kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (250 ml) ja kerran kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 13 g (91 %:n saanto) otsikon mukaista yhdistettä.

^{1}H-NMR

C) NH_2CH_2-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)sykloheksaanin valmistus

Sekoittavaan liuokseen, jossa oli $HOCH_2$-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)sykloheksaani (13 g, 53 mmol) ja trifenyylifosfiini (21 g, 80 mmol) tetrahydrofuraanissa (300 ml), lisättiin atsodikarboksyylihapon dietyyliesteriä (13,9 g, 80 mmol), mitä seurasi difenyylifosforyyliatsidin (22 g, 80 mmol) liuos tetrahydrofuraanissa (100 ml). 16 tunnin sekoittamisen jälkeen liuottimet poistettiin *in*

vacuo ja jäännös ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti etyyliasetaatti/heksaani (1:3) - etyyliasetaatti/heksaani (3:1). Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 17,4 g epäpuhdasta tuotetta (kontaminoitunut korkeamman Rf:n yhdisteellä). Epäpuhdas atsidi liuotettiin metanoliin (200 ml) ja tämä liuos lisättiin sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli hienoksi jauhettua $Na_2S \cdot 9H_2O$:ta (51 g, 212 mmol) ja trietyyliamiinia (1 g, 11 mmol) metanolissa (100 ml). Tuloksena olevaa seosta kuumennettiin palautusjäähdytyksessä (16 tuntia), sitten jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja liuottimet poistettiin *in vacuo*. Jäännös laimennettiin vedellä (250 ml) ja happamoitettiin kiinteällä sitruunahapolla. Vesifaasi pestiin kahdesti etyyliasetaatilla (250 ml), tehtiin emäksiseksi kiinteällä natriumbikarbonaatilla ja kyllästettiin kiinteällä natriumkloridilla. Vesifaasi uutettiin sitten kolme kertaa etyyliasetaatilla (200 ml), ja yhdistetyt uutokset kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 6,4 g (45 %:n saanto) paksua öljyä.

^{1}H-NMR

D) N-Boc-D-Phe-Pro-NHCH$_2$-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)sykloheksaanin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava esimerkissä 1-G kuvatun kanssa, valmistettiin 4,5 g (74 %:n saanto) N-Boc-D-Phe-Pro-NHCH$_2$-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)-sykloheksaania Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja NH_2CH_2-trans-4-(N-Boc-aminometyyli)sykloheksaanista.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 587 (M^+)

E. D-Phe-Pro-NHCH$_2$-trans-4-(aminometyyli)sykloheksaani·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava esimerkissä 1-H kuvatun kanssa, valmistettiin 588 mg (75 %:n

saanto) D-Phe-Pro-$NHCH_2$-trans-4-(aminometyyli)sykloheksaani·HCl:ää. Tässä tapauksessa välituotteena olevan TFA-suolan analyyttinen RPHPLC oli hyvin puhdas, mutta suola oli hygroskooppinen. Niinpä suola liuotettiin 0,1 N HCl:ään (20 ml), pH säädettiin 5:een ja näyte lyofilisoitiin uudelleen, jolloin saatiin stabiili valkoinen kiinteä aine, hydrokloridisuola.

^{1}H-NMR

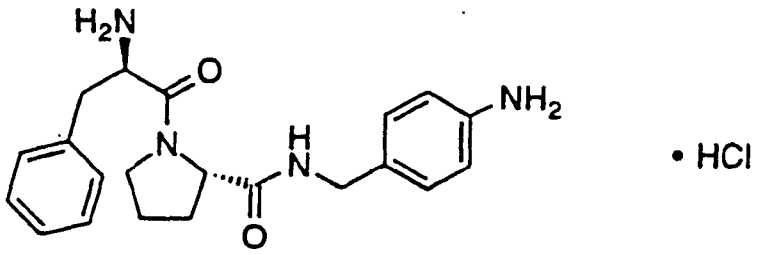
FD-MS, m/e 387 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{34}N_4O_2$·HCl·TFA·$2H_2O$:lle:

Laskettu: C 50,30, H 7,04, N 9,78

Havaittu: C 50,44, H 7,20, N 9,62.

Esimerkki 13



D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NH_2$·HCl

A) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NH_2$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, 8 g Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NO_2$:ta valmistettiin Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-NO_2-bentsyyliamiini·HCl:stä. Välituote liuotettiin etanoliin (250 ml) ja kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin $Na_2S_2O_4$:n (12,3 g, 70 mmol) vesiliuos (125 ml). Sen jälkeen kun oli sekoitettu palautusjäähdytyksessä 2 tuntia, liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin etyyliasetaatin (250 ml) ja veden (250 ml) välillä. Vesifaasi uutettiin uudelleen etyyliasetaatilla (250 ml) ja yhdistetty orgaaninen faasi kuivat-

tiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 2,4 g (21 %:n saanto) vaaleankeltaista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 466 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{34}N_4O_4$:lle:

Laskettu: C 66,93, H 7,34, N 12,01

Havaittu: C 66,69, H 7,32, N 12,28.

B) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NH_2\cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin 180 mg (60 %:n saanto) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NH_2\cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 60 minuuttia).

^{1}H-NMR

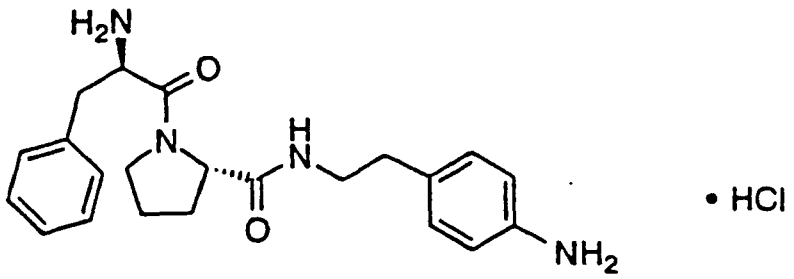
FD-MS, m/e 366 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{26}N_4O_2\cdot HCl\cdot 0,6TFA\cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 55,51, H 6,00, N 11,66

Havaittu: C 55,16, H 6,14, N 11,57.

Esimerkki 14



D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2\cdot HCl$

A) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 13-A kuvattu, valmistettiin 3 g (23 %:n saanto) Boc-D-Phe-pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2$:ta Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-NO_2-fenetyyliamiini·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 480 (M^+)

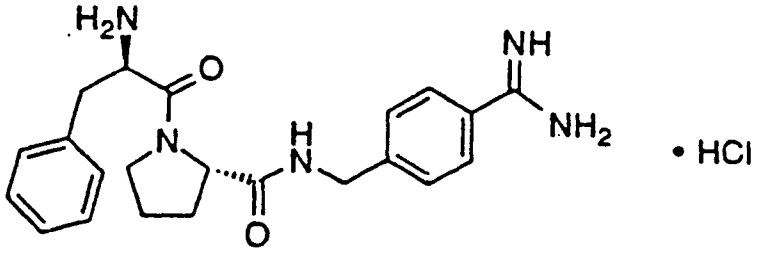
Analyysi $C_{27}H_{36}N_4O_4$:lle:
Laskettu: C 67,48, H 7,55, N 11,66
Havaittu: C 67,30, H 7,54, N 12,34.

B) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin 175 mg (58 %:n saanto) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 98/2 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 60 minuuttia).

^1H-NMR
FD-MS, m/e 380 (M^+)
Analyysi $C_{22}H_{28}N_4O_2 \cdot HCl \cdot 0,7TFA \cdot 0,7H_2O$:lle:
Laskettu: C 55,18, H 6,15, N 11,00
Havaittu: C 55,12, H 6,18, N 10,99.

Esimerkki 15



D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]-metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

A) p-(aminometyyli)bentsonitriili·TFA:n valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli natriumhydridiä (2,2 g, 56 mmol, 60 % öljydispersio) tetrahydrofuraanissa (100 ml), lisättiin 4-(bromimetyyli)bentsonitriiliä (10 g, 51 mmol). Tähän seokseen lisättiin hitaasti additiosuppilon välityksellä iminodikarboksyylihapon di-t-butyyliesterin liuos (12,2 g, 56 mmol). 16 tunnin sekoittamisen jälkeen seos laimennettiin dietyylieetterillä (300 ml) ja pestiin kahdesti vedellä (150 ml). Orgaani-

nen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin. Tuloksena oleva kiinteä aine liuotettiin sitten minimimäärään dikloorimetaania. Anisoli (10 ml) lisättiin ja liuos jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan. Liuos laimennettiin sitten trifluorietikkahapolla (200 ml) ja annettiin sekoittua 1 tunnin ajan. Liuotin poistettiin sitten *in vacuo* ja öljymäinen jäännös sekoitettiin voimakkaasti dietyylieetterin kanssa (100 ml) ja joidenkin minuuttien kuluttua tuote jähmettyi. Sakka suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin 11,3 g (90 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 132 (M^+)

B) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CN$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, 7,4 g (78 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CN$:ää valmistettiin Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-(aminometyyli)bentsonitriili·TFA:sta. Tässä tapauksessa tuote puhdistettiin jälleenkiteyttämällä dietyylieetteristä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 476 (M^+)

C) Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$:n valmistus

Vetysulfidikaasua kuplitettiin liuoksen läpi, jossa oli Boc-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CN$:ää (2 g, 4,2 mmol) pyridiinissä (25 ml) ja trietyyliamiinissa (2,5 ml), 30 minuutin ajan. Reaktioastia suljettiin sitten tiiviisti ja sen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 2 päivän ajan. Sitten liuos laimennettiin vedellä (100 ml) ja uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla (200 ml). Yhdistetty orgaaninen faasi pestiin kahdesti kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*.

Jäännös liuotettiin asetoniin (50 ml), metyylijodidi(10 ml) lisättiin ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä (2 tuntia). Liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin metanolissa (20 ml), NH_4OAc (712 mg, 9,2 mmol) lisättiin ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä (12 tuntia). Liuotin poistettiin uudelleen *in vacuo*, jäännös liuotettiin 1 N sitruunahappoon (100 ml) ja vesifaasi pestiin kahdesti etyyliasetaatilla (200 ml), tehtiin sitten emäksiseksi kiinteällä natriumbikarbonaatilla, kyllästettiin kiinteällä natriumkloridilla ja uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla (200 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 1,4 g (67 %:n saanto) paksua öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 494 (M^+)

D) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-H kuvattu, valmistettiin 7,7 g (57 %:n saanto) D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 3, 98/2 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 300 minuuttia).

^{1}H-NMR

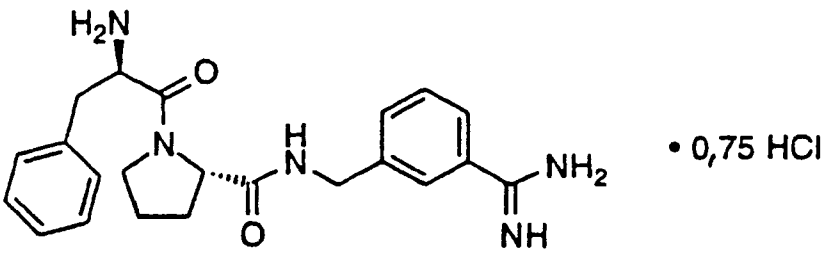
FD-MS, m/e 394 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{27}N_5O_2\cdot HCl\cdot 1,4TFA\cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,76, H 5,12, N 11,70

Havaittu: C 49,75, H 5,19, N 11,58.

Esimerkki 16



D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot 0,75HCl$

A) m-(aminometyyli)bentsonitriili·TFA:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 15-A kuvattu, valmistettiin 10,8 g (86 %:n saanto) m-(aminometyyli)-bentsonitriili·TFA:ta m-(bromimetyyli)-bentsonitriilistä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 132 (M^+)

B) Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CN$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 7,5 g (79 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4CN$:ää Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja m-(aminometyyli)bentsonitriili·TFA:sta. Tässä tapauksessa tuote puhdistettiin jälleenkiteyttämällä dietyylieetteristä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 476 (M^+)

Analyysi $C_{27}H_{32}N_4O_4$:lle:

Laskettu: C 68,05, H 6,77, N 11,76

Havaittu: C 68,27, H 6,82, N 11,96.

C) Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 15-C kuvattu, valmistettiin 1,1 g (53 %:n saanto) Boc-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$:ta.

FD-MS, m/e 494 (M^+)

D) D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot 0,75HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 0,65 g (63 %:n saanto) D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot 0,75HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 75/25:een (A/B), 120 minuuttia).

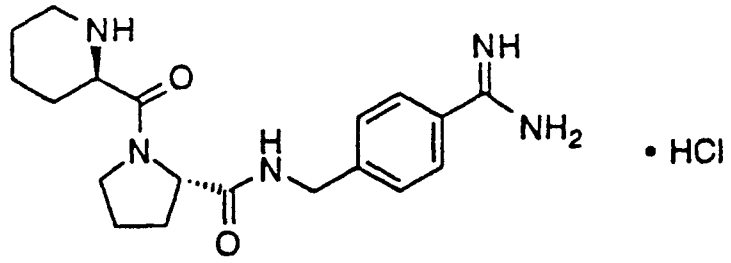
FD-MS, m/e 394 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{27}N_5O_2\cdot 0,75HCl\cdot 1,2TFA\cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,72, H 5,33, H 12,36, Cl 4,69

Havaittu: C 51,79, H 4,93, N 11,96, Cl 4,82.

Esimerkki 17



D-hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(D-homoprolyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]-metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

A) Cbz-D-hPro-OH:n valmistus

D-hPro-OH (5,0 g, 38,7 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (100 ml) ja veteen (30 ml). Liuoksen pH säädettiin 9,5:een 2 N natriumhydroksidilla ja bentsyylikloori-formiaatti (5,5 ml, 38,7 mmol) lisättiin tipoittain ja pH pidettiin 9,5:ssä 2 N natriumhydroksidilla. Reaktiota sekoitettiin vielä 1 tunti huoneenlämpötilassa. Orgaaninen liuotin haihdutettiin *in vacuo*, dietyylieetteri (100 ml) ja vesi (50 ml) lisättiin jäännökseen. Vesikerros erotettiin, liuoksen pH säädettiin 2,8:aan 3 N suolahapolla ja etyyliasetaatti (150 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin ja kuivattiin ($MgSO_4$); suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 9,6 g (95 %:n saanto) kirkasta öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 264 (MH^+)

B) Cbz-D-hPro-Pro-OH:n valmistus

Cbz-D-hPro-OH (9,5 g, 36 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (100 ml), ja liuos jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan. Liuokseen lisättiin 2,4,5-trikloorifenoli (7,1 g, 36 mmol) ja 1,3-disykloheksyyli-karbodi-imidi (7,4 g, 36 mmol). Reaktiota sekoitettiin 1 tunti 0 °C:n lämpötilassa ja 1 tunti huoneenlämpötilassa. Sakka suodatettiin ja suo-

dos konsentroitiin *in vacuo* öljyksi. Öljy liuotettiin pyridiiniin (100 ml), Pro-OH (4,2 g, 36 mmol) ja trietyyliamiini (5,0 ml, 36 mmol) lisättiin. Reaktiota sekoitettiin huoneenlämpötilassa (24 tuntia). Reaktion liuotin poistettiin *in vacuo* öljyksi. Jäännös liuotettiin veteen (100 ml), dietyylieetteri (50 ml) lisättiin ja pH säädettiin 9,5:een 2 N natriumhydroksidilla. Vesikerros uutettiin kahdesti dietyylieetterillä. Vesikerros erottui, pH säätyi 2,8:aan 3 N suolahapolla ja etyyliasetaatti (150 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos haihdutettiin *in vacuo* amorfiseksi kiinteäksi aineeksi (11,4 g, 88 %:n saanto).

FD-MS 361 (M^+)

Analyysi $C_{19}H_{24}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 63,32, H 6,71, N 7,77

Havaittu: C 63,42, H 6,84, N 7,96.

C) Cbz-D-hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CN$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, 2,2 g (84 %:n saanto) Cbz-D-hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4CN$:ää valmistettiin Cbz-D-hPro-Pro-OH:sta ja p-$NH_2CH_2C_6H_4CN \cdot TFA$:sta.

^1H-NMR

FD-MS, m/e 474 (M^+)

Analyysi $C_{27}H_{30}N_4O_4$:lle:

Laskettu: C 68,34, H 6,37, N 11,81

Havaittu: C 68,36, H 6,47, N 11,57.

D) D-hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 15-C kuvattu, valmistettiin D-hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$ (28 mmol, teoreettinen). Tämä epäpuhdas materiaali liuotettiin sitten etikkahappoon (350 ml) ja HBr-kaasua kuplitettiin liuoksen läpi 30 minuutin ajan. Sen jälkeen kun oli sekoitettu vielä 1 tunnin ajan, liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin veteen (200 ml) ja pestiin kahdesti etyyliasetaatilla (100 ml). Vesi-

faasi säädettiin sitten pH 4:ään ioninvaihtohartsilla (Bio Rad AG1-X8, emäksisessä muodossa) ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin höytyväinen valkoinen kiinteä aine. Tuote liuotettiin sitten uudelleen veteen (25 ml) ja puhdistettiin preparatiivisella RPHPLC:llä (menetelmä 3, 92/82 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 300 minuuttia), jolloin saatiin 5 g (41 %:n saanto) hPro-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 0,9HCl \cdot 0,9HBr \cdot 0,5H_2O$:ta.

^{1}H-NMR

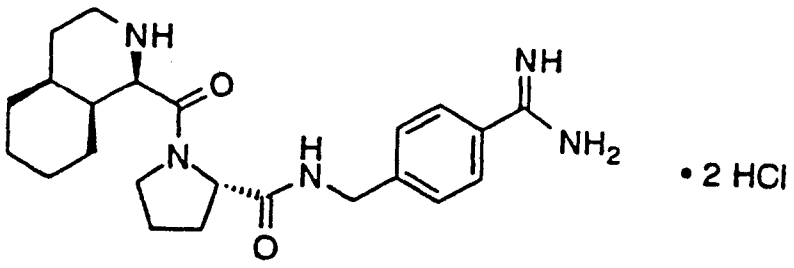
FD-MS, m/e 357 (M^+)

Analyysi $C_{19}H_{27}N_5O_2 \cdot 0,9HCl \cdot 0,9HBr \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 48,34, H 6,36, N 14,83, Cl 6,76, Br 15,23

Havaittu: C 48,66, H 6,36, N 14,62, Cl 7,14, Br 14,90.

Esimerkki 18



1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$ ([[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-1-[[(4aS,8aS)-dekahydro-1(R)-isokinolinyyli]karbonyyli]-L-prolinamidi-dihydrokloridi)

A) Cbz-D-1-Piq-Pro-OH:n valmistus

Liuos, jossa oli 1-isokinoliinikarboksyylihappoa (50 g, 0,288 mol) EtOH:ssa (150 ml) ja 60 ml 5 N HCl:ää, pelkistettiin 5 % Rh/Al_2O_3:lla vedyssä (14 g) 52 baarin paineessa (750 psi) korkeapainelaitteessa 50 °C:n lämpötilassa 17 tunnin ajan. Reaktioseos suodatettiin piimaan

läpi ja suodos konsentroitiin *in vacuo*. Kiinteä aine triturоitiin veden kanssa, suodatettiin ja kuivattiin, jolloin saatiin DL-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappo (DL-1-Piq-OH) (30 g, 48 %:n saanto) FD-MS 184 (MH^+).

DL-1-Piq-OH (30,2 g, 137 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (150 ml) ja veteen (150 ml). Liuoksen pH säädettiin 9,8:aan 5 N NaOH:lla ja bentsyylikloori-formiaatti (21,6 ml, 515 mmol) lisättiin tipoittain ja pH pidettiin 9,5:ssä 2 N NaOH:lla. Reaktiota sekoitettiin vielä 2 tuntia huoneenlämpötilassa. Orgaaninen liuos haihdutettiin *in vacuo* ja jäännökseen lisättiin dietyylieetteri (150 ml) ja vesi (50 ml). Vesikerros erotettiin, liuoksen pH säädettiin 2,5:een 5 N HCl:llä ja etyyliasetaatti (200 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin ja kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (150 ml) ja liuoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa (24 tuntia). Sakka suodatettiin ja kuivattiin, jolloin saatiin 2- Cbz-DL-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappo (Cbz-DL-1-Piq-OH) (32 g, 75 %:n saanto) FD-MS 318 (MH^+).

Cbz-DL-1-Piq-OH (31,8 g, 100 mmol) liuotettiin DMF:ään (100 ml) ja jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan. Reaktioon lisättiin proliinin t-butyyliesteri (17,1 g, 100 mmol), 1-hydroksibentsotriatsoli (13,5 g, 100 mmol) ja DCC (20,6 g, 100 mmol). Reaktiota sekoitettiin 3 tuntia 0 °C:n lämpötilassa ja 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktion sakka suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo* öljyksi. Öljy liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja veteen (100 ml). Orgaaninen kerros erotettiin ja pestiin peräjälkeen 1 N $NaHCO_3$:lla, vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka kuivattiin, jolloin saatiin 2-Cbz-DL-perhydro-1-isokinoliini-karbonyyli-L-prolyylin t-butyyliesteri (Cbz-DL-1-Piq-Pro-O-t-Bu) (47,0 g, 100 %:n saanto) FAB-MS 470 (MH^+).

Cbz-DL-1-Piq-Pro-O-t-Bu (47,0 g, 100 mmol) sijoitettiin pyöreäpohjaiseen kolviin, joka sisälsi trifluorietikkahappoa (100 ml), CH_2Cl_2:ta (35 ml), anisolia (5 ml) ja sitä sekoitettiin huoneenlämpötilassa (1 tunti). Reaktio konsentroitiin *in vacuo* kuumentamatta ja dietyylieetteri (100 ml) ja vesi (100 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin 9,8:aan 5 N NaOH:lla. Vesikerros erotettiin, liuoksen pH säädettiin 2,5:een 5 N HCl:llä ja etyyliasetaatti (200 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin ja kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (700 ml) ja liuokseen lisättiin (L)-(-)-α-metyylibentsyyliamiini. Liuoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 5 päivää. Tuloksena oleva kiinteä aine suodatettiin ja pestiin dietyylieetterillä. Suodos pestiin 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos haihdutettiin öljyksi. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (400 ml) ja annettiin seistä huoneenlämpötilassa (48 tuntia). Tuloksena oleva kiinteä aine suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 2-Cbz-D-perhydro-1-isokinoliinikarbonyyli-L-proliini (Cbz-D-1-Piq-Pro-OH) (5,86 g, 36 %:n saanto) FAB-MS 415 (MH^+); $[\alpha]_D$ = -34,2° (C = 0,5, MeOH).

B) N-Boc-p-(aminometyyli)bentsonitriilin valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli natriumhydridiä (4,6 g, 115 mmol, 60 % dispersio öljyssä) tetrahydrofuraanissa (150 ml), lisättiin 4-(bromimetyyli)-bentsonitriili (20,5 g, 105 mmol). Tähän seokseen lisättiin (hitaasti additiosuppilon kautta) liuos, jossa oli iminodikarboksyylihapon di-t-butyyliesteri (25 g, 115 mmol). Sen jälkeen kun oli sekoitettu 16 tuntia, seos laimennettiin dietyylieetterillä (500 ml) ja pestiin kahdesti vedellä (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 40,2 g epäpuhdasta kiinteää ainetta.

Tuloksena oleva kiinteä aine (28,3 g, 85 mmol) liuotettiin sitten tetrahydrofuraaniin (150 ml) ja lisättiin natriumhydroksidin (3,4 g, 85 mmol) metanoliliuos (300 ml). Yli yön sekoittamisen jälkeen liuos konsentroitiin noin puoleen tilavuuteen ja vesi lisättiin tuotteen sakkautumisen edistämiseksi. Sakka suodatettiin ja kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin 18,5 g (94 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 232 (M^+)

Analyysi $C_{13}H_{16}N_2O_3$:lle:

Laskettu: C 67,22, H 6,94, N 12,06

Havaittu: C 67,19, H 7,16, N 11,82.

C) p-(BocNHCH$_2$)C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 15-C kuvattu, N-Boc-p-(aminometyyli)bentsonitriili (32,7 g, 140 mmol) muutettiin p-(BocNHCH$_2$)C$_6$H$_4$C(NH)-NH$_2$:ksi. Tästä menettelystä saatu jäännös liuotettiin dimetyyliformamidiin (700 ml) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (72 g, 560 mmol) lisättiin. Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin tipoittain bentsyylikloori-formiaattia (48 g, 280 mmol). 16 tunnin sekoittamisen jälkeen vesi (100 ml) lisättiin ja sitten liuottimet poistettiin *in vacuo*. Jäännös partitioitiin veden (250 ml) ja etyyliasetaatin (500 ml) välillä. Faasit erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kolme kertaa kyllästetyllä ammoniumkloridin vesiliuoksella (250 ml), kerran vedellä (200 ml) ja kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin ja tuote jälleenkiteytettiin dietyylieetteristä, jolloin saatiin 14 g (26 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 384 (M^+)

D) p-$H_2NCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:n valmistus

Liuokseen, jossa oli p-$(BocNHCH_2)C_6H_4C(NH)NHCbz$ (11 g, 28,7 mmol) dikloorimetaanissa (125 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin anisolia (10 ml), jota seurasi trifluorietikkahappo (125 ml). 2 tunnin sekoituksen jälkeen liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin 1 N suolahappoon (50 ml) ja pestiin kahdesti dietyylieetterillä (50 ml). pH säädettiin 3:een ioninvaihtohartsilla (Bio Rad AG1-X8, emäksisessä muodossa) ja liuos lyofilisoitiin, jolloin saatiin 9,2 g (90 %:n saanto) valkoista jauhetta.

^1H-NMR

FD-MS, m/e 284 (M^+)

E) Cbz-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 4,4 g (79 %:n saanto) Cbz-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:ää Cbz-1-Piq-Pro-OH:sta ja p-$H_2NCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:stä. Tässä tapauksessa reaktio suoritettiin dimetyyliformamidissa, mikä johtui liukoisuusongelmista p-$H_2NCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:n kanssa.

^1H-NMR

FD-MS, m/e 681 (MH^+)

Analyysi $C_{39}H_{45}N_5O_6$:lle:

Laskettu: C 68,91, H 6,67, N 10,30

Havaittu: C 68,71, H 6,93, N 10,38.

F) 1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:n valmistus

Liuokseen, jossa oli Cbz-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)$-NHCbz (4,2 g, 6,1 mmol) etanolissa (200 ml), lisättiin 1 N suolahappo (18,3 ml, 18,3 mmol) ja vesi (100 ml). Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin 5 % palladoitu hiili (1 g), ja vetykaasua kuplitettiin liuoksen läpi 2 tunnin ajan. Seos huuhdeltiin sitten typellä ja sitten se suodatettiin piimaan läpi. Suodos konsentroitiin sitten *in vacuo*, liuotettiin uudelleen veteen (25 ml) ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 60/40:een

(A/B), 300 minuuttia), jolloin saatiin 1,3 g (53 %:n saanto) 1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää.

^{1}H-NMR

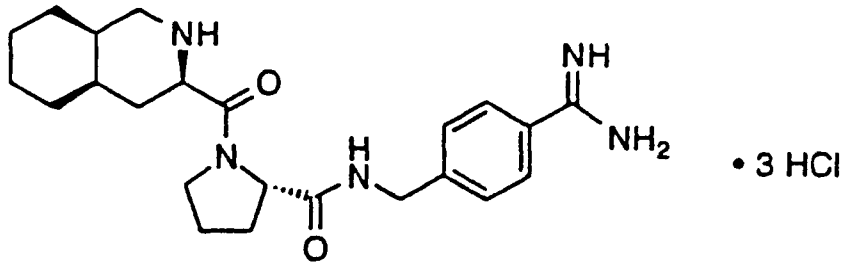
FD-MS, m/e 412 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_5O_2 \cdot 1,9HCl \cdot 2,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,53, H 7,65, N 13,32, Cl 12,81

Havaittu: C 52,63, H 7,36, N 13,47, Cl 12,95.

Esimerkki 19



D-3-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 3HCl$

A) Cbz-D-3-Piq-Pro-OH:n valmistus

D-fenyylialaniini (50 g, 302 mmol) saatettiin reagoimaan 37-prosenttisen formaldehydiliuoksen (120 ml) ja väkevän HCl:n (380 ml) kanssa palautusjäähdytyksessä. 30 minuutin jälkeen lisättiin vielä 50 ml formaldehydiä ja reaktiota jatkettiin 3 tunnin ajan. Reaktio jäähdytettiin -10 °C:n lämpötilaan ja sakka suodatettiin. Kiinteä aine kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin D-1,2,3,4-tetrahydro-3-isokinoliinikarboksyylihappo (24,2 g, 45 %:n saanto) FD-MS 178 (MH^+).

Liuos, jossa oli D-1,2,3,4-tetrahydro-3-isokinoliinikarboksyylihappo (17 g, 96 mmol) vedessä (200 ml) ja 20 ml 5 N HCl:ää, hydrattiin 5-prosenttisella Rh/Al_2O_3:lla (8,5 g) 138 baarin (2000 psi) paineessa korkeapainelaitteessa 120 °C:n lämpötilassa 16 tunnin ajan. Reaktioseos suodatettiin piimaan läpi ja suodos kylmäkuivattiin, jolloin saatiin D-perhydro-3-isokinoliinikarboksyylihappo (D-3-Piq-OH) (21 g, 100 %:n saanto) FD-MS 184 (MH^+).

D-3-Piq-OH (21,0 g, 95,8 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (75 ml) ja veteen (50 ml). Liuoksen pH säädettiin 10,0:aan 5 N NaOH:lla ja bentsyyliklooriformiaatti (16,4 ml, 115 ml) (16,4 ml, 115 mmol) lisättiin tipoittain ja pH pidettiin 9,5:ssä 2 N NaOH:lla. Reaktiota sekoitettiin vielä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Orgaaninen liuotin haihdutettiin *in vacuo* ja dietyylieetteri (100 ml) ja vesi (50 ml) lisättiin jäännökseen. Vesikerros erotettiin, liuoksen pH säädettiin 3,0:ksi 3 N HCl:llä ja etyyliasetaatti (250 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin ja kuivattiin ($MgSO_4$). Suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy, 2-Cbz-D-perhydro-3-isokinoliinikarboksyylihappo (Cbz-D-3-Piq-OH) (25,8, 85 %:n saanto) FD-MS 318 (MH^+).

Cbz-D-3-Piq-OH (17,2 g, 54 mmol) liuotettiin DMF:ään (50 ml) ja jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan. Reaktioon lisättiin proliinin t-butyyliesteri (9,2 g, 54 mmol), 1-hydroksibentsotriatsoli (7,3 g, 54 mmol) ja DCC (11,1 g, 54 mmol). Reaktiota sekoitettiin 3 tuntia 0 °C:n lämpötilassa ja 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktion sakka suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo* öljyksi. Öljy liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja veteen (100 ml). Orgaaninen kerros erotettiin ja pestiin peräjälkeen 1 N $NaHCO_3$:lla, vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodos haihdutettiin öljyksi, joka kuivattiin, jolloin saatiin 2-Cbz-D-perhydro-3-isokinoliinikarbonyyli-L-proliinint-butyyliesteri (Cbz-D-3-Piq-Pro-O-Bu) (23,8 g, 94 %:n saanto) FAB-MS 471 (MH^+).

Cbz-D-3-Piq-Pro-O-t-Bu (31,2 g, 66,3 mmol) sijoitettiin pyöreäpohjaiseen kolviin, joka sisälsi trifluorietikkahappoa (100 ml), anisolia (5 ml), ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa (1 tunti). Reaktio konsentroitiin *in vacuo* kuumentamatta ja dietyylieetteri (150 ml) ja vesi (100 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin 9,8:ksi 5 N

NaOH:lla. Vesikerros erotettiin, liuoksen pH säädettiin 2,8:ksi 3 N HCl:llä ja etyyliasetaatti (200 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodatettiin. Suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (300 ml) ja liuoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa (24 tuntia). Tuloksena oleva kiinteä aine suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 2-Cbz-perhydro-3-isokinoliinikarbonyyli-L-proliini(Cbz-D-3-Piq-Pro-OH) (13,5 g, 49 %:n saanto) FAB-MS 415 (MH^+).

Analyysi $C_{23}H_{30}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 66,65, H 7,29, N 6,76

Havaittu: C 66,90, H 7,33, N 6,81.

B) **Cbz-D-3-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:n valmistus**

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-E kuvattu, valmistettiin 1,6 g (49 %:n saanto) Cbz-D-3-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:aa Cbz-D-3-Piq-Pro-OH:sta ja p-$H_2NCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:stä.

FD-MS, m/e 680 (M^+)

C) D-3-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 3HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 17-E kuvattu, valmistettiin 150 mg D-3-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 3HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 240 minuuttia).

^1H-NMR

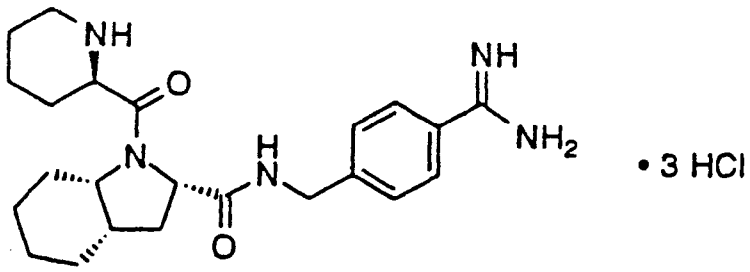
FD-MS, m/e 412 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_5O_2 \cdot 3HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,13, H 7,04, N 13,22

Havaittu: C 52,35, H 7,23, N 12,95.

Esimerkki 20



D-hPro-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 3HCl$
((S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-oktahydro-1-D-homoprolyyli-1H-indoli-2-arboksamiditrihydrokloridi)

A) Cbz-D-hPro-Ohi-OH:n valmistus

HCl-kaasua kuplitettiin sekoitettavan suspension läpi, jossa oli (S)-indoliini-2-karboksyylihappoa (20 g, 110 mmol) etanolissa (500 ml). Kun happo oli täysin liuennut, liuos tuotiin palautusjäähdytykseen. 16 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös trituroitiin dietyylieetterin kanssa ja tuloksena oleva harmahtava kiinteä aine kerättiin suodattamalla, pestiin heksaanilla ja kuivattiin yli yön tyhjiöuunissa 30 °C:n lämpötilassa, jolloin saatiin (S)-indoliini-2-karboksyylihapon etyyliesteri·HCl (25,7 g, 78 %:n saanto).

Kiinteä aine liuotettiin etanoliin (800 ml), 5-prosenttinen palladoitu hiili (25 g) lisättiin ja tuloksena olevaa suspensiota hydrattiin Parrin ravistelijassa 8 tuntia (4,1 baaria, 60 psi). Liuos suodatettiin ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin, trituroitiin dietyylieetterin kanssa ja 18,8 g (73 %:n saanto) harmahtavasta kiinteästä aineesta (cis-Ohi-OEt·HCl) kerättiin suodattamalla.

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, valmistettiin 13,5 g (93 %:n

saanto) Cbz-D-hPro-cis-Ohi-OEt:tä Cbz-D-hPro-OH:sta ja cis-Ohi-OEt·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 442 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{34}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 67,85, H 7,74, N 6,33

Havaittu: C 67,59, H 7,72, N 6,48.

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-D kuvattu, valmistettiin 12,5 g (102 %:n saanto) Cbz-D-hPro-cis-Ohi-OH:ta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 414 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{30}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 66,65, H 7,29, N 6,76

Havaittu: C 66,46, H 7,30, N 6.86.

B) Cbz-D-hPro-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-E kuvattu, valmistettiin 3,3 g (67 %:n saanto) Cbz-D-hPro-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:aa Cbz-D-hPro-Ohi-OH:sta ja p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz·2HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 681 (M^+)

C) D-hPro-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·3HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-F kuvattu, valmistettiin 2,2 g (66 %:n saanto)D-hPro-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·3HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 3000 minuuttia).

^{1}H-NMR

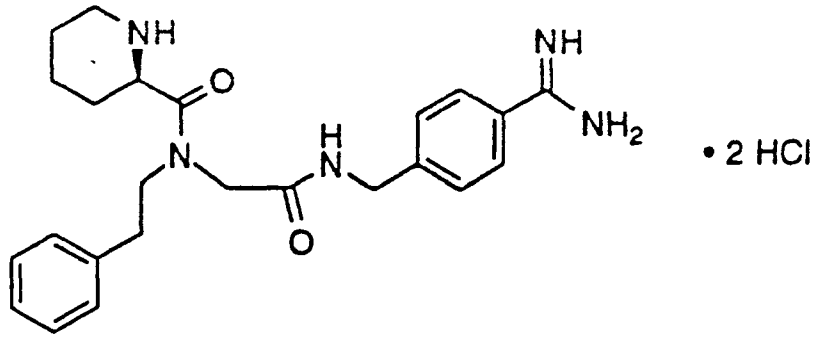
FD-MS, m/e 412 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_5O_2$·3HCl·0,5H$_2$O:lle:

Laskettu: C 52,13, H 7,04, N 13,22

Havaittu: C 51,98, H 7,04, N 13,35.

Esimerkki 21



• 2 HCl

D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$

(D-homoprolyyli-N(α)-(2-fenyylietyyli)-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]glysinamididihydrokloridi)

A) Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-OH:n valmistus

Liuokseen, jossa oli fenetyyliamiini (58 ml, 461 mmol) ja trietyyliamiini (21 ml, 154 mmol) etanolissa (200 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin bromietikkahapon t-butyyliesterin (30 g, 154 mmol) etanoliliuos (50 ml) yhden tunnin aikana. Kylmähaude jätettiin itsekseen ja liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan. Yli yön sekoittamisen jälkeen liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin 1 N sitruunahappoon. Vesiliuos pestiin kahdesti dietyylieetterillä, tehtiin emäksiseksi kiinteällä natriumbikarbonaatilla ja uutettiin sitten kolme kertaa etyyliasetaatilla (200 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja annettiin seistä 24 tuntia. Tuloksena oleva sakka suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 10,5 g valkoista kiinteää ainetta. Emäliuos konsentroitiin noin 100 ml:n tilavuuteen ja laimennettiin sitten dietyylieetterillä (400 ml). 30 minuutin seisotuksen jälkeen liuos suodatettiin, jolloin saatiin vielä 23,5 g valkoista kiinteää ainetta, yhdistettynä kaikkiaan 34 g (94 %:n saanto) N($PhCH_2CH_2$)Gly-O-t-Bu:ta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 235 (M^+)

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, valmistettiin 10,8 g (56 %:n saanto) Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-O-t-Bu:ta Cbz-D-hPro-OH:sta ja N($PhCH_2CH_2$)Gly-O-t-Bu:sta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 480 (M^+)

Analyysi $C_{28}H_{36}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 69,98, H 7,55, N 5,83

Havaittu: C 69,68, H 7,56, N 5,77.

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-A kuvattu Cbz-DL-1-Piq-Pro-O-t-Bu:n suojan poistamista varten, valmistettiin 9,2 g (100 %:n saanto) Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-OH:ta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 425 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{28}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 67,91, H 6,65, N 6,60

Havaittu: C 68,19, H 6,68, N 6,71.

B)Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(NH)NHCbz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-E kuvattu, valmistettiin 3,2 g (55 %:n saanto) Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:aa Cbz-D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-OH:sta ja p-$H_2NCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz\cdot 2HCl$:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 690 (M^+)

Analyysi $C_{40}H_{43}N_5O_6$:lle:

Laskettu: C 69,65, H 6,28, N 10,15

Havaittu: C 69,80, H 6,46, N 10,14.

C) D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(NH)NH_2\cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 19-F kuvattu, valmistettiin 770 mg (54 %:n saanto) D-hPro-N($PhCH_2CH_2$)Gly-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(NH)NH_2\cdot 2HCl$:ää.

Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 85/15:een (A/B), 120 minuuttia).

^{1}H-NMR

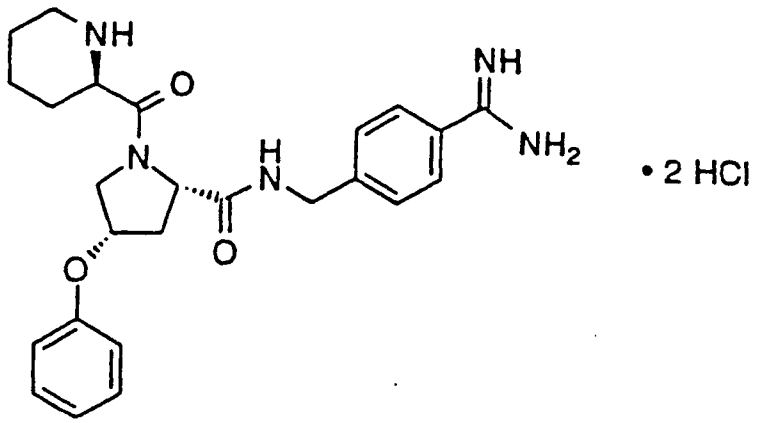
FD-MS, m/e 423 (M^+)

Analyysi $C_{240}H_{31}N_5O_2 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 58,30, H 6,73, N 14,16

Havaittu: C 58,05, H 6,60, N 14,28.

Esimerkki 22



D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl

(cis-D-homoprolyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-fenyyli]-metyyli]-4-fenoksi-L-prolinamidi-dihydrokloridi)

A) Cbz-D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-OH:n valmistus

Liuokseen, jossa oli Cbz-Pro(4-trans-OH)-Et (58,8 g, 200 mmol), trifenyylifosfiini (65,6 g, 250 mmol) ja fenoli (23,5 g, 250 mmol) tetrahydrofuraanissa (500 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin (tipoittain 1 tunnin kuluessa) liuos, jossa oli atsodikarboksyylihapon dietyyliesteri (40 ml, 250 mmol) tetrahydrofuraanissa (50 ml). Kylmähaude poistettiin sitten ja liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan (16 tuntia). Liuotin poistettiin sitten *in vacuo* ja jäljelle jäänyt meripihkan värinen siirappi trituroitiin dietyylieetterillä. Valkoinen kiinteä aine poistettiin suodattamalla ja suodos konsentroitiin. Jäännös ajettiin sitten piidioksidigeelikromatografiassa

(1 kg), ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 1:1 etyyliasetaatti/heksaani. Puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 36,3 g (50 %:n saanto) Cbz-Pro(4-cis-fenoksi)-OEt:tä värittömänä siirappina.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 369 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{23}NO_5$:lle:

Laskettu: C 68,28, H 6,28, N 3,79

Havaittu: C 68,38, H 6,30, N 3,89.

Liuokseen, jossa oli Cbz-Pro(4-cis-fenoksi)-OEt (25 g, 67,7 mmol) etanolissa (400 ml), lisättiin 5-prosenttinen palladoitu hiili (5 g). Sen jälkeen kun vetyä oli kuplitettu liuoksen läpi 3 tuntia, liuos suodatettiin piimaan läpi, 3 ml väkevää suolahappoa lisättiin ja liuos konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös suspensoitiin dietyylieetteriin voimakkaasti sekoittaen ja suodatettiin ja kuivattiin sitten, jolloin saatiin 14,2 g (77 %:n saanto) Pro(4-cis-fenoksi)-OEt·HCl:ää valkoisena kiinteänä aineena.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 235 (M^+)

Analyysi $C_{13}H_{18}NO_3Cl$:lle:

Laskettu: C 57,46, H 6,68, N 5,15

Havaittu: C 57,68, H 6,78, N 5,18.

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, 19,4 g (100 %:n saanto) Cbz-D-hPro-Pro(4-cis-fenoksi)-OEt:tä valmistettiin Cbz-D-hPro-OH:sta ja Pro(4-cis-fenoksi)-OEt·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 480 (M^+)

Analyysi $C_{27}H_{32}N_2O_6$:lle:

Laskettu: C 67,48, H 6,71, N 5,83

Havaittu: C 67,71, H 6,79, N 5,89.

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-D kuvattu, valmistettiin 16 g (100 %:n saanto) Cbz-D-hPro-Pro(4-cis-fenoksi)-OH:ta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 452 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{28}N_2O_6$:lle:

Laskettu: C 66,36, H 6,24, N 6,19

Havaittu: C 66,22, H 6,18, N 6,17.

B) Cbz-D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-p-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$C(NH)-NHCbz:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-E kuvattu, valmistettiin 4,55 g (75 %:n saanto) Cbz-D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:aa Cbz-D-hPro-pro-(4-cis-PhO)-OH:sta ja p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)-NHCbz·2HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 718 (M^+)

C) D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-p-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-F kuvattu, valmistettiin 873 mg (40 %:n saanto) D-hPro-Pro(4-cis-PhO)-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 85/15:een (A/B), 120 minuuttia).

^{1}H-NMR

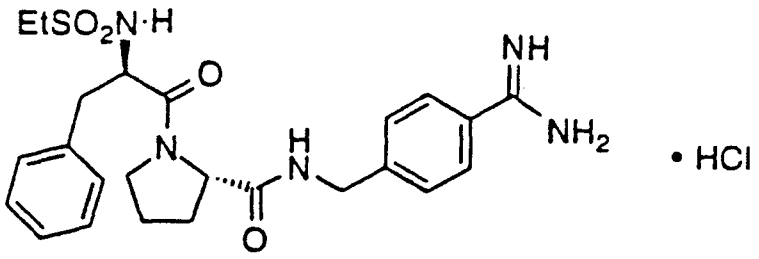
FD-MS, m/e 451 (MH^+)

Analyysi $C_{25}H_{31}N_5O_3$·2HCl:lle:

Laskettu: C 57,47, H 6,37, N 13,40

Havaittu: C 57,22, H 6,29, N 13,47.

Esimerkki 23



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$
(N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) p-NH_2CH_2-$C_6H_4CN \cdot HCl$:n valmistus

HCl-kaasua kuplitettiin sekoituksessa olevan liuoksen läpi, jossa oli N-Boc-p-aminometyylibentsonitriiliä (15 g, 64,6 mmol) etyyliasetaatissa (400 ml) 0 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia. Kylmähaude poistettiin ja 1,5 tunnin sekoituksen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös suspensoitiin dietyylieetteriin, suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 10,1 g (93 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 132 (M^+)

Analyysi $C_8H_9N_2Cl$:lle:

Laskettu: C 56,98, H 5,38, N 16,61, Cl 21,02

Havaittu: C 56,36, H 5,46, N 16,22, Cl 21,31.

B) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,5 g (80 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-C_6H_4CN:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-NH_2CH_2-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 468 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{28}N_4O_4S$:lle:

Laskettu: C 61,52, H 6,02, N 11,90

Havaittu: C 61,23, H 6,13, N 11,80.

C) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Liuokseen, jossa oli $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-C_6H_4CN (1 g, 2,1 mmol) absoluuttisessa etanolissa (35 ml), lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiini (0,47 ml, 2,7 mmol), mitä seurasi hydroksyyliamiinihydrokloridi (185 mg, 2,7 mmol) ja liuos tuotiin palautusjäähdytykseen. 16 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin ja liuottimet poistettiin *in vacuo*. 250 mg tätä materiaalia otettiin seuraavaan vaiheeseen ja jäljellä oleva materiaali puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 90/10 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 200 minuuttia).

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 501 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{31}N_5O_5S \cdot 1,2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,17, H 6,12, N 12,42, Cl 7,55

Havaittu: C 51,04, H 5,81, N 12,39, Cl 7,18.

D) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Liuokseen, jossa oli $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$ (250 mg, 0,52 mmol) etanolissa (40 ml) ja vedessä (19 ml), lisättiin 1 N HCl (1 ml), jota seurasi 5-prosenttinen palladoitu hiili (250 mg). Sekoituksessa oleva suspensio sijoitettiin sitten vety-ilmakehään 18 tunniksi ja sitten suodatettiin, konsentroitiin ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 1, 90/10 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 200 minuuttia), jolloin saatiin 140 mg (52 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 486 (M^+)

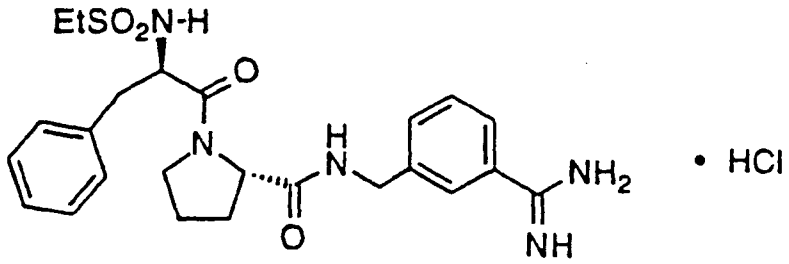
Analyysi $C_{24}H_{31}N_5O_4S \cdot HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,50, H 6,42, N 12,75

Havaittu: C 52,56, H 6,19, N 12,59.

Vielä 5 g tuotetta valmistettiin esimerkissä 15 kuvatuilla menetelmillä ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 3, 98/2 (A/B), 60 minuuttia, nousu 60/40:een (A/B), 300 minuuttia).

Esimerkki 24



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$

A) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23 kuvatut, $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$ valmistettiin käyttämällä m-$BrCH_2$-C_6H_4CN:ää p-$BrCH_2$-C_6H_4CN:n tilalla. 140 mg (13 %:n saanto) tätä kiteistä välituotetta otettiin talteen ja loput materiaalista otettiin vaiheeseen B.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 502 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{31}N_5O_5S$:lle:

Laskettu: C 57,47, H 6,23, N 13,96

Havaittu: C 57,28, H 6,21, N 13,66.

B) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkeissä 23-C ja 23-D kuvattu, valmistettiin 0,27 g (28 %, 2 vaihetta) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

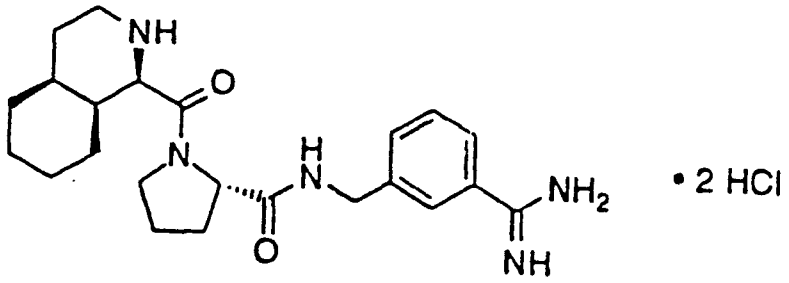
FD-MS, m/e 486 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{31}N_5O_4S \cdot 1,1HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,32, H 6,48, N 12,47, Cl 6,94

Havaittu: C 51,33, H 6,09, N 12,20, Cl 6,66.

Esimerkki 25



D-1-Piq-Pro-m-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$C(=NH)NH$_2$·HCl

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23 kuvattu, valmistettiin 0,86 g D-1-Piq-Pro-m-NHCH$_2$-C$_6$H$_4$C(=NH)NH$_2$·HCl:ää Cbz-D-1-Piq-Pro-OH:sta ja m-NH$_2$CH$_2$-C$_6$H$_4$CN·HCl:stä.

^{1}H-NMR

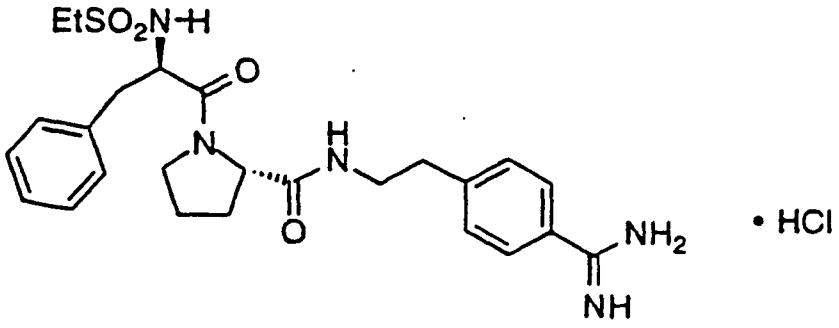
FD-MS, m/e 412 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_5O_2 \cdot 2,5HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,99, H 7,19, N 13,69

Havaittu: C 54,19, H 7,02, N 13,81.

Esimerkki 26



EtSO$_2$-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$CH$_2$-C$_6$H$_4$C(=NH)NH$_2$·HCl

A) p-syaani-trans-kanelihapon metyyliesterin valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli NaH:ta (6,1 g 60-prosenttista öljysuspensiota, 153 mmol) ja p-syaanibentsaldehydiä (20 g, 153 mmol) tetrahydrofuraanissa (250 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin additiosuppilon välityksellä fosfonietikkahapon trimetyyliesterin (28 g, 153 mmol) liuos tetrahydrofuraanissa (50 ml). 48 tunnin sekoituksen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja epäpuhdas jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (500 ml). Etyyliasetaattiliuos pestiin kerran vedellä, kolme kertaa kyllästetyllä $NaHSO_3$-vesiliuoksella ja kerran suolavedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 28 g (98 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 187 (M^+)

B) p-syaani-dihydrokanelihapon metyyliesterin valmistus

Liuokseen, jossa oli p-syaani-trans-kanelihapon metyyliesteri (13,6 g, 73 mmol) tolueenissa (485 ml), lisättiin 5-prosenttinen $Pd/BaSO_4$ (2,7 g). Kun oli kulunut 9 tuntia vetykaasun alla 4 baarin paineessa (60 psi), liuos suodatettiin, konsentroitiin *in vacuo* ja ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 30 % etyyliasetaatti/heksaani. Tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 10,6 g (77 %:n saanto) väritöntä öljyä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 189 (M^+)

C) p-syaani-dihydrokanelihapon valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-D kuvattu, käyttämällä 1,1 ekvivalent-

tia $LiOH \cdot H_2O$:ta, valmistettiin 5,1 g (58 %:n saanto) p-syaani-dihydrokanelihappoa p-syaani-dihydrokanelihapon metyyliesteristä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 175 (M^+)

D) Boc-p-$NHCH_2CH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Liuokseen, jossa oli p-syaani-dihydrokanelihappo (6,7 g, 38,2 mmol) ja trietyyliamiini (5,9 ml, 42 mmol) t-butanolissa (150 ml), lisättiin difenyylifosforyyliatsidi (11,6 g, 42 mmol) ja liuos tuotiin palautusjäähdytykseen. Yli yön sekoittamisen jälkeen liuos jäähdytettiin ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja pestiin kolme kertaa 1 N sitruunahapolla, kerran suolavedellä, kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella, ja sitten kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös ajettiin sitten piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena 10 % etyyliasetaatti/heksaani - 50 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 5,4 g (57 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 246 (M^+)

Analyysi $C_{14}H_{18}N_2O_2$:lle:

Laskettu: C 68,27, H 7,37, N 11,37

Havaittu: C 68,39, H 7,50, N 11,40.

E) p-$NH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 3,6 g (98 %:n saanto) p-$NH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN·HCl:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 147 (M^+)

Analyysi $C_9H_{11}N_2Cl$:lle:

Laskettu: C 59,18, H 6,07, N 15,34, Cl 19,41

Havaittu: C 58,90, H 6,16, N 15,20, Cl 19,30.

F) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 1,5 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-C_6H_4CN:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-$NH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 482 (M^+)

G) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-C_6H_4CN (1 g, 2,07 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (0,45 ml, 2,59 mmol), lisättiin hydroksyyliamiinihydrokloridi (180 mg, 2,59 mmol) ja liuos tuotiin palautusjäähdytykseen. 18 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin, liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etikkahappoon (15 ml) ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 90/10 (A/B), nousu 60/40:een (A/B), 200 minuutin aikana). Fraktiot, jotka sisälsivät analyyttisen RPHPLC:n perusteella puhtaan $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:n, yhdistettiin ja pH säädettiin edellä kuvatulla tavalla, ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 0,35 g (31 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 516 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{33}N_5O_5S \cdot HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,67, H 6,36, N 12,28, Cl 6,22

Havaittu: C 52,40, H 6,10, N 12,25, Cl 6,51.

H) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-D kuvattu, 0,098 g (50 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää valmistettiin $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

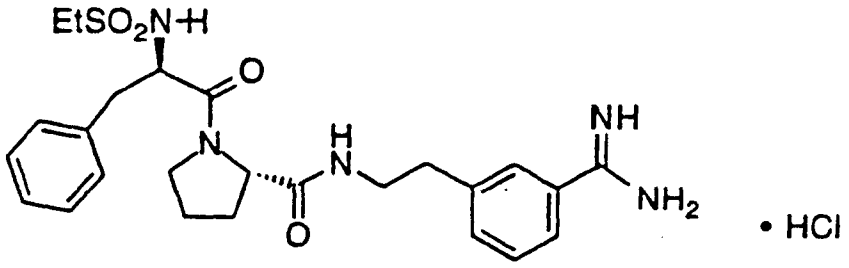
FD-MS, m/e 500 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{33}N_5O_4S \cdot 2,6HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,03, H 6,19, N 11,44

Havaittu: C 48,87, H 5,79, N 11,15.

Esimerkki 27



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$

A) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkeissä 26-A - 26-E ja 24-A kuvattu, valmistettiin 0,15 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$:ta m-syaanibentsaldehydistä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 516 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{33}N_5O_5S$:lle:

Laskettu: C 58,23, H 6,45, N 13,50

Havaittu: C 57,99, H 6,57, N 13,28.

B) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkeissä 24-B kuvattu, valmistettiin 0,21 g (20 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$:sta.

^{1}H-NMR

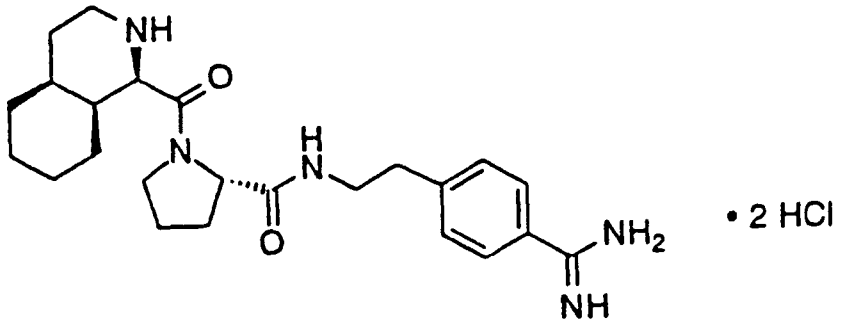
FD-MS, m/e 500 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{33}N_5O_4S \cdot 2,1HCl \cdot 0,7H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,00, H 6,25, N 11,89

Havaittu: C 50,79, H 5,86, N 11,54.

Esimerkki 28



D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23 kuvattu, valmistettiin 0,85 g D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää CBz-D-1-Piq-Pro-OH:sta ja p-$NH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

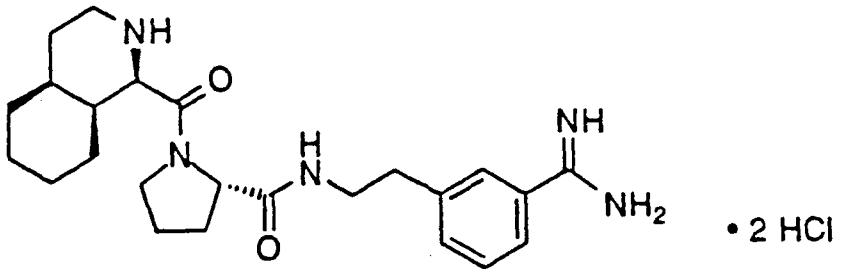
FD-MS, m/e 426 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{35}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,93, H 7,73, N 13,10

Havaittu: C 53,94, H 7,60, N 13,06.

Esimerkki 29



D-1-Piq-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23 kuvattu, valmistettiin 0,8 g 1-Piq-Pro-m-$NHCH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää CBz-D-1-Piq-Pro-OH:sta ja m-$NH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

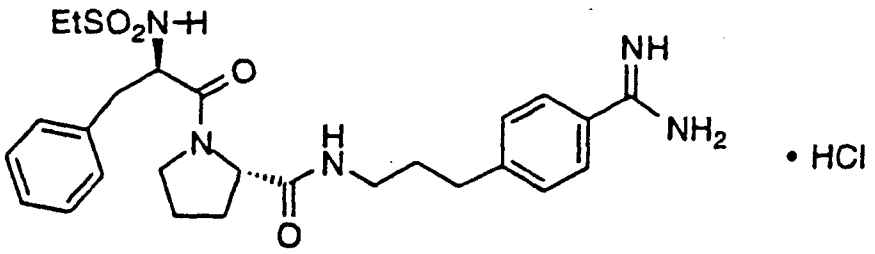
FD-MS, m/e 426 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{35}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,93, H 7,73, N 13,10

Havaittu: C 53,62, H 7,57, N 13,18.

Esimerkki 30



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$

A) p-$HOCH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli metyyli-p-syaanidihydrosinnamaattia (10 g, 53 mmol) tetrahydrofuraanissa (150 ml), lisättiin $LiBH_4$ (1,15 g, 53 mmol) ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 2 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin ja natriumfosfaattipuskuri (pH

7) lisättiin tipoittain. Sen jälkeen kun kaasunkehitys oli mennyt loppuun, etyyliasetaatti ja vesi lisättiin ja kerrokset erotettiin. Vesifaasi uutettiin kerran etyyliasetaatilla ja yhdistetyt etyyliasetaattifaasit pestiin suolavedellä, kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 8,1 g (95 %:n saanto) paksua väritöntä öljyä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 161 (M^+)

B) p-$BrCH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli p-$HOCH_2$-CH_2CH_2-C_6H_4CN (8,1 g, 50 mmol) tetrahydrofuraanissa (100 ml), lisättiin trifenyylifosfiini (14,4 g, 55 mmol), jota seurasi hiilitetrabromidi (18,2 g, 55 mmol). 18 tunnin sekoituksen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 20 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 7,3 g (65 %:n saanto) paksua väritöntä öljyä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 223 (M^+)

Analyysi $C_{10}H_{10}BrN$:lle:

Laskettu: C 53,60, H 4,50, N 6,25

Havaittu: C 53,90, H 4,67, N 6,24.

C) p-$Boc_2NCH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN:n valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli NaH (1,4 g 60-prosenttista öljysuspensiota, 34 mmol) DMF:ssä (100 ml), lisättiin tipoittain iminodikarboksyylihapon di-t-butyyliesterin (7,4 g, 34 mmol) liuos DMF:ssä (20 ml) additiosuppilon kautta. Sen jälkeen kun kaasunmuodostus oli mennyt loppuun, p-$BrCH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN:n (7 g, 31 mmol) liuos DMF:ssä lisättiin additiosuppilon kautta ja liuos

kuumennettiin 70 °C:n lämpötilaan. 12 tunnin sekoittamisen jälkeen liuos jäähdytettiin ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin dietyylieetteriin ja pestiin kolme kertaa vedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin, ja jäännös ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena heksaani - 20 % etyyliasetaatti/heksaani. Tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 9,38 g (84 %:n saanto) valkoista kiinteätä ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 361 (M^+)

Analyysi $C_{20}H_{28}N_2O_4$:lle:

Laskettu: C 66,64, H 7,83, N 7,77

Havaittu: C 66,40, H 7,81, N 7,57.

D) p-$NH_2CH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23-A kuvatut, valmistettiin 4,3 g (84 %:n saanto) p-$NH_2CH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN·HCl:ää.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 160 (M^+)

E) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-G ja 26-G kuvatut, valmistettiin 0,32 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2$·HCl:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-$NHCH_2CH_2CH_2$-C_6H_4CN·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 530 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{35}N_5O_5S·1,2HCl·H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,88, H 6,51, N 11,84

Havaittu: C 52,71, H 6,26, N 11,76.

F) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-D kuvattu, valmistettiin 0,13 g (67 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:stä.

IR

^{1}H-NMR

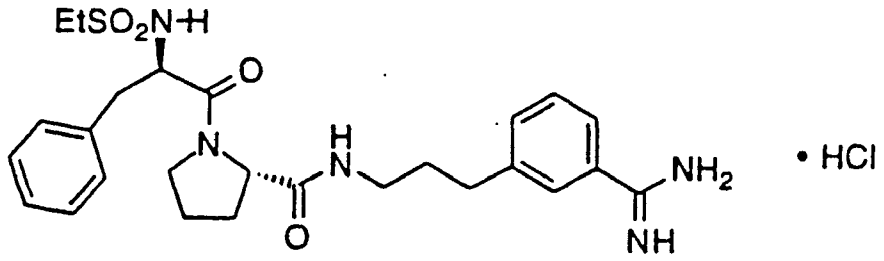
FD-MS, m/e 514 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot 1,5HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,67, H 6,75, N 11,59

Havaittu: C 51,36, H 6,46, N 11,28.

Esimerkki 31



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$

A) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-G ja 26-G kuvatut, valmistettiin 0,32 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:ää m-syaanidihydrokanelihaposta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 530 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{35}N_5O_5S \cdot HCl \cdot 1,1H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,30, H 6,57, N 11,95, Cl 6,05

Havaittu: C 52,97, H 6,19, N 11,96, Cl 6,13.

B) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-D kuvattu, valmistettiin 0,12 g (62 %:n saanto) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NOH)NH_2 \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

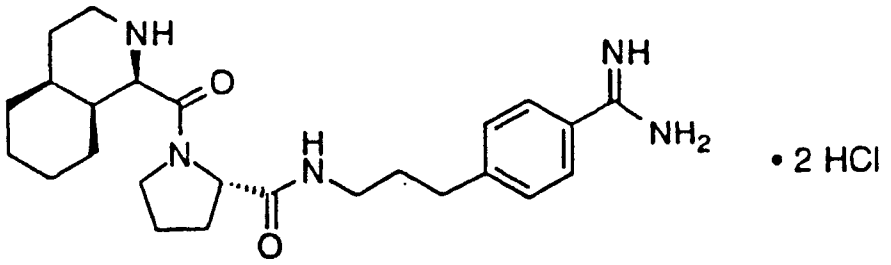
FD-MS, m/e 514 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot 1,5HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,26, H 6,62, N 11,94

Havaittu: C 53,19, H 6,25, N 12,00.

Esimerkki 32



1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23 kuvattu, valmistettiin 0,66 g (48 %:n saanto) 1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää 1-Piq-Pro-OH:sta ja p-$NH_2CH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

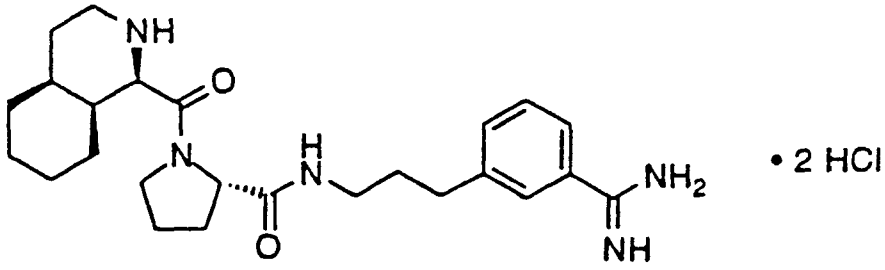
FD-MS, m/e 440 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{37}N_5O_2 \cdot 2,1HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 56,21, H 7,75, N 13,11

Havaittu: C 56,36, H 7,44, N 12,79.

Esimerkki 33



1-Piq-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23 kuvattu, valmistettiin 0,64 (46 %:n saanto) 1-Piq-Pro-m-$NHCH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4C(=NH)NH_2 \cdot HCl$:ää 1-Piq-Pro-OH:sta ja m-$NH_2CH_2CH_2CH_2$-$C_6H_4CN \cdot HCl$:stä.

^{1}H-NMR

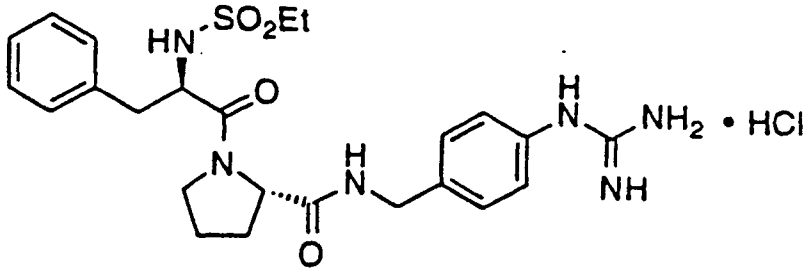
FD-MS, m/e 440 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{37}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 56,60, H 7,79, N 13,20

Havaittu: C 56,92, H 7,55, N 13,26.

Esimerkki 34



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) Boc-p-$NHCH_2C_6H_4NO_2$:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 4-nitrobentsyyliamiinihydrokloridi (15 g, 79 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (14 ml, 79 mmol) dikloorimetaanissa (200 ml), lisättiin di-t-butyylidikarbonaattia (17 g, 79 mmol). 48 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja

jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (500 ml) ja pestiin kahdesti 1 M sitruunahapolla, kerran vedellä ja kerran kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin harmahtava kiinteä aine, joka jälleenkiteytettiin kloroformi/heksaaneista. Kolme erää yhdistettiin, pestiin heksaaneilla ja kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin 11,5 g (58 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 252 (M^+)

Analyysi $C_{12}H_{16}N_2O_4$:lle:

Laskettu: C 57,13, H 6,39, N 11,10

Havaittu: C 57,27, H 6,60, N 11,13.

B) p-BocNHCH$_2$C$_6$H$_4$NH$_2$:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli p-BocNH-$CH_2C_6H_4NO_2$ (7,5 g, 29,7 mmol) ja $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (17,7 g, 74,3 mmol) metanolissa (150 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin $NaBH_4$ (5,6 g, 149 mmol) pieninä annoksina 30 minuutin aikana. Sen jälkeen kun $NaBH_4$:n additio oli täydellinen ja 15 minuutin kuluttua, liuotin haihdutettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin väkevään ammoniumhydroksidiin ja uutettiin kahdesti dikloorimetaanilla. Yhdistetyt orgaaniset uutokset pestiin suolavedellä, kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 6,4 g (97 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 222 (M^+)

Analyysi $C_{12}H_{18}N_2O_4$:lle:

Laskettu: C 64,84, H 8,16, N 12,60

Havaittu: C 65,10, H 8,42, N 12,76.

C) N,N-di-Cbz-S-metyyli-isotiourean valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli bis-S-metyyli-isotioureasulfaatti (20 g, 144 mmol) dikloorimetaanissa (200 ml), lisättiin 5 N natriumhydroksidi (16 ml). Liuos jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan ja bentsyyliklooriformiaatti (41 ml, 288 mmol) lisättiin tipoittain. Samaan aikaan 2 N natriumhydroksidi lisättiin nopeudella, joka piti liuoksen pH:n noin arvossa 11. Kylmähaude poistettiin sitten ja huoneenlämpötilaan lämmittämisen jälkeen faasit erotettiin ja vesifaasi uutettiin dikloorimetaanilla (250 ml). Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin sitten kahdesti 0,1 N HCl:llä (250 ml) ja kerran suolavedellä (250 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 41 g (79 %:n saanto) paksua, väritöntä siirappia.

^{1}H-NMR

D) p-BocNHCH$_2$C$_6$H$_4$NHC(NCbz)NHCbz:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli p-BocNH-$CH_2C_6H_4NH_2$ (5 g, 22,5 mmol) tetrahydrofuraanissa (50 ml), lisättiin N,N'-di-Cbz-S-metyyli-isotiourea (8,9 g, 24,7 mmol). 48 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin kloroformiin. Piidioksidigeeli lisättiin ja liuotin poistettiin *in vacuo*, jolloin saatiin harmahtava jauhe, joka ladattiin sitten kuivana piidioksidigeelipylvääseen. Pylväs eluoitiin sitten portaittaisella gradientilla, 5 % etyyliasetaatti/heksaani - 30 % etyyliasetaatti/heksaani. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:llä määritettynä) yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 7,6 g (63 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 532 (M^+)

Analyysi $C_{29}H_{32}N_4O_6$:lle:

Laskettu: C 65,40, H 6,06, N 10,52

Havaittu: C 65,66, H 6,35, N 10,59.

E) HCl·p-$NH_2CH_2C_6H_4NHC(NCbz)NHCbz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 4,7 g (89 %:n saano) HCl·p-$NH_2CH_2C_6H_4NHC(NCbz)NHCbz$:ää, valkoista kiinteää ainetta, p-$BocNHCH_2C_6H_4NHC(NCbz)NHCbz$:sta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 433 (MH^+)

F) $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2$·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-G ja esimerkissä 18-F kuvatut, valmistettiin 1,1 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2$·HCl:ää $EtSO_2$-D-Phe-ProOH:sta ja HCl·p-$NH_2CH_2C_6H_4NHC(NCbz)NHCbz$:sta.

IR

^{1}H-NMR

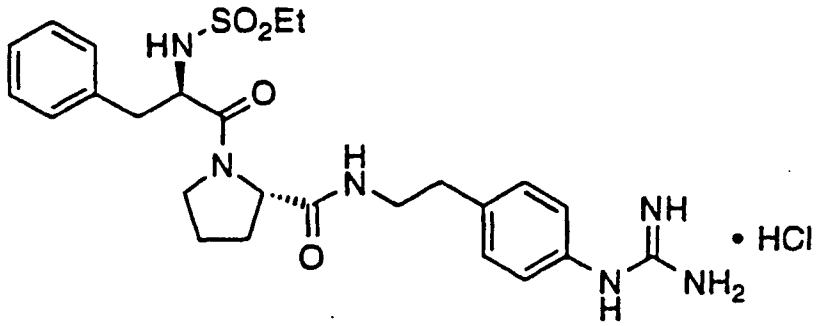
FD-MS, m/e 501 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{32}N_6O_4S$·HCl·H_2O:lle:

Laskettu: C 51,73, H 6,36, N 15,14

Havaittu: C 52,32, H 5,99, N 14,79.

Esimerkki 35



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2$·HCl

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 34 kuvatut, valmistettiin 1,8 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4CNH(NH)NH_2$·HCl:ää 4-nitrofenetyyliamiini·HCl:stä.

IR

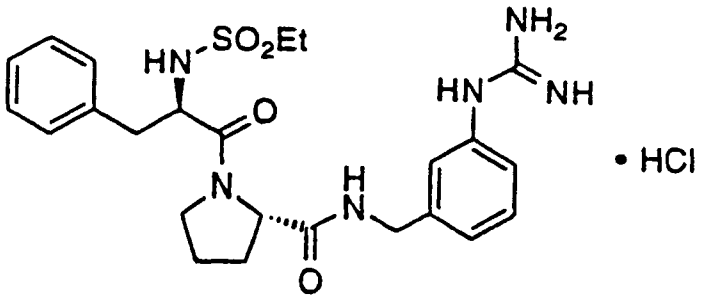
^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 515 (MH^+)

HRMS (FAB) m/e laskettu $C_{25}H_{35}N_6O_4S$:lle: 515,2441

Havaittu: 515,2483

Esimerkki 36



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 30-C ja 34-B - 34-F kuvatut, valmistettiin 1,8 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää 3-nitrobentsyylibromidista.

IR

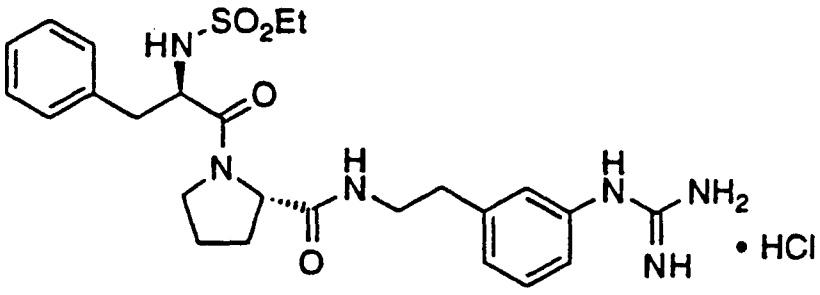
^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 501 (MH^+)

HRMS (FAB) m/e laskettu $C_{24}H_{33}N_6O_4S$:lle: 501,2284

Havaittu: 501,2280

Esimerkki 37



$EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 26-D, 26-B (käyttäen 5-prosenttista palladoitua hiiltä $Pd/BaSO_4$:n sijasta ja etyyliasetaattia tolueenin sijasta) ja 34-D - 34-F, valmistettiin 0,85 g $EtSO_2$-D-Phe-Pro-m-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää 3-nitrokanelihaposta.

^{1}H-NMR

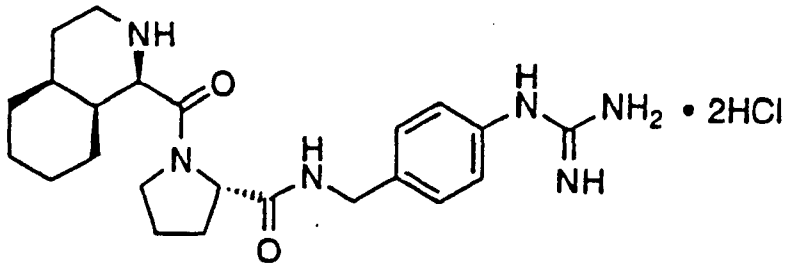
FD-MS, m/e 515 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{34}N_6O_4S \cdot 2,2HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,73, H 6,21, N 13,92

Havaittu: C 49,45, H 5,82, N 13,55.

Esimerkki 38



D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 34 kuvatut, valmistettiin 0,94 g D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 180 minuuttia).

^{1}H-NMR

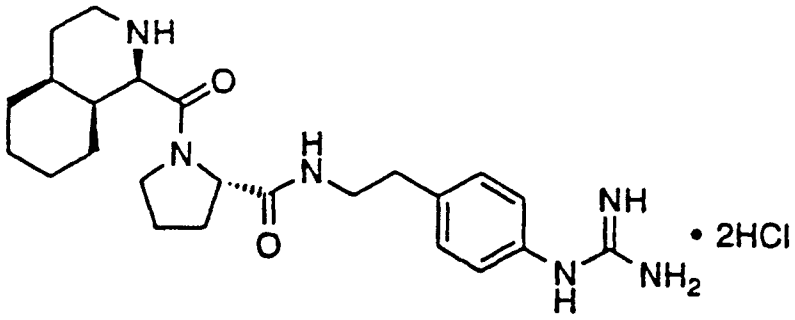
FD-MS, m/e 427 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{34}N_6O_2 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 55,31, H 7,26, N 16,82, Cl 14,20

Havaittu: C 55,05, H 7,23, N 16,55, Cl 14,24.

Esimerkki 39



D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 35 kuvatut, valmistettiin 1,03 g D-1-Piq-Pro-p-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 180 minuuttia).

^{1}H-NMR

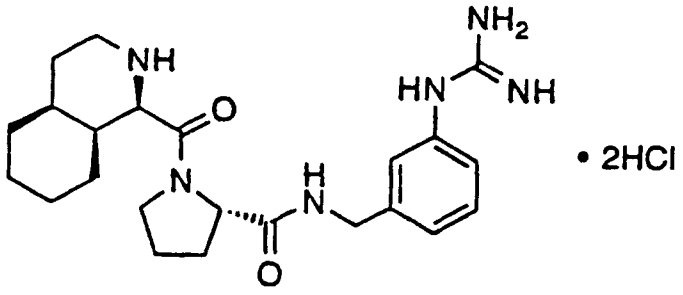
FD-MS, m/e 441 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{36}N_6O_2 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,33, H 7,65, N 15,55, Cl 13,12

Havaittu: C 53,41, H 7,45, N 15,37, Cl 13,48.

Esimerkki 40



D-1-Piq-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 36 kuvatut, valmistettiin 1,04 g D-1-Piq-Pro-m-$NHCH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. Lopputuote puhdistettiin

RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 180 minuuttia).

^{1}H-NMR

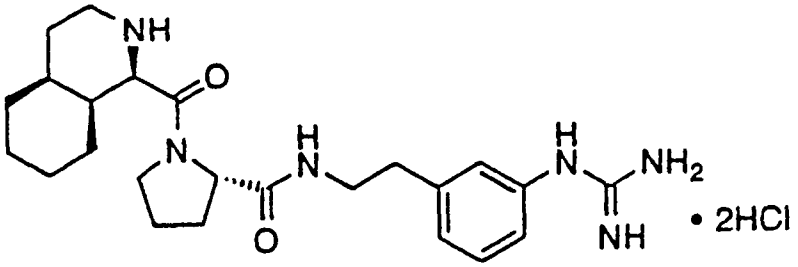
FD-MS, m/e 427 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{34}N_6O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,38, H 7,40, N 16,24, Cl 13,70

Havaittu: C 53,25, H 7,50, N 16,23, Cl 13,88.

Esimerkki 41



D-1-Piq-Pro-m-NHCH$_2$CH$_2$C$_6$H$_4$NHC(NH)NH$_2$·2HCl

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 37 kuvatut, valmistettiin 0,96 g D-1-Piq-Pro-m-$NHCH_2CH_2C_6H_4NHC(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 70/30:een (A/B), 180 minuuttia).

^{1}H-NMR

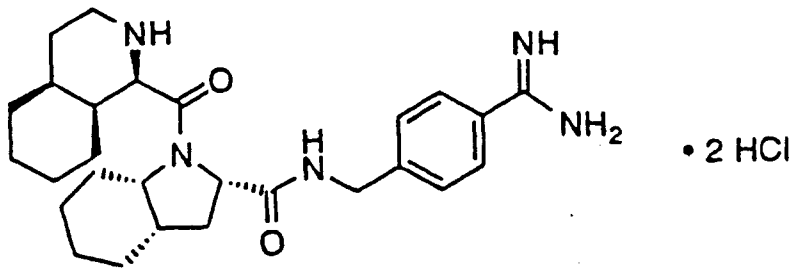
FD-MS, m/e 441 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{36}N_6O_2 \cdot 2,1HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,97, H 7,61, N 15,44, Cl 13,68

Havaittu: C 52,80, H 7,57, N 15,46, Cl 13,35.

Esimerkki 42



D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$NHC(NH)NH$_2$·2HCl

A) CBz-DL-1-Piq-cis-Ohi-OEt:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, 1,6 g (100 %:n saanto) CBz-DL-1-Piq-cis-Ohi-OEt:tä valmistettiin Cbz-DL-1-Piq-OH:sta ja cis-Ohi-OEt·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 496 (M^+)

Analyysi $C_{29}H_{40}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 70,13, H 8,12, N 5,64

Havaittu: C 69,96, H 8,23, N 5,73.

B) Cbz-D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-D ja 18-E kuvatut, Cbz-D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz ja Cbz-L-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C-(NH)NHCbz valmistettiin Cbz-D,L-1-Piq-Pro-OH:sta ja p-H$_2$-NCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz·2HCl:stä. Nämä diastereomeerit erotettiin piidioksidigeelikromatografialla käyttämällä etyyliasetaatti/heksaani-gradienttia., johtavan diastereomeerin (Rf = 0,31, etyyliasetaatti) sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 1,3 g Cbz-L-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:aa. Jälkimmäisen diastereomeerin (Rf = 0,19, etyyliasetaatti) sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 1,5 g Cbz-D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:aa valkoisena vaahtona.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 735 (MH^+)

Analyysi $C_{43}H_{51}N_5O_6$:lle:

Laskettu: C 70,37, H 7,00, N 9,54

Havaittu: C 70,20, H 7,22, N 9,36.

C) D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-F kuvattu, 0,61 g (63 %:n saanto) D-1-Piq-cis-Ohi-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl:ää valmistettiin Cbz-D-1-

Piq-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:sta. Tässä tapauksessa käytetty HPLC-gradientti oli nousu 98/2 A/B - 70/30 A/B 120 minuutin aikana.

^{1}H-NMR

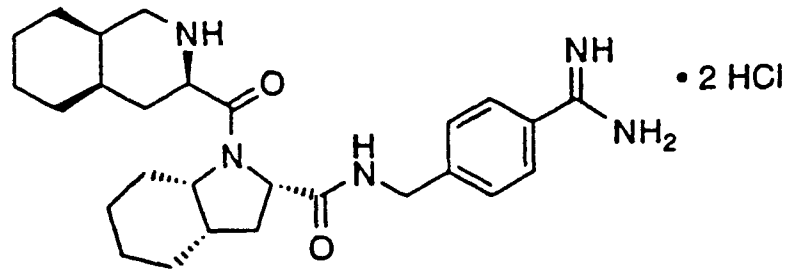
FAB-MS, m/e 466,4 (MH^+)

Analyysi $C_{27}H_{39}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 1H_2O$:lle:

Laskettu: C 58,27, H 7,79, N 12,58

Havaittu: C 58,66, H 7,56, N 12,78.

Esimerkki 43



D-3-Piq-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$

A) D-3-Piq-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-A, 1-D, 18-E ja 18-F kuvatut, valmistettiin 1,3 g 3-Piq-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. Tässä tapauksessa käytetty HPLC-gradientti oli nousu 98/2 A/B - 70/30 A/B, 120 minuutin aikana.

^{1}H-NMR

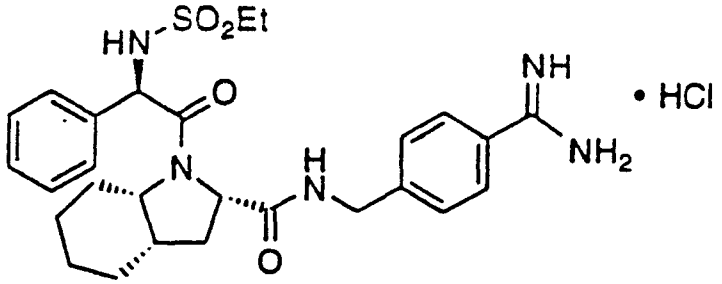
FAB-MS, m/e 466,4 (MH^+)

Analyysi $C_{27}H_{39}N_5O_2 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 60,22, H 7,67, N 13,00

Havaittu: C 59,95, H 7,73, N 12,89.

Esimerkki 44



$EtSO_2$-Phg-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
((S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-1-[N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyyliglysyyli]-1H-indoli-2-karboksamidihydrokloridi)

A) Boc-D-Phg-cis-Ohi-OEt:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-A kuvattu, valmistettiin 14,9 g (58 %:n saanto) Boc-D-Phg-cis-Ohi-OEt:tä Boc-D-Phg-OH:sta ja (S)-cis-oktahydroindoli-2-karboksyylihapon etyyliesteri·HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 430 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{34}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 66,95, H 7,96, N 6,51

Havaittu: C 66,69, H 8,02, N 6,40.

B) D-Phg-cis-Ohi-OEt·HCl:n valmistus

Kylmään (0 °C), sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli Boc-D-Phg-cis-Ohi-OEt etyyliasetaatissa, kuplitettiin HCl-kaasua 10 minuutin ajan. 2 tunnin sekoittamisen jälkeen, samalla kun lämmitettiin huoneenlämpötilaan, liuotin poistettiin *in vacuo*. Tuloksena oleva kiinteä aine suspensoitiin dietyylieetteriin ja eristettiin tämän jälkeen suodattamalla, jolloin saatiin 10,7 g (97 %:n saanto) D-Phg-cis-Ohi-OEt·HCl:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 331 (M^+)

Analyysi $C_{19}H_{27}N_2O_3Cl$:lle:
Laskettu: C 62,20, H 7,41, N 7,64
Havaittu: C 62,42, H 7,36, N 7,85.

C) $EtSO_2$-D-Phg-cis-Ohi-OEt:n valmistus

Liuokseen, jossa oli D-Phg-cis-Ohi-OEt·HCl (10 g, 27 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (10,7 ml, 61 mmol) THF:ssä (200 ml) -78 °C:n lämpötilassa, lisättiin tipoittain additiosuppilon välityksellä liuos, jossa oli etaanisulfonyylikloridia (3,9 g, 30 mmol) THF:ssä (20 ml). Kylmähaude jätettiin sitten itsekseen ja liuos lämpeni hitaasti huoneenlämpötilaan. Noin 18 tunnin kuluttua liuos konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (200 ml), pestiin kahdesti kummallakin keralla 1 N sitruunahapolla (200 ml), kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (200 ml) ja suolavedellä (200 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 11,2 g (97 %:n saanto) keltaista vaahtoa.

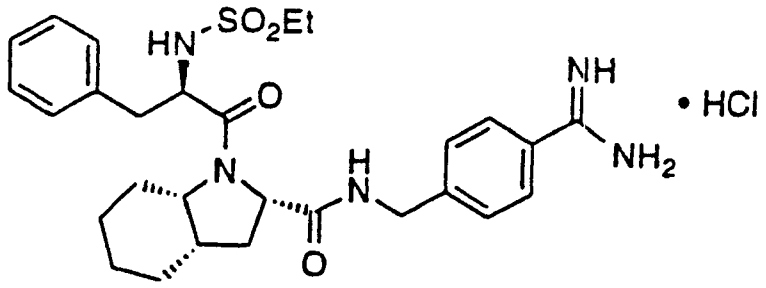
^{1}H-NMR
FD-MS, m/e 422 (M^+)
Analyysi $C_{21}H_{30}N_2O_5S$:lle:
Laskettu: C 59,69, H 7,16, N 6,63
Havaittu: C 59,94, H 7,08, N 6,78.

D) $EtSO_2$-Phg-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-D, 18-E ja 18-F kuvatut, saatiin 0,62 g $EtSO_2$-Phg-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$·2HCl:ää. Tässä tapauksessa käytetty HPLC-gradientti oli nousu 90/10 A/B - 60/40 A/B, 120 minuutin aikana.

^{1}H-NMR
FAB-MS, m/e 526,3 (MH^+)
Analyysi $C_{27}H_{35}N_5O_4S$·HCl:lle:
Laskettu: C 57,69, H 6,45, N 12,46
Havaittu: C 57,47, H 6,48, N 12,20.

Esimerkki 45



$EtSO_2$-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

((S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-1-[N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli]-1H-indoli-2-karboksamidihydrokloridi)

A) $EtSO_2$-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 44 kuvattu, 1,5 g $EtSO_2$-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää valmistettiin Boc-D-Phe-OH:sta.

^{1}H-NMR

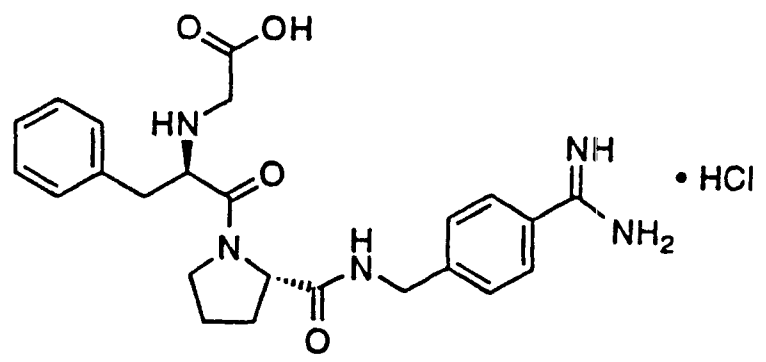
FAB-MS, m/e 540,3 (MH^+)

Analyysi $C_{28}H_{37}N_5O_4S \cdot HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 56,51, H 6,94, N 11,77

Havaittu: C 56,24, H 6,55, N 11,72.

Esimerkki 46



$HOOCCH_2$-D-Phe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

(N-(karboksimetyyli)-D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-OBn:n valmistus

Liuokseen, jossa oli D-Phe-pro-OBn·HCl (20 g, 51 mmol) DMF:ssä (100 ml), lisättiin bromietikkahapon t-butyyliesteri (9,9 g, 56 mmol) yhtenä annoksena ja N,N-diisopropyylietyyliamiini (17,4 ml, 101 mmol) tipoittain 30 minuutin aikana. Tämän seoksen annettiin sekoittua 18 tuntia huoneenlämpötilassa. Di-t-butyylidikarbonaatti (16,6 g, 76 mmol) ja N,N-di-isopropyylietyyliamiini (13,2 ml, 76 mmol) lisättiin sitten yhtenä annoksena ja reaktion annettiin sekoittua vielä 24 tuntia. Liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin etyyliasetaatin (1 litra) ja 1 M sitruunahapon vesiliuoksen (500 ml) välillä. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kerran 1 M sitruunahapon vesiliuoksella, kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella ja kerran suolavedellä (500 ml kutakin). Orgaaninen faasi kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Meripihkan värinen öljy puhdistettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena etyyliasetaatti/heksaani-gradientti (heksaani - 30 % etyyliasetaatti/heksaani). Tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 19,0 g (66 %:n saanto) väritöntä öljyä, joka seisoessaan kiteytyi hitaasti.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 566 (M^+)

Analyysi $C_{32}H_{42}N_2O_7$:lle:

Laskettu: C 67,82, H 7,47, N 4,94

Havaittu: C 68,06, H 7,33, N 5,17.

B) N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-OH:n valmistus

N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-OBn:n (18,5 g, 33 mmol) liuokseen etyyliasetaatissa (250 ml) lisättiin 5-prosenttinen palladoitu hiili katalysaattoriksi (5 g). Tästä liuoksesta poistettiin kaasu *in vacuo* useita kertoja ja se sijoitettiin vetyilmakehän alle 2 tunniksi sekoituksessa. Ilmapallo poistettiin, piimaa lisättiin ja liete

suodatettiin piimaakerroksen läpi. Suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 13,2 g (84 %:n saanto) valkoista vaahtoa.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 476 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{36}N_2O_7$:lle:

Laskettu: C 63,01, H 7,61, N 5,88

Havaittu: C 63,23, H 7,73, N 5,59.

C) N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)-NHCbz:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-E kuvattu, 2,7 g (90 %:n saanto) N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:aa valmistettiin N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-OH:sta ja p-H$_2$NCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz·2HCl:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 743 (MH^+)

Analyysi $C_{41}H_{51}N_5O_8$:lle:

Laskettu: C 66,38, H 6,93, N 9,44

Havaittu: C 66,08, H 6,92, N 9,16.

D) HOOCCH$_2$-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·HCl:n valmistus

N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)-NHCbz:n (2,2 g, 3 mmol) jäähdytettyyn (0 °C) liuokseen dioksaanissa (100 ml) kuplitettiin HCl-kaasua 10 minuutin ajan. 3 tunnin sekoittamisen jälkeen, samalla kun liuos lämpeni huoneenlämpötilaan, dioksaani poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin seokseen, jossa oli absoluuttista etanolia (150 ml), vettä (75 ml) ja 1 N HCl:ää (6 ml). Tähän lisättiin 5-prosenttinen palladoitu hiili (1 g). Alipainetta käyttämällä tapahtuneen kaasun poiston jälkeen tämä seos sijoitettiin vetyilmakehän alle 16 tunniksi, samalla kun sekoitettiin huoneenlämpötilassa. Piimaa lisättiin ja tuloksena oleva liete suodatettiin piimaakerroksen läpi. Suodos konsentroitiin *in vacuo* jäännök-

seksi ja tämä puhdistettiin heti HPLC-menetelmällä 2 (98/2 A/B - 70/30 A/B, nousu 2 tunnin aikana). Puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 1,1 g (72 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

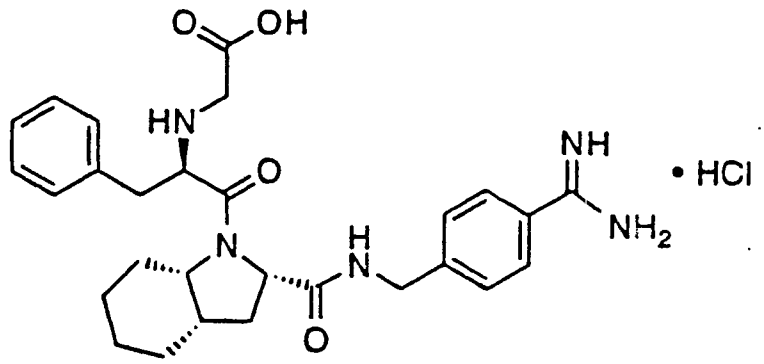
FAB-MS, m/e 452,3 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{29}N_5O_4 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 54,97, H 5,96, N 13,35

Havaittu: C 55,21, H 6,11, N 13,39.

Esimerkki 47



$HOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) t-$BuOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-OEt:n valmistus

Liuokseen, jossa oli D-Phe-cis-Ohi-OEt·HCl (30 g, 79 mmol) asetonitriilissä (400 ml), lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiini (41 ml, 236 mmol) ja bromietikkahapon t-butyyliesteri (14 ml, 87 mmol). Tämä liuos lämmitettiin 50 °C:n lämpötilaan ja pidettiin siinä 3 tuntia. Huoneenlämpötilaan jäähdyttämisen jälkeen liuos konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (300 ml) ja tämä liuos pestiin kahdesti kyllästetyllä ammoniumkloridin vesiliuoksella (200 ml), kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (200 ml) ja kahdesti suolavedellä (200 ml). Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin oranssi öljy, joka puhdistettiin piidioksidigeelikromato-

grafiassa, ajoliuoksena gradientti heksaani - 1:1 heksaani/etyyliasetaatti. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 33,2 g (92 %:n saanto) väritöntä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 458 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{38}N_2O_5$:lle:

Laskettu: C 68,10, H 8,35, N 6,11

Havaittu: C 68,37, H 8,47, N 5,90.

B) N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-cis-Ohi-OH:n valmistus

t-BuOOCCH$_2$-D-Phe-cis-Ohi-OEt:n (30 g, 65 mmol) liuokseen THF:ssä (200 ml) lisättiin N,N-di-isopropyyliamiini (17 ml, 98 mmol) ja di-t-butyylidikarbonaatti (15,7 g, 72 mmol). Tämä liuos pantiin hellävaraiseen palautusjäähdytykseen ja pidettiin siinä 16 tuntia. Kuumentaminen keskeytettiin, ja kun liuos oli jäähtynyt, se konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (400 ml) ja pestiin kahdesti 1,0 M sitruunahapolla (200 ml), kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (200 ml), ja kahdesti suolavedellä (200 ml). Orgaaninen liuos kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin keltainen öljy. Osa tästä öljystä (24,8 g, 44 mmol) liuotettiin 300 ml:aan dioksaania. Tähän lisättiin liuos, joka sisälsi 2,05 g $LiOH \cdot H_2O$:ta (49 mmol) 150 ml:ssa vettä. Tämän seoksen annettiin sekoittua 5 tuntia huoneenlämpötilassa, missä vaiheessa lisättiin 100 ml kyllästettyä ammoniumkloridin vesiliuosta. Liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin kyllästetyn natriumbikarbonaatin vesiliuoksen ja dietyylieetterin välillä. Kerrokset erotettiin ja vesikerros happamoitettiin pH-arvoon 3 sitruunahapolla. Hapan vesiliuos uutettiin 3 kertaa dietyylieetterillä (200 ml) ja nämä yhdistettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 24,3 g N-(t-BuOOCCH$_2$)-N-Boc-D-Phe-cis-Ohi-OH:ia valkoisena vaahtona.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 530 (M^+)

Analyysi $C_{29}H_{42}N_2O_7$:lle:

Laskettu: C 65,64, H 7,98, N 5,28

Havaittu: C 65,39, H 8,04, N 5,39.

C) $HOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 18-E ja 46-D kuvatut, saatiin 1,2 g (67 %:n saanto) $HOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

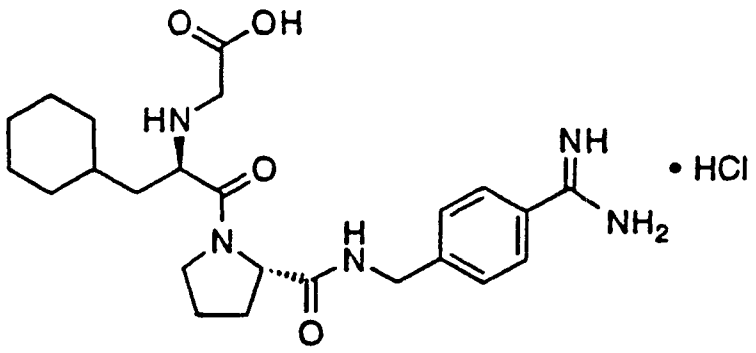
FD-MS, m/e 506,3 (M^+)

Analyysi $C_{28}H_{35}N_5O_4 \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 57,24, H 6,52, N 11,92

Havaittu: C 57,40, H 6,30, N 11,69.

Esimerkki 48



$HOOCCH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi)

A) $HOOCCH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 46 kuvatut, valmistettiin 0,92 g $HOOCCH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

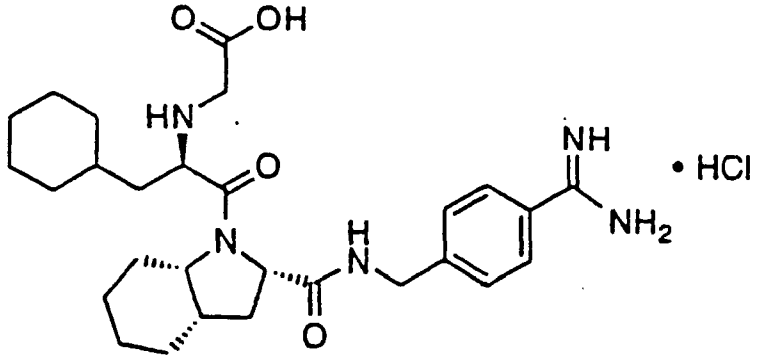
FD-MS, m/e 458 (M^+)

Analyysi $C_{24}H_{35}N_5O_4 \cdot HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 57,30, H 7,41, N 13,92

Havaittu: C 57,52, H 7,29, N 13,83.

Esimerkki 49



$HOOCCH_2$-D-Cha-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

((S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-1-[N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli]-1H-indoli-2-karboksamidihydrokloridi)

A) $HOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-A ja 1-D, 18-E, 44-B, 47-A (käyttäen bentsyylibromiasetaattia) ja 18-F kuvatut, saatiin 0,75 g $HOOCCH_2$-D-Phe-cis-Ohi-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää lähtien Boc-D-Cha:sta ja cis-Ohi-OEt·HCl:stä. HPLC-menetelmää 2 käytettiin tämän materiaalin puhdistukseen käyttäen gradienttia 98/2 A/B - 70/30 A/B, 3 tunnin aikana.

^1H-NMR

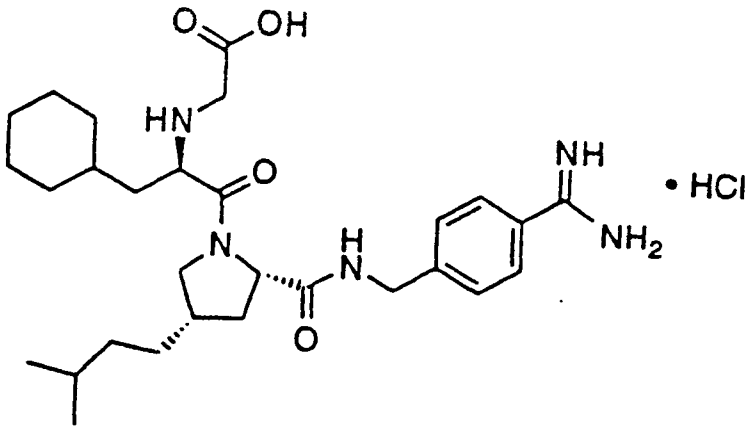
FAB-MS, m/e 512,3 (MH^+)

Analyysi $C_{28}H_{41}N_5O_4 \cdot HCl$:lle:

Laskettu: C 61,36, H 7,72, N 12,78

Havaittu: C 61,08, H 7,47, N 12,53.

Esimerkki 50



$HOOCCH_2$-D-Phe-Pro(4-cis-isoamyyli)-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) Cbz-Pro(4-trans-OH)-OEt:n valmistus

Liuokseen, jossa oli Cbz-Pro(4-trans-OH) (33 g, 124 mmol) etanolissa (500 ml), lisättiin p-tolueenisulfonihappo (1 g) ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 16 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (400 ml) ja pestiin kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella ja kahdesti kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella. Etyyliasetaattiliuos kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 34,5 g (95 %:n saanto) väritöntä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 293 (M^+)

Analyysi $C_{15}H_{19}NO_5$:lle:

Laskettu: C 61,42, H 6,53, N 4,77

Havaittu: C 61,20, H 6,65, N 4,73.

B) Cbz-Pro(4-okso)-OEt:n valmistus

Cbz-Pro(4-trans-OH)-OEt (32,7 g, 111 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (500 ml) mekaanisesti sekoittaen 1 litran pyöreäpohjaisessa kolvissa. Tähän liuokseen lisättiin 3 Å:n molekyyliseulat (100 g) ja pyridiniumkloorikromaatti (60 g, 278 mmol), annoksina, jotka olivat tarpeeksi

pieniä tehokkaan sekoituksen säilyttämiseksi. Huoneenlämpötilassa tapahtuneen 12 tunnin sekoittamisen jälkeen dietyylieetteri (200 ml) lisättiin ja musta liete dekantoitiin tervamaisesta jäännöksestä ja huuhdottiin piidioksidigeelipylvään läpi (200 g). Jäännös pestiin kahdesti dikloorimetaanilla (200 ml) ja yhdistetyt pesunesteet vietiin myös piidioksidikerroksen läpi. Suodos huuhdottiin piidioksidigeelipylvään läpi 1:1 etyyliasetaatti/heksaani -liuoksella (4 l) ja kerättiin 500 ml:n fraktioita. Kaikki fraktiot, jotka sisälsivät TLC:n perusteella tuotteen, yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 23,8 g (74 %:n saanto) väritöntä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 291 (M^+)

Analyysi $C_{15}H_{17}NO_5$:lle:

Laskettu: C 61,85, H 5,88, N 4,81

Havaittu: C 61,57, H 5,82, N 4,71.

C) Cbz-Pro(4-isobutyylimetylideeni)-OEt:n valmistus

Kalium-t-butoksidi (34 g, 288 mmol) suspendoitiin tetrahydrofuraaniin (800 ml) uunissa kuivatussa 2-kaulaisessa 2 litran pyöreäpohjaisessa kolvissa, jossa oli typen sisääntulo, magneettinen sekoitussauva ja additiosuppilo. Tähän suspensioon lisättiin useina annoksina isoamyylitrifenyylifosfoniumbromidi (120 g, 288 mmol). 30 minuutin sekoittamisen jälkeen Cbz-Pro(4-okso)-OEt:n (70 g, 240 mmol) liuos tetrahydrofuraanissa (150 ml) lisättiin tipoittain additiosuppilon kautta 1 tunnin aikana. Sen jälkeen kun oli sekoitettu vielä 2 tuntia, lisättiin kyllästetty NH_4Cl:n vesiliuos (100 ml). Tämä liuos laimennettiin etyyliasetaatilla (750 ml) ja kerrokset erotettiin. Orgaaninen kerros pestiin kaksi kertaa 1 N sitruunahapolla, kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella ja kahdesti kyllästetyllä natriumkloridin vesiliuoksella. Orgaaninen liuos kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin keltainen öljy. Tämä öljy puhdistettiin

piidioksidigeeli-flash-kromatografialla, ajolioksena 2:1 heksaani/etyyliasetaatti. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 37 g (45 %:n saanto) väritöntä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 345 (M^+)

Analyysi $C_{20}H_{27}NO_4$:lle:

Laskettu: C 69,54, H 7,88, N 4,05

Havaittu: C 69,74, H 7,85, N 3,99.

D) Pro(4-cis-isoamyyli)-OEt·HCl:n valmistus

Cbz-Pro(4-isobutyylimetylideeni)-OEt:n (37 g, 107 mmol) liuokseen etanolissa (500 ml) lisättiin 5-prosenttinen palladoitu hiili (5 g). Typpikaasua kuplitettiin tämän liuoksen läpi 5 minuutin ajan ja sitten vetykaasua kuplitettiin läpi 3 tunnin ajan. Liuos suodatettiin piimaakerroksen läpi. Vetykloridikaasua kuplitettiin sitten liuoksen läpi, kunnes se oli kyllästetty, ja sitten liuos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 26 g (97 %:n saanto) meripihkan väristä öljyä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 214 (M^+)

Analyysi $C_{12}H_{24}ClNO_2$:lle:

Laskettu: C 57,70, H 9,68, N 5,61

Havaittu: C 57,46, H 9,50, N 5,82.

E) $HOOCCH_2$-D-Phe-Pro(4-cis-isoamyyli)-p-$NHCH_2C_6H_4$-$C(NH)NH_2$·HCl:n valmistus

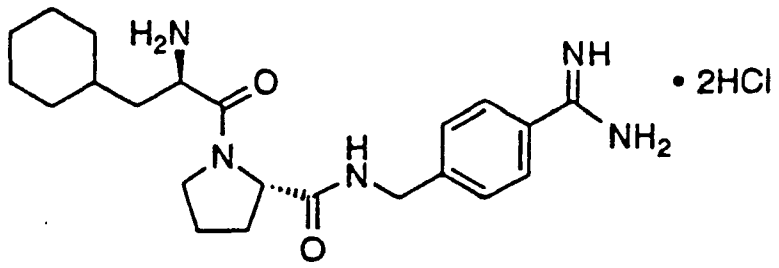
Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-A ja 1-D, 18-E, 44-B, 47-A (käyttäen bentsyylibromiasetaattia) ja 18-F kuvatut, saatiin 0,27 g $HOOCCH_2$-D-Phe-Pro(4-cis-isoamyyli)-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$·HCl:ää lähtien Boc-D-Cha:sta ja Pro(4-cis-isoamyyli)-OEt·HCl:stä. HPLC-menetelmää 2 käytettiin tämän materiaalin puhdistuksessa käyttäen gradienttia 98/2 A/B - 50/50 A/B, 3 tunnin aikana.

^{1}H-NMR

FAB-MS, m/e 528,4 (MH^+)

Analyysi $C_{29}H_{45}N_5O_4 \cdot 1,9HCl$:lle:
Laskettu: C 58,34, H 7,92, N 11,73, Cl 11,28
Havaittu: C 58,30, H 7,85, N 11,83, Cl 11,27.

Esimerkki 51



D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NH$_2$·2HCl
(D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi-dihydrokloridi

A) Boc-D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-A, 46-E ja 18-E kuvatut, 32,5 g (94 %:n saanto) Boc-D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:ää valmistettiin lähtien Boc-D-Cha-Pro-OH:sta.

^{1}H-NMR
FD-MS, m/e 634 (M^+)
Analyysi $C_{35}H_{47}N_5O_6$:lle:
Laskettu: C 66,33, H 7,47, N 11,05
Havaittu: C 66,30, H 7,47, N 11,26.

B) D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz·2HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 9,6 g (101 %:n saanto) D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz·2HCl:ää Boc-D-Cha-Pro-p-NHCH$_2$C$_6$H$_4$C(NH)NHCbz:sta.

^{1}H-NMR
FD-MS, m/e 534 (M^+)
Analyysi $C_{30}H_{41}N_5O_4 \cdot Cl_2$:lle:
Laskettu: C 59,40, H 6,81, N 11,54, Cl 11,69
Havaittu: C 59,54, H 6,80, N 11,77, Cl 11,21.

C) D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-F kuvattu, valmistettiin 0,74 g (62 %:n saanto) D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot 2HCl$:ää. HPLC-menetelmää 2 käytettiin tämän materiaalin puhdistuksessa käyttäen gradienttia 98/2 A/B - 75/25 A/B 2,5 tunnin aikana.

^{1}H-NMR

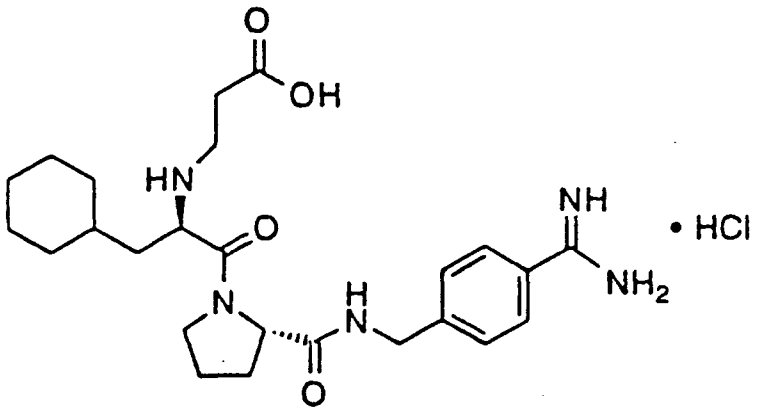
FAB-MS, m/e 400,3 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{33}N_5O_2 \cdot 2,1HCl$:lle:

Laskettu: C 55,50, H 7,43, N 14,71, Cl 15,64

Havaittu: C 55,64, H 7,50, N 14,65, Cl 15,81.

Esimerkki 52



$HOOCCH_2CH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(N-(2-karboksietyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi

A) $HOOCCH_2CH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$ (2,5 g, 4,1 mmol) suspensoitiin EtOAc:hen (100 ml) sekoittaen. Liuos, jossa oli 1 M $KHCO_3$ (100 ml), lisättiin suspensioon ja seosta sekoitettiin, kunnes kaikki kiinteä aine oli liuennut. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja kerrokset erotettiin. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 1,24 g vapaata

emästä valkoisena kiinteänä aineena. Tämä kiinteä aine liuotettiin EtOH:hon (100 ml). Bentsyyliakrylaatti (0,41 g, 2,6 mmol) lisättiin ja liuosta sekoitettiin 2 päivää huoneenlämpötilassa. Sitten tähän liuokseen lisättiin vesi (50 ml), 1 N HCl (4,6 ml) ja 5 % palladoitu hiili (0,5 g) ja sekoituksessa olevasta suspensiosta poistettiin kaasu ja se sijoitettiin vetyilmakehän alle. 16 tunnin kuluttua piimaa lisättiin ja liete suodatettiin piimaakerroksen läpi. Suodos konsentroitiin 25 ml:n tilavuuteen *in vacuo* ja puhdistettiin preparatiivisella RPHPLC-menetelmällä 2 käyttäen gradienttia 98/2 A/B - 75/25 A/B, 2,5 tunnin aikana. Puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot (analyyttisen HPLC:n perusteella) yhdistettiin, konsentroitiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 0,27 g (23 %:n saanto) $HOOCCH_2CH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

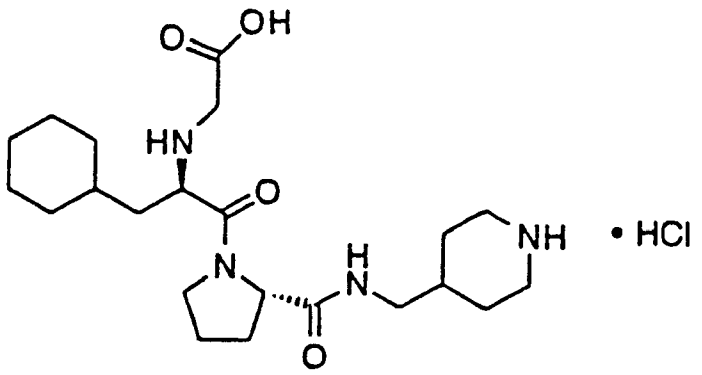
FAB-MS, m/e 472,4 (MH^+)

Analyysi $C_{25}H_{37}N_5O_4 \cdot 1,9HCl$:lle:

Laskettu: C 55,50, H 7,25, N 12,94, Cl 12,45

Havaittu: C 55,26, H 7,26, N 13,21, Cl 12,85.

Esimerkki 53



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-piperidiini·HCl

A) Boc-4-(aminometyyli)pyridiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 34-A kuvattu, 19 g (87 %:n saanto) Boc-4-(aminometyyli)pyridiiniä valmistettiin 4-(aminometyyli)pyridiinistä.

^{1}H-NMR

B) 4-BocNHCH$_2$-N-Cbz-piperidiinin valmistus

4-BocNHCH$_2$-pyridiini (10 g, 48 mmol) liuotettiin etanoliin (280 ml) ja 5 % Rh/C (10 g) lisättiin. Suspensiota sekoitettiin vetyilmakehän alla (4,1 bar, 60 psi) 60 °C:n lämpötilassa yli yön. Katalysaattori suodatettiin sitten pois ja liuos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 9,0 g harmaata kiinteää ainetta. 3,2 g:n annos kiinteää ainetta liuotettiin tetrahydrofuraaniin (75 ml) ja kaliumkarbonaatin (4,2 g, 30 mmol) vesiliuos (75 ml) lisättiin. Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin bentsyyliklooriformiaattia (2,3 ml, 16 mmol). 15 minuutin kuluttua liuos konsentroitiin *in vacuo* noin 1/2:een alkuperäisestä tilavuudesta ja laimennettiin sitten etyyliasetaatilla. Orgaaninen kerros erotettiin ja pestiin suolavedellä, sitten kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 4,6 g (76 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 349 (M^+)

C) 4-NH$_2$CH$_2$-N-Cbz-piperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 3 g (84 %:n saanto) 4-NH$_2$CH$_2$-N-Cbz-piperidiini·HCl:ää 4-BocNHCH$_2$-N-Cbz-piperidiinistä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 249 (MH^+)

D) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:n valmistus

N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Phe-Pro-OH (13 g, 27 mmol) liuotettiin etanoliin (750 ml) ja PtO_2 (13 g) lisättiin. Suspensiota sekoitettiin vetyilmakehän alla 4,1 baarissa (60 psi) 40 °C:n lämpötilassa 16 tunnin ajan. Katalysaattori suodatettiin sitten pois ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 11,7 g (90 %:n saanto) valkoista vaahtoa.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 483 (M^+)

Analyysi $C_{25}H_{42}N_2O_7$:lle:

Laskettu: C 62,22, H 8,77, N 5,80

Havaittu: C 62,99, H 8,96, N 5,48.

E) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-piperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-G ja esimerkissä 46-D kuvatut, valmistettiin 1,1 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-piperidiini·HCl:ää N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:sta ja HCl·4-NH_2CH_2-N-Cbz-piperidiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, nousu 98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 tunnin aikana.

IR

^{1}H-NMR

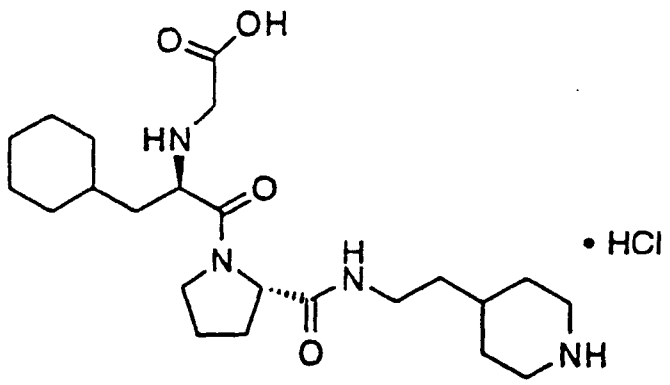
FD-MS, m/e 423 (M^+)

Analyysi $C_{22}H_{38}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 50,57, H 8,29, N 10,72

Havaittu: C 50,31, H 8,46, N 10,93.

Esimerkki 54



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-piperidiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-piperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 52 kuvatut, valmistettiin 0,59 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-piperidiini·HCl:ää 4-aminoetyylipyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, nousu 98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 tunnin aikana.

IR

^{1}H-NMR

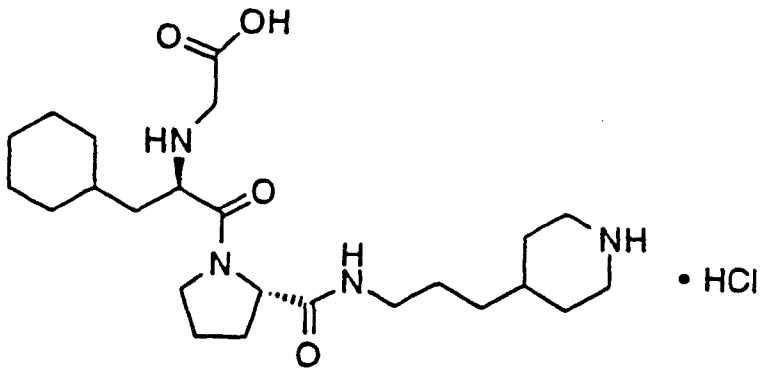
FD-MS, m/e 437 (M^+)

Analyysi $C_{23}H_{40}N_4O_4 \cdot 2,5HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,80, H 8,27, N 10,10

Havaittu: C 49,95, H 8,08, N 10,34.

Esimerkki 55



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-piperidiini·HCl

A) 4-hydroksipropyyli-N-Cbz-piperidiinin valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 53-B kuvatut, valmistettiin 28 g (67 %:n saanto) 4-hydroksipropyyli-N-Cbz-piperidiiniä 4-hydroksipropyylipyridiinistä.

^{1}H-NMR

B) 4-($NH_2CH_2CH_2CH_2$)-N-Cbz-piperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 30-B, 30-C ja 30-D kuvatut, valmistettiin 7,3 g 4-($NH_2CH_2CH_2CH_2$)-N-Cbz-piperidiini·HCl:ää 4-hydroksipropyyli-N-Cbz-piperidiinistä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 276 (M^+)

C) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-piperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 53-D ja 53-E kuvatut, valmistettiin 0,39 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-piperidiini·HCl:ää N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:sta ja n-aminopropyyli-N-Cbz-piperidiini·HCl:stä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, nousu 98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 tunnin aikana.

IR

^{1}H-NMR

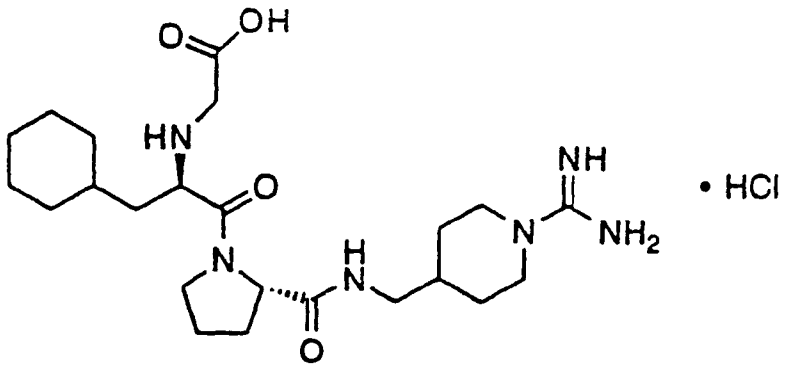
IS-MS, m/e 451,4 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{42}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,23, H 8,56, N 10,35

Havaittu: C 53,43, H 8,63, N 10,19.

Esimerkki 56



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl (N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[1-(aminoiminometyyli)-heksahydropyridin-4-yyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 34-D, 23-A, 1-G (käyttämällä N-(t-BuO_2-CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:ta), 18-E ja 1-H kuvatut, valmistettiin 0,35 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl:ää 4-Boc$NHCH_2$-piperidiinistä. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) nousu 75/25:een (A/B), 150 min).

IR

^{1}H-NMR

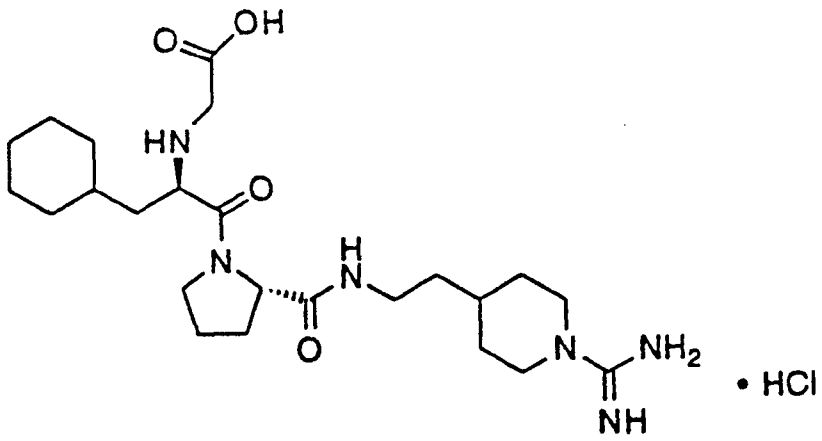
FAB-MS, m/e 465 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{40}N_6O_4 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 51,39, H 7,88, N 15,63, Cl 13,19

Havaittu: C 51,66, H 7,98, N 15,80, Cl 13,48.

Esimerkki 57



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 34-D, 23-A, 1-G (käyttämällä N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:ta), 18-E ja 1-H kuvatut, valmistettiin 0,34 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-1-amidinopiperidiini·HCl:ää 4-Boc$NHCH_2CH_2$-piperidiinistä. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) nousu 75/25:een (A/B), 150 min).

IR

^{1}H-NMR

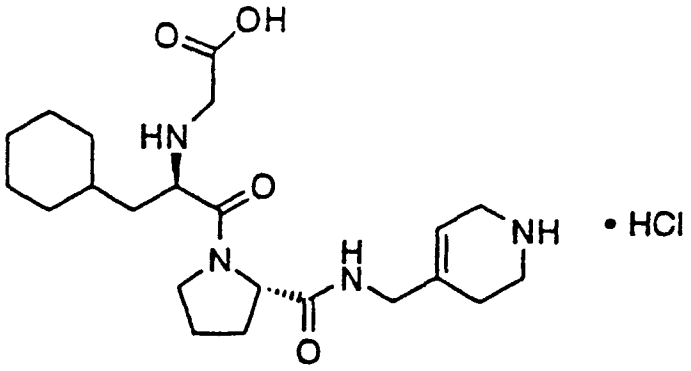
FAB-MS, m/e 479,4 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{42}N_6O_4 \cdot 2HCl$:lle:

Laskettu: C 52,26, H 8,07, N 15,24, Cl 12,86

Havaittu: C 52,56, H 8,15, N 15,37, Cl 13,07.

Esimerkki 58



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,4-dehydro-piperidiini·HCl

A) 4-BocNHCH$_2$-N-metyyli-pyridiniumjodidin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 4-BocNHCH$_2$-pyridiiniä (20 g, 96 mmol) asetonitriilissä (200 ml) lisättiin jodimetaania (8,9 ml, 144 mmol). 16 tunnin kuluttua liuos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 33,8 g (96 %:n saanto) paksua vaaleankeltaista öljyä.

FD-MS, m/e 233,1 (M^+)

B) 4-BocNHCH$_2$-N-Fmoc-3,4-dehydropiperidiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 4-BocNHCH$_2$-N-metyyli-pyridiniumjodidia (7,7 g, 34 mmol) 1,2-dikloorietaanissa (100 ml) lisättiin 1,8-bis(dimetyyliamino)naftaleeni (1,5 g, 6,8 mmol), jota seurasi 2-kloorietyyliklooriformiaatti (5,3 g, 37 ml). Liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä ja 2 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös huuhdottiin nopeasti piidioksidigeelipylvään läpi 20 % etyyliasetaatti/heksaani-liuoksella. Orgaaniset liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin metanolissa (300 ml) ja kuumennettiin palautusjäähdytyksessä 20 minuutin ajan. Kyllästetty $NaHCO_3$:n vesiliuos (100 ml) lisättiin sitten ja liuottimet poistettiin *in*

vacuo. Jäännös liuotettiin veteen (200 ml) ja pestiin kahdesti heksaaneilla, sitten kyllästettiin kiinteällä NaCl:lla ja uutettiin useita kertoja etyyliasetaatilla. Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin vaaleankeltainen öljy, joka liuotettiin dikloorimetaaniin (75 ml). Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin sitten N,N-di-isopropyylietyyliamiini (2,1 ml, 12,2 mmol), jota seurasi 9-fluorenyylimetyylikloorifomiaatti (3,2 g, 12,2 mmol). 2 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (250 ml) ja pestiin kahdesti 1 N sitruunahapolla, kerran suolavedellä, kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella ja lopuksi kerran suolavedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo* ja jäännös ajettiin kromatografiassa piidioksidigeelipylväässä, ajoliuoksena portaittainen gradientti 5 % etyyliasetaatti/heksaani - 50 % etyyliasetaatti/heksaani. Tuotteen sisältävät fraktiot (TLC:n perusteella) yhdistettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 4 g (27 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 435 (M^+)

C) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-NHCH_2-N-Fmoc-3,4-dehydropiperidiinin valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 23-A ja 1-G (käyttämällä N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH:ta) kuvatut, valmistettiin 2,5 g N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-NHCH_2-N-Fmoc-3,4-dehydropiperidiiniä 4-BocNHCH_2-N-Fmoc-3,4-dehydropiperidiinistä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 799 (M^+)

D) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,4-dehydropiperidiinin valmistus

N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-N-Fmoc-3,4-dehydropiperidiini (1,5 g, 1,9 mmol) liuotettiin morfoliiniin (25 ml) ja 5 tunnin sekoituksen jälkeen liuotin haihdutettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja pestiin kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin sitten pieneen tilavuuteen kloroformia ja ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena gradientti 5 % - 10 % A/B (A = 9:1 metanoli/väkevä NH_4OH; B = kloroformi). TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 890 mg (82 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 576 (MH^+)

E) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl:n valmistus

HCl-kaasua kuplitettiin liuoksen läpi, jossa oli N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,4-dehydropiperidiiniä (820 mg, 1,4 mmol) ja anisolia (1 ml) dioksaanissa (25 ml), 0 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia. 12 tunnin sekoituksen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin veteen (50 ml) ja pestiin kahdesti dietyylieetterillä. Vesifaasi konsentroitiin sitten noin 20 ml:n tilavuuteen *in vacuo* ja puhdistettiin RPHPLC:llä (menetelmä 2, 98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h). Analyyttisen RPHPLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin osittain *in vacuo* ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 442 mg (68 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

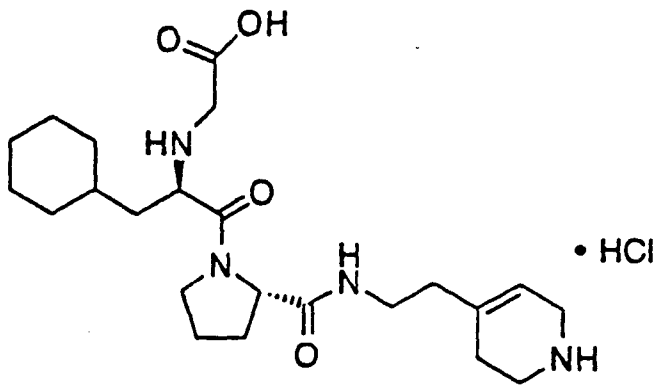
IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 423 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{36}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 50,57, H 8,29, N 10,72
Havaittu: C 50,31, H 8,46, N 10,93.

Esimerkki 59



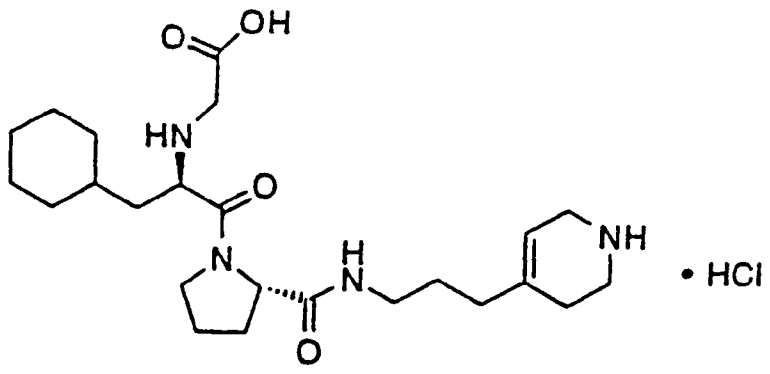
HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-H kuvatut, valmistettiin 73 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl:ää 4-BocNH-CH_2CH_2-pyridiinistä. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR
^{1}H-NMR
IS-MS, m/e 435,2 (MH^+)
Analyysi $C_{23}H_{38}N_4O_4 \cdot 2,3HCl \cdot 3H_2O$:lle:
Laskettu: C 48,26, H 8,15, N 9,79, Cl 14,24
Havaittu: C 48,31, H 7,93, N 9,66, Cl 14,56.

Esimerkki 60



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 58 kuvatut, valmistettiin 205 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2CH_2$-3,4-dehydropiperidiini·HCl:ää 4-Boc-$NHCH_2CH_2CH_2$-pyridiinistä.

IR

^{1}H-NMR

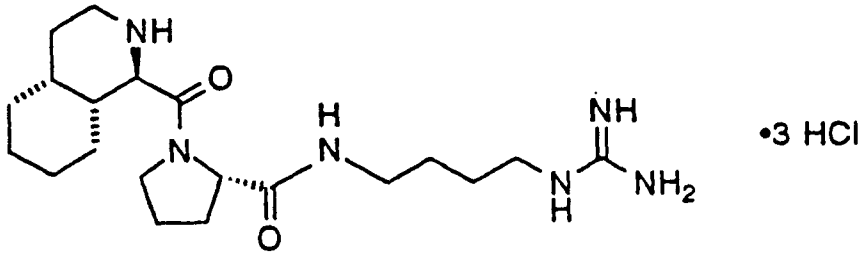
IS-MS, m/e 449,2 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{40}N_4O_4 \cdot 2,3HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 52,37, H 3,11, N 10,18

Havaittu: C 51,64, H 7,72, N 10,31, Cl 14,69.

Esimerkki 61



(IR,4aR,8aR)-1-Piq-Pro-Agm·3HCl

[N-[4-[(aminoiminometyyli)amino]butyyli]-1-[[(4aR,8aR)-dekahydro-1(R)-isokinolinyyli]karbonyyli]-1-prolinamidi-trihydrokloridi)

Tässä esimerkissä Rf-arvot määritettiin piidioksidigeeli-ohutkerroskromatografialla (Kieselgel 60 F-254) seuraavissa järjestelmissä (v/v):

A) Kloroformi:metanoli:etikkahappo 135:15:1

B) Etyyliasetaatti:etikkahappo:absoluuttinen etanoli 90:10:10

C) Etyyliasetaatti:heksaani (70:30)

D) Kloroformi

A) N-metoksikarbonyylifenetyyliamiini

Fenetyyliamiinin (75,2 ml, 0,6 mol) ja trietyyliamiinin (83 ml, 0,6 mol) sekoituksessa olevaan liuokseen THF:ssä (500 ml) lisättiin hitaasti metyyliklooriformiaatti (46,2 ml, 0,6 mol) liuotettuna THF:ään (50 ml). Sen jälkeen kun reaktiota oli sekoitettu vielä 1 tunti huoneenlämpötilassa, dietyylieetteri (2 l) ja 1 N HCl (800 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros pestiin vedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste, kirkas öljy (102 g, 95 %:n saanto).

B) 2-metoksikarbonyyli-DL-1,2,3,4-tetrahydoisokinoliini-1-karboksyylihappo

Liuokseen, jossa oli N-metoksikarbonyylifenetyyliamiini (102 g, 0,57 mol) trifluorietikkahapossa (300 ml), lisättiin glyoksyylihappoa (63 g, 0,68 mol) ja seos kuumennettiin palautusjäähdytyslämpötilassa. 4 palautusjäähdytyksessä pidetyn tunnin jälkeen reaktio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, liuotin poistettiin *in vacuo* ja dietyylieetteri (800 ml)/vesi (100 ml) lisättiin jäännökseen. Reaktioseoksen pH nostettiin 12:een 5 N NaOH:lla ja vesikerros erotettiin. Vesikerrokseen lisättiin dietyylieetteri (500 ml), ja liuos happamoitettiin pH-arvoon 2,5

5 N HCl:llä. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste öljynä (107 g, 80 %:n saanto); FAB-MS 236 (MH^+).

C) 2-metoksikarbonyyli-DL-1,2,3,4-tetrahydoisokinoliini-1-karboksyylihapon t-butyyliesteri

Sekoitettuun, jäähdytettyyn (0 °C) liuokseen, jossa oli 2-metoksikarbonyyli-DL-1,2,3,4-tetrahydoisokinoliini-1-karboksyylihappo (2) (105 g, 0,45 mol) CH_2Cl_2:ssa (200 ml), lisättiin t-butanoli (52 ml, 0,54 mol) ja DCC (92 g, 0,45 mol). 0 °C:n lämpötilassa kuluneen kahden tunnin ja huoneenlämpötilassa kuluneen 24 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja etyyliasetaatti (800 ml) / 1 N $NaHCO_3$ (300 ml) lisättiin jäännökseen. Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste öljynä (106 g, 81 %:n saanto); FAB-MS 292 (MH^+); TLC R_f (A) 0,61; alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{16}H_{21}NO_4$: C 65,96, H 7,27, N 4,81; Havaittu: C 66,24, H 7,28, N 4,73.

D) 2-metoksikarbonyyli-(1RS,4aSR,8aSR)-perhydoisokinoliini-1-karboksyylihapon t-butyyliesteri

Liuos, jossa oli 2-metyylikarbonyyli-DL-1,2,3,4-tetrahydoisokinoliini-1-karboksyylihapon t-butyyliesteri (105 g, 0,36 mol) t-butanolissa (800 ml), pelkistettiin 5 % Rh/Al_2O_3:n yläpuolella (52,5 g) 55 baarin paineessa (800 psi) vetyä korkeapainelaitteessa 50 °C:n lämpötilassa 24 tunnin ajan. Reaktioseos suodatettiin piimaakerroksen läpi ja suodos konsentroitiin *in vacuo*. Tuloksena oleva öljy kuivattiin, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste (96,5 g, 90 %:n saanto) FD-MS 298 (MH^+); TLC R_f (C) 0,63.

E) 2-metoksikarbonyyli-(1RS,4aRS,8aRS)-perhydoisokinoliini-1-karboksyylihapon etyyliesteri

Liuokseen, jossa oli 2-metoksikarbonyyli(1RS,4aSR,-8aSR)-perhydoisokinoliini-1-karboksyylihapon t-butyyliesteri (81,2 g, 273 mmol) EtOH:ssa (500 ml), lisättiin natriumetoksidia (21 % etanoliliuos) (88,4 ml, 273 mmol) ja reaktioseosta palautusjäähdytettiin (24 h). Orgaaninen liuos haihdutettiin *in vacuo*, jäännökseen lisättiin etyyliasetaatti (400 ml) ja vesi (100 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin kahdesti vedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste öljynä (70 g, .95 %:n saanto); FAB-MS 270 (MH^+); TLC R_f (A) 0,61.

F) 2-metoksikarbonyyli-(1RS,4aRS,8aRS)-perhydoisokinoliini-1-karboksyylihappo

Liuokseen, jossa oli vaiheen E tuote (70 g, 260 mmol) THF:ssä (250 ml), lisättiin 2 N NaOH (156 ml, 312 mmol) ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa (30 h). Orgaaninen liuotin haihdutettiin *in vacuo*, jäännökseen lisättiin dietyylieetteri (400 ml) ja vesi (100 ml). Vesikerros erotettiin ja etyyliasetaatti (400 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin 2,0:aan 5 N HCl:llä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy. Öljy kiteytettiin heksaanista (200 ml), jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste (46,4 g, .74 %:n saanto); FAB-MS 242 (MH^+); TLC Rf (A) 0,36; alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{12}H_{19}NO_4$: C 59,74, H 7,94, N 5,81; Havaittu: C 59,95, H 7,88, N 5,54. NMR-määritykset tehtiin homonukleaarisilla dekoplauskokeilla, COSY-, HMQC- ja DEPT-kokeilla.

G)2-Cbz-(1RS,4aRS,8aRS)-perhydoisokinoliini-1-karboksyylihappo

Sekoitettuun liuokseen, jossa oli vaiheen F tuote (46 g, 191 mmol) huoneenlämpötilassa vedettömässä CH_3CN:ssä

(200 ml) inertissä ilmakehässä, lisättiin liuos, jossa oli joditrimetyylisilaania (62,4 ml, 440 ml) CH_3CN:ssä (60 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 55 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia ja jäähdytettiin huoneenlämpötilaan. Reaktio sammutettiin vedellä (100 ml), jota seurasi natriummetabisulfiitti (1 g). Reaktion pH kohotettiin arvoon 10,0 5 N NaOH:lla ja bentsyyliklooriformiaatti (27,3 ml, 191 mmol) lisättiin tipoittain samalla, kun pH pidettiin 10:ssä 2 N NaOH:lla. Sen jälkeen kun reaktiota oli sekoitettu vielä 30 minuuttia huoneenlämpötilassa, orgaaninen liuotin haihdutettiin *in vacuo* ja dietyylieetteri (200 ml) lisättiin. Reaktion annettiin seistä huoneenlämpötilassa (2 h) ja etyyliasetaatti (200 ml) lisättiin. Vesipohjainen liuos happamoitettiin pH-arvoon 2,5 5 N HCl:llä, orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin, ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste öljynä (39,5 g, 65 %:n saanto); FAB-MS 318 (MH^+); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{18}H_{23}NO_4$: C 68,12, H 7,30, N 4,41; havaittu: C 66,37, H 7,52, N 4,37.

H) 2-Cbz-(1RS,4aRS,8aRS)-perhydoisokinoliini-1-karbonyyli-Pro-O-t-Bu

Sekoitettuun, jäähdytettyyn (0 °C) liuokseen, jossa oli vaiheen G tuote (39 g, 123 mmol) DMF:ssä (200 ml), lisättiin proliinin t-butyyliesteri (21,1 g, 123 mmol), 1-hydroksibentsotriatsoli (16,6 g, 123 mmol) ja DCC (25,3 g, 123 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 2 tunnin ajan 0 °C:n lämpötilassa ja 24 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Reaktion sakka suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo* öljyksi. Öljy liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja veteen (100 ml). Orgaaninen kerros pestiin peräjälkeen 1 N $NaHCO_3$:lla, vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos haihdutettiin otsikon mukaiseksi amorfiseksi kiinteäksi aineeksi diasteromeerien seoksena (52,7 g, 91 %:n saanto) FAB-MS 471 (MH^+).

I) 2-Cbz-(4aR,8aR)-perhydoisokinoliini-1(R)-karbonyyli-Pro-OH

Vaiheen H tuotteen sekoitettuun liuokseen (52,4 g, 111 mmol) CH_2Cl_2:ssa (20 ml) lisättiin trifluorietikkahappo (70 ml) ja anisoli (5 ml). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan ja konsentroitiin *in vacuo* lämmittämättä. Jäännös laimennettiin dietyylieetterillä (400 ml), vedellä (100 ml) ja liuoksen pH säädettiin 10,0:aan 5 N NaOH:lla. Vesikerros erotettiin ja etyyliasetaatti (300 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin arvoon 2,5 5 N HCl:llä, orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin kirkas öljy. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (500 ml) ja liuokseen lisättiin (L)-(-)-alfa-metyylibentsyyliamiini. Liuoksen annettiin seisoa huoneenlämpötilassa (24 h). Tuloksena oleva kiinteä aine suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin. Kiinteä aine suspensoitiin etyyliasetaattiin, pestiin 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos haihdutettiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste öljynä (20,2 g, 44 %:n saanto) FAB-MS 415 (MH^+); $[a]_D$ = 3,2° (C = 0,5, MeOH); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{23}H_{30}N_2O_5$: C 66,65, H 7,30, N 6,76. Havaittu: C 66,38, H 7,36, N 6,63.

J) 2-Cbz-(4aR, 8aR)-perhydoisokinoliini-1(R)-karbonyyli-Pro-NH-$(CH_2)_4$-NH-Boc

Kolvissa 1 vaiheen I tuote (1,06 g, 2,55 mmol) liuotettiin DMF:ään (10 ml), jäähdytettiin -15 °C:n lämpötilaan ja lisättiin N-metyylimorfoliini (0,28 ml, 2,55 mmol), jota seurasi isobutyyliklooriformiaatti (0,33 ml, 2,55 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin -15 °C:n lämpötilassa 2 minuuttia.

Kolvissa 2 N-Boc-1,4-diaminobutaani (0,48 g, 2,55 mmol) liuotettiin DMF:ään (10 ml), jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan ja N-metyylimorfoliini (0,28 ml, 2,55 mmol)

lisättiin liuokseen. Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 2 minuuttia.

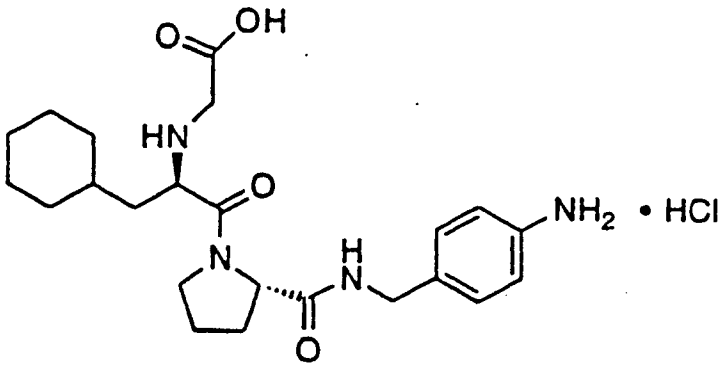
Kolvin 2 sisältö lisättiin kolviin 1 ja reaktioseosta sekoitettiin 4 tuntia (-15 °C) ja 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktioon lisättiin 1 N $NaHCO_3$ (1 ml) ja reaktion liuotin poistettiin *in vacuo* öljyksi. Jäännös liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja pestiin peräjälkeen 1,5 N sitruunahapolla, vedellä, 1 N $NaHCO_3$:lla (100 ml) ja vedellä. Orgaaninen liuos kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin kuivaksi *in vacuo*, jolloin saatiin epäpuhdas otsikon mukainen yhdiste kiinteänä aineena (1,47 g, 99 %:n saanto): FAB-MS 585 (MH^+); TLC R_f (A) 0,70.

K) (4aR, 8aR)-perhydoisokinoliini-1(R)-karbonyyli-Pro-Agm·3HCl

Vaiheen J tuotteen (1,4 g, 2,4 mmol) sekoitettuun liuokseen CH_2Cl_2:ssa (2 ml) lisättiin trifluorietikkahappo (25 ml) ja anisoli (2,5 ml). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia ja konsentroitiin *in vacuo* kuumentamatta. Reaktio laimennettiin dietyylieetterillä (100 ml) ja supernatantti dekantoitiin. Tuloksena oleva öljy trituroitiin kahdesti dietyylieetterillä ja kuivattiin. Kuivattu öljy liuotettiin THF:ään (20 ml), trietyyliamiini (0,66 ml, 4,8 mmol) ja bis-Cbz-S-metyyli-isotiourea (0,859 g, 2,4 mmol) lisättiin seokseen. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 48 tuntia. Orgaaninen liuotin haihdutettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja pestiin peräjälkeen 1 N $NaHCO_3$:lla (100 ml) ja vedellä. Orgaaninen liuos kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin kuivaksi *in vacuo*, jolloin saatiin epäpuhdas kiinteä aine (1,5 g, 79 %:n saanto): TLC R_f (D) 0,33. Epäpuhdas kiinteä aine (1,5 g, 1,93 mmol) liuotettuna etanoliin (50 ml), veteen (10 ml) ja 1 N HCl:ään (5,8 ml, 5,8 mmol) hydrattiin 5-prosenttisen palladoidun hiilen (2,5 g) ollessa katalysaattorina huoneenlämpötilassa ja ympäröivässä paineessa. Katalysaat-

tori poistettiin suodattamalla ja suodos konsentroitiin öljyksi *in vacuo*. Öljy liuotettiin trifluorietikkahappoon (10 ml), tioanisoli (1,0 ml) ja trifluorimetaanisulfonihappo (1,0 ml) lisättiin seokseen. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tunnin ajan ja dietyylieetteri (100 ml) lisättiin. Supernatantti dekantoitiin ja tuloksena oleva öljy trituroitiin kahdesti dietyylieetterin kanssa ja kuivattiin *in vacuo*, jolloin saatiin epäpuhdas kuiva aine (1,3 g). Kiinteä aine (1,3 g) liuotettiin 0,05 % HCl:ään ja pantiin 5 x 25 cm pylvääseen, jossa oli Vydac C_{18} -hartsia. Gradienttia, jossa oli kasvavia CH_3CN-konsentraatioita (2 - 25 %:n saanto) käytettiin eluoimaan peptidi pylväästä. Fraktioita kerättiin ja yhdistettiin analyyttisen RPHPLC-profiilin perusteella ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin puhdas otsikon mukainen yhdiste (0,139 g, 15 %:n saanto): FAB-MS (393) (MH^+); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{20}H_{36}N_6O_2 \cdot 5HCl \cdot 3H_2O$: C 38,28. Havaittu: C, 38,34.

Esimerkki 62



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-G (käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta), 23-D ja 58-E kuvatut, valmistettiin 0,17 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:ää 4-nitrobentsyyliamii-

nihydrokloridista. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

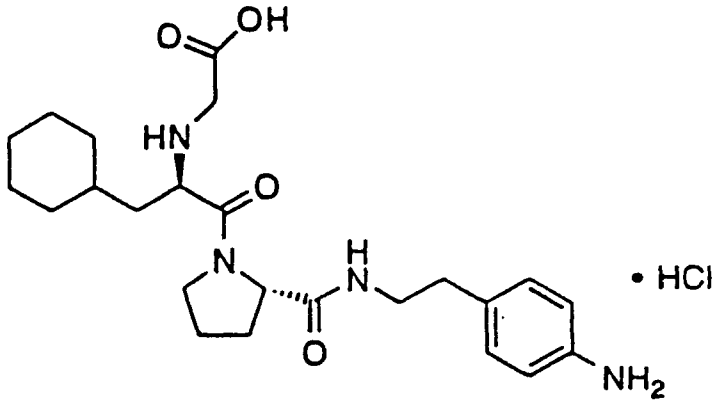
FAB-MS, m/e 431,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{34}N_4O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,37, H 7,35, N 10,42, Cl 14,50

Havaittu: C 50,87, H 6,72, N 10,41, Cl 14,18.

Esimerkki 63



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti samanlaisia kuin esimerkissä 62 kuvatut, valmistettiin 0,19 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2C_6H_4NH_2 \cdot HCl$:ää 4-nitrofenetyyliamiinihydrokloridista. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

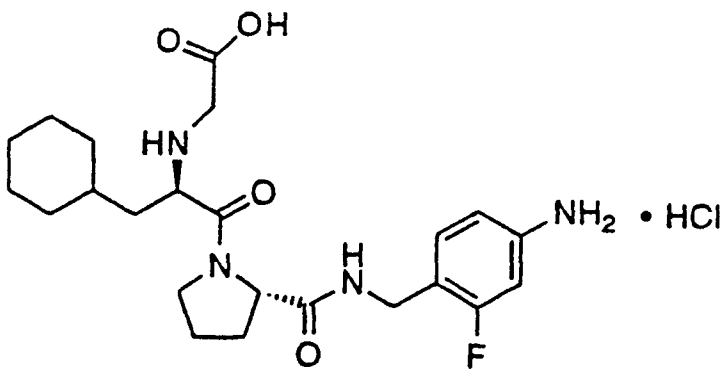
FAB-MS, m/e 445,3 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{36}N_4O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 54,00, H 7,40, N 10,50, Cl 14,61

Havaittu: C 53,65, H 7,59, N 10,24, Cl 14,33.

Esimerkki 64



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2 \cdot HCl$

A) 4-Boc_2NCH_2-3-F-$C_6H_3NO_2$:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 2-fluori-4-nitrotolueeni (5 g, 32 mmol) hiilitetrakloridissa (160 ml), lisättiin N-bromisukkinimidia (5,7 g, 32 mmol), jota seurasi bentsoyyliperoksidi (0,78 g, 3,2 mmol) ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 12 tunnin kuluttua lämmitys poistettiin ja seos laimennettiin hiilitetrakloridilla (100 ml) ja pestiin vedellä. Orgaaninen faasi laimennettiin sitten etyyliasetaatilla (300 ml), kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (50 ml) ja lisättiin sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli NaH (60-prosenttinen dispersio öljyssä, 1,3 g, 32 mmol) ja iminodikarboksyylihapon di-t-butyyliesteri (6,9 g, 32 mmol) tetrahydrofuraanissa (100 ml). Yli yön sekoittamisen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 20 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 3,9 g (33 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 370 (M^+)

Analyysi $C_{17}H_{23}N_2O_6$:lle:

Laskettu: C 55,13, H 6,26, N 7,56

Havaittu: C 55,27, H 6,23, N 7,44.

B) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2$·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 23-A, 1-G (käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta), 23-D ja 58-E kuvatut, valmistettiin 0,44 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2$·HCl:ää. Lopputuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

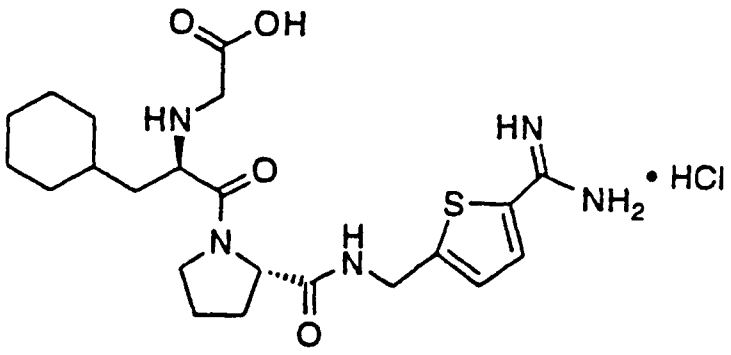
FAB-MS, m/e 449,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_4O_4F·1,3HCl$:lle:

Laskettu: C 55,70, H 6,97, N 11,30, Cl 9,29

Havaittu: C 55,38, H 6,97, N 11,05, Cl 9,31.

Esimerkki 65



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-amidinotiofeeni·HCl

(N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)tiofen-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) 2-syaani-5-formyylitiofeenin valmistus

Liekissä kuivattuun 1 litran pyöreäpohjaiseen kolmikaulaiseen kolviin lisättiin di-isopropyyliamiini (9 ml, 66 mmol) ja THF (150 ml) typpi-ilmakehän alla. Kolvi jäähdytettiin sisälämpötilaan -78 °C (kuivajää/asetoni). Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin n-butyylilitium (1,6 M heksaanissa, 41,3 ml, 66,1 mmol) ruiskulla ja seoksen annettiin sekoittua 5 minuuttia. Tähän liuokseen lisättiin 2-tiofeenikarbonitriilin (6,55 g, 60 mmol) liuos THF:ssä (30 ml) 10 minuutin aikana. Tuloksena olevan kirkkaanpunainen liuoksen annettiin sekoittua -78 °C:n lämpötilassa 45 minuuttia, missä vaiheessa dimetyyliformamidi (23,3 ml, 300 mmol) lisättiin ruiskulla. Tämän seoksen annettiin sekoittua 2 tuntia -78 °C:n lämpötilassa ja sitten lisättiin kiinteä sitruunahappo (noin 10 g), jota seurasi vesi (60 ml). Haihtuvat liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin dietyylieetterin ja suolaveden välillä (200 ml kumpaakin). Kerrokset erotettiin ja vesifaasi pestiin kerran dietyylieetterillä. Yhdistetty orgaaninen faasi pestiin kerran suolavedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine, joka puhdistettiin piidioksidigeelikromatografiassa käyttäen etyyliasetaatti/heksaani-gradienttia (heksaani - 50 % etyyliasetaatti/heksaani). Puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 6,9 g (84 %:n saanto) 2-syaani-5-formyylitiofeeniä.

^{1}H-NMR

B) 2-syaani-5-(hydroksimetyyli)tiofeenin valmistus

Liuokseen, jossa oli 2-syaani-5-formyylitiofeeniä (6,9 g, 50 mmol) EtOH:ssa (100 ml), lisättiin natriumboorihydridiä (1,9 g, 50 mmol) annoksittain. 5 minuutin sekoittamisen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin etyyliasetaatin ja suolaveden välillä. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kerran

1 M sitruunahapolla ja kerran suolavedellä, sitten kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 6,1 g (88 %:n saanto) 2-syaani-5-(hydroksimetyyli)tiofeeniä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 140 (M^+)

Analyysi C_6H_5NOS:lle:

Laskettu: C 51,78, H 3,62, N 10,06

Havaittu: C 51,54, H 3,62, N 9,86.

C) 2-syaani-5-(bromimetyyli)tiofeenin valmistus

Liuokseen, jossa oli 2-syaani-5-(hydroksimetyyli)-tiofeeniä (6,0 g, 43 mmol) THF:ssä (50 ml), lisättiin trifenyylifosfiini (15,7 g, 47 mmol) ja hiilitetrabromidi (12,3 g, 47 mmol). Yli yön sekoituksen jälkeen typpi-ilmakehän alla huoneenlämpötilassa liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin kloroformiin, sitten adsorboitiin piidioksidigeeliin ja ladattiin piidioksidigeelipylvääseen. Tuote eluoitiin käyttämällä etyyliasetaatti/heksaani-gradienttia. (TLC:n perusteella) puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 6,5 g (75 %:n saanto) 2-syaani-5-(bromimetyyli)tiofeeniä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 203 (M^+)

Analyysi C_6H_4NSBr:lle:

Laskettu: C 35,66, H 1,99, N 6,93

Havaittu: C 35,71, H 2,03, N 6,95.

D) 2-syaani-5-(aminometyyli)tiofeenin·HCl:n valmistus

Kylmään (0 °C) liuokseen, jossa oli 2-syaani-5-(bromimetyyli)tiofeeniä (6,0 g, 30 mmol) THF:ssä (50 ml), lisättiin typen alla NaH (60-prosenttinen öljydispersio, 1,3 g, 33 mmol) annoksittain. Tähän sekoituksessa olevaan suspensioon lisättiin liuos, jossa oli iminodikarboksyyli-

hapon di-t-butyyliesteriä (7,1 g, 33 mmol) THF:ssä (50 ml) 30 minuutin aikana. 3 tunnin sekoittamisen jälkeen lisättiin kyllästetty ammoniumkloridin vesiliuos (100 ml). Haihtuvat liuottimet poistettiin sitten *in vacuo* ja jäännös partitioitiin etyyliasetaatin ja veden välillä. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kahdesti suolavedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 10,5 g (100 %:n saanto) 2-syaani-5-Boc_2NCH_2-tiofeeniä, joka kiteytyi seisoessaan. Tämä kiinteä aine liuotettiin EtOAc:hen (200 ml) ja jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan käyttämällä jää/vesi-haudetta. Vedetöntä HCl-kaasua kuplitettiin liuoksen läpi 10 minuutin ajan ja seosta sekoitettiin 2 tuntia samalla, kun sitä lämmitettiin huoneenlämpötilaan. Liuottimet poistettiin *in vacuo* ja tuloksena oleva kiinteä aine suspensoitiin dietyylieetteriin ja eristettiin suodattamalla. Valkoinen kiinteä aine kuivattiin yli yön alipaineessa, jolloin saatiin 5,2 g (100 %:n saanto) 2-syaani-5-(aminometyyli)tiofeeni·HCl:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 139 (M^+)

Analyysi $C_6H_7N_2SCl$:lle:

Laskettu: C 41,26, H 4,04, N 16,04

Havaittu: C 41,19, H 4,12, N 15,82.

E) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-syaanitiofeenin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu (käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta), valmistettiin 4,6 g (93 %:n saanto) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-syaanitiofeeniä 2-syaani-5-(aminometyyli)tiofeeni·HCl:stä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 602 (M^+)

F) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-C(NH)-NHBoc-tiofeenin valmistus

Vetysulfidikaasua kuplitettiin liuoksen läpi, jossa oli N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-syaanitiofeeniä (1,5 g, 2,5 mmol) ja trietyyliamiinia (4,5 ml) pyridiinissä (45 ml), 5 minuutin ajan, ja sitten astia suljettiin tiiviisti ja sen annettiin seistä yli yön. Seuraavana aamuna typpeä kuplitettiin liuoksen läpi 5 minuutin ajan ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja pestiin kerran vedellä ja kerran suolavedellä, sitten kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Jäännös liuotettiin sitten tolueeniin ja sitä konsentroitiin *in vacuo* kaksi kertaa.

Jäännös liuotettiin sitten asetoniin (100 ml) ja jodimetaani (5 ml) lisättiin. Huoneenlämpötilassa yli yön suoritetun sekoituksen jälkeen liuottimet poistettiin *in vacuo*. Tuloksena oleva kultainen vaahto liuotettiin sitten metanoliin (20 ml), NH_4OAc (0,39 g, 5 mmol) lisättiin ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 1 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (10 ml). Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin K_2CO_3:n (1,73 g, 12,5 mmol) liuos vedessä (10 ml), jota seurasi di-t-butyylidikarbonaatti (2,2 g, 10 mmol). 1 tunnin sekoittamisen jälkeen suspensio laimennettiin etyyliasetaatilla (400 ml) ja pestiin vedellä, jota seurasi suolavesi. Orgaaninen faasi konsentroitiin sitten *in vacuo* ja ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti 10 % etyyliasetaatti/heksaani - 75 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 1,1 g (61 %:n saanto) valkoista vaahtoa.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 720 (M^+)

Analyysi $C_{36}H_{57}N_5O_8S$:lle:

Laskettu: C 60,06, H 7,98, N 9,73

Havaittu: C 59,76, H 8,07, N 9,52.

G) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-amidinotiofeeni·HCl:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 58-E kuvattu, valmistettiin 500 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-amidinotiofeeni·HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 /(A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

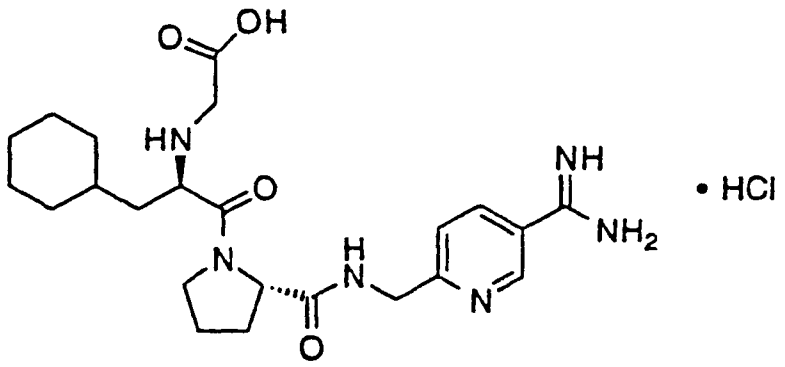
FD-MS, m/e 464,2 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{33}N_5O_4S \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 47,65, H 6,73, N 12,63, Cl 12,79

Havaittu: C 47,53, H 6,57, N 12,59, Cl 12,67.

Esimerkki 66



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-5-amidinopyridiini·HCl (N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)pyridin-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-syaanipyridiinin valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin on kuvattu esimerkissä 64-A, 23-A ja 1-G (käyttäen

N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta), valmistettiin 4,4 g N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-syaanipyridiiniä 2-metyyli-5-syaanipyridiinistä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 597 (M^+)

B) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidinopyridiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin on kuvattu esimerkissä 65-F ja 65-G, valmistettiin 130 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidinopyridiini·HCl:ää N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-syaanipyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

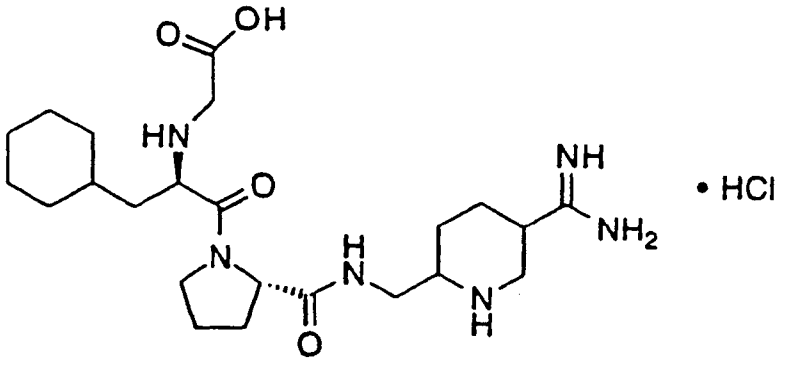
^{1}H-NMR

FAB-MS, m/e 459,3 (MH^+)

HRMS (FAB), m/e laskettu $C_{23}H_{35}N_6O_4$:lle: 459,2720

Havaittu: 459,2707

Esimerkki 67



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidinopiperidiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidinopiperidiini·HCl:n valmistus

N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-syaanipyridiini (1,2 g, 2 mmol), valmistettiin menetelmillä, jotka

olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23-A, 23-B ja 1-B kuvatut. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h). Analyyttisen RPHPLC:n perusteella vähäisemmän tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin osittain *in vacuo* ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 93 mg (9 %:n saanto) vaaleanvihreää kiinteää ainetta.

IR

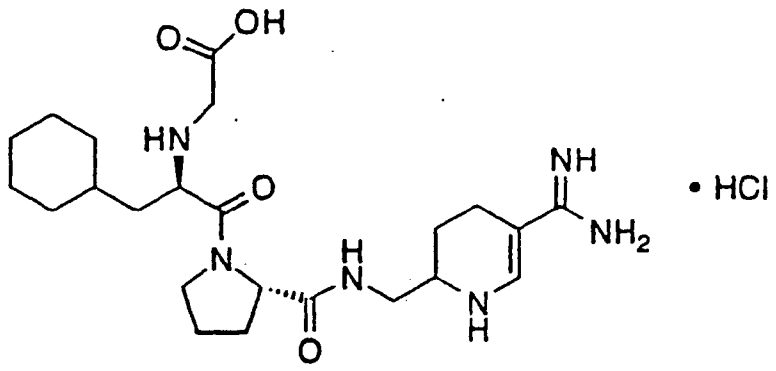
^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 465,5 (MH^+)

HRMS (FAB), m/e laskettu $C_{23}H_{41}N_6O_4$:lle: 465,3189

Havaittu: 465,3191.

Esimerkki 68



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidino-5,6-dehydropiperidiini·HCl

(N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)-1,2,3,4-tetrahydropyridin-2-yyli]-metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-amidino-5,6-dehydropiperidiini·HCl:n valmistus

N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-2-$NHCH_2$-5-syaanipyridiini (1,2 g, 2 mmol) valmistettiin menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23-A, 23-B ja 1-B kuvatut. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2

(98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h). Analyyttisen RPHPLC:n perusteella päätuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin osittain ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 422 mg (39 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

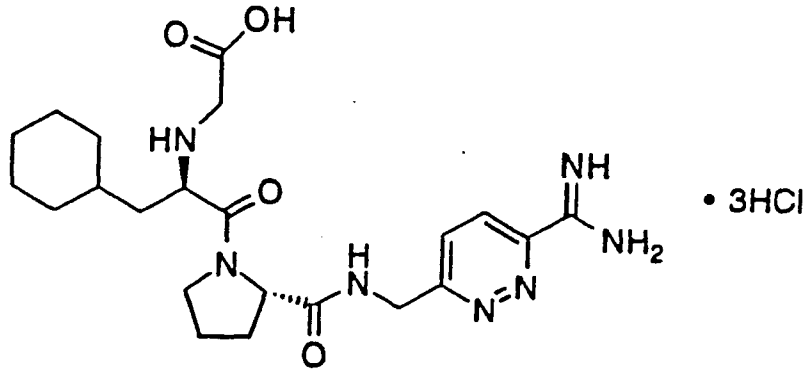
IS-MS, m/e 463,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{38}N_6O_4 \cdot 2,9HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 45,71, H 7,49, N 13,91, Cl 17,01

Havaittu: C 45,51, H 6,83, N 13,66, Cl 16,83.

Esimerkki 69



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-3-$NHCH_2$-6-amidino-pyridatsiini·3HCl (N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[6-(aminoiminometyyli)pyridatsin-3-yyli]metyyli]-L-prolinamiditrihydrokloridi

A) 3-metyyli-6-syaanipyridatsiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 3-metyylipyridatsiini (11 g, 118 mmol) dikloorimetaanissa (200 ml), lisättiin $AlCl_3$ (0,05 g), jota seurasi trimetyylisilyylisyanidi (21 g, 211 mmol). 20 minuutin jälkeen p-tolueenisulfonyylikloridin (38 g, 201 mmol) liuos dikloorimetaanissa (50 ml) lisättiin additiosuppilon kautta ja liuoksen sekoitusta jatkettiin yli yön. Seuraavana aamuna liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös suspensoitiin etanoliin sekoittaen 15 minuutin ajan ja suodatettiin sitten,

jolloin saatiin valkoinen kiinteä aine. Kiinteä aine liuotettiin tetrahydrofuraaniin (200 ml) ja tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni (16 ml, 105 mmol). 1 tunnin jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin heksaanien ja kyllästetyn NH_4Cl:n vesiliuoksen välillä. Faasit erotettiin ja vesifaasi tehtiin emäksiseksi kiinteällä Na_2CO_3:lla, uutettiin sitten kolme kertaa etyyliasetaatilla. Yhdistetyt etyyliasetaattifaasit kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 9 g (64 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 119,1 (M^+)

B) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-3-$NHCH_2$-6-amidino-pyridatsiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 66 kuvatut, 90 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-3-$NHCH_2$-6-amidino-pyridatsiini·HCl:ää valmistettiin 3-metyyli-6-syaanipyridatsiinista. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

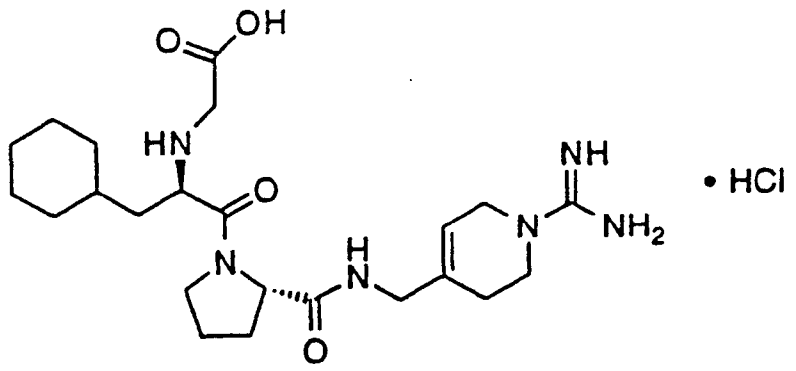
FAB-MS, m/e 460,3 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{33}N_7O_4 \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 43,68, H 6,66, N 16,21

Havaittu: C 44,04, H 6,45, N 15,57.

Esimerkki 70



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidino-3,4-dehydro-piperidiini·HCl

(N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[1-(aminoiminometyyli)1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

A) N,N'-Boc_2-tiourean valmistus

Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli NaH (60-prosenttinen öljydispersio, 9,4 g, 234 mmol) tetrahydrofuraanissa (500 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin tiourea (4,0 g, 52 mmol). 30 minuutin kuluttua kylmähaude poistettiin ja reaktion annettiin sekoittua 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Taas kerran, astia jäähdytettiin 0 °C:n lämpötilaan ja liuos, jossa oli di-t-butyyli-dikarbonaatti (25 g, 115 mmol) tetrahydrofuraanissa (100 ml), lisättiin additiosuppilon välityksellä. Sen jälkeen kun oli sekoitettu 30 minuuttia 0 °C:n lämpötilassa ja vielä 2 tuntia huoneenlämpötilassa, lisättiin kyllästetty $NaHCO_3$:n vesiliuos. Liuos konsentroitiin sitten noin puoleen alkuperäisestä tilavuudesta *in vacuo* ja etyyliasetaatti lisättiin. Orgaaninen faasi pestiin sitten kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella, jota seurasi suolavesi ja kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin, jolloin saatiin 11,9 g (83 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 276 (M^+)

Analyysi $C_{11}H_{20}N_2O_4S$:lle:

Laskettu: C 47,81, H 7,30, N 10,14

Havaittu: C 47,69, H 7,28, N 10,34.

B) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-(N,N'-Boc_2-amidino)-3,4-dehydropiperidiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,4-dehydropiperidiini (0,6 g, 1 mmol) ja trietyyliamiini (0,35 g, 3,4 mmol) dimetyyliformamidissa (10 ml), lisättiin N,N'-Boc_2-tiourea (0,28 g, 1 mmol), jota seurasi $HgCl_2$ (0,28 g, 1 mmol). 4 tunnin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja pestiin kahdesti suolavedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Tuote puhdistettiin piidioksidigeelikromatografialla, ajoliuoksena 20 % etyyliasetaatti/heksaani - 75 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 800 mg (94 %:n saanto) valkoista vaahtoa.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 820 (MH^+)

Analyysi $C_{42}H_{70}N_6O_{10}$:lle:

Laskettu: C 61,59, H 8,61, N 10,26

Havaittu: C 61,81, H 8,79, N 10,45.

C) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidino-3,4-dehydropiperidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 58-E kuvatut, valmistettiin 0,22 g (55 %:n saanto) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-amidino-3,4-dehydro-piperidiini·HCl:ää N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-1-(N,N'-Boc_2-amidino)-3,4-dehydropiperidiinistä. Tuo-

te puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

IR

^{1}H-NMR

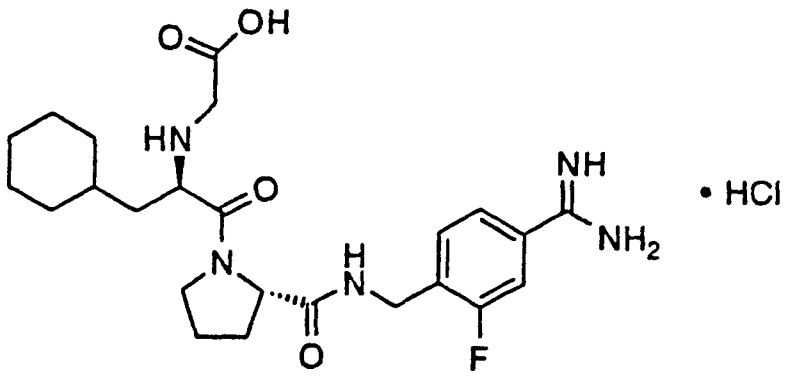
FAB-MS, m/e 463,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{38}N_6O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 47,53, H 7,70, N 14,52, Cl 13,47

Havaittu: C 47,49, H 7,64, N 14,55, Cl 13,48.

Esimerkki 71



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-bentsamidiini·HCl (N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-2-fluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-bentsamidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 66 kuvatut, valmistettiin 0,27 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-bentsamidiini·HCl:ää 3-F-4-Me-bentsonitriilistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 2 h).

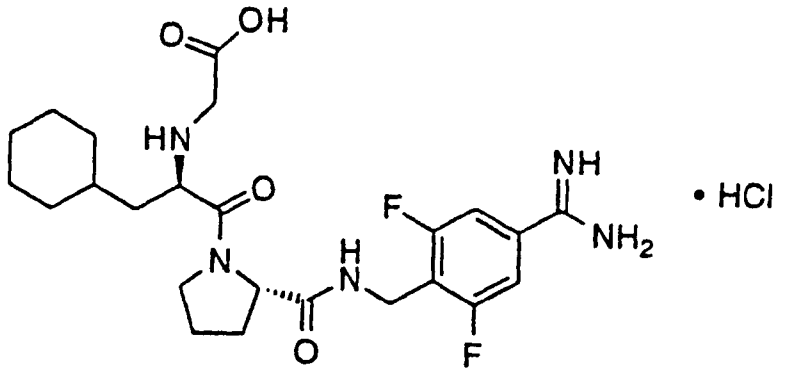
IR

^{1}H-NMR

FAB-MS, m/e 476,3 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{34}N_5O_4F \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 50,09, H 6,83, N 12,17, Cl 12,32
Havaittu: C 49,89, H 6,65, N 12,17, Cl 12,42.

Esimerkki 72



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,5-F_2-bentsamidiini·HCl (N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-2,6-difluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,5-F_2-bentsamidiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 65 kuvatut, valmistettiin 0,28 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3,5-F_2-bentsamidiini·HCl:ää 3,5-F_2-bentsonitriilistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

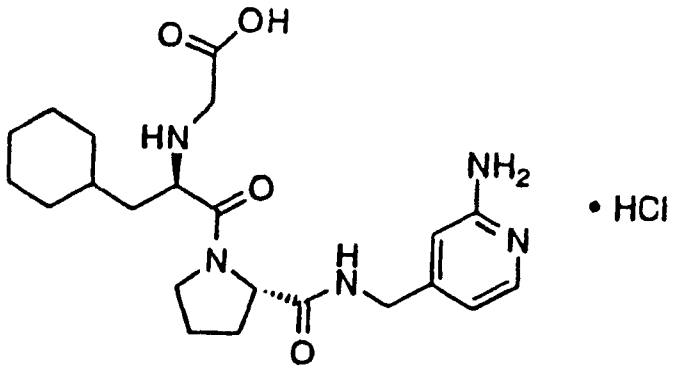
IR

^{1}H-NMR

FAB-MS, m/e 494,2 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{33}N_5O_4F_2 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 48,57, H 6,45, N 11,80, Cl 11,95
Havaittu: C 48,26, H 6,17, N 11,89, Cl 11,90.

Esimerkki 73



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl

A) 4-metyyli-ftaali-imidopyridiini

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 4-metyyli-2-aminopyridiini (50 g, 460 mmol) etikkahapossa (1 l) lisättiin ftaali-anhydridi (68 g, 460 mmol) ja reaktio kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 12 tunnin kuluttua etikkahappoanhydridi (43 ml, 460 mmol) lisättiin ja liuoksen sekoitusta jatkettiin palautusjäähdytyksessä vielä 48 tuntia. Sitten liuotin poistettiin *in vacuo* ja kiinteä jäännös suspensoitiin tolueeniin ja konsentroitiin *in vacuo* kahdesti. Kiinteä aine suspensoitiin etyyliasetaattiin voimakkaasti sekoittaen ja suodatettiin. Tämän etyyliasetaatilla pesemistä käyttävän menettelyn toistamisen jälkeen kiinteä aine kuivattiin yli yön *in vacuo*, jolloin saatiin 46,6 g (42 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 238 (M^+)

Analyysi $C_{14}H_{10}N_2O_2$:lle:

Laskettu: C 70,58, H 4,23, N 11,76

Havaittu: C 70,42, H 4,29, N 11,70.

B) N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-ftaali-imidopyridiinin valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti samanlaisia kuin esimerkissä 64-A, 23-A ja 1-G (käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta) kuvatut, valmistettiin 2,4 g N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-ftaali-imidopyridiiniä 4-metyyli-2-ftaali-imidopyridiinistä.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 717,7 (M^+)

C) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-ftaali-imidopyridiiniä (1,6 g, 2,2 mmol) etanolissa (25 ml), lisättiin hydratsiinihydraattia (0,52 ml, 10,4 mmol). 1 tunnin kuluttua liuottimet poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja konsentroitiin kahdesti *in vacuo*. Jäännös käsiteltiin menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 58-E kuvattu, jolloin saatiin 380 mg (37 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

IR

^{1}H-NMR

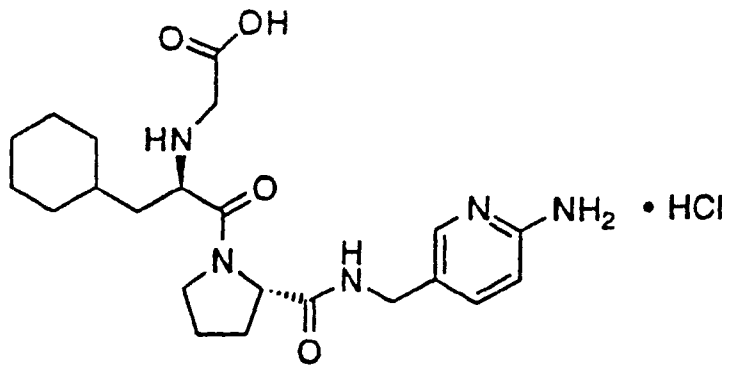
FAB-MS, m/e 432,3 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{33}N_5O_4 \cdot 2,1HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 50,23, H 7,11, N 13,31

Havaittu: C 50,05, H 7,08, N 13,54.

Esimerkki 74



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 73, valmistettiin 0,88 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:ää 5-metyyli-2-aminopyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

IR

^{1}H-NMR

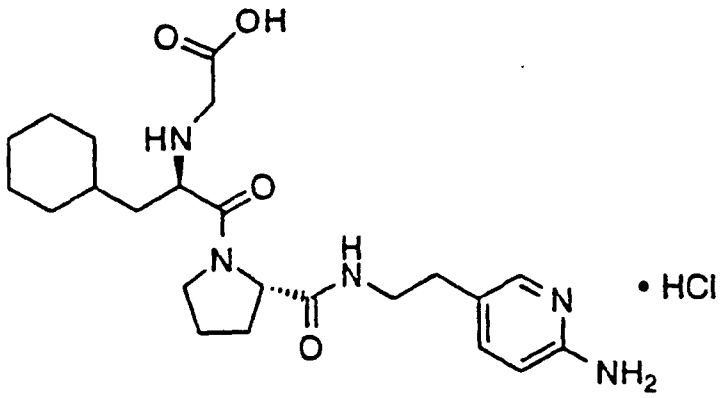
FAB-MS, m/e 432,3 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{33}N_5O_4 \cdot 2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 50,58, H 7,14, N 13,40

Havaittu: C 50,79, H 7,20, N 13,58.

Esimerkki 75



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl

A) 5-Me-2-Boc_2N-pyridiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 5-metyyli-2-aminopyridiini (10,5 g, 100 mmol) dikloorimetaanissa (200 ml) 0 °C:n lämpötilassa, lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiini (25,8 g, 200 mmol), jota seurasi di-t-butyylidikarbonaatti (55 g, 250 mmol) ja lopuksi 4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiini (12,2 g, 100 mmol). Kylmähaude poistettiin ja liuoksen annettiin sekoittua edelleen yön yli. Sitten seos laimennettiin etyyliasetaatilla (600 ml) ja pestiin kolme kertaa kyllästetyllä NH_4Cl:n vesiliuoksella, kerran suolavedellä, kahdesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella ja vielä kerran suolavedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten ($MgSO_4$), suodatettiin, konsentroitiin *in vacuo* ja ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena 10 % etyyliasetaatti/heksaani - 75 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 12,8 g (42 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 308 (M^+)

Analyysi $C_{16}H_{24}N_2O_4$:lle:

Laskettu: C 62,32, H 7,84, N 9,08

Havaittu: C 62,51, H 8,11, N 9,37.

B) 5-$BrCH_2$-2-Boc_2N-pyridiinin valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 64-A kuvatut, valmistettiin noin 11,6 g 5-$BrCH_2$-2-Boc_2N-pyridiiniä (joka oli kontaminoitunut lähtömateriaalilla) 5-Me-2-Boc_2N-pyridiinistä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 386,3 (M^+)

Analyysi $C_{16}H_{23}N_2O_4Br$:lle:

Laskettu: C 49,62, H 5,99, N 7,23

Havaittu: C 49,86, H 6,00, N 7,07.

C) 5-$NCCH_2$-2-Boc_2N-pyridiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli hieman epäpuhdas 5-$BrCH_2$-2-Boc_2N-pyridiini (9,7 g, 25 mmol) dimetyyliformamidissa (150 ml), lisättiin 18-kruunu-6 (1,32 g, 5 mmol), jota seurasi KCN (1,95 g, 30 mmol). 6 tunnin sekoittamisen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös ajettiin piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 40 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 2,6 g (31 %:n saanto kahdesta vaiheesta) valkoista kiinteää ainetta.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 333,4 (M^+)

Analyysi $C_{17}H_{23}N_3O_4$:lle:

Laskettu: C 61,25, H 6,95, N 12,60

Havaittu: C 61,09, H 6,92, N 12,53.

D) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 5-$NCCH_2$-2-Boc_2N-pyridiini (2,5 g, 7,5 mmol) metanolissa (150 ml), lisättiin $CoCl_2$ (0,97 g, 7,5 mmol) ja vesi (0,81 g, 45 mmol). 5 minuutin kuluttua $NaBH_4$ (2,84 g, 75 mmol) lisättiin pieninä annoksina 15 minuutin aikana. Toisen 15 minuutin kuluttua liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös liuotettiin väkevään NH_4OH:n vesiliuokseen ja uutettiin useita kertoja etyyliasetaatilla. Yhdistetyt etyyliasetaattiuutokset kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*.

Sitten jäännös käsiteltiin menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 1-A ja 73-C kuvatut, jolloin saatiin 1,2 g (33 %:n saanto) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl:ää. Tuote puhdis-

tettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 60/40 (A/B), 150 min).

IR

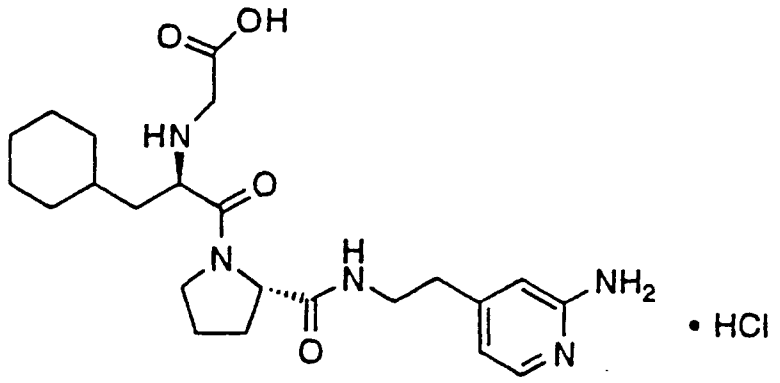
^{1}H-NMR

FAB-MS, m/e 446,3 (MH^+)

HRMS (FAB) laskettu $C_{23}H_{36}N_5O_4$:lle: 446,2767

Havaittu: 446,2769

Esimerkki 76



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl

A) 4-BocNHCH_2CH_2-2-CN-pyridiinin valmistus

Liuokseen, jossa oli 4-BocNHCH_2CH_2-pyridiini (2,22 g, 10 mmol) asetonissa (50 ml), lisättiin liuos, jossa oli m-klooriperbentsoehappo (5,2 g, 30 mmol) asetonissa (50 ml), additiosuppilon kautta 10 minuutin aikana. Yli yön sekoituksen jälkeen liuotin poistettiin *in vacuo* ja jäännös partitioitiin veden (100 ml) ja dietyylieetterin (100 ml) välillä. Orgaaninen faasi erotettiin ja uutettiin kolme kertaa vedellä. Yhdistetty vesifaasi kyllästettiin sitten kiinteällä NaCl:llä ja uutettiin kolme kertaa dikloorimetaanilla (100 ml). Yhdistetyt dikloorimetaaniuutokset pestiin kerran vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä, suodatettiin ja konsentroitiin pieneen tilavuuteen *in vacuo* ja sitten lisättiin dietyylieetteri. Valkoinen sakka (2,0 g) suodatettiin ja kuivattiin *in vacuo*.

Puolet eristetystä kiinteästä aineesta (4,2 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (10 ml) ja tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin trimetyylisilyylisyanidi (0,84 ml, 6,3 mmol), jota seurasi N,N-dimetyylikarbamoyylikloridi (0,58 ml, 6,3 mmol). Yli yön sekoittamisen jälkeen 1 M $KHCO_3$:n vesiliuos (1 ml) lisättiin hitaasti ja seos partitioitiin etyyliasetaatin ja veden välillä. Orgaaninen faasi pestiin sitten kahdesti suolavedellä, kuivattiin $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 0,6 g (58 %:n saanto) meripihkan väristä öljyä, joka kiteytyi seisoessaan.

IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 247 (M^+)

Analyysi $C_{13}H_{17}N_3O_2$:lle:

Laskettu: C 63,31, H 7,02, N 16,99

Havaittu: C 63,31, H 7,02, N 16,71.

B) 4-BocNHCH$_2$CH$_2$-2-CbzNH-pyridiinin valmistus

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 4-BocNHCH$_2$CH$_2$-2-CN-pyridiini (0,5 g, 2 mmol) metanolissa (2,4 ml), lisättiin 5 N NaOH (1,6 ml, 8 mmol) ja liuos kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. 24 tunnin kuluttua liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja sen annettiin sekoittua vielä 48 tuntia. Sitten pH säädettiin arvoon 7 1 N HCl:llä ja liuottimet poistettiin *in vacuo*.

Jäännös suspensoitiin tolueeniin (50 ml) ja kuumennettiin palautusjäähdytyksessä. Tähän sekoituksessa olevaan liuokseen lisättiin peräjälkeen trietyyliamiini (0,36 ml, 2,6 mmol), bentsyylialkoholi (0,27 ml, 2,6 mmol) ja difenyylifosforyyliatsidi (0,72 g, 2,6 mmol). Yli yön palautusjäähdytyksessä sekoituksen jälkeen liuoksen annettiin jäähtyä ja sitten se laimennettiin etyyliasetaatilla (200 ml) ja pestiin kahdesti kyllästetyllä NH_4Cl:n vesiliuoksella ja kahdesti suolavedellä. Orgaaninen faasi kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä, suodatettiin ja konsentroitiin *in*

vacuo. Jäännös ajettiin sitten piidioksidigeelikromatografiassa, ajoliuoksena portaittainen gradientti heksaani - 50 % etyyliasetaatti/heksaani. TLC:n perusteella tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 0,37 g (50 %:n saanto) valkoista kiinteää ainetta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 371,2 (M^+)

Analyysi $C_{20}H_{25}N_3O_4$:lle:

Laskettu: C 64,67, H 6,78, N 11,31

Havaittu: C 64,90, H 7,07, N 11,06.

C) HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 23-A, 1-G (käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta), 23-D ja 58-E kuvatut, valmistettiin 48 mg HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2CH_2$-2-aminopyridiini·HCl:ää 4-Boc-$NHCH_2CH_2$-2-CbzNH-pyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2) (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

^{1}H-NMR

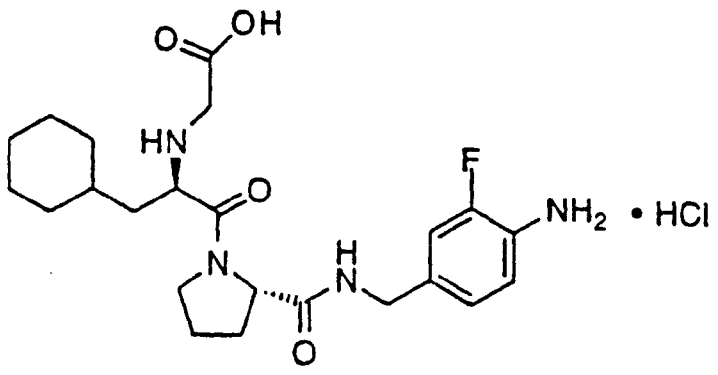
FAB-MS, m/e 446,4 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{35}N_5O_4 \cdot 1,5HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,30, H 7,49, N 13,51

Havaittu: C 53,64, H 7,27, N 13,80.

Esimerkki 77



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-F-aniliini·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-F-aniliini·HCl:nvalmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 64 kuvatut, valmistettiin 0,55 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-F-aniliini·HCl:ää 3-F-4-NO_2-tolueenista. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2) (A/B) - 60/40 (A/B), 180 min).

IR

^{1}H-NMR

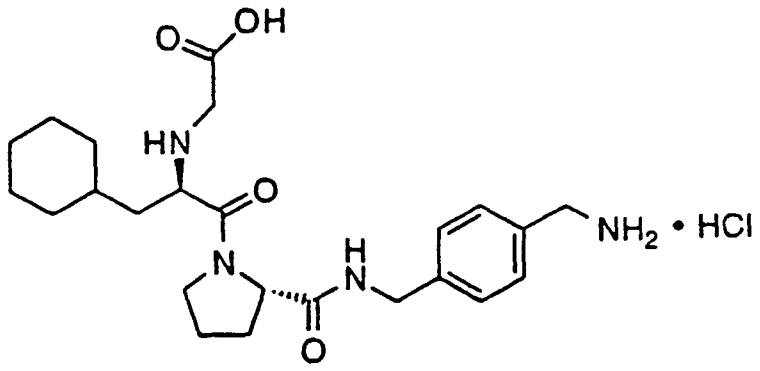
FAB-MS, m/e 449,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_4O_4F \cdot 0,9HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 55,32, H 7,25, N 11,22, Cl 6,39

Havaittu: C 55,49, H 6,93, N 11,15, Cl 6,23.

Esimerkki 78



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2$·HCl

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2$·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 10 kuvatut, käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta Boc-D-Phe-ProOH:n sijasta, valmistettiin 0,53 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2$·HCl:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2) (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

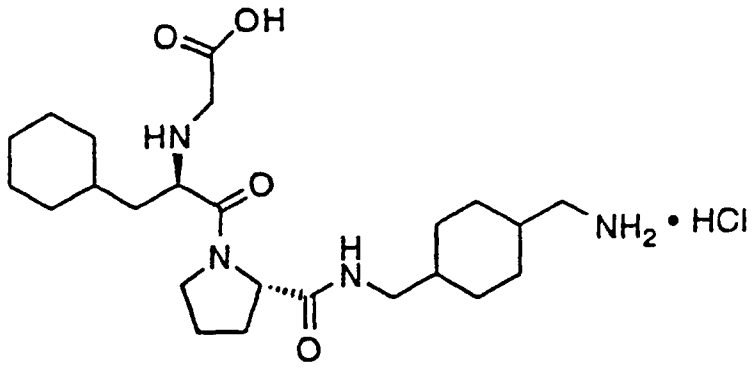
IR

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 445,4 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{36}N_4O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 54,00, H 7,40, N 10,50, Cl 14,61
Havaittu: C 54,18, H 7,54, N 10,31, Cl 14,86.

Esimerkki 79



HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_{10}CH_2NH_2 \cdot HCl$

HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_{10}CH_2NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

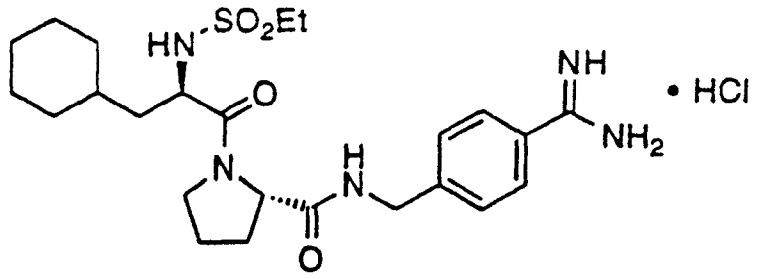
Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 12 kuvatut, käyttäen N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:ta Boc-D-Phe-ProOH:n sijasta, valmistettiin 0,04 g HO_2CCH_2-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_{10}CH_2NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (98/2 (A/B) - 70/30 (A/B), 150 min).

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 451 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{42}N_4O_4 \cdot 2,7HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:
Laskettu: C 51,65, H 8,25, N 10,04
Havaittu: C 51,47, H 7,87, N 9,97.

Esimerkki 80



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(N-(etyylisulfonyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 18 kuvatut, käyttäen $EtSO_2$-D-Cha-ProOH:ta Cbz-D-1-Piq-ProOH:n sijasta, valmistettiin 3,6 g $EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (90/10) (A/B) - 50/50 (A/B), 180 min).

IR

^{1}H-NMR

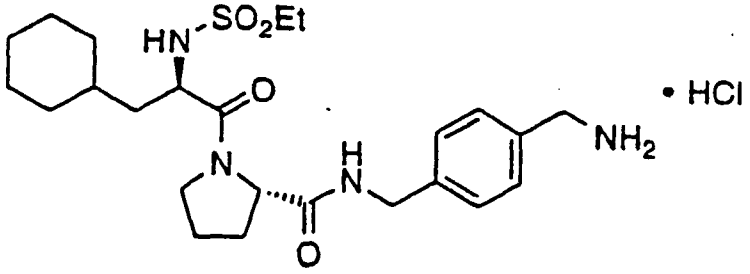
FAB-MS, m/e 429,3 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{37}N_5O_4S \cdot HCl$:lle:

Laskettu: C 54,58, H 7,25, N 13,26, Cl 6,71

Havaittu: C 54,31, H 7,31, N 13,37, Cl 6,71.

Esimerkki 81



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$

$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 10 kuvatut, käyttäen $EtSO_2$-D-Cha-ProOH:ta Boc-D-Phe-ProOH:n tilalla, valmistettiin $EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2 \cdot HCl$. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (90/10) (A/B) - 50/50 (A/B), 180 min).

IR

^{1}H-NMR

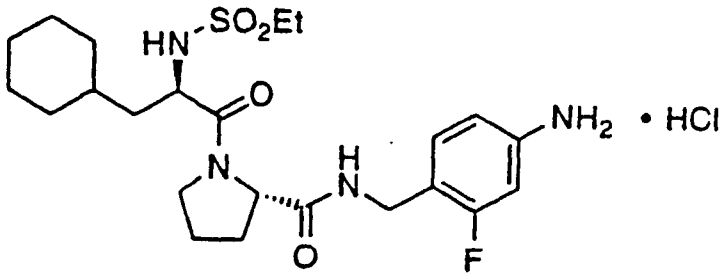
FAB-MS, m/e 479,4 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{38}N_4O_4S \cdot HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 54,07, H 7,75, N 10,51, Cl 6,65

Havaittu: C 54,13, H 7,44, N 10,51, Cl 6,78.

Esimerkki 82



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2 \cdot HCl$

$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 64 kuvatut, käyttäen $EtSO_2$-D-Cha-ProOH:ta N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:n tilalla, valmistettiin 0,53 g $EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-3-F-$C_6H_3NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2 (90/10) (A/B) - 50/50 (A/B), 180 min).

IR

^{1}H-NMR

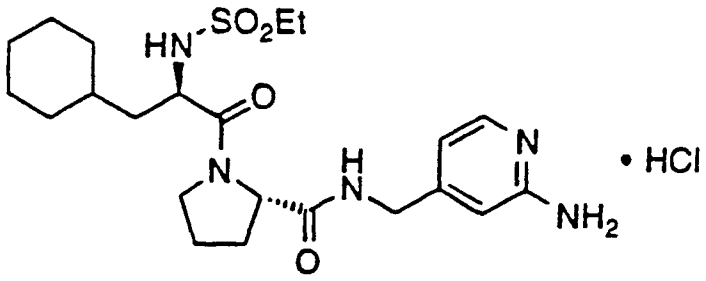
FAB-MS, m/e 483,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{35}N_4O_4SF \cdot 1,1HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,95, H 7,03, N 10,54, Cl 7,33

Havaittu: C 52,09, H 6,94, N 10,39, Cl 7,24.

Esimerkki 83



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl

$EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 73 kuvatut, käyttäen $EtSO_2$-D-Cha-ProOH:ta N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:n sijasta, valmistettiin 0,22 g $EtSO_2$-D-Cha-Pro-4-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:ää 4-metyyli-2-aminopyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, (90/10 (A/B) - 50/50 (A/B), 180 min).

^{1}H-NMR

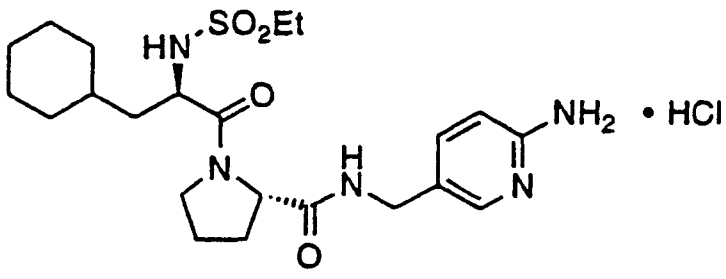
FAB-MS, m/e 466,4 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{35}N_5O_4S·1,1HCl$:lle:

Laskettu: C 52,25, H 7,19, N 13,85, Cl 7,71

Havaittu: C 52,49, H 6,96, N 13,96, Cl 7,76.

Esimerkki 84



$EtSO_2$-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl

$EtSO_2$-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 73 kuvatut, käyttäen $EtSO_2$-D-Cha-ProOH:ta N-(t-BuO_2CCH_2)-N-Boc-D-Cha-ProOH:n sijasta, valmistettiin 0,24 g $EtSO_2$-D-Cha-Pro-5-$NHCH_2$-2-aminopyridiini·HCl:ää 5-metyyli-2-aminopyridiinistä. Tuote puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä 2, (90/10 (A/B) - 50/50 (A/B), 180 min).

^{1}H-NMR

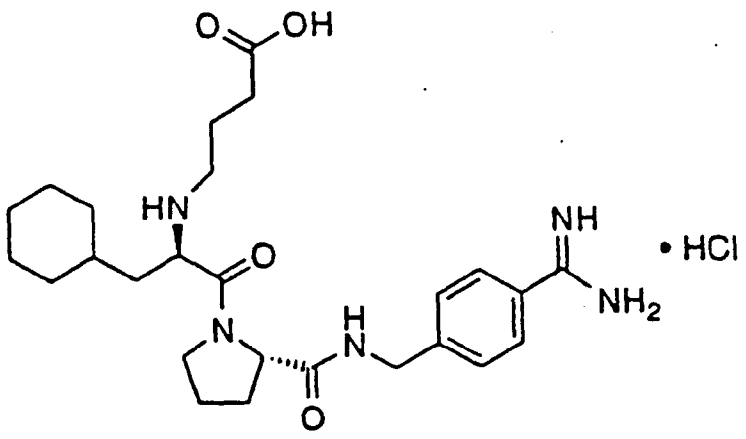
FAB-MS, m/e 466,4 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{35}N_5O_4S·1,15HCl$:lle:

Laskettu: C 52,06, H 7,18, N 13,80, Cl 8,03

Havaittu: C 52,38, H 6,97, N 14,20, Cl 8,46.

Esimerkki 85



$HOOCCH_2CH_2CH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2$·HCl (N-(3-karboksipropyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) Cbz-MeOOCCH=$CHCH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)$-NHCbz:n valmistus

Liuokseen, jossa oli D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)$-NHCbz·2HCl (2,5 g, 4,1 mmol) DMF:ssä (50 ml), lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiini (2,2 ml, 12,2 mmol) ja metyyli-3-bromikrotonaatti (0,95 g, 4,5 mmol). 48 tunnin

sekoituksen jälkeen lisättiin Cbz-Cl (0,7 ml, 5 mmol) ja lisää N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (0,85 ml, 5 mmol). 16 tunnin lisäsekoituksen jälkeen haihtuvat aineet poistettiin *in vacuo*. Jäännös partitioitiin etyyliasetaatin (100 ml) ja kyllästetyn ammoniumkloridin vesiliuoksen (100 ml) välillä. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kerran kyllästetyllä ammoniumkloridin vesiliuoksella (50 ml), kahdesti kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (50 ml) ja kahdesti suolavedellä (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*. Epäpuhdas jäännös puhdistettiin flashkromatografialla (etyyliasetaatti/heksaani-gradientti), jolloin saatiin 660 mg (22 %:n saanto) valkoista vaahtoa.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 766 (M^+)

Analyysi $C_{43}H_{51}N_5O_8$:lle:

Laskettu: C 67,43, H 6,71, N 9,14

Havaittu: C 67,22, H 6,57, N 8,98.

B) $HOOCCH_2CH_2CH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$:n valmistus

Liuokseen, jossa oli Cbz-$MeOOCCH{=}CHCH_2$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$ (0,5 g, 0,65 mmol) etanolissa (5 ml), lisättiin 1 N natriumhydroksidi (0,65 ml). Huoneenlämpötilassa tapahtuneen 5 tunnin sekoituksen jälkeen 1 N HCl (3 ml), 10 % palladoitu hiili (0,5 g), H_2O (15 ml) ja etanoli (25 ml) lisättiin. Sekoitettavasta suspensiosta poistettiin kaasu alipaineessa, sitten se sijoitettiin vetyilmakehän alle 18 tunniksi. Piimaa lisättiin ja liete suodatettiin. Suodos konsentroitiin *in vacuo* ja puhdistettiin RPHPLC-menetelmällä (menetelmä 2, 98/2 (A/B), nousu 75/25:een (A/B) 150 minuutin aikana). Puhtaan tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 46 mg (13 %:n saanto).

^{1}H-NMR

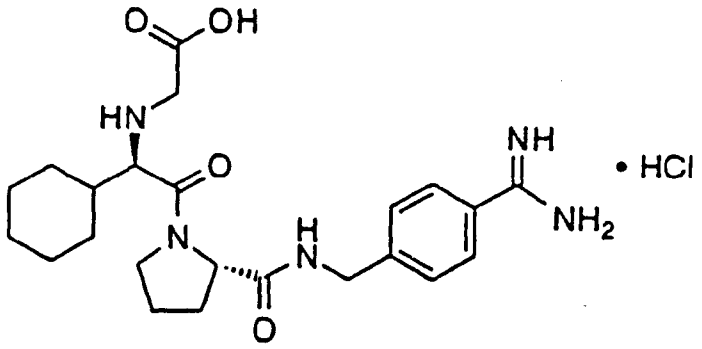
FAB-MS, m/e 486,3 (MH^+)

Analyysi $C_{26}H_{39}N_5O_4 \cdot 2,1HCl$:lle:

Laskettu: C 55,15, H 7,35, N 12,19, Cl 13,24

Havaittu: C 55,55, H 7,37, N 12,19, Cl 13,58.

Esimerkki 86



$HOOCCH_2$-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$
(N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyyliglysyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) D-sykloheksyyliglysiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 53-B kuvattu, valmistettiin 16,1 g (16 %:n saanto) D-sykloheksyyliglysiiniä lähtien D-fenyyliglysiinistä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 117 (M^+)

Analyysi $C_8H_{15}NO_2$:lle:

Laskettu: C 61,12, H 9,62, N 8,91

Havaittu: C 61,23, H 9,56, N 8,73.

B) Boc-D-sykloheksyyliglysiinin valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 17-A kuvattu (käyttäen di-tert-butyylidikarbonaattia), valmistettiin 22 g (90 %:n saanto) Boc-D-sykloheksyyliglysiiniä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 258 (M^+)

Analyysi $C_{13}H_{23}NO_4$:lle:

Laskettu: C 60,68, H 9,01, N 5,44

Havaittu: C 60,91, H 9,18, N 5,38.

C) Boc-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 20,5 g (76 %:n saanto) Boc-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:aa Boc-Pro-OH:sta ja $NH_2CH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 481 (M^+)

Analyysi $C_{26}H_{32}N_4O_5$:lle:

Laskettu: C 64,98, H 6,71, N 11,66

Havaittu: C 64,76, H 6,78, N 11,62.

D) Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 18,4 g (100 %:n saanto) Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz \cdot 2HCl$:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 381 (M^+)

Analyysi $C_{21}H_{26}N_4O_3Cl_2$:lle:

Laskettu: C 55,63, H 5,78, N 12,36

Havaittu: C 54,19, H 6,27, N 12,15.

E) Boc-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 3,6 g (97 %:n saanto) Boc-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:aa.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 619 (M^+)

Analyysi $C_{34}H_{45}N_5O_6$:lle:

Laskettu: C 65,89, H 7,32, N 11,30

Havaittu: C 67,59, H 8,07, N 10,99.

F) Cbz-t-Bu$OOCCH_2$-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 23-A ja 85-A kuvatut (käyttäen bromi-

etikkahapon t-butyyliesteriä ja bentsyylikloori-formiaattia), valmistettiin 1,6 g (45 %:n saanto) N-Cbz-N-(t-$BuOOCCH_2$)-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCbz$:aa.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 769 (M^+)

Analyysi $C_{43}H_{53}N_5O_8$:lle:

Laskettu: C 67,26, H 6,96, N 9,12

Havaittu: C 67,50, H 6,97, N 9,11.

G) $HOOCCH_2$-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 23-A (käyttäen dioksaania liuottimena) ja 18-F kuvatut, valmistettiin 411 mg (61 %:n saanto) $HOOCCH_2$-D-Chg-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

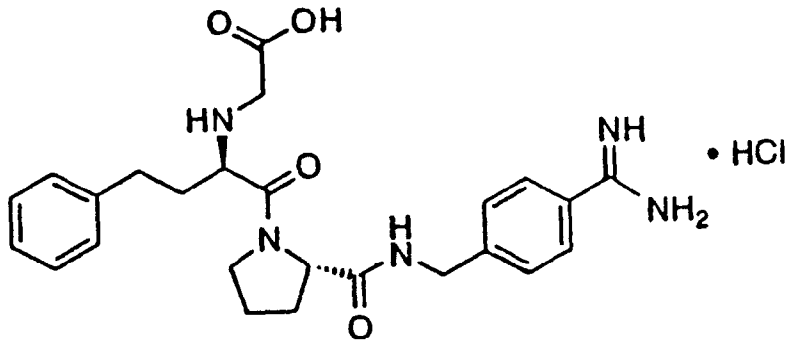
FAB-MS, m/e 444,3 (MH^+)

Analyysi $C_{23}H_{33}N_5O_4\cdot 2,5HCl$:lle:

Laskettu: C 51,67, H 6,69, N 13,10

Havaittu: C 51,84, H 6,50, N 13,15.

Esimerkki 87



$HOOCCH_2$-D-hPhe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2\cdot HCl$

(N-(karboksimetyyli)-D-homofenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidihydrokloridi)

A) $HOOCCH_2$-D-hPhe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 86 kuvatut, valmistettiin 335 mg $HOOCCH_2$-D-hPhe-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää lähtien Boc-D-hPhe-OH:sta.

^{1}H-NMR

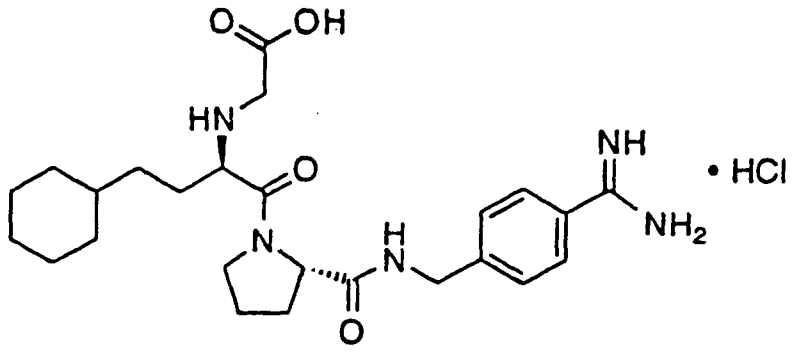
FAB-MS, m/e 466,3 (MH^+)

Analyysi $C_{25}H_{31}N_5O_4 \cdot 2,1HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,61, H 6,32, N 12,50, Cl 13,29

Havaittu: C 53,58, H 6,08, N 12,59, Cl 13,67.

Esimerkki 88



$HOOCCH_2$-D-hCha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$ (N-(karboksimetyyli)-D-homosykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

A) Boc-D-hCa-OH:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 53-D kuvattu, valmistettiin 5,1 g (100 %:n saanto) Boc-D-hCa-OH:ta lähtien Boc-D-hPhe-OH:sta.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 240 (M^+)

Analyysi $C_{15}H_{27}NO_4$:lle:

Laskettu: C 63,13, H 9,54, N 4,91

Havaittu: C 63,38, H 9,39, N 5,12.

B) $HOOCCH_2$-D-hCha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 86 kuvatut, valmistettiin 135 mg $HOOCCH_2$-D-hCha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

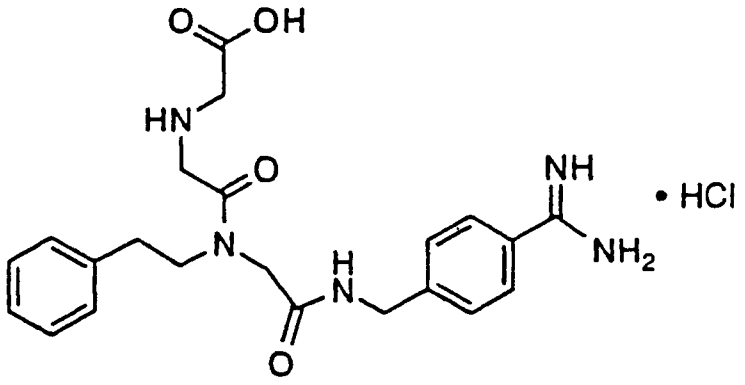
FAB-MS, m/e 472,3 (MH^+)

Analyysi $C_{25}H_{37}N_5O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 0,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 53,54, H 7,22, N 12,49, Cl 13,91

Havaittu: C 53,29, H 7,01, N 12,46, Cl 14,30.

Esimerkki 89



$HOOCCH_2$-Gly-N-$C_6H_5CH_2CH_2$Gly-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) $HOOCCH_2$-Gly-N-$C_6H_5CH_2CH_2$Gly-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-G, 1-D, 1-G, 23-A, 85-A ja 18-F kuvatut, valmistettiin 365 mg N-$HOOCCH_2$-Gly-N-$C_6H_5CH_2CH_2$Gly-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^{1}H-NMR

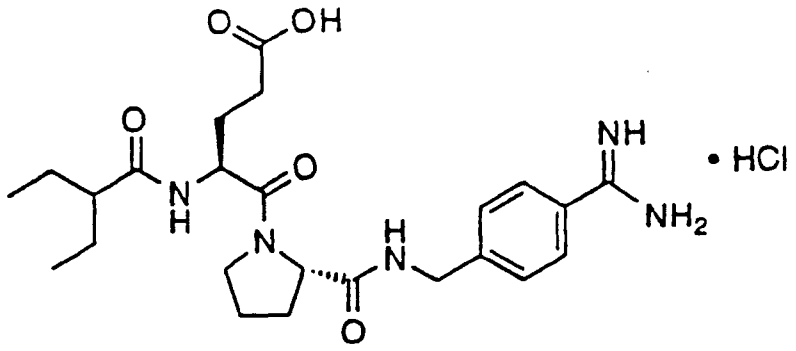
FAB-MS, m/e 426,2 (MH^+)

Analyysi $C_{22}H_{27}N_5O_4 \cdot 2,2HCl \cdot 1,5H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,60, H 6,09, N 13,15, Cl 14,64

Havaittu: C 49,79, H 5,71, N 13,31, Cl 14,49.

Esimerkki 90



$(C_2H_5)_2CHCO$-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) Boc-(γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 1-G kuvattu, valmistettiin 2,7 g (64 %:n saanto) Boc-(γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:aa lähtien Boc-(γ-OBn)-Glu-OH:sta ja Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz \cdot 2HCl$:stä.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 700 (M^+)

Analyysi $C_{38}H_{45}N_5O_8$:lle:

Laskettu: C 65,22, H 6,48, N 10,01

Havaittu: C 65,00, H 6,56, N 10,06.

B) (γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz \cdot 2HCl$:n valmistus

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 23-A kuvattu, valmistettiin 2,38 g (98 %:n saanto) (γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz \cdot 2HCl$:ää.

^{1}H-NMR

FD-MS, m/e 600 (M^+)

Analyysi $C_{33}H_{39}N_5O_6Cl_2$:lle:

Laskettu: C 58,93, H 5,84, N 10,41

Havaittu: C 58,64, H 6,00, N 10,63.

C) $(C_2H_5)_2CHCO$-(γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz$:n **valmistus**

Sekoituksessa olevaan seokseen, jossa oli (γ-OBn)-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NHCBz \cdot 2HCl$ (1,3 g, 2 mmol) THF/H_2O:ssa (50 ml kumpaakin), lisättiin K_2CO_3 (1,38 g, 10 mmol) ja 2-etyylibutyryylikloridi (0,3 g, 2,2 mmol). 10 minuutin sekoituksen jälkeen haihtuvat aineet poistettiin *in vacuo*. Tuloksena oleva jäännös partitioitiin veden ja etyyliasetaatin välillä (100 ml kumpaakin). Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kahdesti sekä kyllästetyllä ammoniumkloridin vesiliuoksella että suolavedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin 1,45 g (100 %:n saanto).

^1H-NMR

FD-MS, m/e 698 (M^+)

Analyysi $C_{39}H_{47}N_5O_7$:lle:

Laskettu: C 67,13, H 6,79, N 10,04

Havaittu: C 67,11, H 6,70, N 9,74.

D) $(C_2H_5)_2CHCO$-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n **valmistus**

Menetelmällä, joka oli oleellisesti vastaava kuin esimerkissä 18-F kuvattu, valmistettiin 425 mg (47 %:n saanto) $(C_2H_5)_2CHCO$-Glu-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää. Tuotteen puhdistukseen käytettiin HPLC-menetelmää 2 (nousu 98/2 A/B - 75/25 A/B 150 minuutin aikana).

^1H-NMR

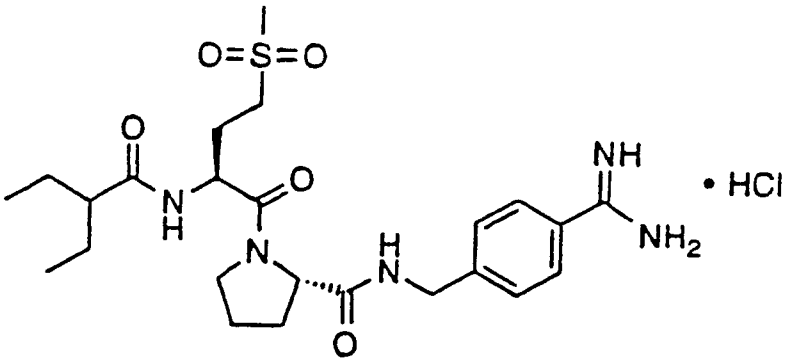
FAB-MS, m/e 474,3 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{35}N_5O_5 \cdot 1,5HCl \cdot 1,1H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,10, H 6,91, N 12,41, Cl 9,43

Havaittu: C 51,10, H 6,81, N 12,41, Cl 9,62.

Esimerkki 91



$(C_2H_5)_2CHCO\text{-}Met(O_2)\text{-}Pro\text{-}p\text{-}NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

A) $(C_2H_5)_2CHCO\text{-}Met(O_2)\text{-}Pro\text{-}p\text{-}NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkissä 90 kuvattu, valmistettiin 530 mg $(C_2H_5)_2$-$CHCO\text{-}Met(O_2)\text{-}Pro\text{-}p\text{-}NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^1H-NMR

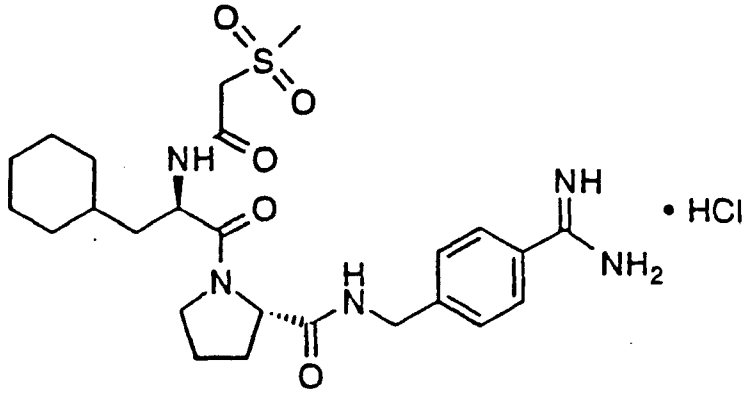
FAB-MS, m/e 508,2 (MH^+)

Analyysi $C_{24}H_{37}N_5O_5S \cdot 1,1HCl$:lle:

Laskettu: C 52,63, H 7,01, N 12,79, Cl 7,12

Havaittu: C 52,42, H 7,03, N 12,80, Cl 6,99.

Esimerkki 92



$MeSO_2CH_2CO\text{-}D\text{-}Cha\text{-}Pro\text{-}p\text{-}NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$

(N-(metyylisulfonyyliasetyyli)-L-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi-hydrokloridi)

$MeSO_2CH_2CO$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:n valmistus

Menetelmillä, jotka olivat oleellisesti vastaavia kuin esimerkeissä 1-G ja 18-F kuvatut, valmistettiin 550 mg $MeSO_2CH_2CO$-D-Cha-Pro-p-$NHCH_2C_6H_4C(NH)NH_2 \cdot HCl$:ää.

^1H-NMR

FAB-MS, m/e 520,5 (MH^+)

Analyysi $C_{25}H_{37}N_5O_5S \cdot 1,2HCl \cdot H_2O$:lle:

Laskettu: C 51,64, H 6,97, N 12,04, Cl 7,32

Havaittu: C 51,58, H 6,84, N 12,18, Cl 7,61.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden uskotaan inhiboivan selektiivisesti trombiinia verrattuna muihin proteinaaseihin ja ei-entsyymi-proteiineihin, jotka ovat osallisena veren hyytymisessä, ilman elimistön luonnollisen hyytymänhajottamiskyvyn havaittavaa häiriintymistä (yhdisteillä on vähäinen inhibitorinen vaikutus fibrinolyysiin). Lisäksi sellaisen selektiivisyyden uskotaan sallivan käytön trombolyyttisten aineiden kanssa ilman, että se oleellisesti häiritsisi trombolyysiä ja fibrinolyysiä. Lisäksi tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden uskotaan olevan aktiivisia suun kautta annettuna.

Keksintö yhdessä aspektissaan tarjoaa menetelmän, jolla voidaan inhiboida trombiinia nisäkkäissä, mille on tunnusmerkillistä, että hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle annetaan tehokas (trombiinia inhiboiva) annos kaavan I mukaista yhdistettä.

Tämän menetelmän lukuun ottama trombiinin inhiboituminen käsittää sekä lääketieteellisen, terapeuttisen ja/tai profylaktisen hoidon asianmukaisesti.

Toisessa suoritusmuodossa keksintö koskee sellaisten tilojen hoitoa ihmisessä tai eläimessä, joissa trombiinin inhibitio on tarpeen. Keksinnön mukaisten yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä eläimissä, mukaan lukien ihminen, hoidettaessa tai ehkäistäessä tromboosia ja tilanteita, joissa veri voi hyytyä liikaa veressä ja kudok-

sissa. Tautitilat, joissa yhdisteillä on mahdollista hyötykäyttöä, ovat tromboosin ja tilanteiden, joissa veri voi hyytyä liikaa, hoidossa tai ehkäisyssä veressä ja kudoksissa. Tautitiloihin, joissa yhdisteillä on mahdollista hyötykäyttöä hoidossa ja/tai ehkäisyssä, sisältyvät laskimon tromboosi ja keuhkoembolia, valtimon tromboosi, kuten sydänlihaksen iskemia, sydänlihaksen infarkti, epästabiili angina pectoris, tromboosista johtuva halvaus ja perifeerisen valtimon tromboosi. Lisäksi yhdisteillä odotetaan olevan hyötykäyttöä ehkäistäessä ateroskleroottisia tauteja, kuten sepelvaltimotautia, aivovaltimoiden tautia ja perifeeristen valtimoiden tautia. Lisäksi yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä yhdessä trombolyyttisten aineiden kanssa sydänlihaksen infarktissa. Lisäksi yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä hoidettaessa tai ehkäistäessä trombolyysin jälkeistä uudelleen tukkeutumista, ihon kautta tapahtuvaa transluminaalista angioplastiaa (PTCA), disseminoitunutta intravaskulaarista koagulaatiota (DIC), sekä sepelvaltimon ohitusleikkauksissa. Lisäksi yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä estettäessä tromboosin uusiutumista mikrokirurgian jälkeen. Lisäksi yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä antikoagulanttihoidossa keinotekoisten elinten ja sydänläppien yhteydessä. Lisäksi yhdisteiden odotetaan olevan hyödyllisiä antikoagulanttihoidossa hemodialyysissä ja disseminoituneessa intravaskulaarisessa koagulaatiossa. Toinen odotettu hyötykäyttö on potilaissa *in vivo* käytettävien katetrien ja mekaanisten laitteiden huuhtominen, ja antikoagulanttina veren, plasman ja muiden verituotteiden säilömiseen *in vitro*. Edelleen yhdisteillä odotetaan olevan hyötykäyttöä muissa taudeissa, joissa veren hyytyminen voisi olla perimmäinen aiheuttaja tai sekundääristen patologisten muutosten lähde, kuten syövässä, mukaan lukien metastaasit, ja tulehdustaudeissa, mukaan lukien artriitti ja diabetes. Antikoagulanttiyhdiste annetaan suun kautta tai parente-

raalisesti, esim. laskimonsisäisenä infuusiona (iv), lihaksensisäisenä injektiona (im) tai ihonalaisena injektiona (sc).

Tämän keksinnön mukaisen annettavan yhdisteen spesifinen annos, jolla saadaan terapeuttisia ja/tai profylaktisia vaikutuksia, on tietenkin tapausta ympäröivien erityisten olosuhteiden määräämä, kuten esimerkiksi annettu yhdiste, antonopeus ja hoidettava tila.

Tyypillinen päivittäinen annos kunkin edellä mainitun hyötykäytön tapauksessa on noin 0,01 mg/kg ja noin 1 000 mg/kg. Annostus voi vaihdella, esim. profylaktista käyttöä varten voidaan antaa yksittäinen päivittäinen annos, tai usea annos, kuten 3 tai 5 kertaa päivässä, voi olla sovelias. Kriittisen hoidon tilanteissa keksinnön mukainen yhdiste annetaan laskimonsisäisenä infuusiona nopeudella välillä noin 0,01 mg/kg/h ja noin 20 mg/kg/h, ja edullisesti välillä noin 0,1 mg/kg/h ja noin 5 mg/kg/h.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää toteutetaan yhdessä hyytymää hajottavan agenssin kanssa, esim. kudosplasminogeeniaktivaattori (t-PA), modifioitu t-PA, streptokinaasi tai urokinaasi. Tapauksissa, joissa on ilmennyt hyytymän muodostumista ja valtimo tai laskimo on mennyt tukkoon, joko osittain tai kokonaan, käytetään tavallisesti hyytymää hajottavaa agenssia. Keksinnön mukainen yhdiste voidaan antaa ennen hajottavaa agenssia tai yhdessä sen kanssa, tai sen yksittäisen käytön jälkeen, ja se edelleen annetaan edullisesti yhdessä aspiriinin kanssa hyytymisen muodostumisen uusiutumisen estämiseksi.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää toteutetaan myös yhdessä verihiutaleen glykoproteiinireseptorin (IIb/IIIa) antagonistin kanssa, joka inhiboi verihiutaleiden aggregoitumista. Keksinnön mukainen yhdiste voidaan antaa ennen IIb/IIIa:n antagonistia tai yhdessä sen kanssa, tai sen käytön jälkeen, hyytymisen muodostumisen uusiutumisen estämiseksi.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää toteutetaan myös yhdessä aspiriinin kanssa. Keksinnön mukainen yhdiste voidaan antaa ennen aspiriinia tai yhdessä sen kanssa, tai sen käytön jälkeen, hyytymisen muodostumisen uusiutumisen estämiseksi. Kuten edellä on mainittu, tämän keksinnön mukainen yhdiste voidaan edullisesti antaa yhdessä hyytymää hajottavan agenssin ja aspiriinin kanssa.

Tämä keksintö tarjoaa myös farmaseuttisia formulaatioita käytettäväksi edellä kuvatun terapeuttisen menetelmän kanssa. Keksinnön mukaisiin farmaseuttisiin formulaatioihin kuuluvat tehokas trombiinia inhiboiva määrä kaavan I mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, apuaineen tai laimennusaineen kanssa. Suun kautta antamista varten antitromboottinen yhdiste formuloidaan gelatiinikapseleiksi tai tableteiksi, jotka voivat sisältää apuaineita kuten sideaineita, liukuaineita, hajotusaineita ja vastaavia. Parenteraalista antamista varten antitromboottinen aine formuloidaan farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen, esim. fysiologisen suolaliuoksen (0,9 %)), 5 % dekstroosin, Ringerin liuoksen ja vastaavan kanssa.

Tämän keksinnön mukainen yhdiste voidaan formuloida kerta-annosformulaatioiksi, jotka sisältävät annoksen, joka on välillä noin 0,1 mg - noin 1 000 mg. Yhdiste on edullisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan muodossa, kuten esimerkiksi sulfaattisuola, asetaattisuola tai fosfaattisuola. Esimerkki kerta-annosformulaatiosta sisältää 5 mg tämän keksinnön mukaista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana 10 ml:n steriilissä lasiampullissa. Toinen esimerkki kerta-annosformulaatiosta sisältää noin 10 mg tämän keksinnön mukaista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana 20 ml:ssa isotonista suolaliuosta, joka on steriilin ampullin sisällä.

Keksinnöt voidaan antaa monia antoreittejä pitkin, mukaan lukien suun kautta, peräsuolen kautta, ihon läpi,

ihon alle, laskimonsisäisesti, lihaksensisäisesti ja nenänsisäisesti. Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet on edullista formuloida ennen antamista. Niinpä tämän keksinnön toinen suoritusmuoto on farmaseuttinen formulaatio, joka käsittää kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai solvaatin tehokkaan määrän yhdessä sen farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimennusaineen tai apuaineen kanssa.

Sellaisissa formulaatioissa vaikuttava aine muodostaa noin 0,1 - 99,9 % formulaation painosta. "Farmaseuttisesti hyväksyttävällä" tarkoitetaan, että kantajan, laimennusaineen tai apuaineen täytyy olla yhteensopiva formulaation muiden ainesosien kanssa eikä haitallinen vastaanottajalleen.

Nämä farmaseuttiset formulaatiot annetaan tunnetuilla menetelmillä käyttämällä hyvin tunnettuja ja helposti saatavilla olevia ainesosia. Kun tämän keksinnön mukaisia koostumuksia tehdään, vaikuttava aine sekoitetaan yleensä kantajan kanssa tai laimennetaan kantajalla, tai suljetaan kantajan sisään, joka voi olla kapselin, annospussin ("sachet"), paperin tai muun säiliön sisällä. Kun kantaja toimii laimennusaineena, se voi olla kiinteä, puolikiinteä tai nestemäinen materiaali, joka toimii vehikkelinä, apuaineena tai väliaineena vaikuttavalle aineelle. Niinpä koostumukset voivat olla tablettien, pillereiden, jauheiden, imeskelytablettien, annospussien ("sachets"), tärkkelyskapselien, eliksiirien, suspensioiden, emulsioiden, liuosten, lääkesiirappien, aerosolien (kiinteässä tai nestemäisessä väliaineessa), pehmeiden ja kovien gelatiinikapseleiden, peräpuikkojen, steriilien injektoitavien liuosten, steriilien pakattujen jauheiden ja vastaavien muodossa. Tämän keksinnön mukaiset koostumukset voidaan formuloida sinänsä tunnetulla tavalla, niin että ne tarjoavat vaikuttavan aineen nopean, pitkittyneen tai viivästyneen vapautumisen potilaalle antamisen jälkeen.

Seuraavat formulaatioesimerkit ovat pelkästään havainnollisia eikä niiden ole tarkoitus rajoittaa millään tavalla keksinnön suojapiiriä. "Vaikuttava aine" tarkoittaa tietenkin kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa tai solvaattia.

Formulaatio 1

Kovia gelatiinikapseleita valmistetaan käyttämällä seuraavia ainesosia:

	Määrä (mg/kapseli)
Vaikuttava aine	250
Kuivattu tärkkelys	200
Magnesiumstearaatti	10
Kaikkiaan	460 mg

Formulaatio 2

Tabletti valmistetaan käyttämällä seuraavia ainesosia:

	Määrä (mg/kapseli)
Vaikuttava aine	250
Mikrokidesselluloosa	400
Höyrytetty piidioksidi	10
Steariinihappo	5
Kaikkiaan	665 mg

Komponentit sekoitetaan keskenään ja puristetaan tableteiksi, joista kukin painaa 665 mg.

Formulaatio 3

Valmistetaan aerosoliliuos, joka sisältää seuraavat komponentit:

	Paino
Vaikuttava aine	0,25
Etanoli	25,75
Ponnekaasu 22 (klooridifluorimetaani)	70,00
Kaikkiaan	100,00

Vaikuttava aine sekoitetaan yhteen etanolin kanssa ja seos lisätään annokseen ponnekaasua 22, jäähdytetään -30 °C:n lämpötilaan ja siirretään täyttölaitteeseen. Sitten haluttu määrä syötetään ruostumattomasta teräksestä valmistettuun säiliöön ja laimennetaan jäljellä olevan ponnekaasun kanssa. Sitten säiliöön sovitetaan venttiiliyksiköt.

Formulaatio 4

Tabletteja, joista kukin sisältää 60 mg vaikuttavaa ainetta, valmistetaan seuraavasti:

Vaikuttava aine	60 mg
Tärkkelys	45 mg
Mikrokideselluloosa	35 mg
Polyvinyylipyrrolidoni (10-prosenttisena vesiliuoksena)	4 mg
Natriumkarboksimetyylitärkkelys	4,5 mg
Magnesiumstearaatti	0,5 mg
Talkki	1 mg
Kaikkiaan	150 mg

Vaikuttava aine, tärkkelys ja selluloosa viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 45 seulan läpi ja sekoitetaan läpikotaisin. Polyvinyylipyrrolidonia sisältävä vesiliuos sekoitetaan tuloksena olevan jauheen kanssa ja sitten seos viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 14 seulan läpi. Näin tuotetut rakeet kuivataan 50 °C:n lämpötilassa ja viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 18 seulan läpi. Natriumkarboksimetyylitärkkelys, magnesiumstearaatti ja talkki, jotka on aikaisemmin viety yhdysvaltalaisen mesh-luvun 60 seulan läpi, lisätään sitten rakeisiin, jota sekoituksen jälkeen puristetaan tablettikoneessa, jolloin saadaan tabletteja, joista kukin painaa 150 mg.

Formulaatio 5

Kapselit, joista kukin sisältää 80 mg vaikuttavaa ainetta, tehdään seuraavasti:

Vaikuttava aine	80 mg
Tärkkelys	59 mg
Mikrokideselluloosa	59 mg
Magnesiumstearaatti	2 mg
Kaikkiaan	200 mg

Vaikuttava aine, selluloosa, tärkkelys ja magnesiumstearaatti sekoitetaan, viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 45 seulan läpi, ja niillä täytetään kovia gelatiinikapseleita 200 mg:n määrinä.

Formulaatio 6

Peräpuikkoja, joista kukin sisältää 225 mg vaikuttavaa ainetta, tehdään seuraavasti:

Vaikuttava aine	225 mg
Tyydyttyneitä rasvahappoglyseridejä	2 000 mg
Kaikkiaan	2 225 mg

Vaikuttava aine viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 60 seulan läpi ja suspensoidaan kyllästettyihin rasvahappoglyserideihin, jotka on sulatettu aikaisemmin käyttämällä pienintä tarvittavaa lämpöä. Seos kaadetaan sitten peräpuikkomuottiin, jossa on 2 g:n nimelliskapasiteetti, ja annetaan jäähtyä.

Formulaatio 7

Suspensioita, joista kukin sisältää 50 mg vaikuttavaa ainetta per 5 ml:n annos, tehdään seuraavasti:

Vaikuttava aine	50 mg
Natriumkarboksimetyyliselluloosa	50 mg
Siirappi	1,25 ml
Bentsoehappoliuos	0,10 ml
Makuaine	q.v.
Väriaine	q.v.
Puhdistetulla vedellä lopputilavuudeksi	5 ml

Vaikuttava aine viedään yhdysvaltalaisen mesh-luvun 45 seulan läpi ja sekoitetaan natriumkarboksimetyyliselluloosan ja siirapin kanssa, jolloin muodostuu sileä tahna. Bentsoehappoliuos, makuaine ja väriaine laimennetaan osan

vedestä kanssa ja lisätään sekoittaen. Sitten lisätään riittävästi vettä halutun tilavuuden tuottamiseksi.

Formulaatio 8

Laskimonsisäinen formulaatio voidaan valmistaa seuraavasti:

Vaikuttava aine	100 mg
Isotoninen suolaliuos	1 000 ml

Edellä mainittujen ainesosien liuos annetaan yleensä laskimonsisäisesti kohteelle nopeudella 1 ml/minuutti.

Keksinnön tarjoamat yhdisteet (kaava I) ovat aktiivisia suun kautta annettuina ja ne inhiboivat selektiivisesti trombiinin vaikutusta nisäkkäissä.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden kykyä olla tehokas ja suun kautta annettuna aktiivinen trombiinin inhibiittori arvioidaan yhdessä tai useammassa seuraavista määrityksistä.

Trombiinin inhiboituminen osoitetaan trombiinin amidaasiaktiivisuuden inhiboitumisella *in vitro*, mitattuna määrityksessä, jossa trombiini hydrolysoi kromogeenisen substraatin, N-bentsoyyli-L-fenyylialanyyli-L-valyyli-L-arginyyli-p-nitroanilidin.

Määritys suoritetaan sekoittamalla 50 µl puskuria (0,03 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) 25 µL:aan naudan trombiini- tai ihmisen trombiiniliuosta (0,21 mg/ml "thrombostat" naudan trombiinia, Parke-Davis, tai puhdistettua ihmisen trombiinia, Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana, noin 8 NIH-yksikköä/ml, samassa puskurissa) ja 25 µl testattavaa yhdistettä liuottimessa (50 % metanolin vesiliuos, v/v). 150 µl kromogeenisen substraatin vesiliuosta (0,25 mg/ml) lisätään ja substraatin hydrolyysinopeudet mitataan seuraamalla reaktioita 405 nm:n aallonpituudella silmällä pitäen p-nitroaniliinin vapautumista. Standardikäyrät muodostetaan piirtämällä kuvaajaan vapaan trombiinin konsentraatio hydrolyysinopeuden funktiona. Testattavien yhdisteiden yhteydessä havaittavat hydrolyy-

sinopeudet muutetaan sitten "vapaa trombiini" arvoiksi vastavissa määrityksissä käyttämällä standardikäyriä. Sitoutunut trombiini (sitoutunut testiyhdisteeseen) lasketaan vähentämällä kussakin määrityksessä havaittu vapaan trombiinin määrä määrityksessä käytettävän trombiinin tunnetusta alkumäärästä. Vapaan inhibiittorin määrä kussakin määrityksessä lasketaan vähentämällä sitoutuneen trombiinin moolien määrä lisätyn inhibiittorin (testattavan yhdisteen) moolien määrästä.

Kass-arvo on hypoteettinen tasapainovakio trombiinin ja testattavan yhdisteen (I) väliselle reaktiolle.

$$\text{Trombiini} + \text{I} \rightleftharpoons \text{Trombiini-I}$$

$$\text{Kass} = \frac{[\text{Trombiini-I}]}{[(\text{Trombiini}) \times (\text{I})]}$$

Kass lasketaan joukolle testattavien yhdisteiden konsentraatioita ja keskimääräinen arvo ilmoitetaan yksikköinä litra/mooli.

Kun oleellisesti noudatetaan edellä ihmisen trombiinia silmällä pitäen kuvattuja menetelmiä, ja käytetään muita ihmisen veren koagulaatiojärjestelmän seriiniproteaaseja ja fibrinolyyttisen järjestelmän proteaaseja soveliaiden jäljempänä nimettyjen kromogeenisten substraattien kanssa, arvioidaan tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden selektiivisyys koagulaatiotekijä-seriiniproteaasien suhteen ja fibrinolyyttisen järjestelmän seriiniproteaasien suhteen, samoin kuin arvioidaan niiden oleellinen häiriön puute fibrinolyyttisen järjestelmän seriiniproteaasien suhteen. Trombiinin inhibiittoreiden pitäisi edullisesti säästää urokinaasin, kudosplasminogeeniaktivaattorin (t-PA) ja streptokinaasin indusoima fibrinolyysi. Tämä olisi tärkeää sellaisten agenssien terapeuttisel-

le käytölle lisänä streptokinaasin, t-PA:n tai urokinaasin trombolyyttiselle terapialle, ja sellaisten agenssien käytölle endogeenisena fibrinolyysiä säästävänä (t-PA:n ja urokinaasin suhteen) antitromboottisena agenssina. Fibrinolyyttisten proteaasien amidaasiaktiivisuuteen kohdistuvan häiriön puuttumisen lisäksi sellaista fibrinolyyttisen järjestelmän säästämistä voidaan tutkia käyttämällä ihmisen plasmahyytymiä ja vastaavien fibrinolyyttisten plasminogeeniaktivaattoreiden aikaansaamaa näiden hajoamista.

Ihmisen faktorit X, Xa, IXa, XIa ja XIIa ostetaan Enzyme Research Laboratoriesilta, South Bend, Indiana, ihmisen urokinaasi Leo Pharmaceuticalsilta, Tanska, ja rekombinanttinen aktivoitu proteiini C (aPC) valmistetaan Eli Lilly and Co. -yhtiössä, oleellisesti US-patentin 4 981 952 mukaisesti. Kromogeeniset substraatit: N-bentsoyyli-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilidi (faktorille Xa); N-Cbz-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilidi (tekijän IXa määritystä varten tekijän Xa substraattina); pyroglutamyyli-Pro-Arg-p-nitroanilidi (tekijälle XIa ja aPC:lle), H-D-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilidi (tekijälle XIIa) ja pyroglutamyyli-Gly-Arg-p-nitroanilidi (urokinaasille), ostetaan KabiVitrumilta, Tukholma, Ruotsi, tai Midwest Biotechilta, Fishers, Indiana. Naudan trypsiini ostetaan Worthington Biochemicalsilta, Freehold, New Jersey, ja ihmisen plasman kallikreiini Kabi Vitrumilta, Tukholma, Ruotsi. Kromogeeninen substraatti H-D-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilidi plasman kallikreiinille ostetaan Kabi Vitrumilta, Tukholma, Ruotsi. N-bentsoyyli-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidi, substraatti ihmisen trombiinille ja trypsiinille, syntetisoidaan edellä kuvatuilla menetelmillä tämän keksinnön yhdisteitä silmällä pitäen, käyttämällä tunnettuja menetelmiä peptidien liittämiseksi kaupallisesti saatavilla olevista reaktanteista, tai se ostettiin Midwest Biotechilta, Fishers, Indiana.

tiivisuusreferenssinä American Diagnosticalta, Greenwich, Connecticut; modifioitu t-PA6 (mt-PA6) valmistetaan Eli Lilly and Company -yhtiöltä sinänsä tunnetulla tavalla (katso Burck ym., J. Biol. Chem., 265, 5120-5177 (1990). Plasmiinin kromogeeninen substraatti H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilidi ja kudosplasminogeeniaktivaattorin (t-PA) substraatti H-D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilidi ostetaan Kabi Vitrum -yhtiöltä, Tukholma, Ruotsi.

Edellä kuvatuissa kromogeenisissä substraateissa kolmikirjaimisia symboleja Ile, Glu, Gly, Pro, Arg, Phe, Val, Leu ja Lys käytetään osoittamaan vastaava aminohappo-ryhmä isoleusiini, glutamiinihappo, glysiini, proliini, arginiini, fenyylialaniini, valiini, leusiini ja vastaavasti lysiini.

Seuraava taulukko I luettelee Kass-arvot, jotka on hankittu kaavan I mukaisella osoitetulla yhdisteellä.

Taulukko 1

Inhibitio-ominaisuudet

----------Kass X 10^6 (litraa/mooli)----------

Esimerkki	Ihmisen trombiini	Xa	Trypsiini	Plasmiini	t-PA
1	3,3	0,0017	0,38	0,010	0,082
2	4,4	0,0092	1,0	0,045	0,023
3	2,1	0,0021	0,24	0,0046	0,033
4	13,	0,0057	0,076	0,0033	0,074
5	0,035	0,00039	0,00015	0,00022	<0,001
6	2,3	0,00024	0,0016	0,00023	<0,001
7	1,9	0,0041	0,0081	0,00022	0,0037
8	5,3	0,00038	0,022	0,00080	0,0012
9	0,033	0,00058	0,00017	<0,001	<0,001
10	1,4	0,000024	0,077	0,0045	0,00055
11	0,064	0,000068	0,0036	0,0060	<0,001
12	0,44	0,000042	0,0022	0,00087	0,000042
13	0,49	0,00098	0,00066	0,00011	<0,001
14	0,021	0,00014	0,000056	0,000046	<0,001
15	220	0,0070	2,6	0,017	0,004
16	0,97	0,0051	0,02	0,0017	0,0012
17	33	0,049	3,8	0,024	0,0034
18	180	0,21	14	0,085	0,0094
19	11	0,14	41	0,16	0,0056
20	10	0,10	19	0,10	0,0077
21	3,6	0,62	0,96	0,031	0,002
22	3,0	0,043	8,5	0,042	0,004
23	770	0,14	21	0,44	0,31
24	0,78	<0,001	0,03	<0,001	<0,001
25	0,43	<0,001	0,01	<0,001	0,01
26	13,	0,01	0,21	0,01	0,01
27	0,29	0,02	0,02	<0,001	0,02
28	0,95	0,01	0,11	<0,001	<0,001
29	0,76	0,02	0,02	<0,001	<0,001
30	0,55	0,02	0,03	<0,001	<0,001

	31	0,07	0,14	0,05	<0,001	<0,001
	32	0,13	0,03	0,04	<0,001	0,01
	33	0,04	0,04	0,02	<0,001	<0,001
	34	0,65	<0,001	0,49	0,01	0,01
5	35	0,09	<0,001	0,04	<0,001	<0,001
	36	0,06	<0,001	0,01	<0,001	<0,001
	37	0,02		<0,009		
	38	1,1	<0,001	0,07	<0,001	
	39	0,12	<0,001	<0,02	<0,001	
10	40	0,03	<0,001	0,01	<0,001	
	41	0,01	<0,001	<0,001	<0,001	
	42	38,	0,07	43,	0,12	0,01
	43	1,4	0,05	100,	0,30	0,01
	44	630	0,66	2,600,	1,8	0,04
15	45	610	1,5	110,	1,1	0,77
	46	240	0,07	48,	0,13	0,01
	47	45	0,04	82,	0,18	0,01
	48	4 100	5,5	250,	0,43	0,05
	49	400	3,4	940,	0,84	0,04
20	50	40	4,3	2,200,	1,8	0,04
	51	1 300	0,84	27,	0,13	0,01
	52	700	0,46	47,	0,11	0,01
	53	0,36	<0,001	0,1	<0,001	<0,001
	54	2,8	<0,001	0,52	0,01	<0,001
25	55	0,01	<0,001	0,01	<0,001	<0,001
	56	490	0,20	3,6	0,01	<0,001
	57	39	0,01	0,24	0,01	<0,001
	58	0,60	<0,001	0,40	<0,001	<0,001
	59	1,10	<0,001	0,21	<0,001	<0,001
30	60	0,24	<0,001	0,03	<0,001	<0,001
	61	63	0,03	1,0	0,004	0,008
	62	7,6				
	63	0,31				
	64	15	0,01			
35	65	4 500		570,		
	66	120		4,6		
	67	11				

68	600		
69	340		3,7
70	430		9,8
71	1 400		240,
72	2 300		280
73	28		
74	29		
75	0,45		
76	12		0,36
77	11		
78	11		8,6
79	2,0		0,24
80	1 700,		90,
81	5,3		2,1
82	5,0		
83	2,4		0,03
84	2,9		0,07
85	265		30,8
86	200	0,63	
87	30	2,5	
88	410	3,9	
89	0,14	0,071	
90	0,61	0,002	
91	3,6	0,007	
92	130		7,7

Huomataan että, odottamattomasti, niillä yhdisteillä, joissa X sisältää D-sykloheksyylialanyyliosan, on parantunut teho mitä tulee trombiinin inhiboitumiseen, ja niillä ilmenee erityisen yllättävästi tehostunut teho mitä tulee faktori Xa:n inhibitioon, kun niitä verrataan esimerkiksi vastaaviin yhdisteisiin, joissa X sisältää D-fenyylialanyyliosan.

Materiaalit

Plasma hankitaan tajuissaan olevista sekarotuisista koirista (kumpi tahansa sukupuoli, Hazelton-LRE, Kalamazoo, Michigan, USA) laskimopunktiolla 3,8-prosenttiseen sitraattiin. Fibrinogeeni valmistetaan tuoreesta koiran plasmasta ja ihmisen fibrinogeeni valmistetaan ACD-ihmisverestä, jonka käyttöaika on voimassa, fraktion I-2 kohdalla aikaisempien menetelmien ja ohjeiden mukaisesti. Smith, Biochem. J., 185, 1-11 (1980); ja Smith ym., Biochemistry, 11, 2958-2967 (1972). Ihmisen fibrinogeeni (98-prosenttisen puhdas/plasmiiniton) on peräisin American Diagnosticalta, Greenwich, Connecticut. Fibrinogeeni I-2 -valmisteiden radioleimaus suoritetaan aikaisemmin raportoidulla tavalla. Smith ym., Biochemistry, 11, 2958-2967 (1972). Urokinaasi ostetaan Leo Pharmaceuticalsilta, Tanska, 2200 Ploug-yksikköä/ml. Streptokinaasi ostetaan Hoechst-Roussel Pharmaceuticalsilta, Somerville, New Jersey.

Menetelmät - vaikutukset ihmisen plasmahyytymisen hajoamiseen, jonka t-PA saa aikaan

Ihmisen plasmahyytymät muodostetaan mikrokoeputkissa lisäämällä 50 µl trombiinia (73 NIH-yksikköä/ml) 100 µl:aan ihmisen plasmaa, joka sisältää 0,0229 µCi 125-jodileimattua fibrinogeeniä. Hyytymän hajoamista tutkitaan panemalla hyytymien päälle 50 µl urokinaasia tai streptokinaasia (50, 100, tai 1 000 yksikköä/ml) ja inkuboimalla 20 tuntia huoneenlämpötilassa. Inkubaation jälkeen putket sentrifugoidaan Beckman Microfuge -laitteessa. 25 µl supernatanttia lisätään 1,0 ml:n tilavuuteen 0,03 M Tris/0,15 M NaCl -puskuria gammalaskentaa varten. Laskentakontrollit 100 % hajoaminen saadaan aikaan jättämällä pois trombiini (ja korvaamalla se puskurilla). Trombiinin inhibiittorit arvioidaan silmällä pitäen mahdollista fibrinolyysin häiriintymistä sisällyttämällä yhdisteet päälle

pantaviin liuoksiin pitoisuuksina 1, 5 ja 10 µg/ml. IC_{50}-arvot arvioidaan karkeina likiarvoina ekstrapoloimalla lineaarisesti datapisteistä sellaiseen arvoon, joka vastaisi 50 % hajotusta kyseisellä tietyllä fibrinolyyttisen aineen pitoisuudella.

Antikoagulanttiaktiivisuus

Materiaalit

Koiran plasma ja rotan plasma hankitaan tajuissaan olevilta sekarotuisilta koirilta (kumpi tahansa sukupuoli, Hazelton-LRE, Kalamazoo, Michigan, USA) tai nukutetuilta urospuolisilta Sprague-Dawley-rotilta (Harlan Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana, USA) laskimopunktiolla 3,8-prosenttiseen sitraattiin. Fibrinogeeni valmistetaan ACD ihmisverestä, jonka käyttöaika on voimassa, fraktion I-2 kohdalla ("human fibrinogen is prepared from indate ACD human blood at the fraction I-2") aikaisempien menetelmien ja ohjeiden mukaisesti. Smith, Biochem. J., 185, 1-11 (1980); ja Smith ym., Biochemistry, 11, 2958-2967 (1972). Ihmisen fibrinogeeni (98-prosenttisen puhdas/plasmiiniton) on peräisin American Diagnosticalta, Greenwich, Connecticut. Koagulaatioreagenssit ACTIN, Thromboplastin ja Human plasma ovat peräisin Baxter Healthcare -yhtiöltä, Dave Division, Miami, Florida. Naudan trombiinia (Parke-Davis, Ann Detroit, Michigan) käytetään koagulaatiomäärityksissä plasmassa.

Menetelmät

Antikoagulaatiomääritykset

Koagulaatiomääritysmenetelmät ovat aikaisemmin kuvattujen kaltaisia. Smith ym., Thrombosis Research, 50, 163-174 (1988). CoAScreener-koagulaatioinstrumenttia (American LABor, Inc.) käytetään kaikissa koagulaatiomääritysmittauksissa. Protrombiiniaika (PT) mitataan lisäämällä 0,05 ml suolaliuosta ja 0,05 ml Thromboplastin-C-reagenssia 0,05 ml:aan testattavaa plasmaa. Aktivoitu osittainen tromboplastiiniaika (APTT) mitataan inkuboimal-

la 0,05 ml testattavaa plasmaa Actin-reagenssin (0,05 ml) kanssa 120 sekunnin ajan, mitä seuraa 0,05 ml $CaCl_2$:ta (0,02 M). Trombiiniaika (TT) mitataan lisäämällä 0,05 ml suolaliuosta ja 0,05 ml trombiinia (10 NIH-yksikköä/ML) 0,05 ml:aan testattavaa plasmaa. Kaavan I mukaiset yhdisteet lisätään ihmisen tai eläimen plasmaan laajalla konsentraatioalueella, jotta saataisiin määritettyä pitkittymisvaikutukset APTT-, PT- ja TT-määrityksiin. Lineaarisia ekstrapolaatioita suoritetaan, jotta saataisiin arvioitua ne vaadittavat konsentraatiot, joilla hyytymisaika kaksinkertaistuisi kussakin määrityksessä.

Eläimet

Urospuolisia Sprague-Dawley-rottia (340 - 425 g, Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, IN) nukutetaan ksylatsiinilla (20 mg/kg, ihonalaisesti) ja ketamiinilla (120 mg/kg, ihonalaisesti) ja pidetään lämpöpatjan päällä (37 °C). Kaulalaskimo(t) kanyloidaan infuusioiden mahdollistamiseksi.

Arteriovenöösinen shunttimalli

Vasen kaulalaskimo ja oikea päänvaltimo kanyloidaan 20 cm:n pituisilla polyetyleeni PE 60 -putkilla. 6 cm:n keskikappale isommasta putkesta (PE 190), jossa on ontelon puolella puuvillasäie (5 cm), sovitetaan kitkan avulla pitempien kappaleiden väliin arteriovenöösisen shunttipiirin loppuunsaattamiseksi. Veri kiersi shuntin kautta 15 minuuttia ennen kuin säie otetaan huolellisesti pois ja punnitaan. Märän säikeen paino vähennetään säikeen ja veritulpan kokonaispainosta (katso J.R. Smith, Br. J. Pharmacol., 77, 29 (1982)).

Kun esimerkin 48 mukaista yhdistettä verrattiin D-MePhe-Pro-Arg-H:hon (edellä pohdittu sivulla 2) valtimolaskimo-ohitusmallissa, antitrombioottisen tehon havaittiin olevan yhdeksänkertainen jatkuvan laskimonsisäisen infuusion aikana. Trombin painon vähentämiseksi yhtä paljon (noin 20 prosenttiin kontrollista), esimerkin 48 mukainen

yhdiste pidensi plasmatrombiiniajan noin 3-kertaiseksi, kun taas plasmatrombiiniaika piteni yli 20-kertaiseksi standardiyhdisteen infuusion aikana. Protrombiiniaika ja APTT pitenivät vain noin 120 %:iin kontrollista (muutamia sekunteja) esimerkin 48 mukaisen yhdisteen infuusion aikana.

Valtimovaurion $FeCl_3$-malli

Päänvaltimot eristetään ventraalisen kaulan keskiviivan viillon kautta. Kuhunkin valtimoon sijoitetaan lämpöpari ja suonen lämpötilaa mitataan jatkuvasti nauhapiirturilla. Letkun käänne (0,058 sisähalkaisija x 0,077 ulkohalkaisija x 4 mm, Baxterin Medical Grade -silikoni), leikattu pituussuuntaan, sijoitetaan kunkin valtimon ympärille suoraan lämpöparin yläpuolelle. $FeCl_3$-heksahydraatti liuotetaan veteen ja konsentraatio (20 %)) ilmaistaan pelkästään $FeCl_3$:n todellisena painona ilmaistuna. Valtimon vahingoittamiseksi ja tromboosin indusoimiseksi 2,85 µl pipetoidaan käänteeseen valtimon hautomiseksi lämpöparin anturin yläpuolella. Valtimon tukkeutumisen merkki on lämpötilan nopea lasku. Valtimon tukkeutumiseen menevä aika raportoidaan minuutteina ja se oli $FeCl_3$:n käyttämisen ja suonen lämpötilan nopean laskun välillä kulunut aika (katso K. D. Kurz, Thromb. Res., 60, 269 (1990)).

Spontaani trombolyysimalli

In vitro -tulokset viittasivat siihen, että trombiinin peptidi-inhibiittorit inhiboivat trombiinia ja muita seriiniproteaaseja, kuten plasmiinia ja kudosplasminogeeniaktivaattoria. Sen arvioimiseksi, inhiboisivatko yhdisteet fibrinolyysiä *in vivo*, spontaanin trombolyysin nopeus määritetään implantoimalla leimattu kokonainen veritukos keuhkoverenkiertoon. Rotan veri (1 ml) sekoitetaan nopeasti naudan trombiinin (4 IU, Parke Davis) ja ihmisen ^{125}I-fibrogeenin (5 µCi, ICN) kanssa, imetään heti "silastic"-letkuun ja inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa 1 tunnin ajan. Ikääntynyt veritulppa poistetaan putkesta,

leikataan 1 cm:n segmenteiksi, pestään kolmasti normaalilla suolaliuoksella ja kukin segmentti lasketaan gammalaskurissa. Segmentti, jossa on tunnetut laskenta-arvot, imetään katetriin, joka implantoidaan tämän jälkeen kaulalaskimoon. Katetrin kärki siirretään sydämen oikean eteisen läheisyyteen ja hyytymä ajetaan ulos niin, että se leijuu keuhkoverenkiertoon. Yksi tunti implantin jälkeen sydän ja keuhkot kerätään ja lasketaan erikseen. Trombolyysi ilmaistaan prosenttiosuutena jossa:

$$\text{trombolyysi-\%} = \frac{(\text{injektoitu cpm} - \text{keuhkon cpm})}{\text{injektoitu cpm}} \times 100$$

Implantoidun hyytymän fibrinolyyttinen liukeneminen tapahtuu ajasta riippuvaisella tavalla (katso J. P. Clozel, Cardiovas. Pharmacol., 12, 520 (1988)).

Koagulaatioparametrit

Plasmatrombiiniaika (TT) ja aktivoitu osittainen tromboplastiiniaika (APTT) mitataan fibrometrillä. Verinäyte otetaan kaulakatetrista ja kerätään ruiskuun, joka sisältää natriumsitraattia (3,8 %, 1 osa 9 osaan vettä). TT:n mittaamisek i rotan plasma (0,1 ml) sekoitetaan suolaliuokseen (0,1 ml) ja naudan trombiiniin (0,1 ml, 30 U/ml TRIS-puskurissa, Parke Davis) 37 °C:n lämpötilassa. APTT:tä varten plasmaa (0,1 ml) ja APTT-liuosta (0,1 ml, Organon Teknika) inkuboidaan 5 minuuttia (37 °C) ja $CaCl_2$ (0,01 ml, 0,025 M) lisätään koagulaation aloittamiseksi. Määritykset tehdään kahtena rinnakkaisena määrityksenä ja niistä otetaan keskiarvo.

Biologisen hyötyosuuden indeksi

Biologisen aktiivisuuden mitta, plasmatrombiiniaika (TT) palveli korvikkeena lähtöyhdisteen määritystä varten, sillä oletuksella, että TT:n lisäykset johtuivat pelkän lähtöyhdisteen aikaansaamasta trombiinin inhiboitumisesta. Trombiinin inhibiittorin TT:hen aikaansaaman vaikutuksen

kesto määritetään sen jälkeen kun nukutetuille rotille on annettu kerta-annos laskimonsisäisesti, ja sen jälkeen kun paastonneille tajuissaan oleville rotille on annettu käsittely suun kautta. Käytetään kahta rottapopulaatiota, mikä johtuu veren tilavuuden tuottamista rajoituksista ja siitä pistemäärästä, joka vaaditaan määritettäessä kesto käsittelyajasta siihen aikaan, jolloin vaste palasi käsittelyä edeltäviin arvoihin. Kukin näytepopulaatio edustaa vaihtoehtoisia perättäisiä aikapisteitä. Keskimääräistä TT:n kestoa käytetään laskettaessa plasmapitoisuus-aikakäyrän alla oleva pinta-ala (AUC). Biologisen hyötyosuuden indeksi lasketaan jäljempänä esitetyllä kaavalla ja se ilmaistaan suhteellisena aktiivisuusprosenttina.

Plasman TT:n keston aikakäyrän alla oleva pinta-ala (AUC) määritetään ja se säädetään annokselle. Tämä biologisen hyötyosuuden indeksi on nimeltään "suhteellinen aktiivisuusprosentti" ja se lasketaan kaavalla:

$$\text{suhteellinen aktiivisuusprosentti} = \frac{\text{AUC po}}{\text{AUC iv}} \times \frac{\text{annos iv}}{\text{annos po}} \times 100$$

Yhdisteet

Yhdisteliuokset valmistetaan tuoreina päivittäin normaaliin suolaliuokseen ja ne injektoidaan kerta-annoksena tai ne annetaan infuusiona lähtien 15 minuutista ennen kokeellista häiriötä, ja koko ajan sen jälkeen, joka on 15 minuuttia valtimo-laskimo-ohitusmallissa ja 60 minuuttia $FeCl_3$:ää käyttävässä valtimovauriomallissa ja spontaanin tromboosin mallissa. Kerta-annosinjektion tilavuus on 1 ml/kg iv:tä ja 5 ml/kg po:ta varten ja infuusiotilavuus on 3 ml/tunti.

Tilastot

Tulokset ilmaistaan keskiarvoina ± keskiarvon keskivirhe. Yksireunaista varianssianalyysiä käytetään havaitsemaan tilastollisesti merkitseviä eroja ja sitten

käytetään Dunnettin testiä määrittämään mitkä keskiarvot ovat erilaisia. Yhtä suuria keskiarvoja koskevan nollahypoteesin hylkäämisen merkitsevyystaso on $P < 0,05$.

Eläimet

Urospuolisia koiria (beagleja, 18 kuukautta - 2 vuotta, 12 - 13 kg, Marshall Farms, North Rose, New York 14516) pidetään paastolla yli yön ja niille syötetään "Purina certified Prescription Diet" (Purina Mills, St. Louis, Missouri) -ruokaa 240 minuuttia annoksen antamisen jälkeen. Vettä on saatavilla mielin määrin. Huoneenlämpötila pidetään 19 - 23 °C:ssa (66 - 74 °F), suhteellinen kosteus 45 - 50 %, ja valot päällä klo 06.00 - 18.00.

Farmakokineettinen malli

Testiyhdiste formuloidaan juuri ennen antamista liuottamalla se steriiliin 0,9 % suolaliuokseen, valmisteeksi, jossa on 5 mg/ml. Koirille annetaan letkuruokintana yksittäinen annos (2 mg/kg) annos testattavaa yhdistettä. Verinäytteet (4,5 ml) otetaan eturaajan ulommasta iholaskimosta 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4 ja 6 tuntia annoksen antamisen jälkeen. Näytteitä kerätään sitraattia sisältäviin Vacutainer-putkiin ja pidetään jäillä ennen pelkistämistä plasmaksi sentrifugaatiolla. Plasmanäytteet derivatisoidaan dinitrofenyylihydratsiinilla ja analysoidaan HPLC:llä (Zorbax SB-C8 -pylväs), ajoliuos metanoli/500 mM natriumasetaatti, säädetty pH-arvoon 7 fosforihapolla (60:40, v/v). Testattavan yhdisteen plasmakonsentraatio otetaan muistiin ja sitä käytetään laskettaessa farmakokineettisiä parametrejä: eliminaation nopeusvakio, Ke; kokonaispuhdistuma, Clt; jakautumistilavuus, V_D, testattavan yhdisteen maksimaalisen plasmakonsentraation ajankohta, Tmax; testattavan yhdisteen maksimikonsentraatio Tmaxissa, Cmax; pitoisuuden puoliintumisaika plasmassa, t0,5; käyrän alainen pinta-ala, A.U.C. ja testattavan yhdisteen imeytynyt osuus, F.

Koiraa käyttävä sepelvaltimon tromboosin malli

Koirien kirurginen valmistaminen ja kojeistus on tehty Jacksonin ym. artikkelin mukaisesti, Circulation, 82, 930-940 (1990). Sekarotuisia koiria (ikä 6 - 7 kuukautta, kumpaa tahansa sukupuolta, Hazelton-LRE, Kalamazoo, MI, USA) nukutetaan natriumpentobarbitaalilla (30 mg/kg laskimonsisäisesti, iv), intuboidaan ja ventiloidaan huoneilmalla. Hengityksen laajuus (tidaalivolyymi) ja hengitystiheys säädetään niin, että veren PO_2, PCO_2 ja pH pysyvät normaalirajoissa. Ihon alle asetetaan neulaelektrodeja kytkennän II EKG:n mittausta varten.

Vasen kaulalaskimo ja yhteinen päänvaltimo eristetään vasemman mediolateraalisen niskaviillon kautta. Valtimoverenpaine (ABP) mitataan jatkuvasti esikalibroidulla Millar-anturilla (malli MPC-500, Millar Instruments, Houston, TX, USA), joka on sijoitettu päänvaltimoon. Kaulalaskimo kanyloidaan verinäytteiden ottoa varten kokeen aikana. Lisäksi molempien takajalkojen reisivaltimot kanyloidaan testattavan yhdisteen antamista varten.

Suoritetaan rintaontelon avaus vasemmalta viidennestä kylkiluiden välisestä tilasta ja sydän ripustetaan sydänpussin varaan. 1 - 2 cm:n segmentti vasemman sepelvaltimon kiertävästä haarasta (LCX) eristetään tyvenpuoleisesti ensimmäisestä suuresta haarasta, joka haarautuu kammion pinnalle. "26-gauge"-neulalla kärjessä varustettu lanka-anodielektrodi (Teflon®-päällystetty, "30-gauge" hopeasilattu kuparilanka), 3 - 4 mm pitkä, sijoitetaan LCX:ään ja sijoitetaan kontaktiin valtimon intimapinnan kanssa (vahvistettu kokeen lopussa). Stimuloiva sähköpiiri saatetaan täydelliseksi sijoittamalla katodi ihonalaiseen kohtaan. Säädettävässä oleva muovinen tukkija sijoitetaan LCX:n ympärille elektrodin alueen yläpuolelle. Esikalibroitu sähkömagneettinen virtauskoetin (Carolina Medical Electronics, King, NC, USA) sijoitetaan LCX:n ympärille proksimaalisesti anodin suhteen, sepelvaltimon veren vir-

tauksen (CBF) mittausta varten. Tukkijaa säädetään niin, että se tuottaa 40 - 50 %:n eston hypereemiseen verivirtausvasteeseen, joka havaitaan sen jälkeen kun LCX on tukittu mekaanisesti 10 sekunnin ajan. Kaikki hemodynaamiset ja ECG-mittaukset otetaan muistiin ja analysoidaan tiedonkeruujärjestelmällä (malli M3000, Modular Instruments, Malvern, PA. USA).

Veritulpan muodostuminen ja yhdisteen antomenetelmät

LCX:n intiman elektrolyyttinen vaurio tuotetaan antamalla anodiin 100 µA:n tasavirta. Virtaa pidetään yllä 60 minuuttia ja sitten se lopetetaan, on suoni tukkiutunut tai ei. Veritulpan muodostuminen etenee spontaanisti, kunnes LCX on täysin tukossa (määritettynä nolla-CBF:nä ja nousuna S-T-segmentissä). Yhdisteen antaminen aloitetaan sen jälkeen kun tukkivan veritulpan on annettu vanheta 1 tunnin ajan. Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden 2-tuntinen infuusio annoksina 0,5 ja 1 mg/kg/h aloitetaan samanaikaisesti trombolyyttisen agenssin infuusion kanssa (esim. kudosplasminogeeniaktivaattori, streptokinaasi, APSAC). Reperfuusiota seurataan 3 tuntia testattavan yhdisteen antamisen jälkeen. Sepelvaltimoiden uudelleen tukkeutuminen menestyksekkään trombolyysin jälkeen määritellään nolla-CBF:nä, joka jatkui 30 minuuttia tai yli.

Hematologia ja mallin verenvuotoajan määritykset

Kokoveren solumäärät, hemoglobiini ja hematokriittiarvot määritetään 40 µl:n näytteestä sitraatilla käsiteltyä (3,8 %) verta (1 osa sitraattia : 9 osaa verta) hematologisessa analyysilaitteessa (Cell-Dyn 900, Sequoia-Turner. Mount View, CA, USA). Ienmallin verenvuotoajat määritetään Simplate II -laitteella, joka mittaa verenvuotoaikaa (Organon Teknika Durham, NC, USA). Laitetta käyttäen tehdään 2 horisontaalista viiltoa koiran ikeneen joko vasemmassa yläleuassa tai vasemmassa alaleuassa. Kukin viilto on 3 mm leveä ja 2 mm syvä. Viillot tehdään ja käy-

tetään ajanottokelloa määritettäessä kuinka kauan verenvuotoa ilmenee. Puuvillavanutuppoa käytetään imemään veri, kun se vuotaa viillosta. Mallin verenvuotoaika ("Template bleeding time") on aika viillosta verenvuodon loppumiseen. Verenvuotoajat otetaan juuri ennen testiyhdisteen antamista (0 minuuttia), 60 minuuttia infuusion alkamisesta, testattavan yhdisteen antamisen loputtua (120 minuuttia) ja kokeen lopussa.

Kaikki tulokset analysoidaan yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA), jota seuraa Stundentin-Neumanin-Kuelsin post hoc t-testi merkitsevyyden määrittämiseksi. Toistettujen mittausten ANOVA:aa käytetään määrittämään merkitsevät erot aikapisteiden välillä kokeissa. Arvojen määritetään olevan tilastollisesti erilaisia ainakin tasolla $p < 0,05$. Kaikki arvot ovat keskiarvoja ± keskiarvon keskivirhe. Kaikki tutkimukset suoritetaan American Physiological Societyn ohjesääntöjen mukaisesti. Menetelmien lisäyksityiskohtia kuvataan Jacksonin ym. artikkelissa, J. Cardiovasc. Pharmacol., 21, 587-599 (1993).

Taulukko 2

Ihmisen plasman antikoagulaatio

2 x hyytymisaika (ng/ml)

Esimerkki	TT	ATPP	PT	% oraalinen/iv aktiivisuus (rotta)
1	250	NT	NT	8
2	170	NT	NT	NT
3	590	NT	NT	NT
4	230	NT	NT	NT
5	30 000	NT	NT	NT
6	390	NT	NT	NT
7	490	NT	NT	NT
8	130	NT	NT	NT
9	>91 000	NT	NT	NT
10	420	NT	NT	NT
11	8 800	NT	NT	NT
12	1 700	NT	NT	NT
13	660	NT	NT	NT
14	21 000	NT	NT	NT
15	9	89	200	4
16	650	8 600	8 500	NT
17	26	370	400	15
18	7	79	170	12
19	58	300	540	NT
20	62	550	600	23
21	160	2 000	1 000	NT
22	170	2 300	1 000	NT
23	7	86	120	12
24	1 000	25 900	25 000	NT
25	1 430	34 600	40 400	NT
26	37	870	750	NC[1]
27	1 940	27 800	27 000	NT
28	520	8 100	8 300	NT
29	750	9 800	15 800	NT

30	1 000	14 000	14 400	NT
31	10 800	34 500	30 000	NT
32	3 100	28 500	47 800	NT
33	18 900	59 300	70 900	NT
34	530	4 900	5 500	NT
35	4 500	50 400	78 400	NT
36	7 700	>91 000	>91 000	NT
37	>9 000	>9 000	>9 000	NT
38	540	6 100	11 100	NT
39	5 300	69 200	78 600	NT
40	35 100	>91 000	>91 000	NT
41	82 200	>91 000	>91 000	NT
42	20	270	320	NC[2]
43	280	1 100	930	NT
44	4,	100	170	NT
45	8	200	330	NC[2]
46	2,	67	77	NC[3]
47	12,	140	270	NC[2]
48	2,	33	59	22
49	5	130	130	NC[2]
50	35	460	420	NT
51	2	48	110	NT
52	6	80	170	NT
53	1 400	33 800	34 500	NT
54	140	3 300	2 200	NT
55	55 800	>91 000	>91 000	NT
56	5	160	200	NT
57	14	360	340	NT
58	710	14 300	11 400	NT
59	420	5 500	7 000	NT
60	3 200	22 200	77 700	NT
61	45	679	756	NT
62	54			NT
63	680			NT
64	23	900	650	NC[3]

65	1	48	85	NT
66	7,9	180	270	NT
67	34,	1 800	1 300	NT
68	4,	49	190	NT
69	5,	110	220	NT
70	2	160	180	NT
71	1	89	150	NC[1]
72	1	160	160	NC[1]
73	21	340	330	NT
74	20	420	350	NT
75				NT
76	29	490	560	NT
77	53	1 600	890	NT
78	46	430	760	NT
79	140	1 700	2 400	NT
80	4	40	130	NT
81	110	1 500	2 700	NT
82	130	3 800	3 000	NT
83	91	1 000	1 300	NT
84	110	1 500	1 900	NT
85	4,9	100	197	NT
86	4	81	180	NT
87	9	260	310	NT
88	4	100	200	NT
89	570	51 000	37 000	NT
90	330	14 500	14 600	NT
91	63	3 000	3 500	NT
92	8,9	210	340	NT

Huomautuksia taulukkoon 2

NC[1] osoittaa, että seulontaa ei ollut viety loppuun; alhainen tai hyvin alhainen aktiivisuus havaittu annoksella 20 mg/kg p.o.

NC[2] osoittaa, että seulontaa ei ollut viety loppuun; alhainen tai hyvin alhainen aktiivisuus havaittu annoksella 60 mg/kg p.o.

NC[3] osoittaa, että seulonta ei ollut viety loppuun; alhainen tai hyvin alhainen aktiivisuus havaittu annoksella 50 mg/kg p.o.

NT osoittaa ettei testattu, samoin kuin tyhjä kohta.

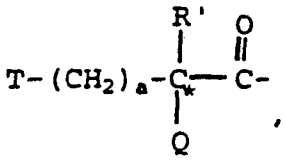
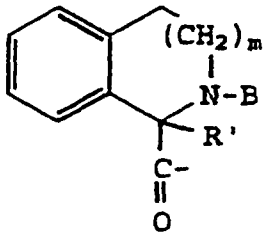
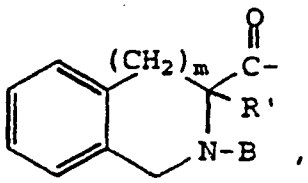
Patenttivaatimukset

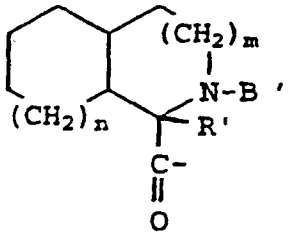
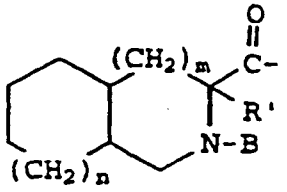
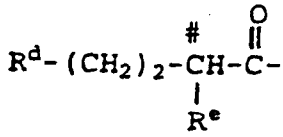
1. Yhdiste, jolla on kaava I:

$$X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r\text{-}G \qquad I$$

jossa

X on prolinyyli, homoprolinyyli, $R^m\text{-}(CH_2)_g\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}C(O)\text{-}$,


,

,

,


,

tai

;

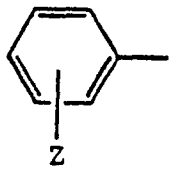
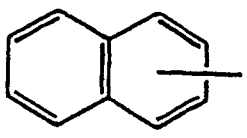
jossa

R^d on karboksi tai metyylisulfonyyli,

R^e on NHR^c, $NHCOR^c$ tai $NHCOOR^c$, jossa

R^c on $C_{1\text{-}10}$-alkyyli, $C_{3\text{-}8}$-sykloalkyyli tai $C_{3\text{-}8}$-sykloalkyyli-$C_{1\text{-}6}$-alkyyliradikaali, jossa on 4 - 10 hiiliatomia,

T on $C_{3\text{-}8}$-sykloalkyyli, $C_{1\text{-}8}$-alkyyli,


tai

;

a on 0, 1 tai 2, ja

Q on -OH, $C_{1\text{-}4}$-alkoksi tai -NH-A,

A on vety, C_{1-4}-alkyyli, $R''SO_2$-, $R''OC(O)$-, $R''C(O)$-, $R^nC(O)$- tai $-(CH_2)_g-R^m$,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R" on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluorialkyyli, $-(CH_2)_d-R^m$, tai substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitu bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

R^m on $-COOR^b$, $-SO_2(C_{1-4}$-alkyyli), $-SO_3H$, $-P(O)(OR^b)_2$ tai tetratsol-5-yyli,

R^n on $-COOR^b$ tai tetratsol-5-yyli,

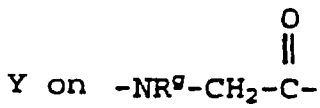
kukin R^b on toisistaan riippumatta vety tai C_{1-4}-alkyyli,

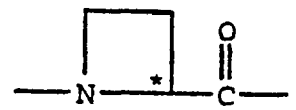
d on 1, 2 tai 3,

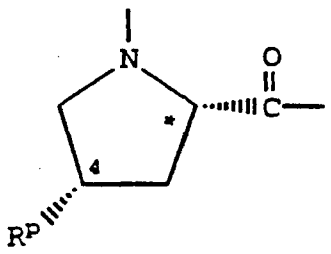
m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

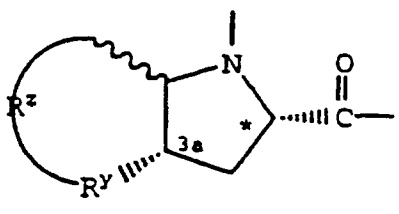
Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,

Y on  ,





tai



;

jossa

R^g on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

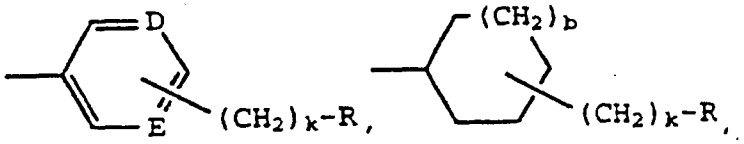
jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$ tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

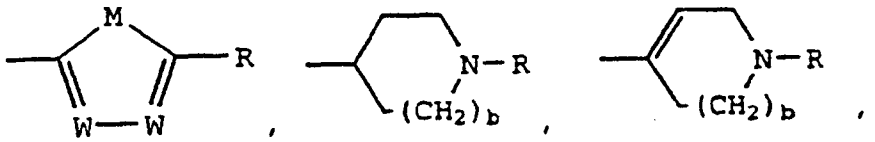
R^Y on $-CH_2-$, -O-, -S- tai -NH-, ja

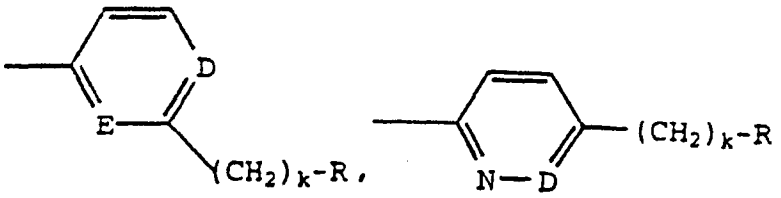
R^z on sidos, tai yhdessä R^Y:n ja kolmen liittyvän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla -O-, -S- tai -NH-,

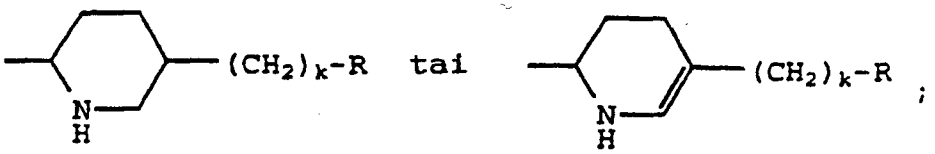
r on 1, 2 tai 3, ja

G on $-(CH_2)_s-R$, jossa s on 0 - 5, $-CH=CH-(CH_2)_t-R$, jossa t on 0 - 3, tai G on









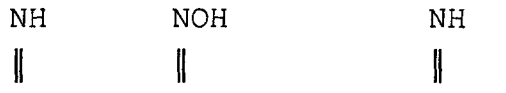
jossa D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

k on 0 tai 1,

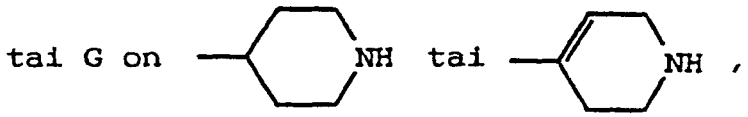
b on 0 tai 1,

M on S, O tai NH,

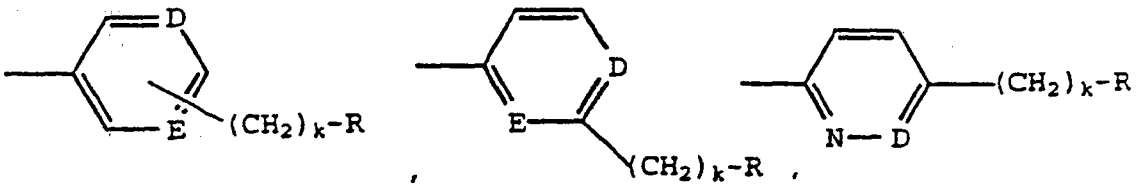
kukin W on toisistaan riippumatta N tai CH, ja



R on $-NH_2$, $-C-NH_2-$, $-C-NH_2$ tai $-NH-C-NH_2$,



ja jossa yksi - kaikki seuraavien rakennekaavojen:



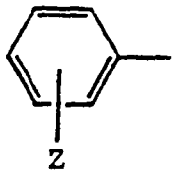
aromaattisten tai heteroaromaattisten renkaiden muuten substituoimattomista hiiliatomeista voivat sisältää fluorisubstituentin,

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola,

tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävä solvaatti,

edellyttäen, että

A ei ole vety tai t-butyylioksikarbonyyli, kun G on $-(CH_2)_s-NH-C(NH)NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) ja T on



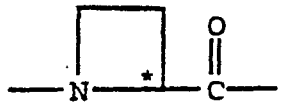
;

ja edellyttäen lisäksi, että R ei ole amino tai guanidino, kun r = 1 ja s = 0,

ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole vety, C_{1-4}-alkyyli, metyylisulfonyyli tai $-(CH_2)g-R^m$, kun G on $-(CH_2)_s-R$,



jossa R on $-C-NH_2$ tai $-NH-C-NH_2$,

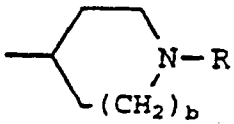
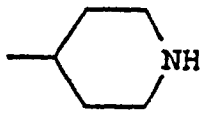
Y on  , substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH), R' on vety, T on sykloheksyyli ja Q on -NH-A,

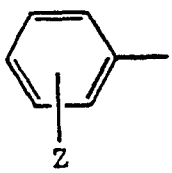
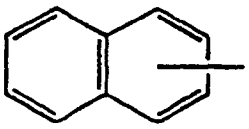
ja edellyttäen lisäksi, että $R"SO_2$ ei ole aryyli-



sulfonyyli, kun G on $-(CH_2)_s-R$, jossa R on $-NH-C-NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) tai 4-metyylitioprolinyyli (R^p on $-SCH_3$), ja Q on -NH-A,

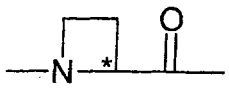
ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole $R"SO_2$-, kun G on

 tai  T on C_{1-8}-alkyyli,

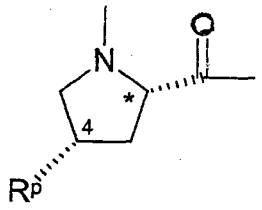
 tai  , ja Q on NH-A;

edellyttäen, että kun:

Y on

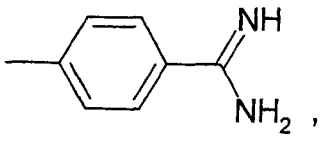


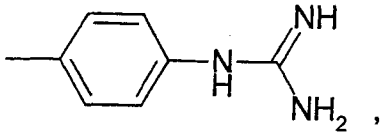
,tai

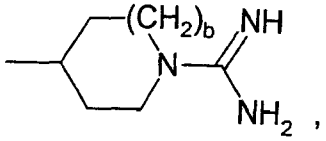


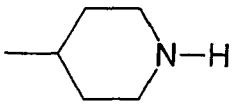
jossa R^p on H tai OH; ja

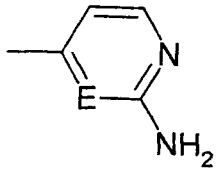
G on

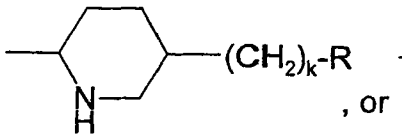




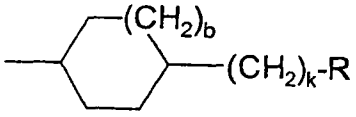








, or



jossa kaksi viimeistä ryhmää R ovat $-C(NH)NH_2$, kun k on 0 tai 1, tai R on $-NH-C(NH)NH_2$, kun k on 0;

silloin:

(a) kun X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

R' on H;

Q on -NH-A; ja

A on H, C_{1-4}-alkyyli,

$R^nC(O)-$ (jossa ryhmä R^n on $COOR^b$),

$R''SO_2-$ (jossa ryhmä R'' on C_{1-4}- alkyyli tai fenyyli, joka on substituoitu yhdellä karboksiryhmällä),

$R''OC(O)-$ (jossa ryhmä R'' on C_{1-4}-alkyyli),

$R''C(O)-$ (jossa ryhmä R'' on C_{1-4} alkyyli tai $-(CH_2)_d-COOR^b$, jossa d on 1 tai 2),

$-(CH_2)_g-COOR^b$,

$-CH_2-SO_3H$, $-CH_2-P(O)(OR^b)_2$, (jossa R^b on H tai C_{1-2}-alkyyli), tai $-CH_2$-tetratsol-5-yyli;

silloin ryhmä T-$(CH_2)_a$ ei ole:

(i) C_{1-8}-alkyyli;

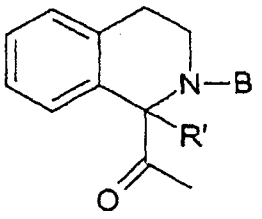
(ii) -$(CH_2)_a$-C_{5-6}-sykloalkyyli;

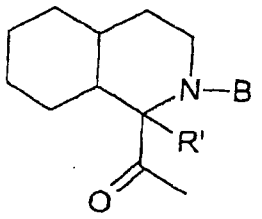
(iii) -$(CH_2)_a$-fenyyli, joka fenyyliryhmä on mahdollisesti substituoitu C_{1-4}-alkyyliryhmällä;

(iv) -$(CH_2)_a$-fenyyli, jossa a on 0 tai 1 ja fenyyliryhmä on substituoitu joko hydroksi- tai C_{1-4}-alkoksiryhmällä; tai

(v) -$(CH_2)_a$-naftyyli, jossa a on 0 tai 1; ja

(b) X ei ole prolinyyli, homoprolinyyli,



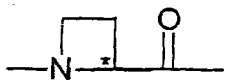
, tai


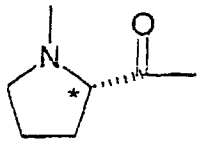
,

jossa R' on H;

ja lisäksi edellyttäen, että kun:

Y on

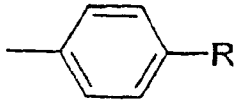


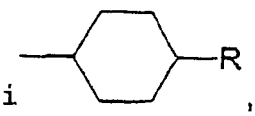
, tai


;

r on 1;

G on

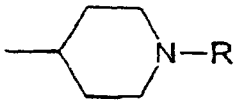


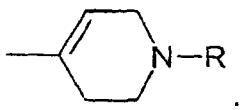
tai


,

jossa kaksi ryhmää R ovat $-NH_2$, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NOH)NH_2$ tai $-NH-C(=NH)NH_2$;

tai G on



tai


.

jossa kaksi ryhmää R ovat $-C(=NH)NH_2$ tai $-C(=NOH)NH_2$;
silloin:

(a) kun X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

T on jokin muu kuin fenyyli, joka on substituoitu R_aSO_2NH-:lla;

ja R' on H;

silloin Q ei ole OH, C_{1-4}-alkoksi tai -NH-A, jossa A on:

(i) H, C_{1-4}-alkyyli;

(ii) R''C(O)- jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluoroalkyyli tai aryyli;

(iii) R''OC(O)- jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, $-(CH_2)_d-COOR^b$ tai aryyli; tai

(iv) $R''SO_2$- jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluoroalkyyli, $-(CH_2)_d-COOR^b$ tai aryyli; tai

jossa aryyli on fenyyli, metyylifenyyli tai naftyyli, joka ryhmä on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai kahdella ryhmällä, jotka valitaan toisistaan riippumatta seuraavista: halogeeni, hydroksyyli, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi ja $-(CH_2)_jCOOH$ (jossa j on 0 - 4); ja

(b) kun X on $R^d-(CH_2)_2-CH(R^c)-C(O)-$; ja

R^d on karboksi;

silloin R^c ei ole:

(i) NHR^c tai $NHCOOR^c$ jossa R^c on C_{1-6}-alkyyli; tai

(ii) $NHCOR^c$ jossa R^c on C_{1-6}-alkyyli tai C_{3-8}-syklo-alkyyli;

ja lisäksi edellyttäen, että:

(a) kun Y on atsetidiini-2-karbonyyli, substituoimaton prolinyyli (R^p on H) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH);

X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

T on sykloheksyyli;

R' on H;

G on $-(CH_2)_s-R$;

R on $-C(NH)-NH_2$ tai $-NH-C(NH)-NH_2$ ja

ketju $-(CH_2)_r-(CH_2)_s$ on C_2-C_6-alkyleeni;

silloin Q ei ole -NH-A, jossa A on:

(a) H, C_1-C_4-alkyyli, tai metyylisulfonyyli;

(b) $R^nC(O)-$ jossa R^n on $-COOR^b$;

(c) $(CH_2)_gCOOR^b$; tai

(d) $-CH_2-R^m$, jossa R^m on:

(i) $-SO_3H$;

(ii) $P(O)(OR^b)_2$, jolloin kukin R^b on toisistaan riippumatta vety, metyyli tai etyyli; tai

(iii) tetratsol-5-yyli;

(b) kun Y on atsedipiini-2-karbonyyli, substituoimaton prolinyyli (R^p on H) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH);

X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

T on sykloheksyyli;

R' on H;

G on $-(CH_2)_s-R$;

R on $-NH-C(NH)-NH_2$; ja

ketju $-(CH_2)_r-(CH_2)_s-$ on C_2-C_6-alkyleeni;

silloin Q ei ole -NH-A, jossa A on:

(i) R''OC(O)- jossa R'' on tert-butyyli; tai

(ii) R''C(O)- jossa R'' on trifluorometyyli;

(c) kun Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on H);

X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

T on sykloheksyyli;

a on 1;

R' on H;

G on $-(CH_2)_s-R$; ja

Q on -NH-A;

silloin:

(i) kun ketju $-(CH_2)_r-(CH_2)_s-$ on C_2-alkyleeni ja R on $-NH_2$, silloin A ei ole $-CH_2-COOR^b$, jossa R^b on etyyli; tai

(ii) kun ketju $-(CH_2)_r-(CH_2)_s-$ on C_3-alkyleeni ja R on $-NH_2$, silloin A ei ole $(CH_2)_g-COOR^b$, jossa g on 1 tai 2 ja R^b on etyyli;

ja lisäksi edellyttäen, että kaavan I mukainen yhdiste ei ole:

(i) N-(4-aminobutyyli)-1-[N-(2-naftalenyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli]-L-proliiniamidi;

(ii) N-[4-[(aminoiminometyyli)amino]butyyli]-1-N-(metyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli]-L-proliiniamidi;

tai

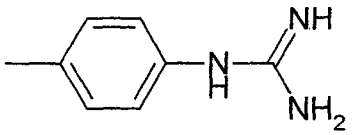
(iii) N-[[1-(aminoiminometyyli)-4-piperidinyyli]-metyyli]-1-D-fenyylialanyyli]-L-proliiniamidi;

ja lisäksi edellyttäen, että kun X on D-fenyylialanyyli; ja Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on H);

silloin:

(a) G ei ole $-CH=CH-CH_2-NH-C(NH)-NH_2$, kun r on 1; ja

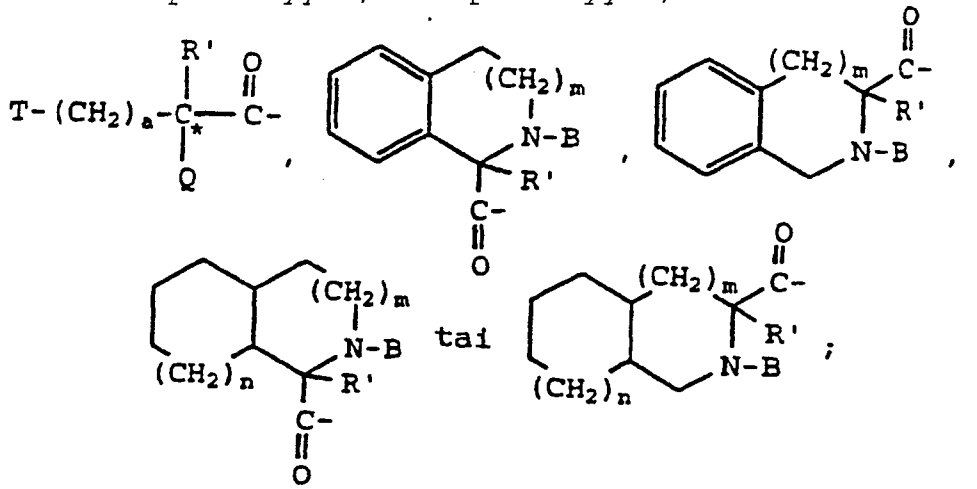
(b) G ei ole



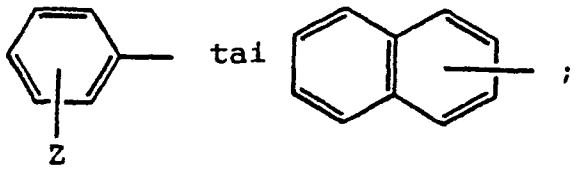
kun r on 1 tai 2.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen, kaavan I mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:

X on prolinyyli, homoprolinyyli,



T on C_{3-8}-sykloalkyyli, C_{1-8}-alkyyli,



;

a on 0 tai 1,

Q on -OH, C_{1-4}-alkoksi tai -NH-A,

A on vety, C_{1-4}-alkyyli, R"SO_2-, R"OC(O)-, R"C(O)- tai $-(CH_2)_g$-COOH,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

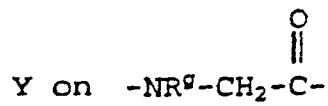
R" on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluorialkyyli, $-(CH_2)_d$-COOH, tai substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitu bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

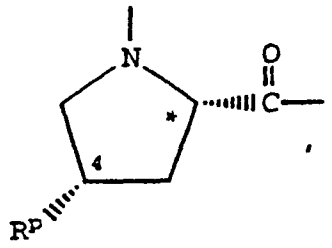
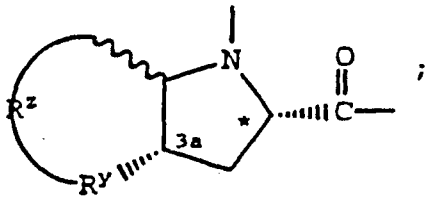
d on 1, 2 tai 3,

m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,

Y on  ,  ,

 or  ;

jossa

R^g on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

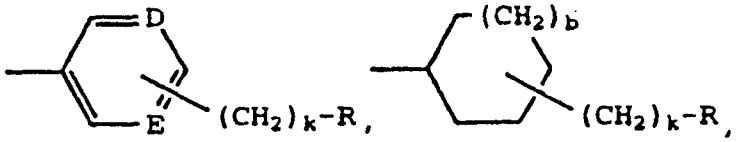
jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$ tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

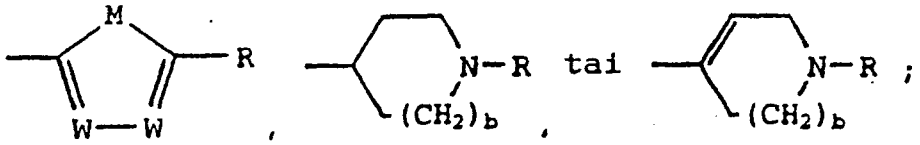
R^y on $-CH_2-$, -O-, -S- tai -NH-, ja

R^z on sidos, tai yhdessä R^y:n ja kolmen liittyvän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla -O-, -S- tai -NH-,

r on 1 tai 2, ja

G on $-(CH_2)_s-R$, jossa s on 0 - 5, $-CH=CH-(CH_2)_t-R$, jossa t on 0 - 3,





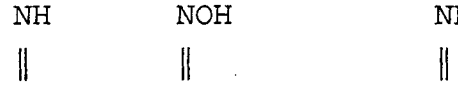
jossa D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

k on 0 tai 1,

b on 0 tai 1,

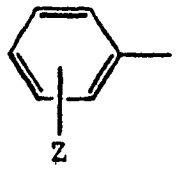
M on S, O tai NH,

kumpikin W on toisesta riippumatta N tai CH, ja



R on $-NH_2$, $-C(=NH)-NH_2$, $-C(=NOH)-NH_2$ tai $-NH-C(=NH)-NH_2$,

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävä solvaatti,

edellyttäen, että A ei ole vety tai t-butyylioksikarbonyyli, kun G on $-(CH_2)_s-NH-C(NH)NH_2$, Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) ja T on  ,

ja edellyttäen lisäksi, että R ei ole amino tai guanidino, kun r = 1 ja s = 0,

ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole vety, C_{1-4}-alkyyli, metyylisulfonyyli tai $-(CH_2)_g-COOH$, kun G on



Y on  , substituoimaton prolinyyli (RP on vety) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH), R' on vety, T on sykloheksyyli ja Q on -NH-A,

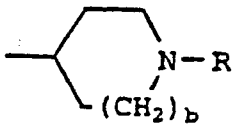
ja edellyttäen lisäksi, että R"SO_2 ei ole aryy-

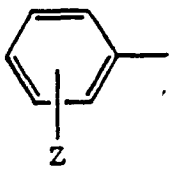
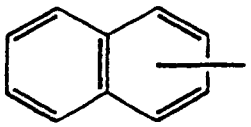
NH

‖

lisulfonyyli, kun G on -$(CH_2)_s$-R, jossa R on -NH-C-NH_2, Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on vety) tai 4-metyylitio-prolinyyli (R^p on -SCH_3) ja Q on -NH-A,

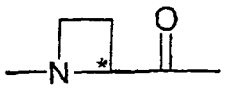
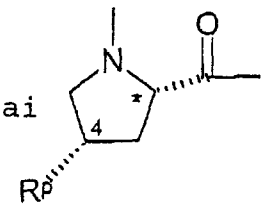
ja edellyttäen lisäksi, että A ei ole R"SO_2-, kun G

on  , T on C_{1-8}-alkyyli,

 tai  , ja Q on NH-A;

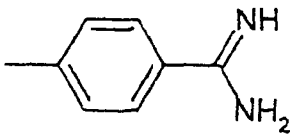
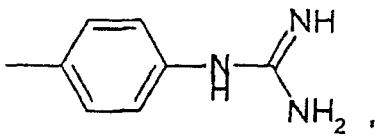
edellyttäen, että kun:

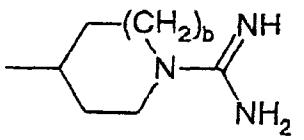
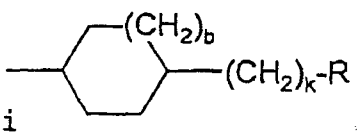
Y on

 , tai  ,

jossa R^p on H tai OH; ja

G on

 ,  ,

 , tai  ,

jossa jälkimmäinen ryhmä R on -C(NH)NH_2 kun k on 0 tai 1, tai R

on -NH-C(NH)NH_2 kun k on 0;

silloin:

(a) kun X on T-$(CH_2)_a$-C(R')(Q)-C(O)-;

R' on H; ja

Q on -NH-A, jossa A on

H, C_{1-4}-alkyyli,

R''SO_2- (jossa ryhmä R'' on C_{1-4}-alkyyli tai fenyyli, joka on substituoitu yhdellä karboksiryhmällä),

R''OC(O)- (jossa ryhmä R'' on C_{1-4}-alkyyli),

R''C(O)- (jossa ryhmä R'' on C_{1-4}-alkyyli tai -$(CH_2)_d$-COOH, jossa d on 1 tai 2), tai -$(CH_2)_g$-COOH;

silloin ryhmä T-$(CH_2)_a$ ei ole:

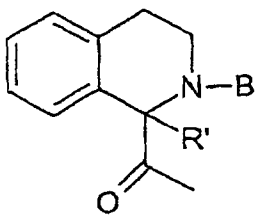
(i) C_{1-8}-alkyyli;

(ii) $(CH_2)_a$-C_{5-6}-sykloalkyyli;

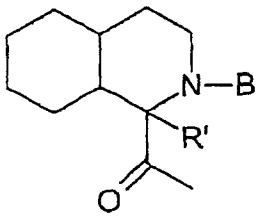
(iii) -$(CH_2)_a$-fenyyli, joka fenyyliryhmä on mahdollisesti substituoitu hydroksilla, C_{1-4}-alkyyli- tai C_{1-4}-alkoksiryhmällä; tai

(iv) -$(CH_2)_a$-naftyyli; ja

(b) X ei ole prolinyyli, homoprolinyyli,



, tai

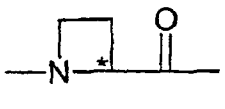


,

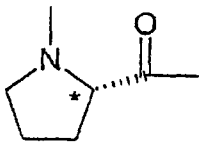
jossa R' on H;

ja lisäksi edellyttäen, että kun:

Y on



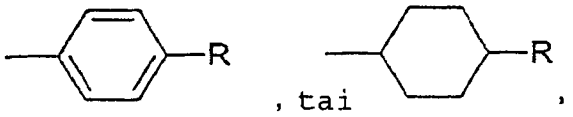
, tai



;

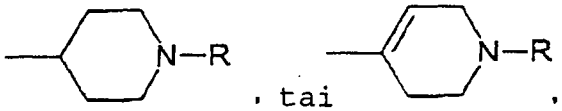
r on 1;

G on



jossa kaksi ryhmää R ovat $-NH_2$, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NOH)NH_2$ tai $-NH-C(=NH)NH_2$

tai G on



jossa kaksi ryhmää R ovat $-C(=NH)NH_2$ tai $-C(=NOH)NH_2$;

silloin:

kun X on $T-(CH_2)_a-C(R')(Q)-C(O)-$;

T on muu kuin fenyyli, joka on substituoitu R_aSO_2NH-:lla;

ja R' on H;

silloin Q ei ole OH, C_{1-4}-alkoksi tai -NH-A, jossa A on:

(i) H, C_{1-4}-alkyyli;

(ii) R''C(O)-, jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluoroalkyyli tai aryyli;

(iii) R''OC(O)-, jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, $-(CH_2)_d$-COOH tai aryyli; tai

(iv) $R''SO_2$-, jossa R'' on C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-perfluoroalkyyli, $-(CH_2)_d$-COOH tai aryyli;

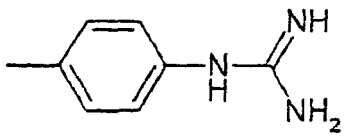
jossa aryyli on fenyyli, metyylifenyyli tai naftyyli, joka ryhmä on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai kahdella ryhmällä valittuna toisistaan riippumatta halogeenista, hydroksyylistä, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi ja $-(CH_2)_jCOOH$ (jossa j on 0 - 4);

ja lisäksi edellyttäen, että:

(a) kun Y on atsetidiini-2-karbonyyli, substituoimaton prolinyyli (R^p on H) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH);

X on T-$(CH_2)_a$-C(R')(Q)-C(O)-;
T on sykloheksyyli;
R' on H;
G on -$(CH_2)_s$-R;
R on -C(NH)-NH_2 tai -NH-C(NH)-NH_2; ja
ketju -$(CH_2)_r$-$(CH_2)_s$ on C_2-C_6-alkyleeni;
silloin Q ei ole -NH-A, jossa A on:
(i) H, C_1-C_4-alkyyli, tai metyylisulfonyyli; tai
(ii) -$(CH_2)_g$-COOH; ja

(b) kun Y on atsetidiini-2-karbonyyli, substituoimaton prolinyyli (R^p on H) tai 4-hydroksiprolinyyli (R^p on OH);
X on T-$(CH_2)_a$-C(R')(Q)-C(O)-;
T on sykloheksyyli;
R' on H;
G on -$(CH_2)_s$-R;
R on -NH-C(NH)-NH_2 ja
ketju -$(CH_2)_r$-$(CH_2)_s$- on C_2-C_6-alkyleeni;
silloin Q ei ole -NH-A, jossa A on:
(i) R''OC(O)-, jossa R'' on tert-butyyli; tai
(ii) R''C(O)-, jossa R'' on trifluorometyyli;
ja lisäksi edellyttäen, että kun X on D-fenyylialanyyli; ja Y on substituoimaton prolinyyli (R^p on H);
silloin:
(a) G ei ole -CH=CH-CH_2-NH-C(NH)-NH_2, kun r on 1; ja
(b) G ei ole



kun r on 1 tai 2.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:
alkyyli itsessään tai osana toista substituenttia on metyyli, etyyli, n-propyyli, isopropyyli, n-butyyli, t-butyyli, isobutyyli tai sec-butyyli,

perfluorialkyyli itsessään tai osana toista substituenttia on trifluorimetyyli, perfluorietyyli, perfluori-n-propyyli, perfluori-isopropyyli, perfluori-n-butyyli, perfluori-t-butyyli, perfluori-isobutyyli tai perfluori-sec-butyyli,

C_{3-8}-sykloalkyyli on syklopropyyli, metyylisyklopropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 4-metyylisykloheksyyli tai syklo-oktyyli,

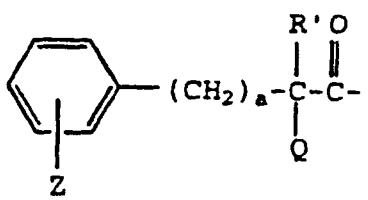
halogeeni on kloori, fluori, bromi tai jodi,

5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas on furyyli, tienyyli, pyrrolyyli, pyratsolyyli, oksatsolyyli, isoksatsolyyli, tiatsolyyli, isotiatsolyyli, pyranyyli, pyridinyyli, pyrimidinyyli, pyratsinyyli, oksatsinyyli tai tiatsinyyli,

9- tai 10-jäseninen heterosyklinen rengas on indolyyli, bentsotienyyli, bentsofuryyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli, bentsopyratsolyyli, kinolinyyli, isokinolinyyli, bentsimidatsolyyli tai bentsotiatsolyyli,

ja lisäksi missä mikä tahansa aromaattisista tai heteroaromaattisista ryhmistä, jotka on lueteltu Ar:n tai R":n määritelmää varten, on toisistaan riippumatta substituoimaton tai substituoitu yhdellä tai kahdella substituentilla, jotka antavat stabiilin rakenteen, ja jotka voivat olla toisistaan riippumatta halogeeni, hydroksyyli, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, amino($-NH_2$), mono(C_{1-4}-alkyyli)amino, $-(CH_2)_jCOOH$, merkapto, $-S(O)_h(C_{1-4}$-alkyyli), $-NHS(O)_h(C_{1-4}$-alkyyli), $-NHC(O)(C_{1-4}$-alkyyli), $-S(O)_hNH_2$, $-S(O)_hNH(C_{1-4}$-alkyyli) tai $-S(O)_hN(C_{1-4}$-alkyyli$)_2$, h on 0, 1 tai 2, ja j on 0, 1, 2, 3 tai 4.

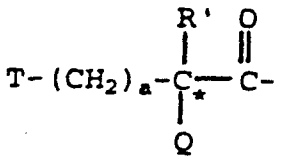
4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:

X on  , homoprolinyyli, 1- tai 3-

Tiq, tai 1- tai 3-Piq; Y on prolinyyli, ja Q on NHA, jossa A on vety tai R"SO_2-, R' on vety, Z on vety, ja B on vety, ja R on guanidino- tai amidinoryhmä.

5. Minkä tahansa edellä mainitun patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että G on 4-amidinofenyyliryhmä.

6. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:

X on  , jossa T on sykloheksyyli, a on

1, R' on vety ja Q on -NH-A, jossa A on vety, R"SO_2- tai -$(CH_2)_g$-COOH.

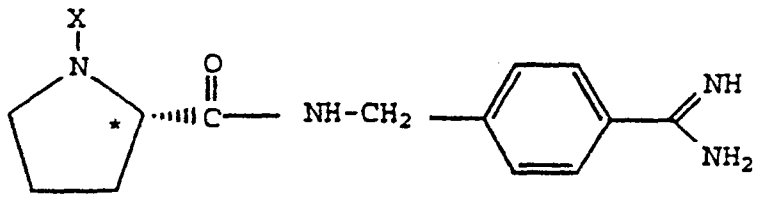
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että A on R"SO_2- ja R" on etyyli.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että A on -$(CH_2)_g$-COOH ja g on 1.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 tai 6 - 8 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että Y on (L)-prolinyyli, (S)-cis-oktahydro-1H-indoli-2-karbonyyli tai N-(2-fenyylietyyli)-glysyyli.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola tai solvaatti, joka yhdiste voi olla:

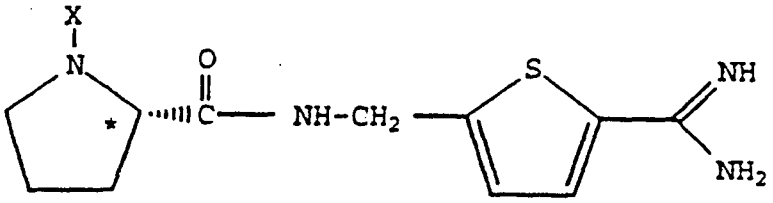
a) yhdiste, jolla on kaava Ia



Ia

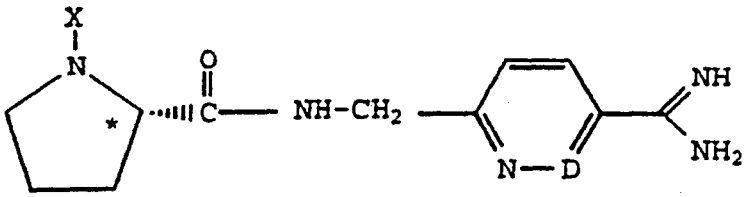
jossa bentsamidiinirengas on substituoimaton tai voi sisältää yksi tai kaksi fluorisubstituenttia,

b) yhdiste, jolla on kaava Ib



Ib

c) yhdiste, jolla on kaava Ic



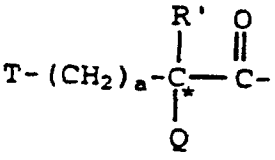
Ic

jossa D on N tai CH,

ja X:llä on mikä tahansa arvo, joka sisältyy patenttivaatimuksiin 1 - 4 ja 6 - 8.

11. Mikä tahansa patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että se on kaavan Ia mukainen yhdiste, jossa bentsamidiinirengas on substituoimaton.

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:

X on  , jossa R' on vety, a on 1, T on

sykloheksyyli tai fenyyli ja Q on -NH-A, jossa A on vety, etyylisulfonyyli tai karboksimetyyli.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti mutta ilman erotuslausumia, t u n n e t t u siitä, että yhdiste voi olla:

a) N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-1-[[(4aS,8aS)-dekahydro-1(R)-isokinolinyyli]karbonyyli]-L-prolinamidi,

b) N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

c) (S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)-fenyyli]metyyli]-1-[N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyyliglysyyli]-1H-indoli-2-karboksamidi,

d) (S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)-fenyyli]metyyli]-1-[N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli]-1H-indoli-2-karboksamidi,

e) N-(karboksimetyyli)-D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

f) (S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)-fenyyli]metyyli]-1-[N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli]-1H-indoli-2-karboksamidi,

g) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[1-(aminoiminometyyli)-heksahydropyridin-4-yyli]metyyli]-L-prolinamidi,

h) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)tiofen-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidi,

i) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)pyridin-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidi,

j) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)-1,2,3,4-tetrahydropyridin-2-yyli]-metyyli]-L-prolinamidi,

k) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[6-(aminoiminometyyli)-pyridatsin-3-yyli]metyyli]-L-prolinamidi,

l) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[1-(aminoiminometyyli)-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yyli]-metyyli]-L-prolinamidi,

m) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-2-fluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

n) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli-2,6-difluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

o) N-(etyylisulfonyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

p) N-(karboksimetyyli)-D-homofenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

q) N-(karboksimetyyli)-D-homosykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi, ja

r) N-(metyylisulfonyyliasetyyli)-L-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, mutta ilman erotuslausumia, t u n n e t t u siitä, että yhdiste voi olla:

i) (S-cis)-N-[[4-(aminoiminometyyli)-fenyyli]metyyli]-1-[N-(etyylisulfonyyli)-D-fenyylialanyyli]-1H-indoli-2-karboksamidi,

ii) N-(karboksimetyyli)-D-fenyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)fenyyli]metyyli]-L-prolinamidi,

iii) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)tiofen-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidi,

iv) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[1-(aminoiminometyyli)-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yyli]-metyyli]-L-prolinamidi,

v) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-2-fluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidi, ja

vi) N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[4-(aminoiminometyyli)-2,6-difluorifenyyli]metyyli]-L-prolinamidi.

15. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että yhdiste on N-(karboksimetyyli)-D-sykloheksyylialanyyli-N-[[5-(aminoiminometyyli)tiofen-2-yyli]metyyli]-L-prolinamidi.

16. Farmaseuttinen formulaatio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimennusaineen tai apuaineen yhteydessä jonkin patenttivaatimuksen 1 - 15 mukaista yhdistettä, jolla on kaava I, Ia, Ib tai Ic, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa tai solvaattia.

17. Menetelmä, jolla voidaan valmistaa minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen yhdiste, jolla on kaava I:

$$X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r\text{-}G \qquad I$$

t u n n e t t u siitä, että:

a) poistetaan yhtaikaisesti tai peräjälkeen suojaryhmä(t) P vastaavasta yhdisteestä, jolla on kaava II

$$(P)X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r\text{-}G(P) \qquad II$$

jossa (P)X on radikaali X, jossa voi olla kiinni yksi tai useampi suojaryhmä P, jotka voivat olla toisistaan riippumatta aminosuojaryhmä P sellaiselle kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa X:ään sisältyy emäksinen NH-rakenneosa, ja karboksisuojaryhmä P sellaiselle kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa X:ään sisältyy karboksitähde, ja G(P) on radikaali G, jossa voi olla kiinni yksi tai useampia toisistaan riippumattomia aminosuojaryhmiä P, tai

b) sellaista kaavan I mukaista yhdistettä varten,

jossa R on $-C(=NH)-NH_2$, tehdään hydrogenolyysi vastaavalle yhdisteelle, jolla on kaava I, jossa R on $-C(=NOH)-NH_2$,

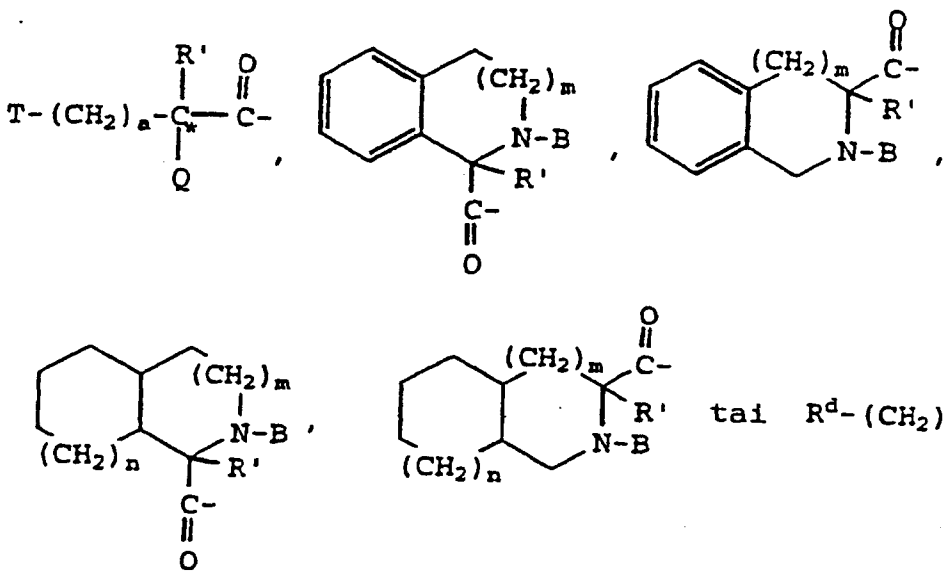
ja milloin tarvitaan kaavan I mukaisen yhdisteen suola, muodostetaan suola farmaseuttisesti hyväksyttävän hapon kanssa.

18. Yhdiste, jolla on kaava I:

$$X\text{-}Y\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r\text{-}G \qquad I$$

jossa

X on prolinyyli, homoprolinyyli, $R^m\text{-}(CH_2)_g\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}C(O)\text{-}$,



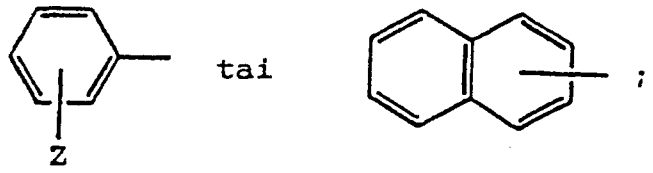
jossa

R^d on karboksi tai metyylisulfonyyli,

R^e on NHR^c, $NHCOR^c$ tai $NHCOOR^c$, jossa

R^c on C_{1-10}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai C_{3-8}-sykloalkyyli-C_{1-6}-alkyyliradikaali, jossa on 4 - 10 hiiliatomia,

T on C_{3-8}-sykloalkyyli, C_{1-8}-alkyyli,



a on 0, 1 tai 2, ja

Q on -NH-A,

A on R"C(O)-, R^nC(O)- tai -$(CH_2)_g$-R^m,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R" on -$(CH_2)_d$-R^m,

R^m on -$COOR^b$, -SO_2(C_{1-4}-alkyyli), -SO_3H, -P(O)$(OR^b)_2$ tai tetratsol-5-yyli,

R^n on -$COOR^b$ tai tetratsol-5-yyli,

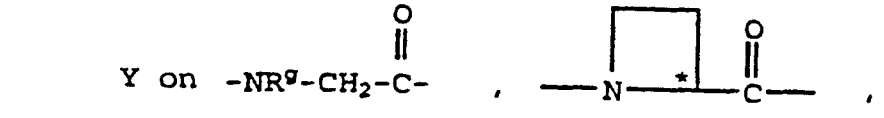
kukin R^b on toisistaan riippumatta vety tai C_{1-4}-alkyyli,

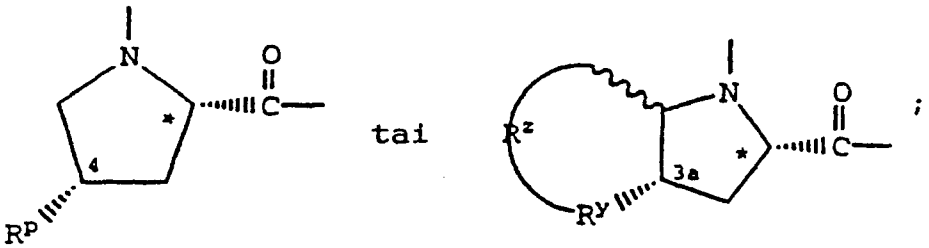
d on 1, 2 tai 3,

m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,





jossa

R^g on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai -$(CH_2)_p$-L-$(CH_2)_q$-T',

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

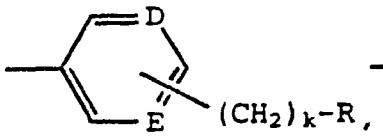
jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$ tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

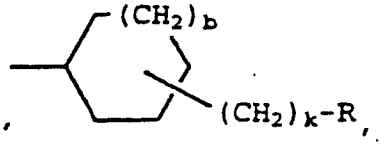
R^Y on $-CH_2-$, -O-, -S- tai -NH-, ja

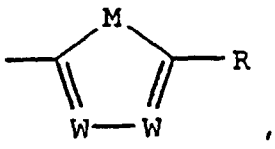
R^z on sidos, tai yhdessä R^Y:n ja kolmen liittyvän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla -O-, -S- tai -NH-,

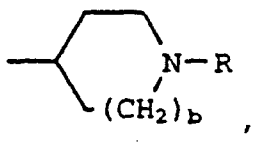
r on 1, 2 tai 3, ja

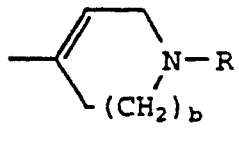
G on

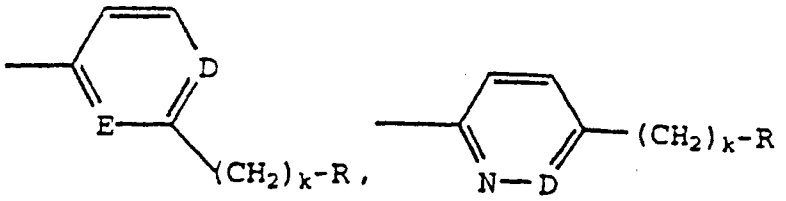


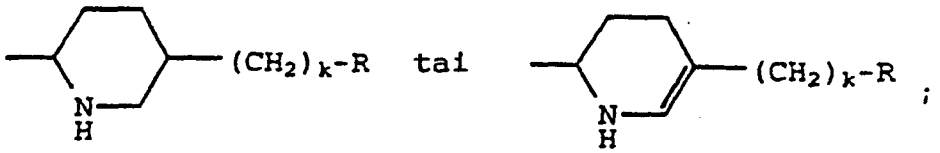












jossa D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

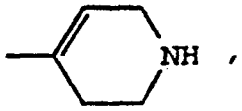
k on 0 tai 1,

b on 0 tai 1,

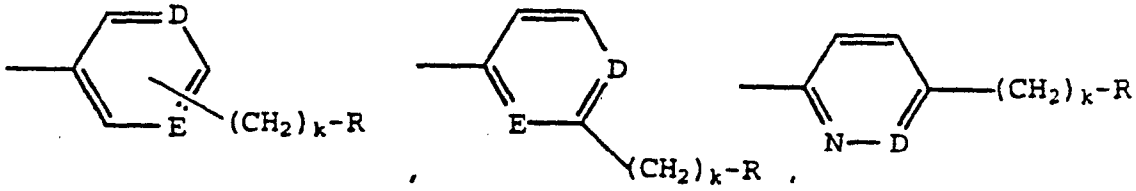
M on S, O tai NH,

kukin W on toisistaan riippumatta N tai CH, ja

R on  ,

tai G on  ,

ja jossa yksi - kaikki seuraavien rakennekaavojen:



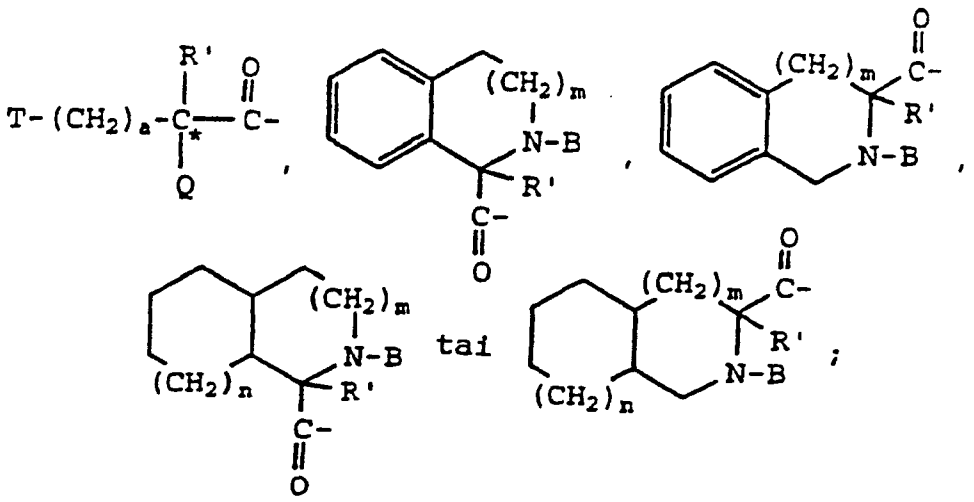
aromaattisten tai heteroaromaattisten renkaiden muuten substituoimattomista hiiliatomeista voivat sisältää fluorisubstituentin,

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola,

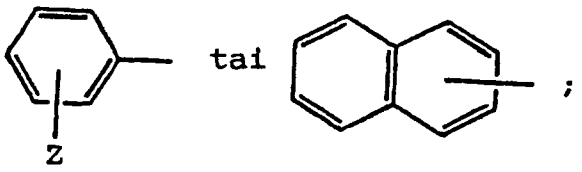
tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävä solvaatti.

19. 2. Patenttivaatimuksen 18 mukainen, kaavan I mukainen yhdiste tai sen suola tai solvaatti, t u n n e t t u siitä, että:

X on prolinyyli, homoprolinyyli,



T on C_{3-8}-sykloalkyyli, C_{1-8}-alkyyli,



a on 0 tai 1,

Q on -NH-A,

A on R"C(O)- tai $-(CH_2)_g$-COOH,

g on 1, 2 tai 3,

B on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli,

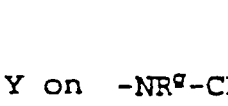
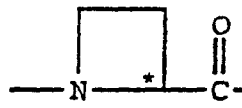
R" on $-(CH_2)_d$-COOH,

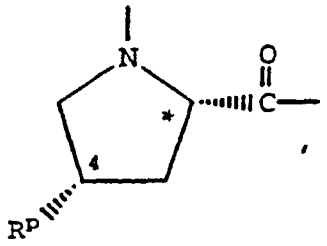
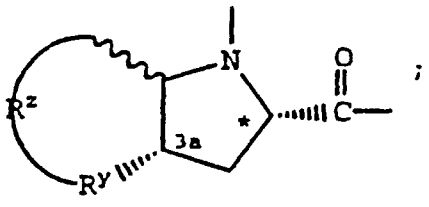
d on 1, 2 tai 3,

m on 0, 1 tai 2,

n on 0, 1 tai 2, ja

Z on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, hydroksi, halogeeni tai R_aSO_2NH-, jossa R_a on C_{1-4}-alkyyli,

Y on  ,  ,

 or  ;

jossa

R^q on C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

R^p on vety, C_{1-6}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli tai $-(CH_2)_p-L-(CH_2)_q-T'$,

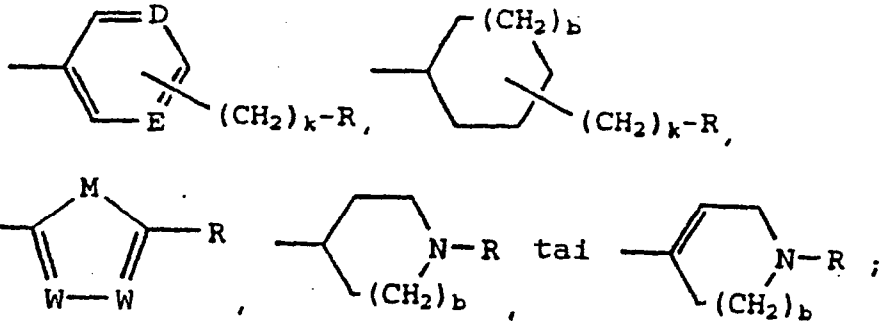
jossa p on 0, 1, 2, 3 tai 4; L on sidos, -O-, -S- tai -NH-; q on 0, 1, 2 tai 3, ja T' on vety, C_{1-4}-alkyyli, C_{3-8}-sykloalkyyli, -COOH, $-CONH_2$ tai Ar, jossa Ar on substituoimaton tai substituoitu aryyli, jossa aryyli on fenyyli, naftyyli, 5- tai 6-jäseninen substituoimaton tai substituoitu aromaattinen heterosyklinen rengas, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi, tai 9- tai 10-jäseninen substituoimaton tai substituoitu fuusioitunut bisyklinen aromaattinen heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai kaksi heteroatomia, jotka ovat samat tai erilaiset ja jotka voivat olla rikki, happi tai typpi,

R^y on $-CH_2-$, -O-, -S- tai -NH-, ja

R^z on sidos, tai yhdessä R^y:n ja kolmen liittyvän hiiliatomin kanssa muodostaa tyydyttyneen karbosyklisen renkaan, jossa on 5 - 8 atomia, joista yksi atomi voi olla -O-, -S- tai -NH-,

r on 1 tai 2, ja

G on



jossa D ja E ovat kumpikin toisistaan riippumatta N tai CH,

k on 0 tai 1,

b on 0 tai 1,

M on S, O tai NH,

kumpikin W on toisesta riippumatta N tai CH, ja

R on $-C(=NOH)-NH_2$

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, tai mainitun yhdisteen tai sen suolan farmaseuttisesti hyväksyttävä solvaatti.