

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 913788 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **913788**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 5/06

C07F 5/02

C07F 7/10

C07C229/28

C07C229/36

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **09.08.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.08.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.02.1992**

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

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

13.08.1990 GB 9017694

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Metternich, Rainer, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Seriiniproteaasien inhibiittoreita

Inhibitorer för serinproteaser

SERIINIPROTEAASIEN INHIBIITTOREITA

Keksintö koskee seriiniproteaasien, kuten trombiinin, tekijä Xa:n, kallikreiinin ja plasmiinin, sekä muiden seriiniproteaasien, kuten prolyyliendopeptidaasin ja Ig AI-proteaasin, inhibiittoreita (estäjiä). Trombiini, joka on viimeinen entsyymi koagulaatiojärjestelmässä (hyytymisjärjestelmä), katkoo liukoisen fibrinogeenin fibriiniksi, joka sitten ristisitoutuu ja muodostaa liukenematonta geeliä matriisiksi veritukosten (trombi) muodostamista varten. Suonen vaurioituessa edellä esitetty prosessi on välttämätön vuodon pysäyttämiseksi. Normaaliolosuhteissa plasma ei sisällä mitattavia määriä trombiinia. Trombiinipitoisuuden kasvu voi aikaansaada hyytymien muodostumisen, mikä voi johtaa tromboemboliatautiin (veritukkotulppaumatauti), joka on aikamme yleisin vakava lääketieteellinen ongelma.

Trombiini myötävaikuttaa hemostaattiseen kontrolliin useiden biologisten reaktioiden välityksellä. Primaarisen toiminnon, so. fibrinogeenin konversion fibriiniksi, lisäksi trombiini aktivoi tekijä XII:aa, joka vastaa fibriinin ristisitoutumisesta. Trombiini vaikuttaa myös positiivisen feed back-mekanismin välityksellä käsittäen tekijöiden V ja VIII aktivoimisen, jotka ovat molemmat välttämättömiä trombiinin omaan muodostumiseen protrombiinista. Trombiinilla on toinenkin oleellinen tehtävä: sen sitoutuminen verihiutaleisiin aikaansaa verihiutaleiden vapautumisen ja aggregoitumisen, joka tapahtuma on primaarinen verenvuodon tyrehdyttämistoiminto.

Trombiinin reaktioita kontrolloivat edelleen plasman sisältämät luonnon omat inhibiittorit. Näistä tärkeimmät ovat antitrombiini III ja hepariini. Nämä kaksi yhdistettä on eristetty ja niitä käytetään terapeuttisesti ja profylaktisesti (ennalta ehkäisevästi) tiloissa, joissa hyytymisjärjestelmässä vallitsee epä-

tasapaino siten, että on olemassa riski protrombiinin aktivaatiolle.

Synteettiset trombiinin inhibiittorit, joilla olisi oraalista aktiivisuutta, olisivat hyödyllisiä vaihtoehtoja näille parenteraalisesti annettaville luonnon inhibiittoreille. Laajojen tälle alueelle liittyvien tutkimuksien tuloksena on aikaansaatu synteesi hyvälle trombiinin inhibiittoreille in vitro, mutta tähän mennessä ei ole kehitetty todella hyvää ehdokasta oraalista terapeutista käyttöä varten. Jäljittelemällä trombiinille tärkeän luonnon oman substraatin, fibrinogeenin, aminohapposekvenssiä trombiinille on saatu useita hyviä lyhyitä peptidisubstraatteja. Näitä peptidisubstraatteja on myös muutettu entsyymin inhibiittoriksi. Siten kromogeeniset substraatit, D-Phe-Pro-Arg-pNA ja D-Phe-Pip-Arg-PNA, jäljittävät sekvenssiä, joka edeltää trombiinilla tapahtuvaa sidoksen katkaisukohtaa. Vastaavat reversiibelit ja irreversiibelit inhibiittorit, D-Phe-Pro-Arginaali ja D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl osoittavat in vitro 10⁻⁸ M suuruusluokkaa olevaa inhibitiota.

Kloorimetyyliketonit ovat tavallisesti liian epäspesifisesti reaktiivisia ollakseen ideaalisia terapeuttiseen käyttöön, ja edellä esimerkkinä esitetyllä peptidialdehydillä on jokseenkin alhainen LD₅₀-arvo.

Tekijä Xa on koagulaatioentsyymi, joka vastaa trombiinin muodostumisesta sen zymogeenistä, protrombiinista, rajoitetulla proteolyysillä. Painoon perustuen tekijä Xa on ainakin 10 kertaa trombogeenisempi in vivo kuin trombiini. Tämä johtuu siitä, että tekijä Xa on yhtä vaihetta trombiinia ylempänä voimistuvassa kaskadijärjestelmässä siten, että yksi tekijä Xa -molekyyli voi muodostaa useita trombiinimolekyyliä tämän prekursorista. Tekijä Xa:n teho voi johtua myös sen jokseenkin hitaasta poistumisesta elimistöstä. Vastakkaisesti tekijä Xa:lle trombiini häviää nopeasti verenkierrosta suonen seinämässä sijaitseviin suuren

affiniteetin omaaviin kohtiin. Tekijä Xa:n sisä- ja ulkosyntyyisten järjestelmien yhtymäkohdassa olevan keskeisen paikan ansiosta se olisi sopiva kohde hyytymismekanismin muuntamiselle.

5 Kallikreiinia muodostuu prekallikreiinista tekijä XII:n vaikutuksesta, kun se sijaitsee negatiivisesti varatulla pinnalla. Kallikreiini voi puolestaan katkaista tekijä XII:n tekijä XIIa:ksi muodostaen tällöin käänteisen aktivaatiojärjestelmän. Tekijä XIIa on
10 koagulaatiojärjestelmän sisäsyntyisen järjestelmän ensimmäinen entsyymi. Kontaktijärjestelmän merkitys liittyy luultavasti pintavälitteisenä puolustusmekanismina, ja järjestelmä aktivoituu tavallisesti suuressa mittakaavassa shokin tai hajapesäkkeisen suonensisäisen koagulaation (disseminated intravascular coagulation, DIC) aikana. Kallikreiinin tehtävänä tässä
15 vaiheessa on katkoa suuren molekyylipainon omaavaa kininogeenia verisuonten laajentajan, bradykiniinin vapautuessa. Myös bradykiniini aiheuttaa lisääntyntä verisuonen läpäisyvyyttä, kipua ja neutrofiilisten leukosyyttien migraatiota (vaeltamista). Kiniinimuodostuksen inhibiittorit ovat osoittautuneet hyödyllisiksi tietyn tyyppisissä inflammaatioissa, joihin kuuluu niveltulehdus ja haimatulehdus, ja ne voivat olla
20 hyödyllisiä myös astman hoidossa. Ainoa aine, jolla on ollut merkitystä kliinisessä mielessä kallikreiinin inhibiittorina, on aprotiniini (Trasyloli). Aprotiniini on molekyylipainoltaan 6 500 suuruinen polypeptidi ja se muodostaa stabiilin kompleksin proteaasien kanssa
25 sitoutumisvakion ollessa 10^{-10} - 10^{-13} M.

Fibrinolyysi on prosessi, jossa fibrinogeeni ja fibriinihiyytymät liuotetaan entsymaattisesti. Plasma sisältää erästä proteiinia, plasminogeenia, joka muuttuu erilaisten aktivaattoreiden vaikutuksesta
35 plasmiiniksi, proteolyyttiseksi entsyymiksi, jonka aktiivisuus muistuttaa trypsiinin aktiivisuutta. Plasmiini hajottaa fibrinogeeniä ja fibriiniä fibrii-

ni/fibrinogeeni-pilkkoutumistuotteeksi.

Normaaliolosuhteissa fibrinolyysijärjestelmä on tasapainossa koagulaatiojärjestelmän kanssa. Verivirrassa muodostunut pieni tukos voidaan liuottaa entsymaattisesti ja verenkierto verisuonissa voidaan palauttaa aktivoimalla kehon fibrinolyyttinen järjestelmä. Mikäli fibrinolyyttinen aktiivisuus on liian voimakasta, se voi aiheuttaa verenvuotoa tai vuotaminen voi pitkittyä. Aktiivisuutta voidaan inhiboida veressä olevilla luonnon omilla inhibiittoreilla.

Prolyyliendopeptidaasi katkoo peptidisidoksia proliinitähteiden peptidiketjussa karboksyylipuolelta. Juuri seriiniproteaasi hajottaa helposti lukuisia neuropeptidiä, joihin kuuluu aine P, neurotensiini, tyrotropiinia vapauttava hormoni ja luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni, ja se on liitetty solun kykyyn tuottaa interleukiini 2:ta (IL-2). Entsyymi inhiboituu bentsyylioksidikarbonyyli-prolyyliprolinaalilla Ki-arvon ollessa 14 nM. Huomioimatta seikkaa, että prolyyliendopeptidaasin fysiologisesta tehtävästä ei oikeastaan tiedetä mitään, sillä voi olla huomattava osa erilaisten neuropeptidien biologisten aktiivisuuksien säätelyssä.

Ig A:n, joka on vallitseva vasta-ainemuoto ollen ensisijainen puolustautumiskeino infektiota vastaan, Ig A proteinaasi-katalysoisoitu katkaisu erottaa Fc:n molekyylin antigeeni-sitovista Fab-alueista. Tällaisen katkaisun voisi olettaa huonontavan tai poistavan sen antimikrobista aktiivisuutta. Kaikki identifioidut Ig A proteinaasit suorittavat siten katkaisun proliinitähteen jälkeen ihmisen Ig A:n sarana-alueessa (hinge region). Peptidiprolyyli-boorihapot inhiboivat Neisseria gonorrhoeasta ja Hemophilus influenzaesta saatuja Ig A 1 proteinaaseja, mikä viittaa näiden entsyymien kuulumiseen proteolyyttisten entsyymien seriiniproteaasiperheeseen.

Koska trombiini osallistuu lukuisiin erilai-

siin fysiologisiin prosesseihin, jotka liittyvät patologiin häiriöihin, kuten syöpään, inflammaatioon ja hermostolliseen toimintaan, trombiini-inhibiittoreilla voisi olla potentiaalista käyttöä monissa indikaatioissa, jotka eivät liity suoraan sydän-verisuonijärjestelmään.

Monien kasvainsolujen on osoitettu aikaansaavan trombiinin muodostumisen kanssa yhteydessä olevaa prokoagulanttiaktiivisuutta. Tämän seurauksena ilmenee paikallista fibriinin sakkautumista ja koaguloitumista, minkä arvellaan olevan tärkeää kasvaimen kasvuille. Lisäksi, johtuen trombiinin vaikutuksista endoteelisoluihin, trombiini voi helpottaa kasvainsolujen purkautumista metastaasivaiheen aikana. Trombiini-inhibiittorit voivat siten osoittautua hyödyllisiksi tiettyjen syöpien hoidon lisäksi myös hyperkoaguloituvuuden vähentämisessä, jota havaitaan usein kemoterapeuttisilla aineilla hoidettavilla potilailla.

Endoteelisolujen trombiiniaktivaatio indusoi lukuisia esi-inflammatorisia muutoksia, kuten interleukiini-1:n, prostaglandiinien ja verihiutaleita aktivoivan tekijän synteesiä ja vapautumista. Trombiini indusoi lisäksi kahden adhesiivisen molekyylin, jotka vastaavat leukosyyttien kiinnittymisestä endoteelipintaan, so. GMP-140:n ja CD63:n, esiin paljastumisen. Trombiini lisää edelleen verisuonten läpäisevyyttä proteiineille, mikä on neutrofiileihin liittyvä toiminto, ja katkaisee interleukiini-8-prekursoriproteiinia, joka on peptidi, jonka oletetaan olevan osallisena respiratorisissa (hengitykseen liittyvissä) häiriöissä, nivelreumassa ja haavaisessa koliitissa.

Trombiinin osallistuminen kaikkiin näihin esi-inflammatorisiin prosesseihin tekee sen potentiaalisesti kohteeksi inflammaatioon liittyvien patologisten häiriöiden terapeuttiseen hoitoon trombiini-inhibiittoreilla.

Neksiini-1-proteaasin, joka on hermokasvun

modulaattori ja spesifinen luonnon oma trombiiniantagonisti, aktiivisuus on vähentynyt merkittävästi ja spesifisesti Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla. Tämä sekä havainto, että trombiinin kaltainen
 5 aktiivisuus lisääntyi Alzheimer-aivoissa, viittaa siihen, että trombiinin inhibiittorit voivat olla tehokkaita rajoittamaan tai kumoamaan trombiinin hyperaktiivisuuden kanssa yhteydessä olevia hermostoon liittyviä patologisia muutoksia.

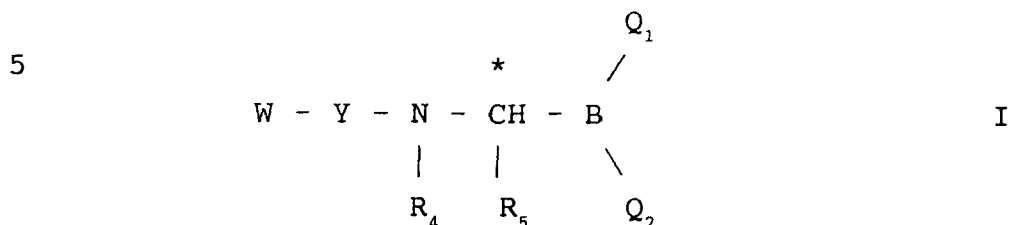
10 Boorihappoja on tutkittu erilaisten seriiniesteraasien ja -proteaasien inhibiittoreina. Ensimmäinen proteaasi-inhibiittorina käytettävä boorihappoa sisältävä aminohappoanalogi oli N-asetyyli-L-fenyylialaniinin boorihappoanalogi, jota käytettiin
 15 kymotrypsiinin ja subtilisiinin inhibiittorina. Peptidiboorihappoja on käytetty kymotrypsiinin, subtilisiinin ja elastaasien inhibiittoreina.

Boorihappojen vuorovaikutus proteaasien kanssa biologisissa järjestelmissä on tunnettua, ja erilaisten
 20 yksinkertaisten boorihappojen on osoitettu olevan riittävän toksittomia ihmiskäyttöön. Elastaasin peptidiboorihappoinhibiittoreita on käytetty viimeaikoina eläinkokeissa ilmapöhon yhteydessä. Peptidikloorimetyyli-
 25 kloorimetyyli- ja elastaasien biologisesti vaikuttavia annostasoja ei ole todettu toksiseksi.

Eurooppalainen patenttihakemus 293 881 kuvaa peptidien valmistusta, jotka sisältävät lysiinin, ornitiinin ja arginiinin C-terminaalaisia boorihappojohdanna-
 30 danna- ja niiden käyttöä trypsiinin kaltaisten seriiniproteaasien inhibiittoreina. Peptidien muut aminohapot ovat joko D- tai L-muotoja 20 luonnossa tavattavasta aminohaposta.

Nyt on havaittu, että saadaan yhdisteitä, joilla on muita paremmat ominaisuudet trypsiinin kal-
 35 taisten seriiniproteaasien inhibiittoreina, kun peptidi sisältää ainakin yhden luontoon kuulumattoman, hydrofobisen sivuketjun omaavan α -aminohapon.

Siten esillä oleva keksintö tuo esiin yhdisteitä, joilla on kaava I,



- 10 jossa W = H tai N-suojaryhmä;
 Y on n aminohapon sekvenssi, joka valitaan siten, että n+1 aminohapon peptidillä, Y-Lys tai Y-Arg, on affiniteettia trypsiinin kaltaisen proteaasin aktiiviseen kohtaan, ja jolloin n on kokonaisluku 1-10, edullisesti
 15 1-4 ja jossa ainakin yksi aminohappo on luontoon kuulumaton, hydrofobisen sivuketjun omaava aminohappo;
 Q₁ ja Q₂, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, valitaan ryhmästä, johon kuuluu -OH, -COR₁, -CONR₁R₂, -NR₁R₂ ja -OR₃; tai Q₁ ja Q₂ muodostavat yhdessä diolitähteen;
 20 R₁, R₂ ja R₃, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, tarkoittavat C₁₋₁₀alkyyliä, C₆₋₁₀aryyliä, C₆₋₁₀aralkyyliä tai fenyylsiä substituoituna korkeintaan kolmella ryhmällä, joka/jotka voivat olla C₁₋₄alkyyli, halogeeni tai C₁₋₄alkoksi;
 25 R₄ on vety tai C₁₋₁₀alkyyli;
 R₅ on ryhmä -A-X, jossa A on -(CH₂)_z-, jossa z on 2,3,4 tai 5; -CH(CH₃)-(CH₂)₂-; -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-; -(CH₂)₂-CH(CH₃)-; -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-; -CH(CH₃)-(CH₂)₃-; -CH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂; -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-CH₂; (CH₂)₃-CH(CH₃)-;
 30 -(CH₂)₃-C(CH₃)₂: C₆₋₁₀aryyli, C₆₋₁₀aralkyyli; ja
 X on -NH₂, -NH-C(NH)-NH₂, -S-C(NH)-NH₂, -N₃, C₁₋₄alkoksi, C₁₋₄alkyyliitio tai Si(CH₃)₃;
 tai R₄ ja R₅ muodostavat yhdessä trimetyleeniryhmän ja *-merkitty asymmetrinen hiiliatomi voi olla D- tai L-
 35 konfiguraatiossa, tai minä tahansa näiden seoksena.

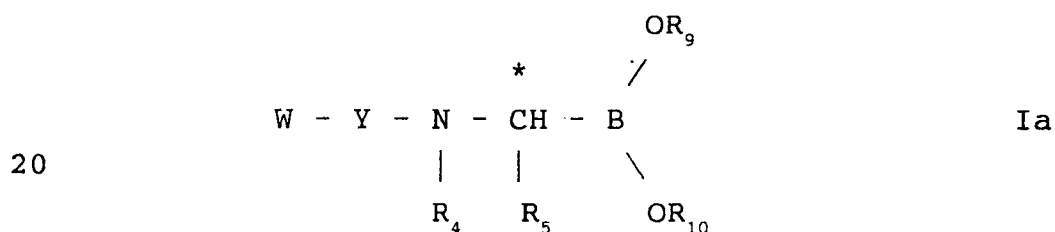
Luontoon kuulumattomalla aminohapolla tarkoitetaan mitä tahansa muuta aminohappoa kuin D- tai L-

Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr tai Val.

N-suojaryhmällä W on edullisesti kaava $H(CH_2CH_2O)_p-$, jossa $p = 3-30$; R_6CO- ; R_7OCO- tai R_8SO_2- , jolloin R_6 on C_{1-6} alkyyli; R_7 on C_{1-6} alkyyli, fenyyli, bentsyyli tai naftyyli; ja R_8 on fenyyli, naftyyli tai C_{1-4} alkyylifenyyli; joista R_7OCO- on edullisin. Kaikkein edullisimpia ovat suojaryhmät, joilla on kaava $R_7'OCO-$, jossa R_7' on tert-butyyli (merkitään Boc) tai jossa R_7' on bentsyyli (merkitään Z).

R_5 on edullisesti R_5' , jolloin R_5' on $-(CH_2)_z-$ X' , jossa X' on $-NH_2$, $-NH-C(NH)-NH_2$, $-N_3$ tai $-Si(CH_3)_3$ ja z' on 2, 3 tai 4.

Edullisia yhdisteitä ovat yhdisteet, joilla on kaava Ia,

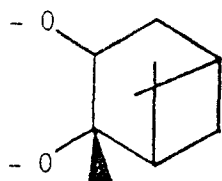


jossa W, Y, R_4 ja R_5 tarkoittavat samaa kuin edellä ja R_9 ja R_{10} tarkoittavat dihydroksiyhdistetähdettä.

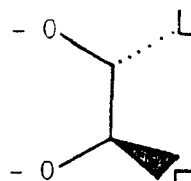
Edullisia esimerkkejä ovat 2,3-butaanidioli; katekoli; 2,3-dimetyylibutaanidioli-2,3; sykloheksaanidioli; etyleeniglykoli; 1,2-heksaanidioli; 2,3-heksaanidioli; dietanoliamiini tai alifaattiset tai aromaattiset yhdisteet, joissa hydroksiryhmät on substituoitu vierekkäisiin hiiliatomiin tai toisilla hiiliatomeilla substituoituihin hiiliatomiin.

Erityisen edullisia ovat yhdisteet, joissa Q_1 ja Q_2 tarkoittavat yhdessä ryhmää OPin, jolla on kaava a), tai ryhmää, jolla on kaava b),

5



a)



b)

10

Y:n muodostavat aminohapot ovat α -aminohappoja, jotka voidaan valita proteiinien luonnossa tavattavista L-aminohapoista, näiden vastaavista enantiomeerisistä D-aminohapoista tai kemiallisesti muunnelluista alfa-aminohapoista, kuten glutamiinihappo-

15

gamma-piperidiini (Glu N  tai pipekoolihappo

(Pip), edellyttäen, että ainakin yksi aminohappo on luontoon kuulumaton aminohappo, jossa on hydrofobinen sivuketju.

20

Edullisia luontoon kuulumattomia aminohappoja ovat aminohapot, joilla on kaava II,

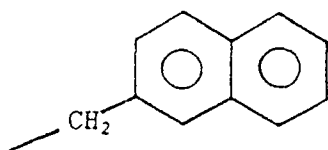
25



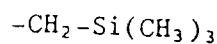
30

jossa R_{11} on hydrofobinen ryhmä. Edullisista hydrofobisista ryhmistä mainittakoon metyleeniryhmä, joka on liitetty valinnaisesti polaaraisella ryhmällä substituoituun aromaattiseen ryhmään tai alisykliseen ryhmään, jossa on ainakin kaksi rengasta ja ei ole polaarisia substituentteja, tai tert-butyyl- tai trimetyylisilyyliryhmään. R_{11} on edullisesti R_{11}' , jolloin R_{11}' on ryhmä, jolla on kaava c), d), e), f), g), h) tai i)

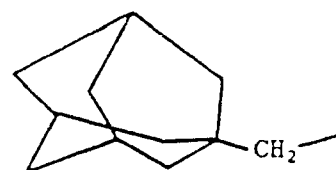
5



c)



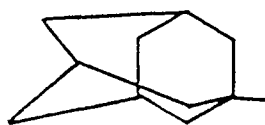
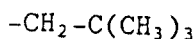
d)



e)

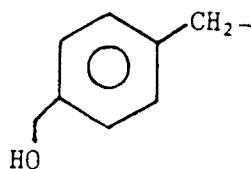
10

15

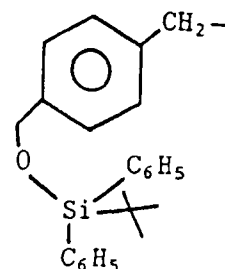


f)

g)



h)



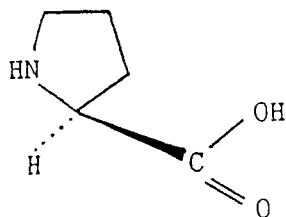
i)

20

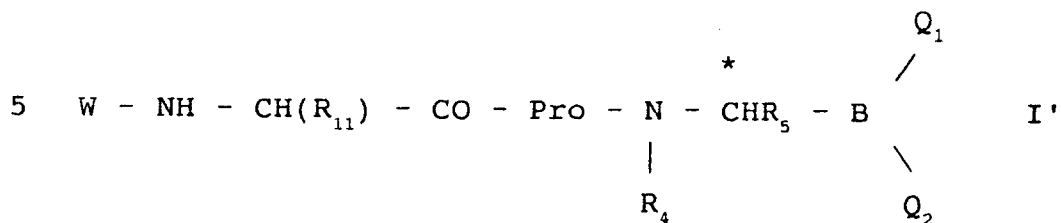
Kaavan II mukaiset luontoon kuulumattomat aminohapot voivat olla D- tai L-muodossa tai minä tahansa näiden seoksena, kuitenkin edullisesti D-muodossa.

Edelleen edullisempia yhdisteitä ovat kaavan I mukaiset trombiinin inhibiittorit, joissa Y tarkoittaa kahden aminohapon sekvenssiä, joista N-terminaalinen aminohappo on luontoon kuulumaton aminohappo ja toinen aminohappo on L-proliini (Pro), jolla on kaava,

35

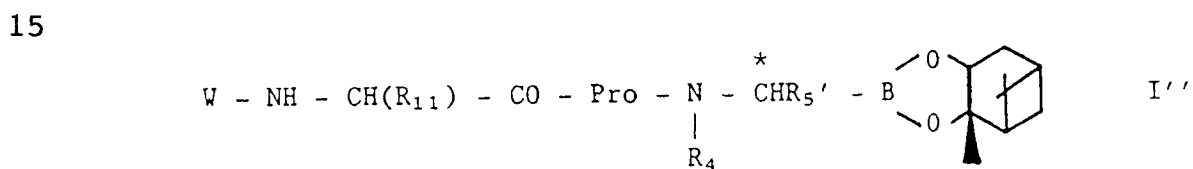


Näillä edullisemmilla yhdisteillä on kaava I',



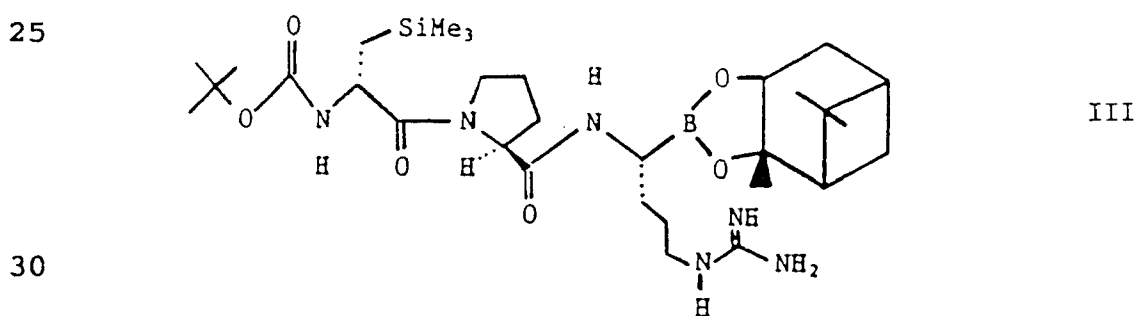
10 jossa W, R₄, R₅, R₁₁, Q₁ ja Q₂ tarkoittavat samaa kuin edellä.

Erityisen edullisia ovat yhdisteet, joilla on kaava I'',



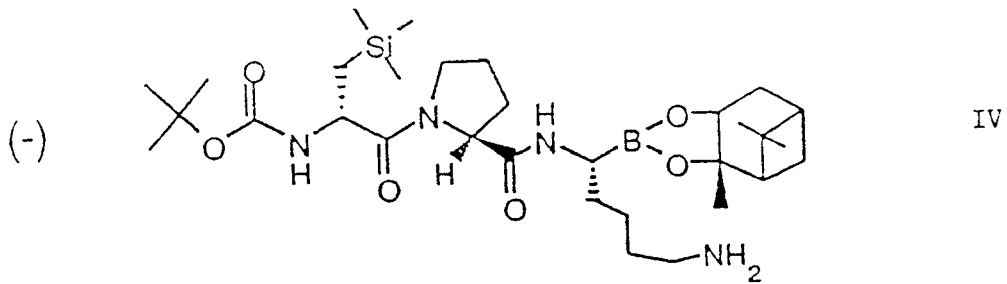
20 jossa W, R₄, R₅' ja R₁₁ tarkoittavat samaa kuin edellä.

Kaikkein edullisimpia ovat yhdisteet, joilla on kaava III,

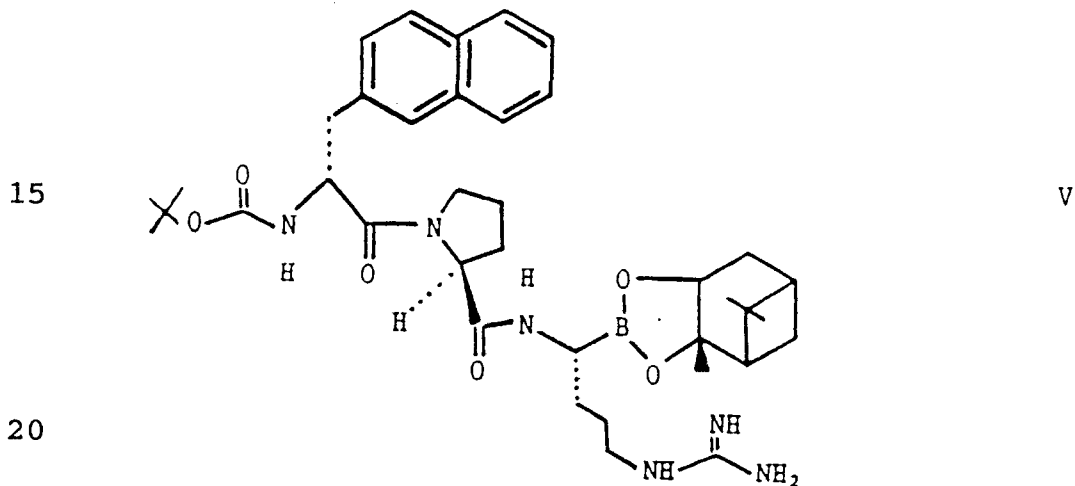


yhdiste, jolla on kaava IV,

35



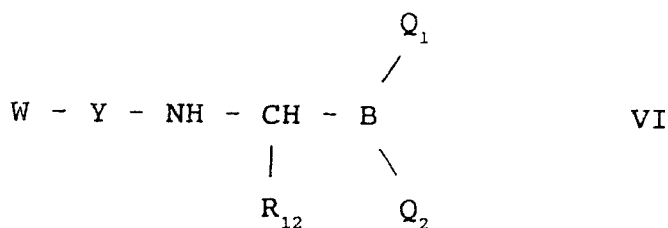
ja yhdiste, jolla on kaava V



Peptidillä katsotaan olevan affiniteettia trypsiinin kaltaisten proteaasien aktiiviseen kohtaan, mikäli tämän erityisen peptidin dissosiaatiovakion arvo on 10^{-3} M tai tätä alhaisempi.

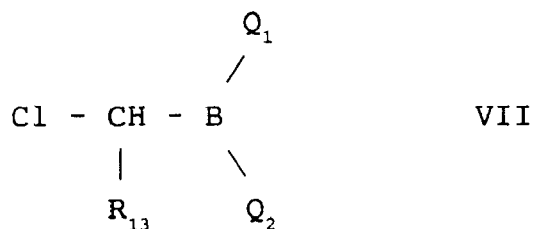
Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on -NH-C(NH)-NH_2 voidaan valmistaa antamalla kaavan I mukaisen yhdisteen, jossa X on -NH_2 , reagoida syanamidin kanssa orgaanisessa liuottimessa vahvasti happamissa olosuhteissa. Yhdisteet, joissa X on -NH_2 , voidaan puolestaan valmistaa hydraamalla kaavan I mukainen yhdiste, jossa X on N_3 . Hydraus voidaan suorittaa standardiolosuhteissa käyttäen esimerkiksi Pd/C-katalyyttiä.

Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on -N_3 , voidaan valmistaa antamalla kaavan VI mukaisen yhdisteen,

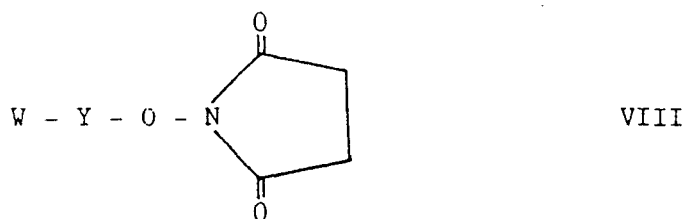


jossa W, Y, Q₁ ja Q₂ tarkoittavat samaa kuin edellä ja R₁₂ on -A-Br, jossa A tarkoittaa samaa kuin edellä, reagoida natriumatsidin kanssa polaarisisä aprottisessa liuottimessa kuten dimetyylisulfoksidissa. Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on alkyylitioryhmä, voidaan valmistaa antamalla kaavan VI mukaisen yhdisteen reagoida tiolin kanssa orgaanisen emäksen kuten guanidiinin läsnäollessa.

Kaavan VI mukaiset välituotteet sekä kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa X on $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ tai alkoksiryhmä, voidaan valmistaa antamalla kaavan VII mukaisen yhdisteen,



jossa Q_1 ja Q_2 tarkoittavat samaa kuin edellä ja R_{13} on -A-Br, A-Oalkyyli tai -A-Si(CH₃)₃, jolloin A tarkoittaa samaa kuin edellä, reagoida LiN[Si(CH₃)₃]₂:n kanssa, ja sitten suorittamalla hydrolyysi 3 mooliekvivalenttisen happomäärän kanssa ja liittäminen suojattuun peptidiin, jolla on kaava VIII,



jossa W ja Y tarkoittavat samaa kuin edellä.

Reaktio suoritetaan edullisesti kuivassa ap-roottisessa polaarisisä liuottimeä, esim. tetrahyd-rofuraanissa, lämpötilassa -78°C - huoneenlämpötila.

5 Kaavan VII mukaiset välituotteet voidaan saada julkaisussa, Matteson et al, Organometallics 3 1284-8 (1984), kuvatuä menetelmän avulla.

Kaavan VIII mukainen suojuattu peptidi voidaan valmistaa peptidikemiassa tunnetulla menetelmällä läh-
10 tien halutusta luontoon kuulumattomasta aminohaposta. Tällaiset aminohapot ovat joko kaupallisesti saatavilla (esim. aminohappo, jossa R_{11} on ryhmä c), tai ne voidaan valmistaa menetelmillä, jotka ovat analogisia kirjalli-suudessa, esim. Angew. Chem. 93, 793 (1981) ja J. Am.
15 Chem. Soc. 109, 6881 (1987), kuvattujen menetelmien kanssa.

Kaavan I mukaiset yhdisteet ovat käyttökel-poisia trypsiinin kaltaisten proteaasien inhibiitto-reina ja niitä voidaan käyttää in vitro näiden entsyy-
20 mien diagnostisissa ja mekanistisissa tutkimuksissa. Edelleen, niiden inhiboivasta toiminnasta johtuen niitä ehdotetaan käytettäväksi estämään ja hoitamaan sai-rauksia, jotka aiheutuvat säätelyjärjestelmässä ole-vasta ylimääräisestä entsyymimäärästä, niitä voidaan
25 käyttää esim. kontrolloimaan fibinolyysijärjestelmän koagulaatiota.

Esillä olevan keksinnön mukaisilla yhdisteil-lä, jotka ovat trombiinin tai tekijä Xa:n inhibiitto-reita, on anti-trombogeneisiä ominaisuuksia ja niitä
30 voidaan käyttää tarvittaessa anti-trombogeneistä ai-netta. Näitä yhdisteitä annetaan isännälle tavallisesti oraalisesti tai parenteraalisesti anti-trombogeneisen vaikutuksen aikaansaamiseksi. Suurempien nisäkkäiden kuten ihmisten tapauksessa yhdisteitä voidaan antaa
35 yksin tai yhdistettynä farmaseuttisiin kantajiin tai laimennusaineisiin annosten vaihdellaessa 0.02-5 mg/Kg kehonpaino ja edullisesti 1-10 mg/Kg anti-trombogenei-

sen vaikutuksen aikaansaamiseksi, ja ne voidaan antaa yhtenä annoksena tai jaettuina annoksina tai hitaasti vapautuvassa muodossa. Kun potilas tarvitsee kehon ulkopuoleista verenkiertosilmukkaa, antomäärä voi olla
 5 0.1-1 mg/Kg laskimonsisäisesti. Koko verimäärää varten antomäärä voi olla 1-10 mg per litra koaguloitumisen estämiseksi. Farmaseuttiset laimennusaineet ovat hyvin tunnettuja ja niihin kuuluu sokerit, tärkkelykset ja vesi, joita voidaan käyttää tablettien, kapselien,
 10 injektoitavien liuosten ja vastaavien valmistamiseksi. Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan lisätä vereen veren koaguloitumisen estämistarkoituksessa verenkeräys- tai -jakelusäiliöissä, putki- tai implantoitavassa laitteessa, joka saatetaan kosketuksiin veren kanssa.
 15 sa.

Keksinnön mukaisten yhdisteiden eduista mainittakoon oraalinen aktiivisuus, aktiivisuuden nopea käynnistyminen ja alhainen toksisuus. Lisäksi nämä yhdisteet ovat erityisen käyttökepoisia sellaisten
 20 yksilöiden hoitoon, jotka ovat yliherkkiä esim. hepariineille ym.

Seuraavissa esimerkeissä käytetyt symbolit tarkoittavat:

	Z	= bentsyylioksikarbonyyli
25	Boc	= t-butylioksikarbonyyli
	Ac	= asetyyli
	MeOH	= metyylialkoholi
	EtOAc	= etyyliasetaatti
	DCC	= disykloheksyylikarbodi-imidi
30	HONSu	= N-hydroksi-sukkini-imidi
	OPin	= pinaanidioli
	THF	= tetrahydrofuraani
	n-Bu	= <u>n</u> -butyyli
	Np	= p-nitrofenyyli
35	TLC	= ohutlevykromatografia
	Bzl	= bentsyyli
	Baa	= -NH-CH-(CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br)B-

- TMSal = trimetyylisilyylialaniini
 Adal = adamantyylialaniini
 Nafal = 2-naftyylialaniini
 booriOrn = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{B}-$
 5 booriArg = $-\text{NH}-\text{CH}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2]\text{B}-$
 Adgly = 1-adamantyyliglysiini
 booriPro- = proliinianalogi, jossa ryhmä $-\text{COOH}$ on kor-
 OPin vattu B-OPin:llä
 booriLys = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)\text{B}-$
 10 booriMpg = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)\text{B}-$
 booriMpg = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_3)\text{B}-$
 p-OH-Me-Phal = p-hydroksimetyylifenyylialaniini
 p-TBDPS-O-Me-Phal = p-tert-butyylidifenyylisilyyliok-
 simetyylifenyylialaniini
 15 Kineettiset parametrit K_1 , k_{on} ja k_{off} määrite-
 tään peptidi-arg-pNA:n entsyymikatalysoidun hydrolyysin
 inhibitiolla. Tämä hydrolyysi tuottaa p-nitroaniliinia
 ja sen ajasta riippuva vapautuminen, joka määritetään
 kvantitatiivisesti optisen tiheyden avulla aallonpituu-
 20 della 405 nm, määrittää inhiboitujen ja inhiboimattomi-
 en reaktioiden nopeudet.
 Kineettiset mittaukset suoritetaan 96-mikro-
 kuopan levyllä yhdessä yksisolu-kineettisellä lukijal-
 la. Ihmisen trombiini, jonka aktiivinen kohta on tit-
 25 rattu, liuotetaan 0.1 M fosfaattipuskuriin, pH 7.4,
 joka sisältää 0.1 M NaCl:a ja 0.1 % naudan seerumialbu-
 miinia, 400 nM aktiivista entsyymiä sisältäväksi va-
 rastoliuokseksi. Kromogeenista määrittystä varten tämä
 liuos liuotetaan samaan puskuriin 0.4 nM pitoisuuteen.
 30 Substraatti, 2AcOH-H-D-sykloheksyyli-ala-arg-pNA, liu-
 otetaan samaan puskuriin 0.5 mM pitoisuuteen. Inhibiit-
 torit liuotetaan ensin kremofoori/etanoliin 1:1 ja
 sitten laimennetaan tislatusella vedellä 1 mM varastoliu-
 okseksi. Muut laimennukset suoritetaan edellä kuvatulla
 35 fosfaattipuskurilla.

Määritykset aloitetaan lisäämällä 100 μl ent-
 syymiliuosta seokseen, joka sisältää 100 μl inhibiit-

tori- ja 50 μ l substraattiliuosta. p-nitroalaniinin vapautumista peptidyyli-p-nitroanilidisubstraattien hydrolyysistä seurataan 30 min - 1 h mittaamalla optisen tiheyden lisääntyminen allonpituudella 405 nm. Saatuja tuloksia käytetään kineettisten parametrien laskemiseen inhibiittoreiden läsnäollessa ja puuttuessa. Vaikka muita toimintamekanismeja ei suljetakaan pois, tämän trombiinien inhibiittoriluokan karakterisointi rajoitetaan havaittuun kahteen päämekanismiin, so. nopeaan, reversiibeliin sekä hitaaseen, tiukasti sitovaan kompetitiiviseen inhibitioon. Niiden inhibiittoreiden, jotka osoittavat nopeaa, reversiibeliä sitomismekanismia, eli nopeaa sitomista (alkunopeus kontrollin tapauksessa $v_0 > v_0$ inhibiittorin tapauksessa), kun $I_t \gg E_t$ (kokonaisinhibiittoripitoisuus/kokonaisentsyymipitoisuus), kineettiset vakiot lasketaan lineaarisella regressiolla käyttäen $1/v$ - inhibiittoripitoisuus $[I]$ -kuvaajia. K_1 -arvo lasketaan vaakasuorasta leikkaajasta $K_{1,app}$ yhtälöllä (1),

$$K_{1,app} = K_1 (1 + S/K_M) \quad (1)$$

Mikäli vuorovaikutusnopeus entsyymin kanssa on hidas (inhibiittori ei vaikuta v_0 :aan) ja tiukasti pysyvä (K_1 lähellä tai alhaisempi kuin E_t) siten, että inhiboitu tasapainotila (steady state) -nopeus saavutetaan vain hitaasti, pNA-muodostuksen etenemissuuntaa kuvataan yhtälöllä,

$$P = V_s t + \frac{(V_0 - V_s)}{K_{obs}} [1 - \exp(-k_{obs} t)] \quad (2)$$

jossa P on muodostunut pNA-määrä aikana 't', V_0 on alkunopeus, V_s on nopeus tasapainotilassa (steady-state) ja k_{obs} on näennäinen kokonaisreaktionopeus $E_t:n$, $I_t:n$, $K_{1,app}:n$ ja inhibiittorin ja entsyymin vuorovaikutukselle

havaitun toisen asteen nopeusvakion (k'_{on}) funktiona. Tulokset hitaista, tiukasti sitovista inhibitiomittauksista sovitetaan yhtälöön (2) ei-lineaarisella regressioanalyysillä, jolloin saadaan k_{obs} -arviot. k'_{on} -, k_{off} - ja $K_{i,app}$ -arvot saadaan sitten $k_{obs} - [I]$ -kuvaajasta. k_{off} -arvo saadaan pystysuorasta leikkauksesta, kun taas k'_{on} - ja K_i -arvot lasketaan kulmakertoimesta ja vast. vaakasuorista leikkauksista käyttäen yhtälöä (1).

10 Esimerkki 1: Boc-TMSal-Pro-NH-CH[(CH₂)₃N₃]BOPin
 A. Boc-D-TMSal-OH

Julkaisussa, Angew. Chem. 93, 793 (1981), kuvatus menetelmän mukaisesti valmistettu D-TMSal-
 15 etyyliesteri (21.5 g, 113.7 mMol) liuotetaan CH₂Cl₂-liuokseen ja joukkoon lisätään ylimäärä Boc₂O:n CH₂Cl₂-liuosta. Huoneenlämpötilassa 15 h pitämisen jälkeen seokseen lisätään 500 ml jääkylmää 0.25N suolahappoa. Orgaanista kerrosta pestään 5 % NaHCO₃-liuoksella ja
 20 suolavedellä, sitten se kuivataan Na₂SO₄:llä ja konsentroidaan vakuuissa.

Raakamateriaalia käytetään välittömästi saippuimisvaiheessa. Se liuotetaan metanoliin, jäähdytetään 0°:een, sekoitetaan 510 ml 1N NaOH-liuokseen ja
 25 seosta sekoitetaan 0° 3 h ajan. Sen jälkeen kun seos on tehty happamaksi, pH 1, 1N HCl-liuoksella, seosta uutetaan useita kertoja eetterillä. Orgaaniset kerrokset yhdistetään, pestään suolavedellä, kuivataan Na₂SO₄:llä ja konsentroidaan vakuuissa. Tuote (29.7 g öljy) käytetään
 30 seuraavassa vaiheessa ilman lisäpuhdistamista.

B. Boc-D-TMSal-Pro-ONSu

Boc-D-TMSal-OH (29.7 g, 113.7 mMol) ja p-nitrofenoli (19.0 g, 136.3 mMol) liuotetaan EtOAc:hen. Jäähdytyksen 0° lämpötilaan jälkeen seokseen lisätään DCC (23.4 g, 113.6 mMol) ja seosta sekoitetaan 1 h ajan

0° lämpötilassa ja sitten 15 h huoneenlämpötilassa. Sakka suodatetaan ja pestään EtOAc:llä ja suodos konsentroidaan vakuuissa. Saatu öljy puhdistetaan flash-kromatografisesti (9:1 heksaani/EtOAc) halutun Boc-D-TMSal-ONp:n saamiseksi valkoisina kiteinä.

Boc-D-TMSal-ONp (51.6 g, 113.7 mMol) liuotetaan THF:ään ja joukkoon lisätään ekvivalenttiset määrät proliinia ja Et₃N:ää vesiliuoksessa. Huoneenlämpötilassa 20 h pitämisen jälkeen THF poistetaan vakuuissa ja vesipitoinen jäännös laimennetaan vedellä ja sitten uutetaan useita kertoja EtOAc:llä. Vesikerroksen pH sovitetaan arvoon 3 lisäämällä 10 % sitruunahappoa. Saatua öljyistä tuotetta uutetaan useita kertoja EtOAc:llä. Yhdistetyt orgaaniset kerrokset pestään suolavedellä, kuivataan Na₂SO₄:llä ja konsentroidaan vakuuissa. Väritön öljy uudelleenkiteytetään eetteri/heksaanista saaden dipeptidiä, Boc-D-TMSal-Pro-OH:ta, valkoisena kiteisenä yhdisteenä, sp: 176°C.

Saatu dipeptidi (26.0 g, 72.5 mMol) liuotetaan EtOAc:iin. 0° lämpötilaan jäähtymisen jälkeen liuokseen lisätään HONSu:a (9.8 g, 85.5 mMol) ja DCC:tä (14.9 g, 72.3 mMol). Seosta sekoitetaan 3 h ajan 0° lämpötilassa ja vielä 15 h huoneenlämpötilassa. Seos jäähdytetään uudelleen 0° lämpötilaan, disykloheksyyliurea suodatetaan pois ja pestään useita kertoja EtOAc:llä. Suodosta pestään 0.1M Na₂CO₃-vesiliuoksella ja sitten 2 % KHSO₄-vesiliuoksella.

Na₂SO₄:llä kuivaamisen ja vakuuissa konsentroidon jälkeen saadaan Boc-D-TMSal-Pro-ONSu:a valkoisena vaahtona.

C. Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin

Tämä menetelmä on yhdessä astiassa tapahtuva 3-vaiheinen menetelmä, joka sisältää kiraalisen α-(bis-trimetyylisilyyli)amidoboronaatin in situ muodostuksen, kahden trimetyylisilyyliryhmän hydrolyysin ja näin

muodostuneen α -aminoboronaatin liittämisen vaiheessa B valmistettuun (Boc-D-TMSal-Pro-ONSu)-aktiiviseen esteriin. Kaikki reaktiovaiheet suoritetaan argonatmosfäärissä. Kiraalinen α -klooriboronaatti ((+)-Pinaanidioli-

5 (S)-1-kloori-4-bromi-butaani-1-boronaatti) (1.75 g, 5.0 mMol) liuotetaan 2.5 ml THF:ään ja lisätään esijäähdytettyyn (-78°) litiumheksametyyliidisilatsaaniliuokseen (5 ml 1.0M heksaaniliuos, 5.0 mMol). -78° lämpötilassa 30 min sekoituksen jälkeen liuos lämmitetään yön aikana

10 huoneenlämpötilaan. Liuos jäähdytetään uudelleen -78° :een ja joukkoon lisätään 3 mooliekvivalenttia HCl-dioksaaniliuosta. Seos lämmitetään huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitetaan 2 h ajan tässä lämpötilassa. Uudelleen -20° lämpötilaan jäähdyttämisen jälkeen joukkoon

15 lisätään 6 ml CH_2Cl_2 -liuoksessa vaiheesta B saatua aktiivista esterää (2.28 g, 5.0 mMol), jonka jälkeen 1.39 ml (10.0 mMol) trietyyliamiinia.

Seosta sekoitetaan 1 h ajan -13° lämpötilassa, lämmitetään huoneenlämpötilaan ja sekoitetaan 2 h ajan

20 tässä lämpötilassa. Seos suodatetaan, suodos konsentroidaan vakuuissa, jäännös laimennetaan eetterillä ja pestään 2N HCl-liuoksella, 5 % NaHCO_3 -liuoksella ja suolavedellä. Orgaaninen kerros kuivataan Na_2SO_4 :llä ja konsentroidaan vakuuissa. Jäännös kiteytetään seisot-

25 tamalla saaden haluttua kiraalista peptidiboronaattia valkoisena kiteisenä yhdisteenä.

D. Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH[(CH₂)₃N₃]BOPin

30

Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin, vaiheen C tuote (804 mg, 1.2 mMol), liuotetaan 13 ml DMSO-liuokseen ja joukkoon lisätään natriumatsidia (156 mg, 2.4 mMol). Seosta sekoitetaan 3 h ajan huoneenlämpötilassa. Eetteri/jää-

35 vesi-seosta lisätään, jolloin seoksesta saostuu välittömästi valkoisia kiteitä. Valkoinen sakka suodatetaan ja sitä pestään eetterillä saaden 0.6 g atsidia val-

koisena kiteisenä yhdisteenä.

Esimerkki 2: Boc-D-TMSal-Pro-booriOrn-OPin

5 Esimerkin 1 mukainen atsidi (569 mg, 0.9 mMol)
liuotetaan 25 ml EtOAc:hen ja hydrataan 0.5 g 10 % Pd/C
läsnäollessa. 2.5 h kuluttua katalyytti poistetaan ja
liuos konsentroidaan vakuuissa saaden valkoista vaah-
toa, joka uudelleenkiteytetään EtOAc/eetteristä, jol-
10 loin saadaan haluttua tuotetta valkoisena kiteisenä
yhdisteenä, sp: 200 - 202°, $[\alpha]_D^{20} = -11.6^\circ$ (c = 0.5,
MeOH).

Esimerkki 3: Boc-D-TMSal-Pro-booriArg-OPin (bent-
15 seenisulfonaatti)

Esimerkin 2 mukainen Boc-D-TMSal-Pro-booriOrn-
OPin (250 mg, 0.412 mMol) liuotetaan 2 ml etanoliin.
Bentseenisulfonihappoa (65.2 mg, 0.412 mMol) lisätään
20 joukkoon. Huoneenlämpötilassa 15 min sekoituksen jäl-
keen seokseen lisätään syanamidia (86.6 mg, 2.06 mMol)
ja seosta kuumennetaan refluksoiden. Reaktion etenemi-
stä seurataan RP-TLC avulla, jolloin havaitaan amiini-
lähtömateriaalin ninhydriinitäplän häviäminen ja tuot-
teen Sakaguchi-juovan ilmaantuminen. 7 päivän kuluttua
25 amiinia ei voida enää havaita ja liuos konsentroidaan
vakuuissa. Jäännös liuotetaan MeOH-liuokseen ja kro-
matografoidaan 5 x 55 cm Sephadex LH-20 -pylväässä
käyttäen MeOH-liuosta.

30 Haluttu tuote saadaan valkoisena vaahtona,
 $[\alpha]_D^{20} = -45.3^\circ$ (c = 1, CH₂Cl₂).

Esimerkki 4: Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₃N₃)B-OPin

A. (+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-5-bromi-pentaani-1-
35 boronaatti

4-Bromi-1-buteenin (20.8 ml, 203.3 mMol) an-

netaan reagoida katekoliboraanin kanssa (24.4 g, 203.3 mMol) 100°C lämpötilassa 16 h ajan. Raakatuote tislataan vakuumissa saaden 4-bromi-butaani-1-boronaattia valkoisena kiteisenä yhdisteenä.

5 (+)-pinaanidioli (27.7 g, 163 mMol) liuotetaan THF-liuokseen ja joukkoon lisätään edellä syntetisoitu 4-bromi-butaani-1-boronaatti (41.6 g, 163 mMol). Huoneenlämpötilassa 1 h pitämisen jälkeen THF poistetaan vakuumissa ja jäännös puhdistetaan flash-kromatografi-
10 sestä (90:10 heksaani/EtOAc) saaden (+)-pinaanidioli-4-bromi-butaani-1-boronaattia värittömänä öljynä.

Haluttu (+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-5-bromi-pentaani-1-boronaatti valmistetaan julkaisussa, Organometallics 3, 1284 (1984), esitetyn menetelmän mu-
15 kaisesti. Tätä tarkoitusta varten metyleenikloridi (9.8 ml) jäähdytetään -100°C lämpötilaan ja joukkoon lisätään n-butyylilitiumia (71.6 ml 1.6M liuos, 114.5 mMol) 20 min aikana. -100°C lämpötilassa 15 min pitämisen jälkeen joukkoon lisätään kylmä (-78°C) (+)-pi-
20 naanidioli-5-bromi-pentaani-1-boronaatin (32.8 g, 104.1 mMol) THF-liuos. -100°C lämpötilassa vielä 15 min pitämisen jälkeen reaktioseos lämmitetään huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitetaan 2 h ajan tässä lämpötilassa. Liuotin poistetaan vakuumissa, jäännös laimennetaan
25 heksaani/vedellä ja laimennosta uutetaan useita kertoja heksaanilla. Na₂SO₄:llä kuivauksen ja vakuumissa liuottimen poiston jälkeen saadaan (+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-5-bromi-pentaani-1-boronaattia keltaisena öljy-
nä, joka käytetään seuraavassa vaiheessa ilman lisä-
30 puhdistamista.

B. Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₄Br)B-OPin

35 LiN(SiMe₃)₂:n (65.2 ml 1.0M liuos, 65.2 mMol) THF-liuos jäähdytetään -78°C:een. Joukkoon lisätään vaiheesta A saatu α-kloori-boronaatti (23.7 g, 65.2

mMol) THF-liuoksessa. -78°C lämpötilassa 1 h sekoituksen jälkeen seosta sekoitetaan 15 h huoneenlämpötilassa. Tämän jakson jälkeen reaktioseos jäädytetään uudelleen -78°C:een, HCl:n dioksaaniliuos (29.8 ml 6.56N
 5 liuos, 196 mMol) lisätään, liuosta sekoitetaan 45 min -78°C:ssa ja sitten 2 h huoneenlämpötilassa. Seos jäädytetään -15°C:een, joukkoon lisätään esimerkin 1 mukaisen Boc-TMSal-Pro-ONSu:n (29.7 g, 65.2 mMol) CH₂Cl₂-liuos, ennen kuin trietyyliamiini (18.1 ml, 130.4 mMol)
 10 lisätään liittymisreaktion käynnistämiseksi. -15°C lämpötilassa 1 h sekoittamisen jälkeen seosta sekoitetaan 2 h ajan huoneenlämpötilassa. Seos suodatetaan Hyflon läpi ja konsentroidaan vakuuissa. Jäännös laimennetaan eetteri/vedellä ja laimennosta uutetaan useita kertoja
 15 eetterillä. Na₂SO₄:llä kuivaamisen ja vakuuissa konsentroidon jälkeen saadaan haluttua Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₄Br)B-OPin:a eetteri/heksaanilla kiteytyksettä valkoisena kiteisenä yhdisteenä, sp: 74°C.

20 C. Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₄N₃)B-OPin

Vaiheesta B saatu tuote (33.3 g, 48.6 mMol) liuotetaan DMSO-liuokseen ja joukkoon lisätään natriumatsidia (6.3 g, 97.2 mMol). Seosta sekoitetaan 6 h
 25 ajan huoneenlämpötilassa. Eetteri/jäävettä lisätään ja seosta uutetaan useita kertoja eetterillä. Na₂SO₄:llä kuivaamisen ja vakuuissa konsentroidon jälkeen saatu öljy kiteytetään saaden Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₄N₃)B-Pin:ä valkoisena kiteisenä yhdisteenä, sp.:69-70°C; α_D
 30 = -74.4° (c = 1.0, MeOH).

Esimerkki 5: Boc-D-TMSal-Pro-booriLys-OPin

Esimerkin 4 mukainen atsidi (22.0 g, 34.0
 35 mMol) liuotetaan EtOAc:hen ja hydrataan 4.0 g 10 % Pd/C:n läsnäollessa. Katalyytti poistetaan 9 h kuluttua ja liuos konsentroidaan vakuuissa. Saatu vaahto liuo-

tetaan EtOAc:hen ja kiteytetään saaden haluttua Boc-D-TMSal-Pro-booriLys-OPin:ä valkoisina kiteinä, sp.: 128-129°C; $\alpha_D = -59.6^\circ$ (c = 1.0, MeOH).

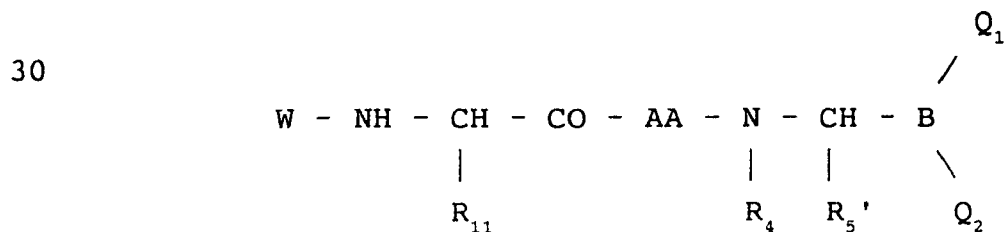
5 Esimerkki 6: Boc-D-TMSal-Pro-booriHArg-OPin (bentseenisulfonaatti)

Esimerkin 5 mukainen Boc-D-TMSal-Pro-booriLys-OPin:n bentseenisulfonaatti (800 mg, 1.03 mMol) liuotetaan etanoliin. Joukkoon lisätään syanamidia (210 mg, 5.0 mMol) ja seosta kuumennetaan refluksoiden. Reaktio-
10 etenemistä seurataan RP-TLC:n avulla, jolloin havaitaan amiinilähtömaterialin ninhydiiniäplän häviäminen ja tuotteen Sakaguchi-juovan ilmaantuminen. 7 päivän ku-
15 luttua amiinia ei voida enää havaita ja liuos konsentroidaan vakuumissa. Jäännös liuotetaan MeOH-liuokseen ja kromatografoidaan 5 x 55 cm Sephadex LH-20 -pylväässä MeOH-liuoksella.

Haluttu tuote saadaan valkoisena vaahtona, α_D
20 = -40.8° (c = 0.5, CH₂Cl₂).

Esimerkit 7 - 29:

Esimerkeissä 1-6 esitettyjen menetelmien
25 kanssa analogisesti voidaan valmistaa yhdisteitä, joilla on kaava,



35

jossa R_4 , R_5' , R_{11} , $Q_1 + Q_2$ ja AA on määritelty seuraavassa taulukon I mukaisesti

TAULUKKO I

	Ex	W	R ₁₁	R ₄	R ₅ '	Q ₁ +Q ₂	AA	[α] _D ²⁰	C	Liuotin
5	7	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-27,8°	0,5	EtOH
	8	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-75,0°	1,0	CH ₂ Cl ₂
	9	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ N ₃	a)	Pro	-64,7°	0,51	CH ₂ Cl ₂
	10	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₂ SiMe ₃	a)	Pro	-57,0°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	11	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₂ SiMe ₃	a)	Pro	-59,3°	1,0	CH ₂ Cl ₂
10	12	Ac	c)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-80,2°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	13	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-42,3°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	14	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-18,8°	0,5	EtOH
	15	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-61,7°	0,41	CH ₂ Cl ₂
	16	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Pro	-52,4°	0,54	CH ₂ Cl ₂
15	17	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	b)	Pro	-35,8°	1,0	EtOAc
	18	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-10,6°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	19	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	b)	Gly	+ 8,8°	0,5	EtOAc
	20	Ac	c)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-78,6°	0,75	CH ₂ Cl ₂
	21	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	b)	Gly	-4,4°	0,5	CH ₂ Cl ₂
20	22	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ -N ₃	a)	Pro	-76,0°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	23	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-25,4°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	24	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-34,8°	0,5	CH ₂ Cl ₂
	25	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Gly	-14,7°	1,0	MeOH
	26	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Gly	-30,6	0,5	EtOH
25	27	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Asp	-18,4°	0,5	MeOH
	28	H	d)	H	-(CH ₂) ₃ NH ₂	a)	Pro	-53,6	0,32	MeOH
	29	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ OC ₂ H ₅	a)	Pro	-54,2	0,5	MeOH

30 Esimerkki 30: Boc-D-TMSal-Pro-booriMpg-OPin

A. (+)-Pinaanidioli-(S)-1-kloori-4-metoksi-butaani-1-boronaatti

35 3-metoksi-1-propeenin (6.0 g, 83.3 mMol) an-netaan reagoida katekoliboraanin kanssa (10.0 g, 83.3 mMol) 100°C lämpötilassa 24 h ajan. Raakatuote tislataan vakuumissa saaden 3-metoksi-propaani-1-boronaattia

värittömänä öljynä.

(+)-pinaanidioli (10.6 g, 62.5 g mMol) liuotetaan THF-liuokseen ja joukkoon lisätään edellä syntetisoitu 3-metoksi-propaani-1-boronaatti (12.0 g, 62.5 mMol). Huoneenlämpötilassa 1h pitämisen jälkeen THF poistetaan vakuuissa ja jäännös puhdistetaan flash-kromatografisesti (80:20 heksaani/EtOAc) saaden (+)-pinaanidioli-3-metoksi-propaani-1-boronaattia värittömänä öljynä.

Haluttu (+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-4-metoksi-butaani-1-boronaatti valmistetaan julkaisussa, Organometallics 3, 1284 (1984), kuvatun menetelmän mukaisesti. Tätä tarkoitusta varten metyleenikloridin (2.2 ml) THF-liuos jäähdytetään -100°C:een ja joukkoon lisätään n-butyylilitiumia (13.8 ml 1.6M liuos, 22.0 mMol) 20 min aikana. -100°C lämpötilassa 15 min pitämisen jälkeen joukkoon lisätään (+)-pinaanidioli-3-metoksi-propaani-1-boronaatin (5.04 g, 20 mMol) THF-liuos, jonka jälkeen lisätään vedetöntä ZnCl_2 :ta (1.42 g, 10.0 mMol). -100°C lämpötilassa vielä 15 min pitämisen jälkeen reaktioseos lämmitetään huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitetaan 2 h ajan tässä lämpötilassa. Liuotin poistetaan vakuuissa, jäännös laimennetaan eetterillä ja sitä pestään vedellä. Orgaaninen kerros kuivataan Na_2SO_4 :llä ja konsentroidaan saaden öljyä, joka puhdistetaan flash-kromatografisesti (9:1 heksaani/EtOAc) saaden haluttua (+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-4-metoksi-butaani-1-boronaattia värittömänä öljynä.

30 B. Boc-D-TMSal-Pro-booriMpg-OPin

$\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$:n (5 ml 1.0M liuos, 5.0 mMol) THF-liuos jäähdytetään -78°C:een. Joukkoon lisätään vaiheen A mukaista α -kloori-boronaatin (1.53 g, 5,0 mMol) THF-liuosta. -78°C lämpötilassa 1 h sekoituksen jälkeen seosta sekoitetaan 15 h huoneenlämpötilassa. Tämän aikajakson jälkeen reaktioseos jäähdytetään uudelleen

-78°C:een, joukkoon lisätään HCl:n dioksaaniliuosta (2.7 ml 5.65N liuos, 15.0 mMol), liuosta sekoitetaan 30 min ajan -78°C:ssa ja sitten 2 h huoneenlämpötilassa. Seos jäädytetään -15°C:een, joukkoon lisätään esimerkiksi 1 mukaisen Boc-TMSal-Pro-ONSu:n (2.28 g, 5.0 mMol) CH₂Cl₂-liuos, ennen kuin trietyyliamiini (1.39 ml, 10.0 mMol) lisätään liittymisreaktion käynnistämiseksi. -15°C lämpötilassa 1 h sekoittamisen jälkeen seosta sekoitetaan 2 h ajan huoneenlämpötilassa. Seos suodatetaan Hyflon läpi ja konsentroidaan vakuuissa. Jäännös laimennetaan EtOAc:llä ja laimennosta pestään 0.2N HCL-liuoksella, 5 % NaHCO₃-liuoksella ja lopuksi suolavedellä. Liuottimen poiston jälkeen saadaan öljyä, joka puhdistetaan flash-kromatografisesti (EtOAc) saaden Boc-D-TMSal-Pro-booriMpg-OPin:a valkoisena vaahtona, $\alpha_D = -48.8^\circ$ (c = 0.25, CH₂Cl₂).

Esimerkki 31: Boc-D-(p-(TBDPS-O)metyyli)Phal-Pro-booriOrn-OPin

20 A. Boc-D-(p-((1,1-dimetyylietyyli)difenyyli-silyyli)oksi)metyylifenyylialaniini

Substraatin atsidoryhmän selektiivisesti pelkistämiseksi SnCl₂:n (3.12 g, 16.5 mMol) ja CH₂Cl₂:n suspensioon lisätään tiofenolia (7.27 g, 66.0 mMol). Joukkoon lisätään trietyyliamiinia (6.8 ml, 49.5 mMol), jolloin saadaan keltainen liuos. Boc-anhydridi (4.8 g, 22.0 mMol) lisätään ennen (3 (2S), 4S-3-(2-atsido-3-(p-((1,1-dimetyyli)difenyyli-silyyli)oksi-metyyli)fenyyli-1-okso-propyyli)-4-(fenyylimetyyli)-2-oksatsolidinonin (%de>95; 6.8 g, 11.0 mMol), joka on valmistettu julkaisussa, J. Am. Chem. Soc. 109 6881 (1987), kuvatus menetelmän mukaisesti, CH₂Cl₂-liuoksen lisäämistä. Huoneenlämpötilassa 2.5 h sekoittamisen jälkeen seos laimennetaan EtOAc/2N NaOH-liuoksella ja suodatetaan Hyflolla. Orgaanista kerrosta pestään 2 % NaHSO₄-vesiliuoksella, 5 % NaHCO₃-vesiliuoksella ja lopuksi suolavedellä.

lä. Na_2SO_4 :llä kuivauksen ja vakuuissa konsentroidin jälkeen saatu keltainen öljy puhdistetaan flash-kromatografisesti saaden (3(2S),4S)-3-(2-(((tert-butyylioksi)karbonyyli)amino)-3-(p-(((1,1-dimetyylietyyli)difenyyli-silyyli)oksi)metyyli)fennyli-1-oksopropyyli)-4-(fenyylimetyyli)-2-oksatsolidinonia valkoisena vaahtona. Tämä yhdiste (2.0 g, 2.88 mMol) liuotetaan THF/ve-
 5 teen ja hydrolysoidaan in situ muodostetulla LiOOH :lla (5.76 mMol) 0°C lämpötilassa. 0°C lämpötilassa 1.75 h
 10 pitämisen jälkeen joukkoon lisätään Na_2SO_3 :n (1.25 g, 9.9 mMol) vesiliuosta. THF poistetaan vakuuissa, jään-
 nöksen pH sovitetaan arvoon 1-2 ja seosta uutetaan 3 kertaa EtOAc :llä. Yhdistettyjä orgaanisia kerroksia pestään vedellä, kuivataan Na_2SO_4 :llä ja ne konsentroi-
 15 daan vakuuissa. Heksaani/eetteristä kiteytyksen jäl-
 keen saadaan oksatsolidinonia valkoisina kiteinä. Suo-
 dos konsentroidaan vakuuissa saaden haluttua otsikon mukaista yhdistettä valkoisena vaahtona.

20 B. Boc-D-(p-(((1,1-dimetyylietyyli)difenyyli-silyyli)oksi)-metyyli)-fenyylialaniini-Pro-ONSu

Vaiheen A otsikon mukaisen yhdisteen (1.6 g, 2.88 mMol) ja p-nitrofenolin (0.43 g, 3.12 mMol) EtOAc -
 25 seokseen lisätään 0°C lämpötilassa DCC:tä (0.59 g, 2.88 mMol). Reaktioseosta sekoitetaan 16 h ajan huoneenläm-
 pötilassa. 0°C lämpötilaan jäähdyttämisen jälkeen sakka suodatetaan ja sitä pestään kylmällä EtOAc :llä. Suodos konsentroidaan vakuuissa. Saatu (Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-
 30 Phal-ONp)-öljy käytetään seuraavassa vaiheessa ilman lisäpuhdistamista.

Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-ONp (2.2 g, 2.88 mMol) liuotetaan THF-liuokseen joukkoon lisätään L-proliinin (365 mg, 3.17 mMol) ja Et_3N :n (0.88 ml, 6.33
 35 mMol) vesiliuos. Huoneenlämpötilassa 15 h pitämisen jälkeen THF poistetaan vakuuissa. pH sovitetaan arvoon 3 lisäämällä 10 % sitruunahappoa. Saatua öljyistä tuo-

tetta uutetaan useita kertoja EtOAc:llä. Yhdistettyjä orgaanisia kerroksia pestään suolavedellä, kuivataan Na_2SO_4 :llä ja ne konsentroidaan vakuuissa. Väritön öljy puhdistetaan flash-kromatografisesti (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ p-
 5 nitrofenolin eluoimiseksi, sitten 80:20 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$) saaden Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-OH valkoisena vaahtona.

Tämä dipeptidi (1.3 g, 2.06 mMol) liuotetaan EtOAc:hen. 0°C lämpötilaan jäähtyksen jälkeen jouk-
 10 koon lisätään HONSu:a (220 mg, 2.47 mMol) ja DCC:tä (330 mg, 2.06 mMol). Seos jäähdytetään uudelleen 0°C :een, disykloheksyyliurea suodatetaan pois ja sakkaa pestään useita kertoja kylmällä EtOAc:llä. Suodosta pestään 0.1M Na_2CO_3 -vesiliuoksella, 8 % NaHSO_4 -vesiliuok-
 15 sella ja sitten suolavedellä. Na_2SO_4 :llä kuivauksen ja vakuuissa konsentroinnin jälkeen saadaan otsikon mukaista yhdistettä, Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-ONSu:-a, valkoisena vaahtona.

20 C. Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-Baa-OPin

Otsikon mukaista yhdistettä saadaan käyttämällä analogista yhdessä astiassa tapahtuvaa 3-vaiheista menetelmää, kuin on kuvattu esimerkissä 1/C Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin:n valmistamiseksi. Siten α -amino-
 25 boronaattivälituotteen, joka saadaan kiraalisen α -kloori-boronaatin ((+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-4-bromibutaani-1-boronaatti) (659 mg, 2.0 mMol) ja $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$:n (2.0 mMol) reaktiosta ja hydrolyysistä HCl:llä,
 30 annetaan reagoida vaiheesta B saadun aktiivisen esterin (1.45 g, 2.0 mMol) kanssa Et_3N :n (4.0 mMol) läsnäollessa otsikon mukaisen yhdisteen saamiseksi, joka puhdistetaan flash-kromatografisesti (1:1 heksaani/EtOAc).

35 D. Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-booriOrn-OPin

Vaiheesta C saatu tuote (680 mg, 0.72 mMol)

liuotetaan DMSO-liuokseen ja joukkoon lisätään natriumatsidia (94 mg, 1.44 mMol). Seosta sekoitetaan 4 h ajan huoneenlämpötilassa. Seokseen lisätään eetteri/jäävettä, jolloin seoksesta saostuu välittömästi valkoisia kiteitä. Valkoinen sakka suodatetaan pois ja sitä pestään vedellä saaden Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-NH-CH((CH₂)₃N₃)B-OPin:ä valkoisena kiteisenä yhdisteenä.

Tämä atsidi (272 mg, 0.3 mMol) liuotetaan EtOAc:hen ja hydrataan Lindlar-katalyytin läsnäollessa. Katalyytti poistetaan 8 h kuluttua ja liuos konsentroidaan vakuumissa. Raakatuote puhdistetaan flash-kromatografisesti (EtOAc, sitten EtOH) saaden haluttua otsikon mukaista yhdistettä valkoisena vaahtona, $\alpha_D = -32.4^\circ$ (c = 0.25, MeOH).

Esimerkki 32: Boc-D-(p-OH-Me)-Phal-Pro-booriOrn-OPin

Esimerkin 31 mukainen boori-ornitiini (132 mg, 0.15 mMol) liuotetaan THF-liuokseen ja sen annetaan reagoida n-Bu₄NF:n (0.3 ml 1.1M liuos, 0.3 mMol) kanssa. Huoneenlämpötilassa 45 min pitämisen jälkeen seokseen lisätään jäävettä ja saatua seosta uutetaan useita kertoja EtOAc:llä. Yhdistetyt orgaaniset kerrokset kuivataan Na₂SO₄:llä ja konsentroidaan vakuumissa. Saatu öljy puhdistetaan lyhytkromatografisesti (EtOAc, sitten EtOH) saaden otsikon mukaista yhdistettä valkoisena vaahtona, $\alpha_D = -34.0^\circ\text{C}$ (c = 0.1, MeOH).

Esimerkki 33: Boc-D-TMS-al-Adgly-booriPro-OPin
A. L-1-Adamantyyliiglyysiini

(3(2S),4S)-3-(2-atsido-2-adamant-1-yyli-1-oksoetyyli)-4-(fenyyliimetyyli)-2-oksatsolidoni (% de > 95; 9.86 g, 25.0 mMol), joka valmistetaan julkaisussa, J.Am. Chem. Soc. 109, 6881 (1987), esitetyn menetelmän mukaisesti, liuotetaan 320 ml THF/H₂O-seokseen (3:1),

jäähdytetään 0°C:een, seostetaan 4 ekvivalentin vetyperoksidia ja 2.0 ekvivalentin LiOH:n kanssa. Saatua seosta sekoitetaan 0°C lämpötilassa kunnes substraatti on kulutettu (30 min) ja peroksidi (perkarboksylaatti) sammutetaan 0°C:ssa 1.5N Na₂SO₃-vesiliuoksen 10 % ylimäärällä. NaHCO₃-vesiliuoksella (pH 9-10) puskuroinnin jälkeen seosta uutetaan useita kertoja EtOAc:llä ylimääräisen kiraalisen oksatsolidinonin poistamiseksi. Karboksyylihappotuote eristetään happamaksi tehdyn (pH 1-2) vesifaasin EtOAc-uutolla, Na₂SO₄-kuivauksella ja vakuumissa konsentroinnilla. Haluttu (S)-atsido-adamant-1-yyli-etikkahappo eristetään valkoisina kiteinä (5.29 g) ja se käytetään seuraavassa vaiheessa ilman lisäpuhdistamista. 2(S)-atsido-adamant-1-yylietikkahappo (5.29 g, 22.5 mMol) liuotetaan 110 ml EtOH- ja 11.3 ml 2N HCl-liuokseen ja hydrataan 0.7 g 10 % Pd/C:n läsnäollessa. Katalyytti poistetaan 2.5 h kuluttua ja liuos konsentroidaan vakuumissa saaden haluttua aminohappoa hydrokloridisuolan muodossa. Saatu hydrokloridi suspendoidaan 40 ml H₂O:hon ja sitä käsitellään 1.9 g kiinteällä NaHCO₃:lla. Saatu aminohappo suodatetaan pois ja sitä pestään useita kertoja vedellä. Vakuumissa kuivauksen jälkeen saadaan L-1-adamantyyli-glysiiniä valkoisena kiteisenä yhdisteenä, $[\alpha]_D^{20} = +3.0$ (c = 1.0, MeOH).

B. Boc-D-TMSal-Adgly-ONSu

Esimerkin 1 mukainen Boc-D-TMSal-ONp (7.71 g, 20.2 mMol) liuotetaan THF-liuokseen joukkoon lisätään ekvimolaariset määrät 1-adamantyyli-glysiiniä ja Et₃N:ää vesiliuoksessa. Huoneenlämpötilassa 20 h sekoituksen jälkeen THF poistetaan vakuumissa ja vesipitoinen jäännös laimennetaan 150 ml 0.1N HCl-liuoksella ja sitten liuosta uutetaan useita kertoja EtOAc:llä. Yhdistettyjä orgaanisia kerroksia pestään suolavedellä, kuivataan Na₂SO₄:llä ja konsentroidaan vakuumissa. Öljyinen tuote

kromatografoidaan silikageelillä (CH_2Cl_2) saaden dipeptidiä, Boc-D-TMSal-Adgly-OH:ta, öljyn muodossa. Boc-D-TMSal-Adgly-OH (6.9 g, 15.2 mMol) liuotetaan 80 ml EtOAc:iin. 0°C:een jäähdytyksen jälkeen joukkoon lisätään HONSu:a (2.1 g, 18,0 mMol) ja DCC:tä (3.1 g, 15.2 mMol). Seosta sekoitetaan 3 h ajan 0°C lämpötilassa ja sitten vielä 15 h huoneenlämpötilassa. Seos jäähdytetään uudelleen 0°C:een, disykloheksyyliurea suodatetaan pois ja sitä pestään EtOAc:llä. Suodosta pestään 0.1M NaHCO_3 -vesiliuoksella ja sitten 2 % KHSO_4 -vesiliuoksella. Na_2SO_4 :llä kuivauksen ja vakuumissa konsentroinnin jälkeen saadaan Boc-D-TMSal-Adgly-OnSu:a (7.2 g) valkoisena vaahtona.

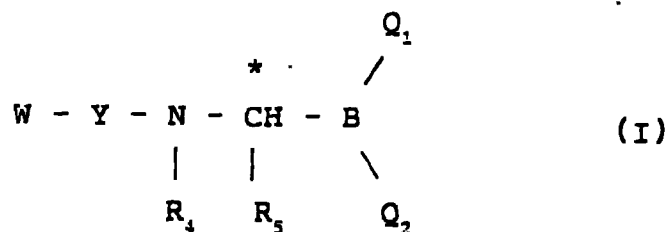
15 C. Boc-D-TMSal-Adgly-booriPro-OPin

Otsikon mukainen yhdiste saadaan käyttämällä analogista yhdessä astiassa tapahtuvaa 3-vaiheista menetelmää, kuin on kuvattu esimerkissä 1/C Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin:n valmistamiseksi. Steerisesti estyneen vaiheen B mukaisen aktiivisen esterin (2.7 g, 5.0 mMol) alhaisesta reaktiivisyydestä johtuen α -aminoboronaattivälituote, joka saadaan kiraalisen α -klooriboronaatin ((+)-pinaanidioli-(S)-1-kloori-4-bromibutaani-1-boronaatti) (1.7 g, 5.0 mMol) ja litiumheksametyylidisilatsaanin (5.0 mMol) reaktiosta ja hydrolyysistä HCl:ää käyttäen, syklataan booriproliniinijohdannaiseksi, joka sitten reagoi vaiheesta B saadun aktiivisen esterin kanssa, jolloin saadaan odottamattomasti Boc-D-TMSal-Adgly-booriPro-OPin:ä pääasiallisena tuotteena. Raakatuotteen flash-kromatografia (2:1 heksaani/EtOAc) tuottaa otsikon mukaista yhdistettä (0.48 g) valkoisena vaahtona, joka puhdistetaan edelleen uudelleenkiteyttämällä eetteri/heksaanista saaden haluttua Boc-D-TMSal-Adgly-booriPro-OPin-tuotetta valkoisena kiteisenä yhdisteenä.

sp.: 187-188°C, $[\alpha]_D^{20} = +2.8^\circ$ (c = 1.0, CH_2Cl_2).

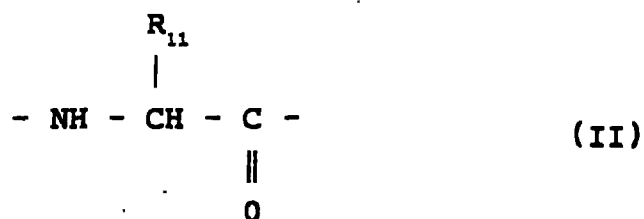
PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi,

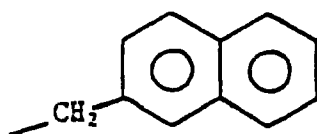


jossa W on vety tai N-suojaaava ryhmä;

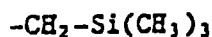
Y on kahden aminohapon sekvenssi, joista N-terminaalinen aminohappo on ei-luonnollinen kaavan II mukainen aminohappo



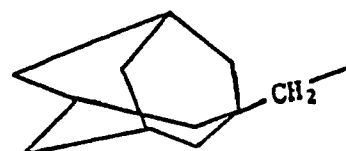
jossa R_{11} on ryhmä, jolla on kaava (c), (d), (e), (f), (g), (h) tai (i)



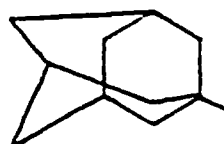
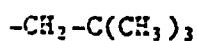
c)



d)

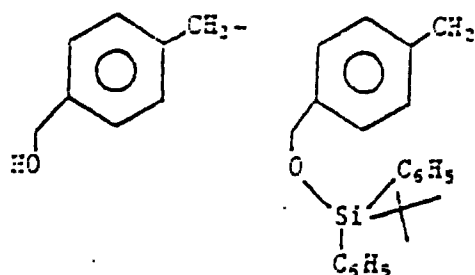


e)



f)

g)

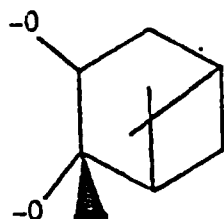


h)

i)

ja toinen aminohappo on L-proliini;

Q_1 ja Q_2 ovat $-OH$, tai Q_1 ja Q_2 muodostavat yhdessä kaavan (a) mukaisen ryhmän;



(a)

R_4 on vety tai C_{1-10} alkyyli;

R_5 on ryhmä $-A-X$, jossa A on $-(CH_2)_2-$, jossa z on 2,3,4 tai 5; $-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$; $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$; $-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$; $-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$; $(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ tai $-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ja

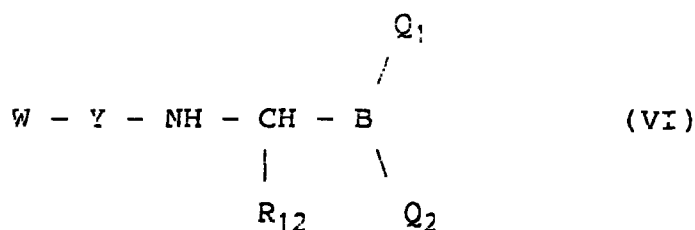
X on $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$, $-\text{S}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$, C_{1-4} alkoksi tai $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$;

t u n n e t t u siitä, että

i) kun X on $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$, kaavan I mukaisen yhdisteen, jossa X on $-\text{NH}_2$, annetaan reagoida syanamidin kanssa,

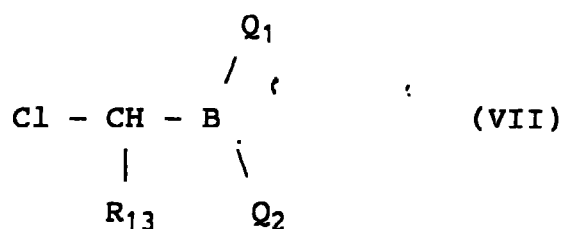
ii) kun X on $-\text{NH}_2$, hydrataan kaavan I mukainen yhdiste, jossa X on $-\text{N}_3$;

iii) kun X on $-\text{N}_3$, kaavan VI mukaisen yhdisteen,

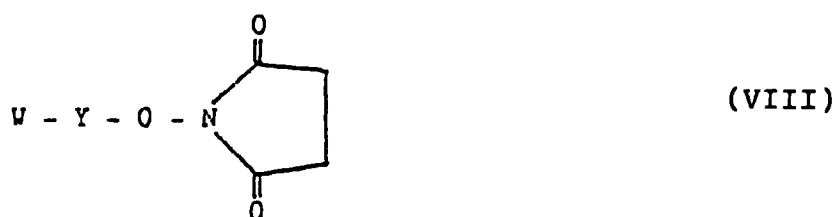


jossa W, Y, Q₁ ja Q₂ ovat kuten edellä on määritelty ja R₁₂ on -A-Br, jolloin A on kuten edellä on määritelty, annetaan reagoida natriumatsidin kanssa;

iv) kun X on -Si(CH₃)₃ tai O-alkyyli, kaavan VII mukaisen yhdisteen,



jossa Q₁ ja Q₂ ovat kuten edellä on määritelty ja R₁₃ on -A-O-alkyyli tai -A-Si(CH₃)₃, annetaan reagoida LiN[Si(-CH₃)₃]₂ kanssa, jonka jälkeen suoritetaan happohydrolyysi ja liittäminen suojattuun peptidiin, jolla on kaava VIII,



jossa W ja Y ovat kuten edellä on määritelty.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että W on H(CH₂CH₂O)_p-, R₆CO-, R₇OCO- tai R₈SO₂-, jossa

p= 3 - 30

R₆= C₁₋₆alkyyli

R₇= C₁₋₆alkyyli, fenyyli, bentsyyli tai naftyyli; ja

R₈= fenyyli, naftyyli tai C₁₋₄alkyylifenyyli.

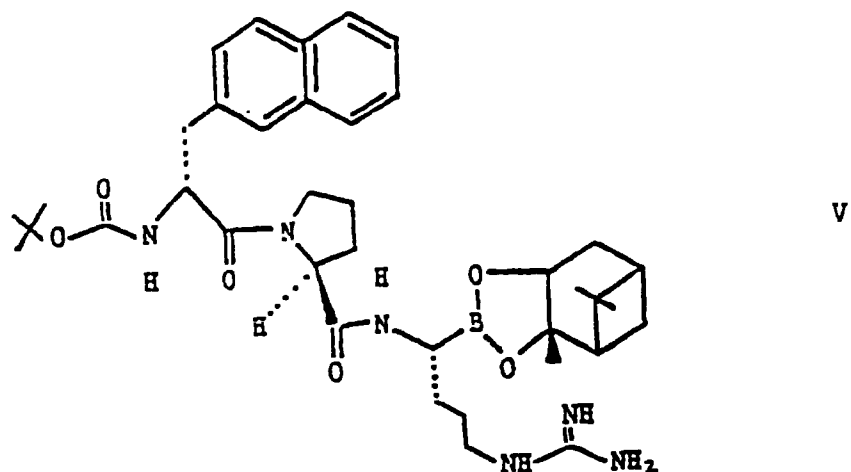
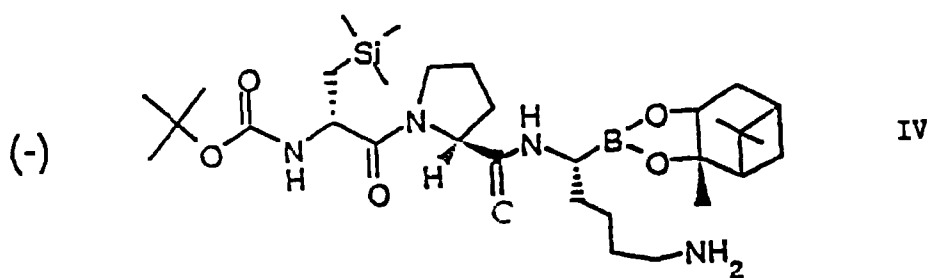
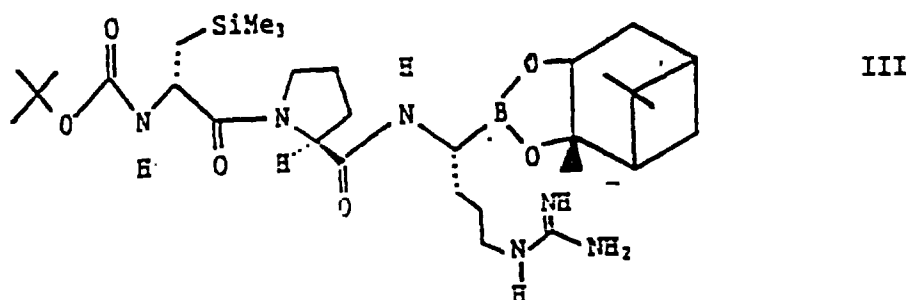
5

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä
kaavan III, IV tai V mukaisen yhdisteen valmistamiseksi

10

KAAVAT III, IV ja V

15



Hak.n:o 9/3788

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

285068 (1075 5108)
826327 - - -

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Käännä

Vänd

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EF

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

*Isotopochron, Vol. 44 (17) 5277-92,
1988*

J. Med. Chem. 28 (1985) 1917-25

14
Allekirjoitus