

(19)



(10) **LT 3614 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3614**

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

(21) Paraiškos numeris: **IP607**

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

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

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

(31,32,33) Prioritetas: **9211674, 1992 06 02, GB**
9211675, 1992 06 02, GB
9211676, 1992 06 02, GB

(72) Išradėjas:
Kjell Undheim, NO
Magne Solbakken, NO
Erik Agner, NO
Peter Kremminger, AT
Melnolf Lange, NO

(73) Patent savininkas:
HAFSLUND NYCOMED AS, Slemdalsveien 37, N-0301 Oslo 3, NO

(74) Patentinis patikėtinis:
Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001
Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Peptidiniai junginiai, jų gavimo būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Atskleisti dipeptidiniai junginiai, kuriuose dvi peptidinės grandinės yra prijungtos kartu prie negalinės aminorūgšties C α -atomo divalente jungiančia tilteliu grupe -A-. C α -atomai, prijungti prie grupės -A-, yra išdėstyti ekvivalentiškose vietose kiekvienoje minėtoje peptidinėje grandinėje ir kiekvienas neturi natyvos α -šoninės grandinės.

Atskleisti tilteliniai dipeptidiniai junginiai turi stimuliacinį poveikį ląstelės dalijimuisi, ypač mielopoezės ir kaulų čiulpų ląstelėms.

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

5

Žinduolių kūnas sudarytas iš ląstelių, itin stipriai besiskiriančių struktūra ir funkcijomis, todėl ląstelių diferenciacijos ir vystymosi mechanizmai buvo daugelio tyrinėjimų objektu. Žinoma, kad nuolat atsinaujinančių ląstelių sistemoje paprastai būna rezervuaras daugia-

10 vaisių (pliuripotentinių) kamieninių ląstelių, kurios dalijasi ir pastoviai tiekia sistemai naujas ląsteles. Nors patiektos iš "rezervuaro" kamieninės ląstelės pradžioje yra vienodos, tačiau netrukus jos patiria vie-

15 nokį ar kitokį morfologinį pakitimą ir vėliau išsivysto į ląsteles, atliekančias reikiamą funkciją.

20

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

25

Kamieninių ląstelių dalijimosi valdymas ar reguliavimas yra labai perspektyvi terapijos sritis, todėl daugelio tyrimų tikslas tebėra mechanizmų išaiškinimas ir specifinių cheminių mediatorių suradimas. Iki šiol buvo nustatytos kelios tikrai dalyvaujančios ląstelių gamyboje ir diferenciacijoje molekulės, kurios skatina arba slopina tam tikrą proceso grandį. Tuo požiūriu itin gerai ištirta mielopoezė, nustatytos joje daly-

30 vaujančios molekulės: kolonijas stimuliuojantys faktoriai (KSF), kaip antai, granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-KSF), makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (M-KSF), granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-KSF), įvairia-

35 kilmes kolonijas stimuliuojantis faktorius (multi-KSF; IL-3)

[žiūr. Metcalf, Science 229: 16 (1985)], interleukinas 11 (IL-11) [žiūr. Paul et al, Proc. Natl. Acad Sci., USA, 87: 7521 (1990)], Laktoferinas [žiūr. Broxmeyer et al, Blood Cells, 11: 429 (1989)], prostaglandinai
5 [žiūr. Pelus et al, J. Immunol. 140: 479 (1988)], rūgštinis (H-subvienetas) feritinas [žiūr. Broxmeyer et al, Blood 68: 1257 (1986)], interferonai (α , β ir γ) [žiūr. Pelus et al aukščiau, ir Broxmeyer et al, J. Immunol., 131: 1300 (1983)], auglio nekrozės faktoriai (α ir β)
10 [žiūr. Broxmeyer et al, J. Immunol. 136: 4487 (1986)], transformuojantis augimą faktorius - β [žiūr. Ottman et al, J. Immunol., 140: 2661 (1988)], ir aktyvinas bei inhibinas [žiūr. Broxmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 779 (1989)].

15

Taip pat buvo rasta, kad hemoreguliacinis pentapeptidas (pEEDCK) selektyviai inhibuoja mielopoezės ląstelių proliferaciją [žiūr. Paukovits et al, Z. Naturforsch 37: 1297 (1982)], ir buvo atskleisti kiti peptidai,
20 atitinkantys siaurą bendrą formulę, duodantys panašų inhibicinį poveikį hemopoezėje [žiūr. EP-A-112656 ir WO90/02753]. Peptido monomerų oksidacija davė dimerines molekules, sujungtas cisteino tilteliu, ir buvo rasta, kad tos dimerinės molekulės stimuliuoja mielopoezę
25 [žiūr. Laerum et. al, Exp. Hematol., 16: 274 (1988)]. (pEEDCK)₂ dimeras ir kiti panašūs junginiai yra atskleisti WO-A-88/03535. Kiti dimeriniai peptidų junginiai yra atskleisti EP-A-408371, kuriame disulfidinė jungtis buvo pakeista anglimi arba anglies/sieros tilteliu, jungiančiu parinktas peptidines grandines. Tiltelis tuo būdu yra santykinai atsparus hidrolizei, bet
30 pats yra inertinis ir negali dalyvauti receptoriaus - dimero sąveikose.

35

Nors mes nenorime būti surišti teorinių svarstymų, bet dabar manoma, kad tokie peptidiniai junginiai sąveikauja su stromos ląstelėmis in vivo ir kad stromos

ląstelės atsakingos už ląstelinio dalijimosi stimu-
liaciją arba inhibiciją per kitus išaiškinamus fakto-
rius. Tuo būdu manoma, kad dimerai indukuoja arba pa-
greitina stimuliuojančių ląstelinių reguliuojančių fak-
5 torių stromos gamybą, tuo tarpu kai monomeriniai pepti-
dai gali arba inhibuoti šį procesą, arba sukelti fakto-
rių, kurie užkerta kelią ar trukdo ląstelės daliji-
muisi, gamybą. Tuo būdu pagal tokią galvosena stromos
ląstelės gali sustiprinti dimerų ir monomerinių peptidų
10 atitinkamai stimuliacinį arba inhibicinį poveikį.

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

Šis išradimas pateikia peptidinį junginį, sudarytą iš
20 dviejų vienos grandinės hemoreguliacinių, ypač inhi-
buojančių hemopoezę, peptidų, prijungtų kartu prie ne-
galinių amino rūgščių C α atomų ekvivalentiškose vietose
kiekviename iš minėtų peptidų per jungtį anglis-anglis
25 arba per terminaliai prijungtą divalentę jungiančią
tiltelių grupę -A-, natyvios α -šoninės grandinės nėra
prie minėtų C α atomų, kur A yra C₁₋₆ anglies grandinė,
kuri yra

30 1) a) mono- arba poli-pakeista grupė -R^A, -OR^A, -SR^A,
-NRR^A arba -COOR^A arba halogeno atomu, tokiu kaip
fluoras, chloras, bromas arba jodas (kur kiekvienas R^A
nepriklausomai reiškia vandenilio atomą ar C₁₋₆ -alkilo,
-alkanoilo arba -alkoksialkilo grupę, kuri gali būti
35 mono- arba poli-hidroksilinta) ir/arba

b) į kurią įterpta viena ar daugiau dvigubų arba tri-
gubų jungčių anglis-anglis ir/arba

c) į kurią įterpta viena ar daugiau grupių -Z-, kur

5

kiekviena -Z- yra nepriklausomai -O-, -CO-, $\text{>C} = \text{NR}^B$

10 arba $-\text{NR}^B-$ (kur kiekvienas R^B yra nepriklausomai vande-
ilio atomas arba C_{1-6} alkilo arba C_{6-10} arilo grupė),
arba kur vienas ar daugiau pakaitalų ar neprisotintų
jungčių anglis-anglis yra grupėje -A-, -Z- gali taip
pat būti -S- arba

ii) $(\text{CH}_2)_y$, kur y yra 1, 5 arba 6.

15

Geriau, kai jungiančioje tilteliu grupėje -A- bendras
atomų skaičius yra ne didesnis už 6.

20

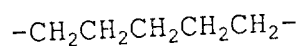
Kur grupė R^A reiškia alkilo, alkoksi arba alkanoilo
grupę, kiekviena iš jų gali būti linijinė arba šakota
grandinė. Tinkamos alkilo grupės apima metilą, etilą,
2-hidroksietilą, propilą, butilą, 1,3-dihidroksibutilą,
2-metil-3-hidroksibutilą ir pentilą. Metoksi, etoksi,
propoksi ir 2-hidroksipropoksi visos yra tinkamos al-
25 koksi grupės grupei R^A , tuo tarpu alkanoilo grupė,
pvz., gali būti formilas, acetilas, propionilas.

30

Grupei R^B , kaip alkilo grupei, alkilo anglies grandinė
gali būti linijinė arba šakota, ir grupės, paminėtos
aukščiau grupei R^A , čia yra tinkamos taip pat.

35

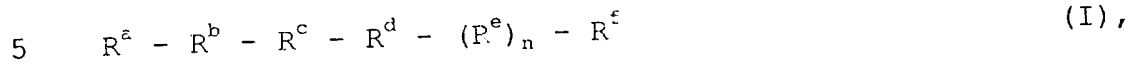
Tuo būdu tinkamos grupės A skeleto struktūros (kurios
gali būti toliau pakeistos, kaip išdėstyta aukščiau)
apima:



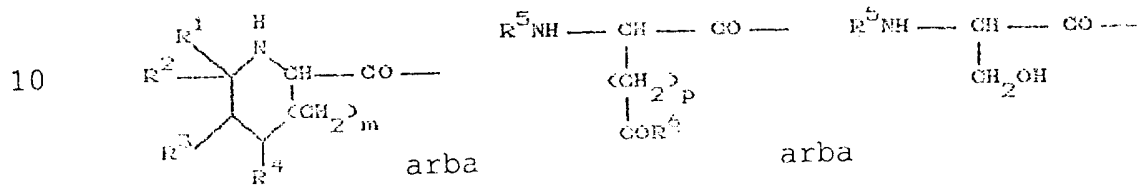
- CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
- HC=CH-
- HC=C=CH-
- CH₂-CH=CH-CH₂-
- 5 -CH₂-C≡C-CH₂-
- CH₂-CH=CH-CH=CH-CH₂-
- CH₂-CH₂-C≡C-CH₂-CH₂-
- CH₂-C≡C-C≡C-CH₂-
- 10
$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \\ | \qquad \qquad \qquad | \\ -\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}- \end{array}$$
- 15
$$\begin{array}{c} \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \\ | \qquad \qquad \qquad | \\ -\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}- \end{array}$$
- CH₂-O-CH₂-
- CH₂-NH-CH₂CH₂-
- CH₂CH₂-CO-CH₂CH₂
- 20
$$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}- \\ | \qquad \qquad \qquad | \\ \text{OCH}_3 \qquad \qquad \text{OCH}_3 \end{array}$$
- CH₂-CH=CH-CH₂-S-CH₂-
- 25 -CH₂-C≡C-CH₂-NH-CH₂CH₂- arba
- CH₂-CH=CH-CH(COOH)CH₂-

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

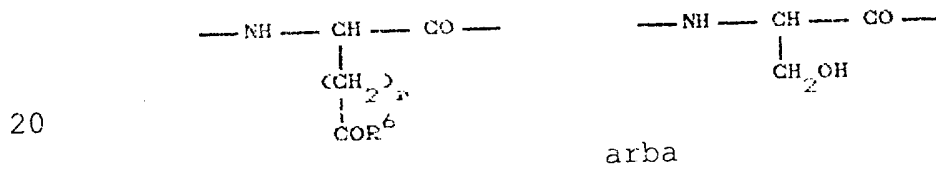
Alternatyviai išreikštas, šis išradimas pateikia junginius pagal šį išradimą, kuriuose minėtos hemoreguliacinės peptido grandinės apima šias formules:



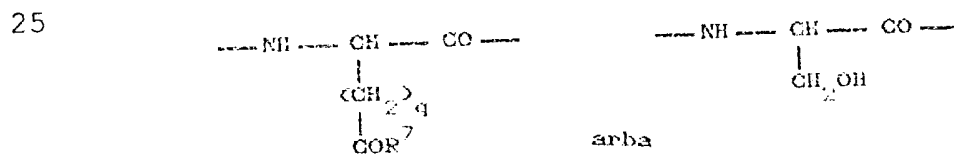
kurioje R^a reiškia



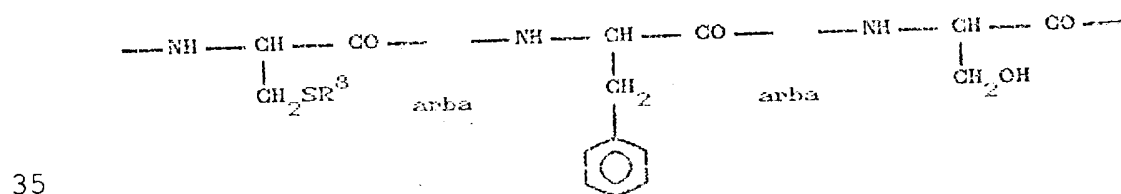
15 R^b reiškia



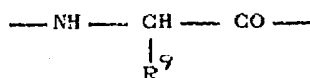
R^c reiškia



30 R^d reiškia



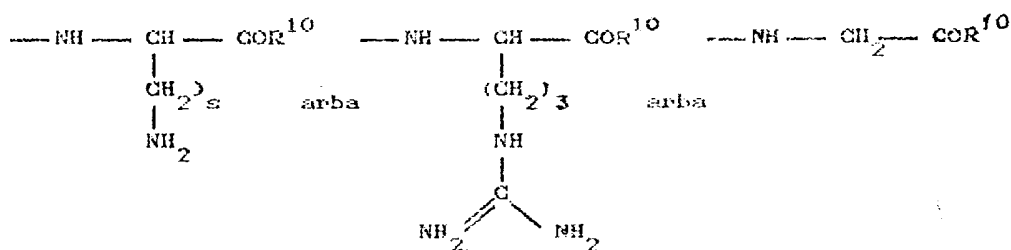
R^e reiškia



5

R^f reiškia

10



15

20 (kuriose

n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

p, q ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2;

s reiškia 3 arba 4;

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

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

30

R⁵ yra vandenilis arba acilo grupė;

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

35

grupės;

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

5

R^9 reiškia vandenilį arba metilo grupę; ir

R^{10} reiškia hidroksilo arba amino grupę, aminorūgšties glutamino liekaną arba peptidą, turintį N-galinį glutamino fragmentą).

10

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

15

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

20

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

25

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

30

Yra geriau, kai bendros (I) formulės peptido galinė amino grupė yra apsaugota, pvz., acilinant alkanoilo, aralkanoilo arba aroilo grupę.

35

Kur R^8 yra C_{2-6} alkilo grupė, tai gali būti, pvz., etilo, butilo arba heksilo grupė. Kai R^8 yra aralkilo grupė, tai gali patogiai būti arilmetilo grupė, tokia

5 kaip benzilas, difenilmetilas arba trifenilmetilas. Kur R^b yra metaboliškai labili grupė, tai gali, pvz., būti ariltio grupė, turinti nuo 5 iki 10 anglies atomų, pvz., piridiltio arba acilo grupė, kaip apibrėžta aukščiau.

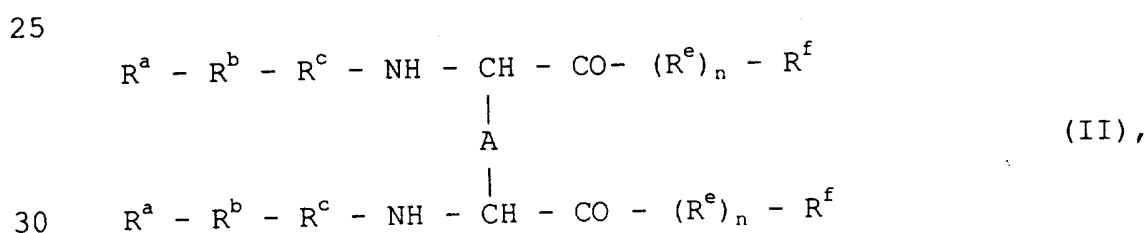
Tinkamesni šio išradimo junginiai yra pentapeptidai, t.y. n yra geriau 0.

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

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

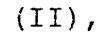
20 Dimeriniuose peptiduose, sudarytuose iš peptidinių grandinių, kaip pavaizduota (I) formulėje, jungiantis grandinės taškas yra pageidaujamas ties R^d .

Ypač tinkami peptidiniai junginiai pagal šį išradimą yra tie (II) formulės junginiai



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

5



15

20

25

30

35

tarpu kai regeneracija bus pagreitinata iš eilės einančiais aktyvumo pikais.

5 Apskritai, kad būtų pasiektas stimuliacinis poveikis, šio išradimo peptidai gali būti paskirti pacientui oraliai arba injekcijomis 0.001-100 mg, pvz., 1-5 mg 70 kg kūno svoriui, dienos doze. Jei paskyrimas intraveninis arba paodinis, dozė gali būti 1-10 mg ribose 70 kg kūno svoriui per dieną, pvz., apie 6 mg, iki 10 dienų.

10 Nazalinis, vietinis (transdermalinis) arba rektalinis paskyrimas taip pat yra, žinoma, lankstus. Iš esmės reikia pagaminti peptido koncentracijas apie $10^{-13}M$ - $10^{-5}M$ nelasteliniame paciento skystyje.

15 Pagal tolimesnius šio išradimo požymius, pateikiamos farmacinės kompozicijos, turinčios savyje kaip aktyvią komponentę vieną arba daugiau (I) formulės junginių, kaip čia apibūdinta anksčiau, arba fiziologiškai suderinamų jų druskų, kartu su farmaciniu nešikliu arba

20 užpildu. Kompozicijos pagal šį išradimą gali būti pateiktos, pvz., tokio pavidalo, kad tikėtų oraliniam, nazaliniam, parenteraliam arba rektaliniam paskyrimui.

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

25

Junginiai pagal šį išradimą gali būti įprastų vaistų formų, tokių kaip tabletės, apvilktos tabletės, aerozoliai nosiai, tirpalai, emulsijos, milteliai, kapsulės

30 arba ilgalaikio atpalaidavimo formos. Įprasti farmaciniai užpildai, kaip ir įprasti gamybos būdai, gali būti panaudoti šių formų paruošimui. Tabletės gali būti pagamintos, pvz., sumaišant aktyvią komponentę arba komponentes su žinomais užpildais, kaip, pvz., skiedikliais, tokiais kaip kalcio karbonatas, kalcio fosfatas arba laktozė, skaidytojais, tokiais kaip grūdų

35 krakmolai arba algininė rūgštis, rišikliais, tokiais

5 kaip krakmolai arba želatinos, tepalais, tokiais kaip magnio stearatas arba talko milteliai, ir/arba ilgalaikio atpalaidavimo agentais, tokiais kaip karboksipolimetilenas, karboksimetilceliuliozė, celiuliozės acetato ftalatas arba polivinilacetatas.

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

20 Organinės specifinės nešiklių sistemos taip pat gali būti panaudotos.

25 Injekcijų tirpalai gali būti, pvz., pagaminti įprastu būdu, tokiu kaip konservavimo agentų, tokių kaip p-hidroksibenzoatai, arba stabilizatorių, tokių kaip EDTA, pridėjimas. Tirpalais paskui užpildomi injekcijų buteliukai arba ampulės.

30 Neazaliniai aerosoliai gali būti sudaryti panašiai vandens tirpale ir supakuoti į purškimo konteinerius arba su aerosoliniu išstūmėju, arba su priemonėmis rankiniam spaudimui. Kapsulės, turinčios vieną arba kelias aktyvias komponentes, gali būti pagamintos, pvz., sumaišant aktyvias komponentes su inertiniais nešikliais,
35 tokiais kaip laktozė arba sorbitolis, ir užpildant mišinį į želatinos kapsules.

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

Tinkami dozavimo vienetai, turintys savyje šio išradimo junginius, turi 0.1-10 mg, pvz., 1-5 mg (I) formulės peptido arba jo druskos.

Taigi šis išradimas pateikia peptidinius junginius ir mišinius aprašytus aukščiau, skirtus naudoti ląstelės dalijimosi stimuliavimui. Peptidinių junginių pagal šį išradimą panaudojimas medikamentų, skirtų ląstelės dalijimosi stimuliavimui, gamyboje yra tolesnis šio išradimo aspektas. Mielopoezės ir kaulų čiulpu regeneracija turi ypatingą reikšmę.

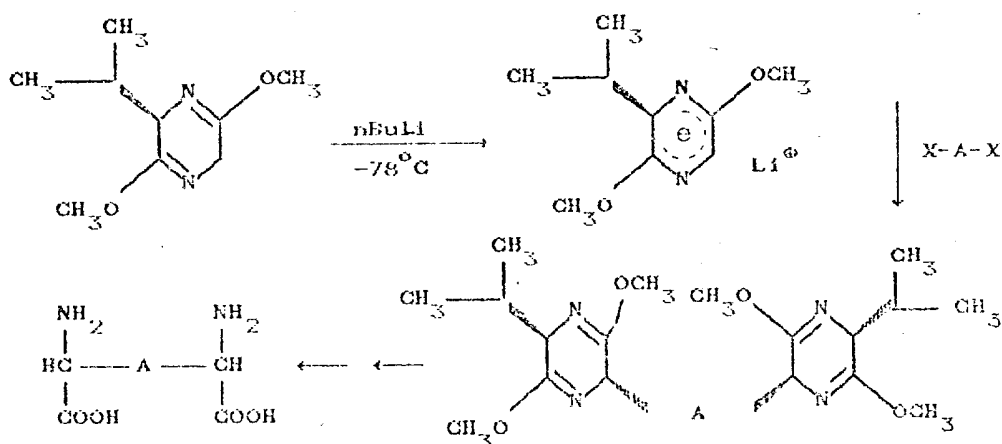
Tačiau kitas svarbesnis naujų peptidų panaudojimas yra medžiagų, skirtų imunologinių tyrimų technikos gamyboje. Tada peptidas gali būti kovalentiškai prijungtas prie tinkamo didelio molekulinio nešiklio, tokio kaip albuminas, polilizinas arba poliprolinas tam, kad būtų įvestas antikūnus gaminantiems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

Šio išradimo peptidai gali būti sintezuoti bet kuriuo patogiu būdu. Tinkami metodai aminorūgšties vienetų sudarymui yra aprašyti, pvz., "Synthesis of Optically

Active α -Amino Acids" ("Optiškai aktyvių α -Amino rūgščių sintezė"), Robert M. Williams (Pergamon Press, 1989). Apskritai, esančios reaktyvios šoninių grandinių grupės (amino, tiolo ir/arba karboksilo) bus apsaugotos per visos sintezės prijungimo reakcijas, bet galima palikti kai kurias šoninių grandinių grupes neapsaugotas (hidroksilo grupes, imidazolo grupes, pirmines amido grupes, amido grupes ciklinėse aminorūgštyse kaip piroGlu) per visą sintetinę procedūrą.

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

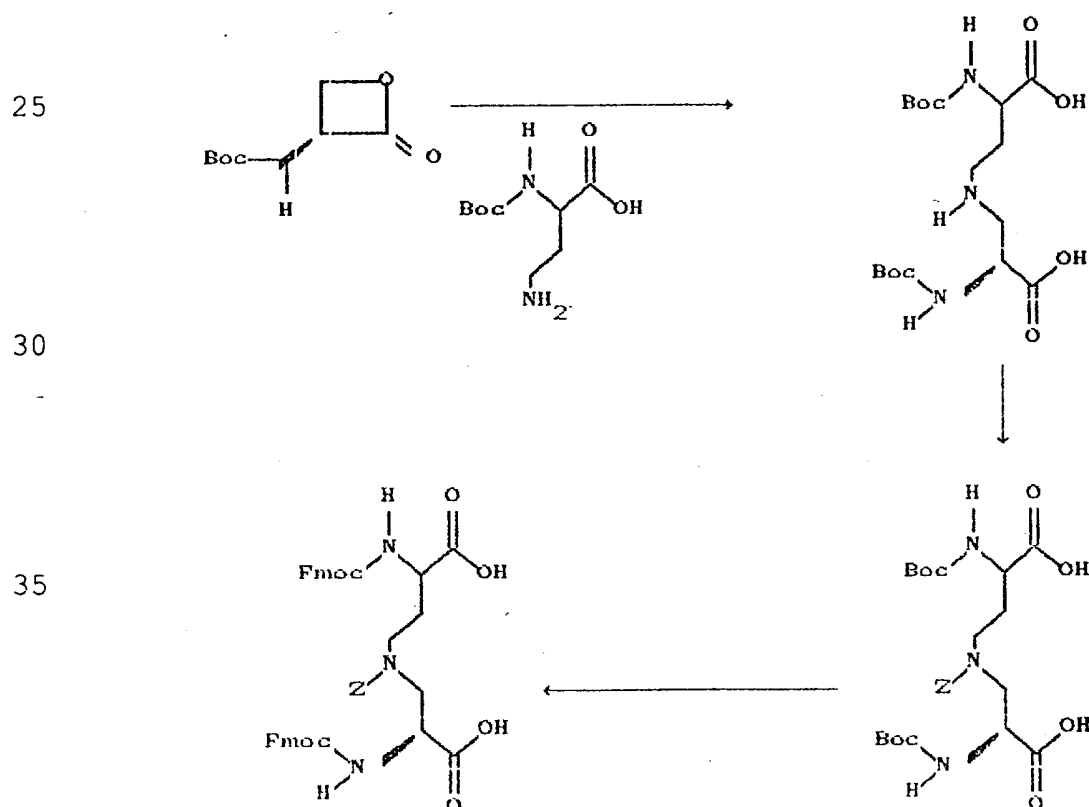
Schöllkopf ir kt. aprašė įvairių aminorūgščių gavimą bis-laktimo eterių metalinimu ir po to alkiliniu (žiūr., pvz., Tetrahedron 39: 2085 (1983) ir Topics Curr. CHEM., 109: 65 (1983)). Šio metodo pritaikymas pasirodė ypač naudingas tiltelinių amino rūgščių, kurios sudaro šio išradimo pagrindą, gavimui.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



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

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

10 Alternatyvi metodika, naudinga tiltelinių α,α' -diamino rūgščių, kurios sudaro šio išradimo tiltelinių dipeptidinių junginių pagrindą, gamybai yra metodo, išvystyto Vederas ir kt., pritaikymas (J. Am. Chem. Soc. 107: 7105 (1985) ir J. Am. Chem. Soc. 110: 2237
15 (1988)). Ši alternatyvi metodika paremta β -laktonų, išvestų iš serino, žiedo atidarymo reakcijomis. β -laktonai gali būti paveikti visa eile "švelnių" nukleofilų, kurie sukelia laktoninės alkilo-deguonies jungties skilimą. Aza-pakeistos tiltelinės amino-
20 rūgštys, apimančios oksa- ir tia-analogus, gali būti susintetintos pagal metodiką, kuri iliustruota tokia schema:



Tilteliniams dipeptidiniams junginiams pagal šį išradimą, kur -A- yra $-CH_2-$, galima nuoroda į Belokon et al., Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim, (1987), 852 (Chemical Abstracts 108: 132255v).

5

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

10

Kitu aspektu, šis išradimas pateikia peptidinio junginio gavimo būdą, kuris apima:

15

a) bis-laktimo eterio metalinimą ir nuoseklų alkilinimą, kad būtų sudarytas bis-laktimo dipeptidinis eteris;

b) bis-laktimo eterio iš žingsnio a) hidrolizę, kad būtų gauta tiltelinė α, α' -diamino rūgštis;

20

c) pasiliekančių amino rūgščių įvedimą į peptidines grandines; ir

d) bet kurios apsauginės grupės deblokavimą.

25

Bis-laktimo dipeptidiniai eteriai ir tiltelinė rūgštis - α, α' -diaminorūgštis, pagaminta pagal šį metodą, sudaro tolesnį šio išradimo aspektą.

30

Kai tilteliniai dipeptidai yra sudaryti, pasiliekančios aminorūgštys peptidinėje grandinėje gali būti įvestos įprastais metodais.

35

Sudarant peptidines grandines, galima pradėti arba nuo C-galo, arba nuo N-galo, nors tik nuo C-galo prasidedanti procedūra yra visuotinai naudojama.

Tuo būdu, galima pradėti nuo tinkamai apsaugoto C-galo, pvz., lizino, darinio reakcija su tinkamai apsaugotu cisteino dariniu. Lizino darinys turės laisvą α -amino grupę, tuo tarpu kitas reagentas turės arba laisvą, arba aktyvuotą karboksilo grupę ir apsaugotą amino grupę. Po prijungimo, tarpiniai produktai gali būti išgryninti, pvz., chromatografija, ir tada selektyviai N-apsaugoti, kad galima būtų pridėti laisvą arba aktyvuotą aminorūgšties liekaną. Ši procedūra yra tęsiama, kol sudaroma reikalinga amino rūgščių seka.

Karboksilinę rūgštį aktyvuojantys pakaitalai, kurie gali, pvz., būti naudojami, apima simetrinius arba mišrius anhidridus arba aktyvuotus esterius, tokius kaip, pvz., p-nitrofenilo esteris, 2,4,5-trichlorofenil-esteris, N-hidroksibenzotriazolo esteris (OBt), N-hidroksisukcinimidilesteris (OSu) arba pentafluoro-fenilesteris (OPFP).

Laisvų amino ir karboksilo grupių prijungimas gali, pvz., būti atliktas, panaudojant dicikloheksilkarbodiimidą (DCC). Kitas prijungimo agentas, kuris gali, pvz., būti naudojamas, yra N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrochinolinas (EEDQ).

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

Gali būti patogiau vykdyti sintezę ant kietos fazės dervos nešiklio. Chlorometilintas polistirenas (susiūtas su 1 % divinilo benzenų) yra vienas naudingas nešiklio tipas; tuo atveju sintezė prasidės nuo C-galo, pvz., prijungiant N-apsaugotą liziną prie nešiklio.

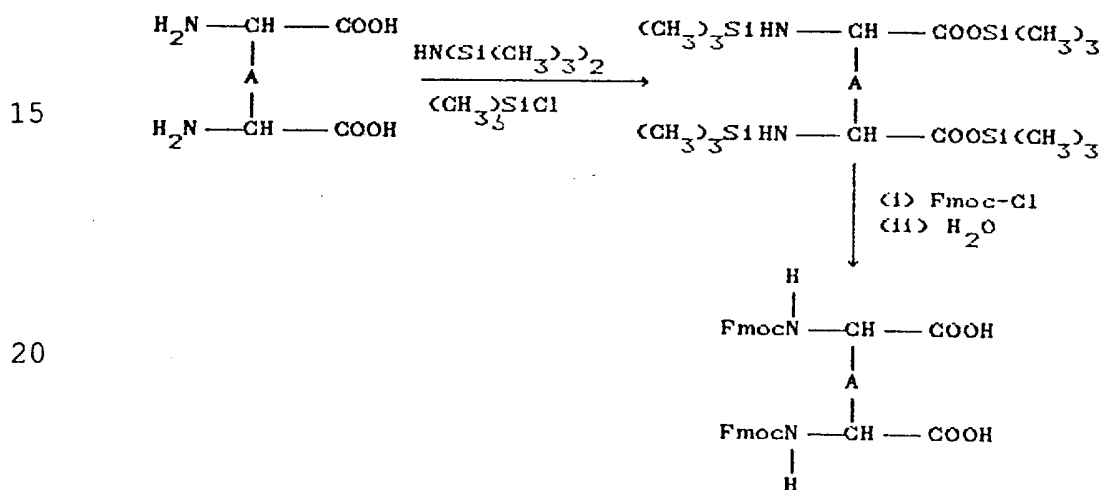
- Eilė tinkamų kietos fazės metodu yra aprašyta Eric Atherton, Christopher J. Logan, and Robert C. Sheppard, J. Chem. Soc. Perkin I, 538-46 (1981); James P. Tam, Foe S. Tjoeng, and R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 102, 6117-27 (1980); James P. Tam, Richard D. Dimarchi and R.B. Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res 16, 412-25 (1980); Manfred Mutter and Dieter Bellof, Helvetica Chimica Acta, 67, 2009-16 (1984).
- 10 Prijungimo reakcijos taip pat gali būti atliktos tirpale.
- Yra žinomas platus apsauginių grupių amino rūgštims pasirinkimas ir pateikta pavyzdžių Schroder, E. and Lubke, K., The Peptides, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York and London, 1965 and 1966; Pettit, G. R., Synthetic Peptides, Vols. 1-4, Van Nostrand, Reinhold, New York 1970 1971, 1975 and 1976; Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Synthese von Peptiden, Band 15, Georg Thieme Verlag Stuttgart, NY, 1983; The Peptides, Analysis, synthesis, biology 1-7, Ed: Erhard Gross, Johannes Meienhofer, Academic Press, NY, San Fransisco, London; Solid phase peptide synthesis 2nd ed., John M. Stewart, Janis D. Young, Pierce Chemical
- 25 Company.
- Tuo būdu, pvz., amino apsauginės grupės, kurios gali būti panaudotos, apima apsaugines grupes, tokias kaip karbobenzoksi (Z-), t-butoksikarbonilas (Boc-), 4-metoksi-2,3,6-trimetilbenzolo sulfonilas (Mtr-) ir 9-fluorenilmetoksikarbonilas (Fmoc-).
- 30
- Bus suprantama, kad kai peptidas sudarytas nuo C-galo, amino apsauginė grupė bus kiekvienos naujos pridedamos liekanos α -amino grupėje ir ją reikės pašalinti selektyviai prieš kitą jungimo stadiją. Kietos fazės sistemoms viena ypač naudinga grupė tokiai laikinai
- 35

amino apsaugai yra Fmoc grupė, kuri gali būti pašalinta selektyviai, paveikiant piperidinu organiniame tirpiklyje. Sintzei tirpale Boc- yra tinkamesnė apsauginė grupė, kuri gali būti įvesta ir pašalinta įprastu būdu.

5

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

10



20

25

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

30

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

35

Bus suprantama, kad egzistuoja daug kitų tokių grupių, kaip, pvz., detalčiai aprašyta aukščiau nurodytoje li-

teratūroje, ir visų tokių grupių panaudojimas čia anksčiau aprašytuose procesuose įeina į šio išradimo sritį.

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

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

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

Toliau einantys pavyzdžiai pateikiami tik kaip iliustracijos.

1 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksidikarbonilamino)-(E)-
30 okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgštis

a) 1,4-Bis((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil)-(E)-but-2-enas

35 Į maišomą (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksiizopropilpirazino (5.53 g, 30 mmol) tirpalą THF (100 ml), esant -78°C , su švirkštu pridėta 1.55 M butylličio (19.62 ml,

31 mmol) tirpalo heksane, ir maišymas buvo tęsiamas 1 valandą, esant -78°C . Tada pridėta (E)-1,4-dibromobut-2-eno (3.21 g; 15 mmol) tirpalo THF (20 ml), ir maišymas buvo tęsiamas per naktį. Tirpiklis pašalintas sumažintame slėgyje, o likutis buvo ištirpintas dietilo eteriye bei ekstrahuotas vandeniu. Organinis sluoksnis išdžiovintas magnio sulfatu, eteris išgarintas ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (etilo acetatas/heksanas 1/4; silikagelis).

10

Išeiga 4.73 g (75 %), blyškiai geltonas skystis.

^1H BMR (CDCl_3): δ

15 0.67 (d, 6H), 1.04 (d, 6H), 2.1-2.4 (m, 2H), 2.48 (dd, 4H), 3.67 (s, 6H), 3.68 (s, 6H), 3.93 (dd, 2H), 4.03 (dd, 2H), 5.35 (dd, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

20

16.52, 19.07, 31.65, 37.09, 52.16, 52.23, 55.62, 60.60, 127.50

$\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$ (420)

25

Pask. %: C: 62.86; H: 8.57 N: 13.33

Rasta %: C: 62.65; H: 8.62 N: 12.91

30 **b) (S,S)-2,7-Diamino-(E)-okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgšties dimetilo esteris**

I 1,4-bis((2R,5S)-2,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil)-(E)-but-2-eno (4.02 g, 9.9 mmol) ir 0.5 N HCl (40 ml, 20 mmol) mišinį pridėta 40 ml dioksano, ir tirpalas maišomas kambario temperatūroje 4 valandas. Jis ekstrahuotas dietilo eteriu, i vandeningą tirpalą buvo pridėta vandeninio amonio, kol buvo

5 pasiektas pH 9. Tada vandens fazė ekstrahuota chloroformu ir organinis sluoksnis išdžiovintas magnio sulfatu. Pašalinus tirpiklį, perdistiliuota 30-40°C (0.04 mbar), atskiriant valino metilo esterį. Nedis-
distiliuotas pavadinimo junginys buvo naudojamas be tolesnio gryninimo.

Išeiga 1.92 g (84.3 %), geltonas aliejus.

10 ^1H BMR (CDCl_3): δ

1.70 (s, 4H), 2.20-2.60 (m, 4H), 3.51 (dd, 2H), 3.69 (s, 6H), 5.46 (dd, 2H).

15 ^{13}C BMR (CDCl_3): δ

37.99, 52.00, 54.11, 128.84, 175.32

20 **c) (S,S)-2,7-Diamino-(E)-okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgšties dihidrochloridas**

25 (S,S)-2,7-Diamino-(E)-okt-4-eno-1,8-karboksirūgšties dimetilo esteris (1.65 g, 7.17 mmol) virinamas su grįžtamu šaldytuvu su 6 N HCl (10 ml, 60 mmol), dvi valandas. Tada tirpiklis išgarintas, likutis ištirpintas vandenyje (10 ml), ir pridėta etanolio (100 ml). Balti kristalai nufiltruoti ir išdžiovinti vakuume, esant 40°C.

30 Išeiga 1.32 g (67 %); balti kristalai.

^1H BMR (D_2O): δ

2.53 (dd, 4H), 3.93 (dd, 2H), 5.49 (dd, 2H).

35

^{13}C BMR (D_2O): δ

33.57, 53.07, 128.49, 171.49

$C_8H_{16}N_2O_4Cl_2$ (275)

- 5 Pask. %: C: 34.91; H: 5.81; N: 10.18;
Cl: 25.78
Rasta %: C: 36.58; H: 5.80; N: 9.70;
Cl: 26.01

- 10 FAB-MS signalas prie m/z

405.3(11), 203.2(100), 157.1(19), 130.1(7), 93.0(18),
73.9(13).

- 15 d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-E)-
okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgštis

- Rūgšties hidrokloridas - (S,S)-2,7-diamino-E-okt-4-
eno-1,8-dikarboksirūgšties dihidrokloridas (1.59 g,
20 5.8 mmol) suspenduotas heksametildisilazane (20 ml), ir
buvo pridėta 1 ml trimetilsililo chlorido. Tada su-
spensija virinama su grįžtamu šaldytuvu per naktį.
Tirpiklis pašalintas sumažintame slėgyje ir likutis
ištirpintas bevandeniame metileno chloride. Šis tir-
25 palas atšaldytas iki 0°C, ir pridėtas 9-fluorenilmetilo
chloroformiato (3.10 g, 12 mmol) tirpalas metileno
chloride. Prieš pašalinant šaldymo vonią, tirpalas buvo
maišomas 1 valandą. Kitą rytą tirpiklis išgarintas ir
likutis ištirpintas THF. Tada mišinys užgesintas 1 N
30 vandeniniu HCl, ir tirpalas buvo maišomas 2 valandas.
Organinis tirpiklis pašalintas ir vandens fazė eks-
trahuota chloroformu. Organinis sluoksnis išdžiovintas
magnio sulfatu ir išgarintas. Likutis ištirpintas
metileno chloride ir nusodintas eteriu.

35

Išeiga 2.50 g (67 %); balti kristalai.

¹H BMR (DMSO): δ

2.2-2.4 (s, 4H), 3.6 (s, 2H), 3.9-4.5 (m, 8H), 5.55 (s, 2H), 7.2-8.1 (m, 16H).

¹³C BMR (DMSO): δ

33.98, 46.56, 53.93, 65.49, 119.66, 124.81, 126.61, 127.17, 127.98, 140.19, 143.28, 155.43, 172.59

C₃₈H₃₄N₂O₈ (646)

Pask. %: C: 70.59; H: 5.26; N: 4.33

Rasta %: C: 70.17; H: 5.58; N: 4.08

FAB-MS signalas prie m/z

661.3(3), 647.4(3), 191.2(17), 179.2(100), 165.1(18), 78.9(31).

2 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-(Z)-
okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgštis

a) 1,4-Bis((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil)-(Z)-but-2-enas

(2R)-(-)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas
(1.3 ml, 6.4 mmol) ištirpintas sausame THF (20 ml) ir atšaldytas iki -78°C. Lašinant pridėta BuLi (1.6 M heksane, 3.9 ml, 6.4 mmol), ir tirpalas maišomas 30 minučių. Cis-1,4-dichlor-2-butenas (0.32 ml, 3 mmol) ištirpintas sausame THF (10 ml) ir sudėtas visas iš karto, esant -78°C. Reakcijos mišinys maišomas per naktį N₂ atmosferoje. Reakcija užgesinta amonio chloridu (3 ml), mišinys išgarintas. Likutis ekstrahuotas

dietilo eteriu, ir organinė fazė dukart išplauta vandeniu. Tada išdžiovinta MgSO_4 ir išgarinta. Gryninimas atliekamas silikageliu (heptanas: EtOAc/2:1).

5 Išeiga: 0.81 g (60 %), gelsvas aliejus.

PSG (plonasluoksnė chromatografija) (heptanas: EtOAc/2/1):
Rf= 0.39

10 HPLC (aukšto slėgio skystinė chromatografija) (50-100 % MeOH, 10 minučių): Rt = 6.75 minučių.

^1H BMR (CDCl_3): δ

15 0.66 (d, 6H), 1.02 (d, 6H), 2.55 (m, 2H), 2.66 (m, 4H),
3.66 (s, 6H), 3.70 (s, 6H), 3.90 (t, 2H), 4.01 (m, 2H),
5.39 (t, 2H)

20 **b) (S,S)-2,7-Diamino-(Z)-okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgšties dimetilesteris**

1,4-Bis((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil)-(Z)-but-2-enas (0.58 g, 1.23 mmol) iš-
tirpintas dioksane (8 ml), ir pridėta 0.25 M HCl (8 ml,
25 2.5 mmol) bei maišoma per naktį kambario temperatūroje.
PSG (plonasluoksnė chromatografija) (MeCN:MeOH:H₂O/4:1:1).
Tirpalas ekstrahuotas dietilo eteriu, ir vandens fazė
išgarinta. Likutis ištirpintas mažame kiekyje vandens,
vandeninis amoniako tirpalas dedamas, kol buvo pa-
siekta pH 9. Vandens fazė dukart ekstrahuota dietilo
30 eteriu, ir organinė fazė išdžiovinta MgSO_4 bei iš-
garinta.

Išeiga: 0,6 g, geltonas aliejus

c) (S,S)-2,7-Diamino-(Z)-okt-4-eno-1,8-karboksirūgšties dihidrochloridas

5 I (S,S)-2,7-Diamino-(Z)-okt-4-eno-1,8-karboksirūgšties dimetilo esterio mišinį (0.6 g, 1.3 mmol) pridėta konc. HCl (1 ml) ir dioksano (10 ml), ir tirpalas buvo deflegmuojamas 2 valandas, tada išgarintas.

10 Išėiga 0.6 g, balta kieta medžiaga.

^1H BMR (D_2O): δ

0.88 (2d, 6H), 2.15 (m, 1H), 2.57 (2d, 4H), 3.68 (m, 1H), 3.86 (m, 2H), 5.51 (m, 2H).

15 **d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-(Z)-okt-4-eno-1,8-dikarboksirūgštis**

20 Rūgšties hidrochloridas, gautas c) stadijoje (0.6 g, 2 mmol), suspenduotas heksametildisilazane (HMDS) (12 ml) ir trimetilsililo chloride. (TMS-Cl) suspensija deflegmuojama per naktį, azoto atmosferoje. HMDS ir TMS-Cl perteklius nudistiliuotas vakuume. Likutis buvo ištirpintas sausame metilchloride ir atšaldytas iki
25 0°C. Buvo pridėtas fluorenilmetilo chloroformiato (712 mg, 2.8 mmol) tirpalas sausame metilchloride, mišinys maišomas 2 valandas, tada išgarintas. Likutis ištirpintas THF, užgesintas 1 M HCl, ir maišomas 2 valandas. Organinis tirpiklis pašalintas, ir vandens fazė ekstrahuota chloroformu. Organinis sluoksnis išdžiovintas MgSO_4 ir išgarintas. Gryninimas atliktas silicio dioksidu (heptanas: EtOAc:AcOH/3:6:1).

35 HPLC (40-70 % MeCN 0.1 % TFA, 10 minučių): $R_t = 4.75$ min.

^1H BMR (CDCl_3): δ

2.4-2.7 (s, 4H), 3.7 (s, 2H), 4.0-4.5 (m, 8H), 5.5 (s, 2H), 7.1-7.8 (m, 16H).

3 PAVYZDYS

5

(S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-okt-4-ino-1,8-dikarboksirūgštis

10

a) 1,4-Bis((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil)-but-2-inas

15

(2R)-(-)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (2.76 g, 15 mmol) ištirpintas 100-e ml sauso THF ir atšaldytas iki -78°C , tada lašinant ir maišant pridėta 9.5 ml 1.6 M BuLi (15 mmol) tirpalo. Po valandos lėtai įvesta 0.92 g (7.5 mmol) 1,4-dichlor-2,3-butino. Reakcijos mišinio PSC (plonasluoksnė chromatografija) ir DC (dujinė chromatografija) po valandos parodė esminius nesureagavusio 2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino ir monoalkilinto produkto kiekius. Reakcijai buvo leista tęstis per naktį ir palaipsniui pasiekti kambario temperatūrą. THF išgarintas, esant sumažintam slėgiui, ir likutis padalintas tarp eterio ir vandens. Vandens fazė dukart ekstrahuota eteriu, išdžiovinta (MgSO₄) ir išgarinta. Reakcijos mišinio Kugelrohr'o distiliacija davė 2.3 g (77 %) gryno produkto.

20

25

¹H BMR (CDCl₃):δ

30

4.03 (m, 4H, žiedas H's), 3.68 (m, 12H, 4 x OCH₃), 2.63 (pl.AB q, 4H, 2 x CH₂), 2.27 (m, 2H, 2 x CH(CH₃)₂); 1.05 (d, J=6.8Hz, 6H, 2 x CH₃), 0.64 (d, J=6.8Hz, 6H, 2 x CH₃).

35

¹³C BMR (CDCl₃):δ

163.9, 161.0, 77.4, 60.6, (60.68), 54.6 (54.2), 52.3, 52.2, 31.6 (31.20), 25.5 (25.6), 19.3 (19.5), 16.7 (6.9).

5 MS (Cl) 419 (M^+ , 55), 403 (4), 391 (7), 279 (15), 236 (17), 183 (44), 167 (34), 149 (100), 141 (41), 113 (44).

10 **b) (S,S)-2,7-Diamino-okt-4-in-1,8-karboksirūgšties dimetilesteris**

I a) stadijos produktą pridėta 20 ml 1.0 M HCl ir 60 ml MeOH, kad būtų gauta 0.25 M HCl $H_2O/MeOH$. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje per naktį, ir, nustačius, kad nebeliko pradinės medžiagos, visas tirpiklis pašalintas. Likutis ištirpintas vandenyje, ekstrahuotas eteriu, ir vandens fazė neutralizuota iki pH 8 konc. NH_4OH . Tirpalas išplautas eteriu ir ekstrahuotas kelis kartus EtOAc, kol visas produktas perėjo į EtOAc fazę. Tada išdžiovinta, tirpiklis pašalintas ir valino metilo esteris atskirtas iš tirpalo Kulgelrohr'o distiliacija, kad duotų 0.97 g (78 %) metilo esterio pavadinimo junginio.

25 1H BMR (D_2O): δ

4.0 (m, 2H, HC- α), 3.6 (d, 6H, 2 x OCH_3), 2.6 (m, 4H, 2 x CH_2).

30 ^{13}C BMR (D_2O): δ

171, 81.6, 61.6, 56.6, 20.5

35 **c) (S,S)-2,7-Diamino-okt-4-ino-1,8-dikarboksirūgštis**

Pakankamai MeOH, kad ištirptų b) stadijos produktas, ir 20 ml 6 M HCl sumaišyta ir maišoma kambario tem-

peratūroje per naktį. PSC, panaudojant 1:1:1:1/nBuOH:EtOAc:MeOH:H₂O mišinį ir ninhidrino pulverizatorių, parodė metilo esterio buvimą. Reakcijos mišinys deflegmuojamas 60°C temperatūroje 24 valandas, kol buvo suhidrolizuotas visas metilo esteris. Tirpalas buvo išgarintas iki sausumo, likutis išdžiovintas aukštu vakuumu ir panaudotas be tolesnio gryninimo.

¹³C BMR (D₂O): δ

172.3, 81.1, 55.0, 24.3

**d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-
okt-4-ino-1,8-dikarboksirūgštis**

50 ml HMDS ir 1 ml TMSCl pridėta į produktą iš aukščiau, ir mišinys buvo deflegmuojamas, esant 120°C azoto atmosferoje, kol buvo gautas skaidrus tirpalas maždaug po 24 valandų. HMDS perteklius nudistiliuotas, o gautas produktas ištirpintas 50-tyje ml sauso CH₂Cl₂ ir atšaldytas iki 0°C. Maišant, palaipsniui pridėti 3 g FMOC-Cl, ištirpinto 20-tyje ml sauso CH₂Cl₂, ir reakcija vyko per naktį. Tirpiklis pašalintas sumažintame slėgyje, o produktas padalintas tarp prisotinto vandeninio NaHCO₃ tirpalo ir eterio, kad būtų pašalintas nesureagavęs FMOC-Cl ir kiti FMOC skilimo produktai. Vandeninis tirpalas buvo atšaldytas iki 0°C bei parūgštintas 2 M HCl iki pH 3, produktas ekstrahuotas 5 kartus EtOAc, tada perplautas, išdžiovintas ir išgarintas. Chromatografija, panaudojant CHCl₃: MeOH/96:4, davė 2.35 g (66 %) pavadinimo junginio. Nors PSC parodė, kad jis grynas, atvirkštinės fazės HPLC parodė priemaišų buvimą, kas beveik sutapo su pagrindinio produkto piku. Produktas, ištirpintas 40 % MeCN su 0.1 % TFA išgrynintas preparatyvine HPLC, panaudojant Beckman'o ODC C-18 kolonėlę bei 0.1 % TFA H₂O, ir 0.1 % TFA MeCN buvo kaip eliuentas.

¹H BMR (DMSO):δ

7.9 (d, $\underline{J}$ 7.3 Hz, 4H, arom. H), 7.7 (d, $\underline{J}$ =7 Hz, 4H, arom. H), 7.3 (d tripletas, $\underline{J}$ 7.2 Hz, 8H, arom. H),
5 4.26 (m, 8H, OCH₂, 2 x CH), 2.5 (m, 4H, CH₂).

¹³C BMR (DMSO):δ

170.4, 154.5, 142.5, 139.4, 126.5, 125.9, 124.2, 119.0,
10 77.6, 65.5, 53.0, 46.5, 21.7.

4 PAVYZDYS

(S,S)-2,4-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-(E)-
15 pentano-1,5-dikarboksirūgštis

a) 1,1-Di((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopro-
pil-5-pirazinil)-(E)-metanas

20 Į maišomą (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-izopropilpi-
razino (5.53 g, 30 mmol) tirpalą THF (100 ml), esant
-78°C, per švirkštą pridedamas 1.55 M butilličio (19.62 ml,
31 mmol) tirpalas heksane, ir maišymas tęsiama 1 va-
landa, esant -78°C. Tada pridedamas (E)-bromochlo-
25 rometano (15 mmol) tirpalas THF (20 ml), ir maišymas
tęsiama per naktį. Tirpiklis pašalinamas sumažintame
slėgyje ir likutis ištirpinamas dietilo eteriye bei
ekstrahuojamas vandeniu. Organinis sluoksnis išdžio-
vinamas magnio sulfatu, eteris išgarinamas, o likutis
30 gryninamas impulsine chromatografija (etilo aceta-
tas/heksanas 1/4; silikagelis).

b) (S,S)-2,4-Diamino-(E)-pentan-1,5-dikarboksirūgšties
esteris

35

Į 1,1-di((2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-
5-pirazinil)-(E)-metano (4.02 g, 9.9 mmol) ir 0.5 N HCl

(40 ml, 20 mmol) mišinį pridedama 40 ml dioksano, ir tirpalas maišomas kambario temperatūroje 4 valandas. Po to ekstrahuojama dietilo eteriu, vandeninis amoniakas pilamas į vandeninį tirpalą, kol pasiekiamas pH 9. Tada vandeninė fazė ekstrahuojama chloroformu ir organinis sluoksnis išdžiovinamas magnio sulfatu. Pašalinus tirpiklį, valino metilo esteris pašalinamas distiliacija iš kolbos į kolbą, esant 30-40°C (0.04 mbar). Nedistiliuotas pavadinimo junginys yra naudojamas be tolesnio gryninimo.

c) (S,S)-2,4-Diamino(E)-pentan-1,5-dikarboksirūgšties dihidrochloridas

(S,S)-2,4-Diamino-(E)-pentano-1,5-dikarboksirūgšties dimetilo esteris (1.65 g, 7.17 mmol) virinamas su grižtamu šaldytuvu su 6 N HCl (10 ml, 60 mmol) 2 valandas. Tada tirpiklis išgarinamas, likutis ištirpinamas vandenyje (10 ml) ir pridedama 100 ml etanolio. Balti kristalai nufiltruojami ir išdžiovinami vakuume, esant 40°C.

d) (S,S)-2,4-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-(E)-pentan-1,5-dikarboksirūgštis

Rūgšties hidrochloridas - (S,S)-2,4-Diamino-(E)-pentano-1,5-dikarboksirūgšties dihidrochloridas (1.59 g, 5.8 mmol) yra suspenduojamas heksametilidisilazane (20 ml) ir pridedamas 1 ml trimetilsililo chlorido. Tada suspensija deflegmuojama per naktį. Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, o likutis ištirpinamas be vandeniame metileno chloride. Šis tirpalas atšaldomas iki 0°C, ir pridedamas 9-fluorenilmetilchloroformiato (3.10 g, 12 mmol) tirpalas metileno chloride. Tirpalas maišomas 1 valandą, prieš pašalinant šaldymo vonią. Kitą rytą tirpiklis išgarinamas ir likutis ištirpinamas THF. Tada mišinys paveikiamas 1 N vandenine HCl ir tirpalas mai-

šomas 2 valandas. Organinis tirpiklis pašalinamas ir vandens fazė ekstrahuojama chloroformu. Organinis sluoksnis išdžiovinamas magnio sulfatu ir išgarinamas. Likutis ištirpinamas metileno chloride ir nusodinamas eteriu.

5 PAVYZDYS

(S,S)-2,9-Diamindekandikarboksirūgštis

a) 1,6-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]heksanas

(R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (4.12 g, 22.4 mmol) ištirpintas bevandeniame THF, ir tirpalas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėtas BuLi tirpalas heksane (22.42 mmol, 14.0 ml). Po 30 minučių, esant -78°C , 1,6-dibromoheksano (11.2 mmol, 2.73 g) tirpalas THF sulašintas, ir tirpalas įgijo kambario temperatūrą per naktį. Po hidrolizės su fosfato buferiu (pH=7) mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu, ir organinis sluoksnis plautas vandeniu ir sūrymu. Po išdžiovinimo (MgSO_4) tirpiklis išgarintas, o likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1).

Išeiga: 2.57 g (51 %).

^1H BMR (CDCl_3): δ

0.67 (d, 6H), 1.04 (d, 6H), 1.10-1.30 (m, 8H), 1.60-1.85 (m, 4H), 2.15-2.35 (m, 2H), 3.66 (s, 6H), 3.67 (s, 6H), 3.91 (dd, 2H), 3.95-4.05 (m, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

16.54, 19.08, 24.44, 29.46, 31.63, 34.15, 52.27,
52.28, 55.47, 60.68, 163.41, 163.96.

5 FAB-MS signalai prie m/z 451.2(80), 407.2(33),
141.0(100). $C_{24}H_{42}N_4O_4$ (450).

**b) (S,S)-2,9-Diamindekandikarboksirūgšties dimetilo di-
esteris**

10 1,6-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-
5-pirazinil]-heksano tirpalas 40-tyje ml dioksano ir
22.8 mmol HCl (1.90 ml) 36-iuose ml vandens buvo
maišoma kambario temperatūroje 6 valandas, tirpiklis
pašalintas ir tirpalas ekstrahuotas dietilo eteriu.
15 Vandeninis amoniako tirpalas pridedamas, kol pasiektas
pH 9, ir tada tirpalas ekstrahuotas chloroformu. Or-
ganinis sluoksnis išdžiovintas ($MgSO_4$). Valino metilo
esteris nudistiliuotas vakuume (0.03 torų, kambario
temperatūra).

20

Išeiga: 1.48 g (100 %).

1H BMR ($CDCl_3$): δ

25 1.20-1.70 (m, 16H), 3.36 (dd, 2H), 3.65 (s, 6H).

^{13}C BMR ($CDCl_3$): δ

25.40, 29.06, 34.77, 51.76, 54.30, 176.51.

30

c) (S,S)-2,9-Diaminodekandikarboksirūgštis·2HCl

Dimetilo diesteris iš b) stadijos (1.40 g, 5.38 mmol)
ištirpintas 6 N HCl (40 ml, 240 mmol) ir maišomas, N_2
35 atmosferoje, 60°C temperatūroje 12 valandų. Tirpiklis
išgarintas, likutis ištirpintas EtOH ir kristalizuotas,
pridedant dietilo eterio. Kristalai nufiltruoti.

Išeiga: 0.700 g, balti kristalai (42.7 %).

^1H BMR (D_2O): δ

5 1.07-1.37 (m, 8H), 1.60-1.90 (m, 4H), 3.85 (m, 2H).

^{13}C BMR (D_2O): δ

23.81, 27.65, 29.61, 53.09, 172.55.

10

FAB-MS signalai prie m/z 439.3(15), 340.3(100), 233.2(11).

$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{O}_4$ (450): Pask., %: N, 9.18.

15

Rasta, %: N, 9.13.

**d) (S,S)-2,9-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-de-
kandikarboksirūgštis**

20 (S,S)-2,6-Diaminodekandikarboksirūgšties dihidrochlori-
das (0.50 g, 1.64 mmol) suspenduotas HMDS bei TMSCl ir
deflegmuojamas azoto atmosferoje per naktį. Tirpikliai
pašalinti, likutis ištirpintas bevandeniame CH_2Cl_2 .
Tirpalas atšaldytas iki 0°C , ir pridėta FmocCl (1.69 g,
25 6.56 mmol) tirpalo CH_2Cl_2 . Tirpalas maišomas per naktį,
tirpalas pašalintas ir likutis ištirpintas THF.
Pridėjus 5 ml 0.5 M HCl, mišinys maišomas 2 valandas,
ekstrahuotas chloroformu ir išdžiovintas (MgSO_4). Liku-
tis išgrynintas impulsine chromatografija (hepta-
30 nas/etilo acetatas/acto rūgštis 4/6/1).

Išeiga: 0.580 g (52.5 %).

^1H BMR (DMSO): δ

35

1.00-1.44 (m, 8H), 1.44-1.80 (m, 4H), 3.90 (s, 2H),
4.13-4.43 (m, 4H), 7.25-8.05 (m, 16H);

^{13}C BMR (DMSO): δ

21.29, 25.63, 28.62, 31.08, 46.86, 54.17, 65.70,
120.25, 125.44, 127.20, 127.77, 140.86, 143.96, 144.04,
5 156.21, 174.28

FAB-MS signalai prie m/z 699.5(6), 677.4(2), 603.6(4),
409.3(4), 339.3(4), 179.1(55), 72.9(100).

10 **6 PAVYZDYS**

(S,S)-2,8-Diaminononandikarboksirūgštis

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

I (R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino
(3.68 g, 20 mmol) tirpalą THF (68 ml) lašinant (10 mi-
nučių) pridėta 1.6 M n-BuLi tirpalo heksane (12.8 ml,
20 20.4 mmol), ir maišymas buvo tęsiamas, esant -78°C ,
1 valandą. Tada sulašintas 1,5-dibromopentano (2.3 g,
10 mmol) tirpalas THF (13.2 ml), ir mišiniui buvo
leista išigyti kambario temperatūrą per naktį. Reakcija
užgesinta, pridedant 50 ml NaHCO_3 , ir mišinys pa-
dalintas tarp eterio (50 ml) ir vandens (20 ml). Po at-
skyrimo, vandens sluoksnis dukart ekstrahuotas eteriu
(50 ml), ir sujungti organiniai sluoksniai išdžiovinti
(MgSO_4), nufiltruoti, sukonzentruota ir išgryninta im-
pulsine chromatografija (silikagelis, heksanas: etilo
30 acetatas = 12:1).

Išėiga: 3.68 g (8.43 mmol, 84.3 %).

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

35

4.02 (kv. 2H, J. 2.1 Hz), 3.92 (t, 2H, J 3.3 Hz), 3.68
(s, 12H), 2.28 (d sept, 2H, J 3.3, 6.8 Hz), 1.71 (m,

4H), 1.21 (m, 6H), 1.05 (d, 6H, J 6.8), 0.68 (d, 6H, J 6.8);

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

5

163.89, 163.31, 60.62, 55.40, 52.22, 52.19, 34.02, 34.56, 29.31, 24.33, 19.01, 16.48.

FAB-MS m/z 437 (M+1).

10

$\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4$ (436.59): Pask., %: C, 63.28; H, 9.23; N, 12.83.

Rasta %: C, 62.95; H, 9.01; N, 129.91.

15 **b) (S,S)-2,8-Diaminononandikarboksirūgšties dimetilo diesteris**

1,5-Bis[(1S,4R)-3,6-4-izopropil-2,5-dihidropirazinil]-pentanas (2.8 g, 6.4 mmol) ištirpintas dioksane (51.2 ml) bei 0.5 M HCl (51.2 ml) ir maišomas 4 valandas kambario temperatūroje. Šis mišinys plautas dietilo eteriu (100 ml), pH padarytas 9, pridedant 25 % amoniako vandenyje, ir greitai ekstrahuotas CHCl_3 (3 x 75 ml). Organinis sluoksnis buvo išdžiovintas MgSO_4 , nufiltruotas ir sukonzentruotas. Metilo valinatas buvo pašalintas Kulgelrohr'o distiliacija (25-50°C, 0.01 torų), ir gauta 1.505 g (0.11 mmol, 95.5 %) išeiga.

20

25

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

30

3.71 (s, 6H), 3.43 (t, 2H, J 6.0 Hz), 1.70 (m, 2H), 1.57-1.34 (m, 8H).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

35

176.40, 54.33, 51.86, 34.79, 29.08, 25.42.

c) (S,S)-2,8-Diaminononandikarboksirūgštis

Esteris iš b) stadijos buvo maišomas deflegmuojant 6 M HCl (7.2 ml) 2 valandas azoto atmosferoje. Lakūs junginiai išgarinti. Likutis ištirpintas vandenyje (5 ml), pridėta etanolio (20 ml), ir lėtas eterio idėjimas davė baltas, kristalines nuosėdas. Šis mišinys laikomas 12 valandų šaldytuve, nufiltruotas, plautas eteriu ir išdžiovintas vakuume.

Išeiga 1.37 g (4.71 mmol, 77.4 %).

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

3.74 (m, 2H), 1.80–1.63 (m, 4H), 1.38–1.15 (m, 6H).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

173.35, 53.62, 29.71, 27.65, 23.65.

FAB-MS m/z 437 ($\text{M}^+ - 72$).

$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{Cl}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ (291.17): Pask., %: C, 37.13; H, 6.92.

Rasta %: C, 37.90; H, 7.21.

d) (S,S)-2,8-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-nonandikarboksirūgštis

(S,S)-2,8-Diaminononano dirūgštis (291 mg, 1 mmol) TMSCl (260 mg; 2.4 mmol) ir HMDS (3.5 ml) deflegmuojama azoto atmosferoje per naktį. Atšaldžius iki kambario temperatūros, lakios dalys pašalintos (iki 50°C , 0.01 torr), likutis ištirpintas CH_2Cl_2 (6.6 ml), atšaldytas iki 0°C , ir lašinant pridėta FmocCl (905 mg, 3.5 mmol) CH_2Cl_2 (6.6 ml). Mišiniui leista įgyti kambario temperatūrą per naktį. Tirpiklis išgarintas, likutis ištirpintas THF (7.5 ml), ir pridėta 1 M HCl (7.5 ml).

Šis mišinys maišomas 4 valandas kambario temperatūroje. Tada pridėta chloroformo (50 ml) ir sūrymo (40 ml), ir fazės atskirtos. Vandens sluoksnis ekstrahuotas 2 x CHCl_3 (50 ml). Sujungti organiniai sluoksniai išdžio-
vinti (MgSO_4), sukonzentruoti ir išgryninti impulsine chromatografija (silikagelis, heksanas: etilo acetatas: acto rūgštis = 50 : 50 : 5). Produkta turinčios frakcijos buvo sukonzentruotos ir liofilizuotos, gauta 615 mg (0.928 mmol, 92.8 %) išeiga.

^1H BMR (300 MHz, d_6 -DMSO): δ

7.86 (d, 4H, J 7.2 Hz), 7.70 (d, 4H, J 7.5 Hz), 7.41-7.27 (m, 8H), 4.24 (m, 6H), 3.86 (kv, 2H, J 4.5 Hz), 1.62 (m, 4H), 1.24 (m, 6H).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

174.40, 172.39, 156.30, 144.31, 144.22, 141.10, 129.31, 127.99, 127.68, 127.44, 125.67, 121.77, 120.46, 65.91, 54.66, 47.12, 31.40, 28.68, 25.57, 21.53.

FAB-MS m/z 663 ($\text{M}^+ + 1$);

$\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$ (662.73). Pask., %: C, 70.68; H, 5.78; N, 4.23.

Rasta, %: C, 71.20; H, 5.62; N, 4.07.

7 PAVYZDYS

2,3-Diaminogintaro rūgštis

a) 2,3-Bis(benzilamino)gintaro rūgštis

I mechaniskai maišomą mezo-2,3-dibromogintaro rūgšties (27.6 g, 0.1 mol) tirpalą alkoholyje (200 ml) lėtai pridėta benzilamino (85 g, 0.8 mol) kambario temperatūroje. Sudėjus viską, mišinys deflegmuojamas per nak-

ti. Pasirodė sunkios druskų nuosėdos. Mišinys atšaldytas iki 50°C, ir pridėta koncentruotos hidrochloro rūgšties, kol pH pasiekė 4-5. Nuosėdos nufiltruotos, kelis kartus vandeniu bei alkoholiu ir išdžiovintos.

5

Išeiga 24.5 g (75 %).

^1H BMR (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$): δ

10 3.08 (2H, s), 3.30 (2H, d, J 13 Hz), 3.55 (2H, d, J 13 Hz), 7.2 (10H, m).

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

15 50.9, 64.7, 127.1, 128.5 (br), 139.2, 179.0.

b) Mezo-2,3-diaminogintaro rūgštis

20 Mezo-2,3-bis(benzilamino)gintaro rūgštis (9.5 g, 0.029 mol) ištirpinta ledinės acto rūgšties (50 ml) ir koncentruotos hidrochloro rūgšties (50 ml) mišinyje. Hidro
atliekama kambario temperatūroje 10 % paladžiu/medžio
anglies (1.0 g) kaip katalizatoriumi. Reakcija vyko,
kol BMR parodė, kad daugiau nėra nesureagavusios pra-
25 dinės medžiagos. Buvo pridėta vandens (100 ml), ir
katalizatorius pašalintas filtruojant. Filtratas sukonzentruotas (rotaciniu garintuvu), o likutis ištirpintas
atskiestame vandeniniame natrio hidrokside. pH sure-
guluojamas iki apytikriai 5, įdedant ledinės acto rūgš-
30 ties. Kristalai nufiltruoti ir perplauti.

Išeiga 3.8 g (88 %), balta kieta medžiaga.

^1H BMR (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$): δ

35

3.21 (s).

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

60.3, 180.0.

5 $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ Pask. %: C, 32.44; H, 5.44; N, 18.91.
Rasta %: C, 31.51; H, 5.41; N, 18.32.

c) Mezo-2,3-bis(trimetilsililamino)gintaro rūgštis
di(trimetilsilil)esteris

10 Reakcija buvo atliekama azoto atmosferoje. Mezo-2,3-diaminogintaro rūgštis (296 mg, 2.00 mmol) suspensija
heksametildisilazane (10 ml) ir trimetilchlorsilane (1 ml)
maišoma, esant 100°C per naktį, davė skaidrų tirpalą.
15 Sililinančių reagentų perteklius nudistiliuotas sumažintame slėgyje. Kietas baltas likutis tiesiai panaudotas acilinimo reakcijose.

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

20 0.03 (18H, s), 0.28 (18H, s), 3.5 (2H, m).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

25 -0.3, 0.03, 60.9, 174.1.

d) Mezo-2,3-bis[(9-fluorenilmetoksikarbonil)amino]gintaro rūgštis

30 Reakcija atliekama azoto atmosferoje. Sililinta diaminogintaro rūgštis, gauta c) stadijoje, ištirpinta sausame
dichlormetane (10 ml) ir atšaldyta iki 0°C . Buvo pridėtas 9-fluorenilmetilo chloroformiato (1.14 g, 4.4 mmol)
tirpalas sausame dichlormetane (4 ml). Reakcijos mišinys maišomas per naktį ir po to sukonzentruotas.
35 Likutis ištirpintas THF (10 ml), ir buvo pridėta vandens (apytikriai 1 ml). Mišinys maišomas 10 minučių

ir tada sukoncentruotas. Produktas ekstrahuotas etilo acetatu, tirpalas plautas vandeniu, išdžiovintas (MgSO_4) ir nufiltruotas. Buvo pridėta heksano, ir nuosėdos nufiltruotos bei plautos heksanu. Galiausiai produktas gryninamas kolonėlės chromatografija (silicio dioksidas, heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 1:3:1).

Išeiga 0.85 g (72 %), balti kristalai.

¹H BMR (300 MHz DMSO- d_6): δ

4.1-4.3 (6H, m), 4.5 (2H, d), 7.2-7.4 (12H, m), 7.6-7.7 (4H, m), 7.8-7.9 (4H, m).

¹³C BMR (75 MHz DMSO- d_6): δ

47.0, 56.1, 66.5, 120.5, 125.9, 127.5, 128.0, 141.0, 144.1, 156.4, 171.1.

FAB-MS signalai prie m/z 637.2(3), 631.1(5), 615.2(21), 593.2, 435.1(9), 326.3(15), 179.1(100).

e) Raceminis-2,3-bis[(9-fluorenilmetoksikarbonil)amino]gintaro rūgšties anhidridas

25

Mezo-2,3-bis[(9-fluorenilmetoksikarbonil)-amino]gintaro rūgšties (150 mg, 0.25 mmol) suspensija acto rūgšties anhidride maišoma, esant 120°C, kol ištirpo visa medžiaga (1-2 minutes). Anhidrido perteklius atskirtas vakuumu. Žalias produktas buvo panaudotas peptido sintezėje be tolesnio gryninimo.

30

¹H BMR (300 MHz DMSO- d_6): δ

4.25 (2H, t), 4.39 (4H, d), 4.80 (2H, d), 7.2-7.4 (8H, m), 7.66 (4H, d), 7.88 (4H, d), 8.30 (2H, d).

35

^{13}C BMR (75 MHz DMSO- d_6): δ

46.8, 55.6, 66.9, 120.6, 125.5, 127.5, 128.1, 141.1,
143.9, 156.4, 168.2.

5

8 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Diamino-E-okt-4-endikarboksirūgštis

10 a) 1,4-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-E-but-2-enas

(2R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas
(5.53 g, 30 mmol) ištirpintas bevandeniam THF ir tirpalas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėtas BuLi tirpalas
15 heksane (19.62 ml, 31.0 mmol). Po 60 minučių -78°C temperatūroje lašinant buvo pridėtas E-1,4-dibromobut-2-eno (3.21 g, 15 mmol) tirpalas 30-tyje ml THF, ir tirpalas per naktį įgijo kambario temperatūrą. Po hidrolizės su fosfato buferiu (pH 7) mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu, organinis sluoksnis plautas vandeniu ir sūrymu. Po išdžiovinimo (MgSO_4), tirpiklis išgarintas ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 4/1).
20

25

Išeiga 4.73 (75 %).

^1H BMR (CDCl_3): δ

30 0.67 (d, 6H), 1.04 (d, 6H), 2.1-2.4 (m, 2H), 2.48 (dd, 4H), 3.67 (s, 6H), 3.68 (s, 6H), 3.93 (dd, 2H), 4.03 (dd, 2H), 5.35 (dd, 2H).

^{13}C - (CDCl_3): δ

35

16.52, 19.07, 31.61, 37.09, 52.16, 52.23, 55.62, 60.60,
128.50

$C_{33}H_{36}N_4O_4$ (420): Pask., %: C, 62.86; H, 8.57.

Rasta %: C, 62.65; H, 8.62.

5 **b) (S,S)-2,7-diamino-E-okt-4-enodikarboksirūgšties di-**
metilo diesteris

1,4-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-
5-pirazinil]-E-but-2-eno (4.02 g, 9.9 mmol) tirpalas
40-tyje ml dioksano ir 20.0 mmol HCl (1.67 ml) 38-iuose ml
10 vandens maišomas kambario temperatūroje 4 valandas, po
to tirpalas ekstrahuotas dietilo eteriu. Buvo pridėta
vandeninio amoniako tirpalo, kol buvo pasiektas pH 9,
ir tirpalas ekstrahuotas chloroformu. Organinis sluoks-
nis išdžiovintas ($MgSO_4$). Valino metilo esteris nudis-
15 tiliuotas vakuume (0.04 torų, kambario temperatūra).

Išėiga: 192 g (84.3 %).

20 1H BMR ($CDCl_3$): δ

1.70 (s, 4H), 2.2-2.6 (m, 4H), 3.51 (dd, 2H), 3.69 (s,
6H), 5.46 (dd, 2H).

25 ^{13}C - ($CDCl_3$): δ

37.99, 52.00, 54.11, 128.84, 175.32.

c) (S,S)-2,7-Diamino-E-okt-4-enodikarboksirūgštis • 2 HCl

30 Dimetilo diesteris iš b) stadijos (1.65 g, 7.17 mmol)
ištirpintas 6N HCl (10 ml, 60 mmol) ir deflegmuojamas
azoto atmosferoje 2 valandas. Tirpiklis išgarintas,
likutis ištirpintas 10-tyje ml vandens ir krista-
lizuojamas, pridedant EtOH (100 ml). Kristalai nufilt-
35 ruoti.

Išėiga 132 g = 67 %.

^1H BMR (D_2O): δ

2.53 (dd, 4H), 3.97 (dd, 2H), 5.52 (dd, 2H).

5 ^{13}C - (D_2O): δ

33.57, 53.07, 128.85, 171.49.

10 FAB-MS signalai prie m/z 405.3(11), 203.2(100),
157.(19), 130.1(7), 93.0(18), 73.9(13).

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}_2$ (275):

Pask. %: C, 34.91; H, 5.81; N, 10.18; Cl, 25.78.

15 Rasta %: C, 36.58; H, 5.80; N, 9.70; Cl, 26.01.

d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-E-okt-4-enodikarboksirūgštis

20 (S,S)-2,7-Diamino-E-oct-4-enodikarboksirūgšties dihidrochloridas (1.59 g, 5.8 mmol) suspenduotas HMDS (20 ml) bei TMSCl ir deflegmuojamas per naktį. Tirpikliai pašalinti, likutis ištirpintas bevandeniame dichlormetane. Šis tirpalas atšaldytas iki 0°C , ir pridėtas FmocCl

25 (3.10 g, 12 mmol) tirpalas dichlormetane. Tirpalas buvo maišomas 1 valandą, esant šiai temperatūrai, ir per naktį, esant kambario temperatūrai. Tirpiklis išgarintas, likutis ištirpintas THF. Pridėjus 1 N vandeninio HCl , tirpalas maišomas dvi valandas, ekstrahuotas chloroformu ir išdžiovintas (MgSO_4). Likutis ištirpintas dichlormetane ir kristalizuotas, pridėjus dietileterio.

30

Išeiga: 2.50 g (66.8 %).

35

^1H - (DMSO): δ

2.2-2.4 (s, 4H), 3.6 (s, 2H), 3.9-4.5 (m, 8H), 5.55 (s, 2H), 7.2-8.1 (m, 16H).

^{13}C - (DMSO): δ

5

33.98, 46.56, 53.93, 65.49, 119.66, 124.81, 126.61, 127.17, 127.98, 140.19, 143.28, 155.43, 172.59

$\text{C}_{38}\text{N}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$ (646):

10

Pask. %: C, 70.59; N, 5.26; N, 4.33.

Rasta %: C, 70.17; N, 5.58; N, 4.08.

FAB-MS signalas prie m/z 661.3(3), 647.4(3), 191.2(17), 179.2(100), 165.1(18), 78.9(31).

15

9 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-enodikarboksirūgštis

20

a) 1,4-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-Z-but-2-enas

25

(2R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (7.3 g, 39.2 mmol) ištirpintas bevandeniam THF, ir tirpalas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėtas BuLi tirpalas heksane (24.5 ml, 39.2 mmol). Po 15 minučių, esant -78°C temperatūrai, pridėta 16.9 ml 1,3-dimetil-2-imidazolindikarboksi rūgšties (156 mmol), o po 5 minučių lašinant pridėtas Z-1,4-dichlorobut-2-eno (2.45 g, 19.6 mmol) tirpalas 10-tyje ml THF, ir tirpalas maišomas 6 valandas bei laikomas -20°C , per naktį. Po hidrolizės su fosfato buferiu (pH=7), mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu, o organinis sluoksnius plautas vandeniu bei sūrymu. Po išdžiovinimo (MgSO_4), tirpiklis išgarintas, o likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1). Išeiga: 710 mg (10.2 %).

30

35

^1H BMR (CDCl_3): δ

0.67 (d, 6H), 1.03 (d, 6H), 2.25 (m, 2H), 2.55 (m, 4H),
3.66 (s, 6H), 3.68 (s, 6H), 3.91 (dd, 2H), 4.07 (m,
5 2H), 5.38 (dd, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

16.50, 19.01, 31.57, 32.01, 52.22, 52.31, 55.46, 60.67,
10 127.30, 163.19, 163.66.

**b) (S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-endikarboksirūgšties dime-
tilo diesteris**

15 1,4-bis[(1S,4R)-3,6-dimetoksi-4-izopropil-2,5-dihidro-
5-pirazinil]-Z-but-2-eno (0.23 g, 0.55 mmol) tirpalas
30-tyje ml dioksano ir 2.2 mmol HCl (0.183 ml) 10-tyje ml
vandens maišoma kambario temperatūroje 12 valandų.
Tirpalas ekstrahuotas dietileteriu. Buvo pridėta van-
20 deninio amoniako tirpalo, kol pasiektas pH 9, ir tir-
palas ekstrahuotas chloroformu. Organinis sluoksnis
išdžiovintas (MgSO_4). Valino metilo esteris nudis-
tiliuotas (0.02 torų, kambario temperatūra).

25 Išeiga: 0.127 g (85 %).

^1H BMR (CDCl_3): δ

1.54 (s, 4H), 2.3-2.6 (m, 4H), 3.52 (dd, 2H), 3.71 (s,
30 6H), 5.54 (m, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

32.55, 52.02, 54.17, 127.94, 175.67.

c) (S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-endikarboksirūgštis • HCl

I dimetilo diesterio iš b) stadijos (0.108 g, 0.47 mmol) tirpalą 0.7 ml metanolio pridėtas 2N LiOH tirpalas vandenyje (1.41 mmol, 0.71 ml). Mišinys maišomas kambario temperatūroje per naktį, tada parūgštintas, lašinant pridėjus 1 N HCl. Kristalai nufiltruoti.

Išeiga 50 mg (38.7 %).

10

^1H BMR (D_2O): δ

2.58 (m, 4H), 3.99 (m, 2H), 5.51 (m, 2H).

15

^{13}C BMR (D_2O): δ

27.59, 52.20, 126.84, 171.10.

20

d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-Z-okt-4-endikarboksirūgštis

(S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-endikarboksirūgštis (0.050 g, 0.25 mmol) ir Na_2CO_3 (0.21 g, 20.0 mmol) ištirpinta 3-juose ml vandens ir 2-juose ml dioksano. Tirpalas atšaldytas iki 0°C , ir pridėtas FmocCl (0.26 g, 1.0 mmol) tirpalas 1-ame ml dioksano. Šis mišinys maišomas 0°C 3 valandas, ir įgijo kambario temperatūrą per naktį. Po ekstrahavimo dietilo eteriu, jis parūgštintas, pridėjus hidrochloro rūgšties. Tirpalas ekstrahuotas chloroformu, o aminorūgštis kristalizuota iš chloroformo/heksano. Junginys toliau gryninamas impulsine chromatografija (chloroformas/acto rūgštis 9/1).

25

30

Išeiga: 90.0 mg (55.9 %).

35

^1H BMR (DMSO): δ

2.12-2.64 (m, 4H), 3.88 (s, 2H), 4.04-4.37 (m, 6H),
5.42 (s, 2H), 7.02 (s, 2H), 7.20-8.00 (m, 16H).

^{13}C BMR (DMSO): δ

5

29.77, 46.88, 55.53, 65.66, 120.23, 125.43, 127.23,
127.74, 129.08, 140.84, 144.11, 155.59, 174.10.

10

FAB-MS signalai prie m/z 676.2(2), 587.5(5), 447.4(10),
419.3(45), 391.3(100), 363.3(38), 261.2(45), 233.2(29).

10 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Diamino-okt-4-indikarboksirūgštis

15

a) 1,4-Bis-((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-di-
hidro-5-pirazinil)but-2-inas

20

I (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino
(4.605 g, 25 mmol) ir 1,3-dimetil-2-imidazolidinono
(11.4 g, 102 mmol) tirpalą THF (48 ml) lašinant pridėta
1.6 M n-BuLi (16 ml, 25.5 mmol). Po 1 valandos lašinant
pridėtas 1,4-dichlor-2-butino (1.54 g, 12.5 mmol) tir-
palas THF. Mišiniui leista įgyti kambario temperatūrą
per naktį, ir jis užgesintas 1 M fosfato buferiu (pH 7).
Mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu (150 ml) bei van-
deniu (40 ml), ir sluoksniai atskirti. Vandens sluoks-
nis dukart ekstrahuotas eteriu (2 x 150 ml), ir su-
jungti organiniai sluoksniai išdžiovinti (MgSO_4), nu-
filtruoti, sukonzentruoti ir išgryninti impulsine chro-
matografija (silikagelis, heksanai: eteris = 7:1).

30

Išeiga 3.325 g (7.94 mmol, 63.6 %).

35

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

4.05-3.99 (m, 4H), 3.68 (s, 6H), 3.67 (s, 6H), 2.70 (dd, 2H, J -14.1, 3.0 Hz), 2.57 (dd, 2H, J -14.1, 3.0 Hz), 2.26 (d sept, 2H, J 6.9, 3.0 Hz), 1.05 (d, 6H, J 6.9 Hz), 0.64 (d, 6H, J 6.9 Hz).

5

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

164.56, 161.53, 77.52, 60.51, 54.46, 52.34, 52.22, 31.43, 25.26, 19.07, 16.40.

10

FAB-MS m/z 419 ($\text{M}^+ + 1$).

$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$ (418.53):

15 Pask. %: C, 63.14; H, 8.19; N, 13.39.

Rasta %: C, 63.27; H, 8.12; N, 13.54.

b) (S,S)-2,7-Diamino-okt-4-indikarboksirūgšties dimetilo diesteris

20 1,4-Bis-((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil)but-2-inas (920 mg, 2.2 mmol) ištirpintas dioksane (18 ml) bei 0.5 M HCl (18 ml) ir maišomas kambario temperatūroje 12 valandų. Šis mišinys plautas dietilo eteriu (30 ml), pridėjus 25 % amoniako vandenyje, vandens sluoksnio pH padarytas 9, ir greitai ekstrahuotas CHCl_3 (3 x 75 ml). Organinis sluoksnis išdžiovintas MgSO_4 , nufiltruotas ir sukonzentruotas. Metilo valinatas pašalintas Kugelrohr'o distiliacija (25-50°C, 0.01 torų).

30

Išeiga 486 mg (2.13 mmol, 96.8 %) geltonas aliejus.

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ

35 3.74 (s, 6H), 3.59 (t, 2H, J 5.4 Hz), 2.60 (d, 4H, J 5.4 Hz).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ

174.46, 78.31, 53.31, 52.22, 25.15.

5 **c) (S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-indikarboksirūgštis • 2 HCl**

Dimetilo diesterio iš b) stadijos (450 mg, 1.97 mmol) tirpalas šildomas su 6 M HCl (7.2 ml) iki 50-60°C 12 valandų, azoto atmosferoje. Lakūs junginiai išgarinti (rotacinis garintuvas, vandens vonia 40°C). Likutis ištirpintas vandenyje (1 ml, drumstas), pridėta etanolio (20 ml), ir lėtas eterio pridėjimas davė baltas kristalines nuosėdas. Šis mišinys laikomas 12 valandų šaldytuve, nufiltruotas, plautas eteriu ir išdžiovintas vakuumu.

Išeiga 399 mg (1.46 mmol, 74.2 %)

20 ^1H BMR (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$): δ

4.18 (t, 2H, J 4.8 Hz), 2.85 (m, AA'X, 4H);

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

25 172.62, 79.88, 53.75, 22.60.

FAB-MS m/z 201 ($\text{M}^+ - 72$).

30 **d) (S,S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-okt-4-indikarboksirūgštis**

(S,S)-2,7-Diamino-Z-okt-4-indikarboksirūgštis • 2 HCl (400 mg, 1.46 mmol) tirpalas dioksane ir 1 M Na_2CO_3 - tirpalas (10.22 ml, 10.22 mmol) atšaldyti iki 0°C, ir pridėta FmocCl (1.14 g, 4.39 mmol) tirpalo 4-iuose ml dioksano. Šis mišinys maišomas 0°C temperatūroje 1 valandą, ir jam leista įgyti kambario temperatūrą per

naktį. Po ekstrahavimo dietilo eteriu, (2 x 50 ml) vandens sluoksnis parūgštintas, pridėjus atskiestos HCl. Tirpalas ekstrahuotas chloroformu (3 x 50 ml), išdžiovintas (MgSO₄) ir sukonzentruotas. Likutis išgrynintas impulsine chromatografija (silikagelis, heksanas: etilo acetatas: acto rūgštis = 10:10:1).

Išeiga 376 mg (0.58 mmol, 39 %)

¹H BMR (300 MHz, DMSO): δ

7.87 (d, 4H, J 7.5 Hz), 7.73 (d, 4H, J 7.5 Hz), 7.41 (t, 4H, J 7.5 Hz), 7.33 (d, 4H, J 7.5 Hz), 4.26 (m, 8H), 2.52 (m, 4H).

15

¹³C (DMSO): δ

170.43, 154.62, 152.58, 142.32, 139.47, 126.22, 125.94, 124.35, 119.12, 77.68, 65.45, 53.08, 46.57, 21.77.

20

FAB-MS m/z 645 (M+ +1).

C₃₈H₃₂N₂O₈ (644.67):

25

Pask. %: C, 70.80; H, 5.00; N, 4.35.

Rasta %: C, 69.20; H, 5.34; N, 4.13.

11 PAVYZDYS

30

(2S,4R,5R,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

35

a) (2R,3R)-1,4-Bis(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-0,0-izopropilidenbutanas

(2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas
(7.36 g, 40 mmol) ištirpintas vandeniniame THF, ir tir-

palas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėtas BuLi tirpalas
heksane (40.0 mmol, 25 ml). Po 20 minučių, esant -78°C ,
(2R,3R)-1,4-dibrom-2,3-dihidroksi-2,3-O-izopropilideno-
butano (3.78 g, 13.1 mmol) tirpalas 10-tyje ml THF
5 pridėtas lašinant, ir tirpalas laikomas 4°C tempera-
tūroje 36 valandas. Po hidrolizės fosfato buferiu (pH 7),
mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu, organinis sluoks-
nis išplautas vandeniu ir sūrymu. Po išdžiovinimo
(MgSO_4), tirpiklis išgarintas, ir likutis išgrynintas
10 pakartotinu kristalizavimu iš acetonitrilo.

Išeiga: 3.70 g (57 %).

^1H BMR (CDCl_3): δ

15

0.68 (d, 6H), 1.03 (d, 6H), 1.34 (s, 6H), 1.95-2.15 (m,
4H), 2.24 (m, 2H), 3.65 (s, 6H), 3.67 (s, 6H), 3.94 (m,
2H), 4.04 (m, 2H), 4.11 (m, 2H).

20

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

16.91, 19.05, 27.39, 31.73, 38.32, 52.27, 52.36, 52.70,
60.60, 77.89, 108.19, 163.66, 163.70.

25

FAB-MS m/z signalas prie 495.4 (100).

$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}$ (494):

Pask. %: C, 60.71; H, 8.56; N, 11.33.

30

Rasta %: C, 60.76; H, 8.32; N, 11.36.

b) (2S,4R,5R,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-O,0-izo-
propilidenoktandikarboksirūgšties dimetilo diesteris

35

(2R,3R)-1,4-Bis((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-
dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-O,0-izopropil-
idenobutanas (1.22 g, 2.47 mmol) ištirpintas 10-tyje ml
dioksano ir 20-tyje ml MeOH. Buvo pridėta 9.88 mmol HCl

tirpalo vandenyje, ir tirpalas maišomas kambario temperatūroje per naktį. Tirpikliai pašalinti, likutis ištirpintas vandenyje ir ekstrahuotas dietilo esteriu. Į vandeninį sluoksnį pridėta amoniako, kol pasiektas pH 9, ir šis sluoksnis ekstrahuotas chloroformu. Po išdžiovinimo (MgSO_4), tirpiklis pašalintas ir valino metilo esteris nudistiliuotas (30-40°C, 0.04 torų).

Išeiga: 0.67 g (89.3 %).

^1H BMR (CDCl_3): δ

1.34 (s, 6H), 1.64 (pl s, 4H), 1.72-1.84 (m, 2H), 1.99-2.08 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.71 (s, 6H), 3.80 (m, 2H).

^{13}C BMR (CDCl_3): δ

27.17, 37.54, 52.04, 52.74, 78.78, 108.99, 175.51.

c) (2S,4R,5R,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-O,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

Dimetilo diesteris iš b) stadijos (0.62 g, 2.04 mmol) ištirpintas 2.5 ml dioksano ir pridėta 2.1 ml 2N LiOH tirpalo vandenyje (4.1 mmol), ir tirpalas maišomas argono atmosferoje per naktį. PSC parodė kiekybinį pavadinimo junginio susidarymą. Nevalytas reakcijos tirpalas buvo panaudotas kitoje stadijoje.

d) (2S,4R,5R,7S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonil-amino)-4,5-dihidroksi-4,5-O,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

Nevalytas (2S,4R,5R,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-O,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis (2.04 mmol) tirpalas atšaldytas iki 0°C ir pridėta 10 ml dioksano bei 1N NaOH (10 mmol) tirpalo. Tada pridėta 2.07 g

FmocCl (8.0 mmol) mažomis porcijomis, ir mišinys maišomas, esant 0°C, 5 valandas kambario temperatūroje per naktį. Mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu ir parūgštintas, pridedant KHSO₄.

5

Iš ekstrahavus CHCl₃, organinis sluoksnius išdžiovintas (MgSO₄), tirpiklis pašalintas. Nesureagavusio FmocCl perteklius atskirtas filtracija ant silikagelio acetonu/MeOH, ir likutis buvo išgrynintas, nusodinant iš CHCl₃/EtOEt.

10

Išeiga: 0.49 g (33.6 %)

¹H BMR (DMSO/D₂O) δ:

15

1.20 (s, 6H), 1.73 (m, 2H), 1.99 (m, 2H), 3.87 (m, 2H), 4.14-4.24 (m, 6H), 7.23-7.82 m, 16H).

¹³C BMR (DMSO) δ:

20

27.78, 36.21, 47.27, 53.75, 66.19, 78.82, 107.89, 120.67, 125.81, 127.76, 128.32, 141.24, 144.39, 156.12, 175.96.

25

FAB-MS signalas prie m/z 563.2(2), 179.1 (100)

C₄₁H₄₀N₂O₁₀ (720): Pask.: N, 3.89

Rasta: N, 3.81.

12 PAVYZDYS

30

(2S,4S,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

a) (2S,3S)-1,4-Bis((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-0,0-izopropilidenbutanas

35

(2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas
(9.59 g, 52.1 mmol) ištirpintas bevandeniame THF, ir
tirpalas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėta BuLi tir-
palo heksane (52 mmol, 32.5 ml). Po 60 minučių, esant
5 -78°C , lašinant pridėta (2S,3S)-1,4-dibrom-2,3-di-
hidroksi-2,3-0,0-izopropilideno-butano (6.0 g, 20.83 mmol)
tirpalo 10-tyje ml THF, ir tirpalas įgijo kambario
temperatūrą per naktį, bei buvo maišomas dar 24 va-
landas. Po hidrolizės fosfato buferiu (pH 7), mišinys
10 ekstrahuotas dietilo eteriu, o organinis sluoksnis
plautas vandeniu bei sūrymu. Po išdžiovinimo (MgSO_4),
tirpiklis išgarintas, o likutis išgrynintas pakartotinu
kristalizavimu iš MeCN.

15 Išeiga: 3.43 g (33.3 %).

^1H BMR (CDCl_3) δ :

0.70 (d, 6H), 1.03 (d, 6H), 1.44 (s, 6H), 2.15-2.30 (m,
20 4H), 3.66 (s, 6H), 3.69 (s, 6H), 3.92 (m, 2H), 4.04 (m,
2H), 4.09-4.20 (m, 4H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

25 16.78, 19.11, 27.67, 31.88, 38.38, 52.37, 52.44, 52.83,
60.84, 77.65, 108.57, 163.15, 163.88

FAB-MS signalas prie m/z 495.4(53), 253.2(40),
197.2(58), 141.1(100)

30

$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}$ (494):

Pask. %: C, 60.71; H, 8.56; N, 11.33.

Rasta %: C, 60.89; H, 8.42; N, 11.45.

b) (2R,4S,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izo-propilidenoktandikarboksirūgšties dimetilo diesteris

(2S,3S)-1,4-Bis((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-0,0-izopropilidenbutanas (2.5 g, 5.06 mmol) ištirpintas 40-tyje ml dioksano. Buvo pridėta 20.0 mmol HCl tirpalo 40-tyje ml vandens, ir tirpalas maišomas kambario temperatūroje per naktį. Tirpikliai pašalinti, likutis ištirpintas vandenyje ir ekstrahuotas dietilo eteriu. Į vandeninį sluoksnį pridėta amoniako, kol buvo pasiektas pH 9, ir šis sluoksnis ekstrahuotas chloroformu. Po išdžiovinimo (MgSO_4), tirpiklis atskirtas ir valino metilo esteris nudistiliuotas (30-40°C, 0.04 torų).

15

Išeiga: 1.507 g (98.0 %).

^1H BMR (CDCl_3) δ :

20 1.32 (s,6H), 1.53 (br s,4H) 1.60-1.68 (m,2H), 1.85-1.94 (m,2H), 3.63 (m,2H), 3.67 (s,6H), 3.80 (m,2H).

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

25 27.25, 37.20, 51.96, 52.74, 77.58, 108.80, 176.10.

c) (2S,4S,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izo-propilideno-oktandikarboksirūgštis

30 Dimetilo diesteris iš b) stadijų (1.51 g, 4.96 mmol) ištirpintas 5-iuose ml dioksano, buvo pridėta 4.95 ml 2N LiOH tirpalo vandenyje (9.91 mmol), ir tirpalas maišomas argono atmosferoje per naktį. PSC parodė kiekybinį (2S,4S,5S,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgšties susidarymą.

35 Nevalytas tirpalas buvo panaudotas kitoje stadijoje.

d) (2S,4S,5S,7S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonil-amino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

5 (2S,4S,5S,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandioinės rūgšties nevalytas tirpalas (4.96 mmol) atšaldytas iki 0°C ir pridėta 16 ml 1 N NaOH tirpalo (16 mmol). Tada mažomis porcijomis pridėta
10 3.89 g FmocCl (15.0 mmol) tirpalo 16-yje ml dioksano, ir mišinys maišomas kambario temperatūroje 90 minučių. Tirpalas parūgštinamas, pridedant KHSO₄. Po ekstrakavimo CHCl₃, organinis sluoksnis išdžiovintas (MgSO₄), tirpiklis pašalintas. Likučio mėginys išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 5/5/1).

Išeiga: 1.69 (46 %).

¹H BMR (DMSO/D₂O) δ:

20 1.23 (s, 6H), 1.7-2.0 (m, 4H), 3.62 (m, 2H), 4.02 (m, 2H), 4.1-4.35 (m, 6H), 7.2-7.9 (m, 16H).

¹³C BMR (DMSO) δ:

25 27.94, 34.59, 47.39, 52.29, 66.45, 77.49, 109.13, 120.90, 125.91, 127.97, 128.59, 141.44, 144.44, 157.02, 174.75.

30 FAB-MS signalas prie m/z 743.3(28), 563.2(58), 502.2(72).

C₄₁H₄₀N₂O₁₀ (720):

35 Pask. %: N, 3.89.

Rasta %: N, 4.09.

13 PAVYZDYS

(2S,4R,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

5

a) (2R,3S)-1,4-Bis[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-2,3-dihidroksi-2,3-O,0-izopropilidenobutanas

10 (2R)-2,5-dihidro-3,5-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (6.08 g, 33.0 mmol) ištirpintas bevandeniam THF, ir tirpalas atšaldytas iki -78°C . Buvo pridėta BuLi tirpalo heksane (33.0 mmol, 20.6 ml). Po 45 minučių, esant -78°C , lašinant pridėta (2R,3S)-1,4-dibromo-2,3-dihidroksi-2,3-O-izopropilidenobutano (4.52 g 15.7 mmol)

15 tirpalo 10-tyje ml THF. Per naktį tirpalas įgavo kambario temperatūrą bei buvo maišomas dar 24 valandas. Po hidrolizės fosfato buferiu (pH 7), mišinys ekstrahuotas dietilo eteriu, o organinis sluoksnis plautas vandeniu ir sūrymu. Po išdžiovinimo (MgSO_4), tirpiklis išgarintas ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1).

20

Išeiga: 0.77 g (10 %).

25

^1H BMR (CDCl_3) δ :

0.68 (m, 6H), 1.03 (m, 6H), 1.32 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.30-1.55 (m, 1H), 1.85-2.30 (m, 5H), 3.62 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.68 (s, 6H), 3.92 (m, 2H), 4.06-4.26 (m, 3H), 4.45 (m, 1H).

30

^{13}C BMR (CDCl_3) δ :

16.62, 16.77, 19.04, 19.08, 26.20, 28.49, 31.71, 31.91, 33.69, 35.07, 52.21, 52.27, 52.32, 52.35, 52.40, 52.98,

35

60.58, 60.80, 74.31, 74.66, 107.16, 163.03, 163.40,
163.91, 164.30.

5 **b) (2S,4R,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izo-
propilidenoktanodikarboksirūgšties dimetilo diesteris**

(2R,3S)-1,4-Bis((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-
dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-0,0-izopropil-
10 idenbutanas (0.77 g, 1.55 mmol) ištirpintas 12-oje ml
dioksano. Buvo pridėta 6.0 mmol HCl tirpalo 12-oje ml
vandens, ir tirpalas maišomas kambario temperatūroje
5 valandas. Buvo pridėta amoniako, kol pasiektas pH 9,
ir tirpalas ekstrahuotas chloroformu. Po išdžiovinimo
(MgSO₄), tirpiklis pašalintas ir valino metilo esteris
15 buvo nudistiliuotas (30-40°C, 0.05 torų).

Išeiga 0.36 g (77 %).

20 ¹H BMR (CDCl₃) δ:

1.30 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.40-1.48 (m, 1H), 1.72 (s, 4H),
1.75-2.00 (m, 3H), 3.60-3.67 (m, 2H), 3.70 (s, 6H), 4.20-
4.40 (m, 2H).

25 ¹³C BMR (CDCl₃) δ:

25.81, 28.26, 34.69, 34.89, 51.55, 52.00, 52.02, 52.66,
74.26, 75.20, 108.23, 175.43, 176.51.

30 **c) (2S,4R,5S,7S)-2,7-Diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izo-
propilidenoktandikarboksirūgštis**

Dimetilo diesteris iš b) stadijos (0.36 g, 1.19 mmol)
ištirpintas 5-iuose ml dioksano, pridėta 1.19 ml 2 N
35 LiOH tirpalo vandenyje (2.38 mmol), ir tirpalas mai-
šomas argono atmosferoje per naktį. PSC kontrolė parodė
kiekybinį (2S,4R,5S,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-

0,0-izopropilidenoktandioinės rūgšties susidarymą. Žalias reakcijos tirpalas panaudotas kitoje stadijoje.

5 d) (2S,4R,5S,7S)-2,7-Bis(9-fluorenilmetiloksikarbonil-amino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgštis

10 Nevalytas (2S,4R,5S,7S)-2,7-diamino-4,5-dihidroksi-4,5-0,0-izopropilidenoktandikarboksirūgšties tirpalas (1.19 mmol) atšaldytas iki 0°C ir pridėta 4.0 ml 1 N NaHCO₃ tirpalo (4.0 mmol). Tada mažomis porcijomis pridėta 1.03 g FmocCl (4.0 mmol) tirpalo 4-iuose ml dioksano ir mišinys maišomas kambario temperatūroje 60 minučių. Tirpalas parūgštintas, pridedant KHSO₄. Po ekstrahavimo 15 CHCl₃, organinis sluoksnis išdžiovintas (MgSO₄) ir tirpiklis pašalintas. Likutis išgrynintas impulsine chromatografija. (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 5/5/1).

20 Išeiga: 0.566 (66 %).

¹H BMR (DMSO, D₂O) δ:

25 1.16 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.50-2.05 (m, 4H), 3.80-4.40 (m, 8H), 7.15-8.0 (m, 16H).

¹³C BMR (DMSO, D₂O) δ:

30 26.63, 29.05, 31.50, 31.94, 47.43, 51.52, 52.19, 66.50, 74.10, 75.10, 108.36, 120.88, 125.93, 127.98, 128.60, 141.48, 144.39, 144.76, 156.82, 157.12, 174.11, 175.11.

14 PAVYZDYS

(S,S)-2,6-Diamino-4-oksaheptandikarboksirūgštis5 **a) Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pirazinil]metilo eteris**

Butillitis heksane (1.6 M, 6.25 ml, 10 mmol) pridėtas į
(2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino
10 (1.84 g, 10.0 mmol) tirpalą sausame THF (8 ml), esant
-78°C. Mišinys maišomas 15 minučių. Buvo pridėta
bis(chlormetil)eterio (0.67 g, 5.0 mmol) tirpalo sau-
same THF (2 ml). Reakcijos mišiniui leista įgyti kam-
bario temperatūrą per naktį. Tirpiklis išgarintas, o
15 likutis užpiltas dietilo eteriu. Eterio tirpalas
plautas vandeniu, išdžiovintas (MgSO₄) ir išgarintas.
Produktas išgrynintas chromatografija (silikagelis,
heksanas/etilo acetatas 2:1).

20 Išeiga: 0.65 g (32 %), geltonas aliejus.

¹H BMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

0.63 (6H, d), 1.05 (6H, d), 2.25 (2H, m), 3.58 (2H,
25 dd), 3.63 (6H, s), 3.64 (6H, s), 3.76 (2H, dd), 3.83
(2H, t), 3.98 (6H, m).

¹³C BMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

30 16.4, 19.1, 30.1, 52.1, 52.2, 56.9, 60.3, 72.5, 161.0,
165.0.

**b) (S,S)-2,6-Diamino-4-oksaheptandikarboksirūgšties di-
metilo diesteris**

35

Bis[(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-pi-
razinil] metilo eteris (0.65 g, 1.49 mmol) ištirpintas

metanolyje (5 ml), ir pridėta 0.25 M hidrochloro rūgštis (23.8 ml, 5.96 mmol). Mišinys maišomas kambario temperatūroje per naktį. Vandens/metanolio tirpalas ekstrahuotas dietilo eteriu. Tada pH sureguliuotas iki pH 10, pridedant amoniako, ir D-valino metilo esteris ekstrahuotas eteriu. Didžioji vandens dalis išgarinta. Likutis buvo naudojamas kitoje stadijoje be tolesnio gryninimo.

10 ^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ :

3.72 (6H, s), 3.85 (4H, m), 4.23 (2H, t).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3) δ :

15

52.8, 53.2, 68.9, 168.4.

c) (S,S)-2,6-Diamino-4-oksaheptandikarboksirūgštis • 2HCl

20 Dimetilo esteris, aprašytas aukščiau, deflegmuojamas 6M hidrochloro rūgštyje (5 ml) 3 valandas. Tirpalas išgarintas ir išdžiovintas užšaldant.

Išeiga: 420 mg baltos kietos medžiagos.

25

^1H BMR (300 MHz, D_2O) δ :

3.87 (2H, dd, J 10.8 Hz, J 3.2 Hz), 3.95 (2H, dd, J 10.8 Hz J 4.6 Hz), 4.13 (2H, dd J 3.2 ir 4.6 Hz).

30

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3) δ :

53.4, 68.40, 170.3.

d) (S,S)-2,6-Bis[(9-fluorenilmetoksikarbonil)amino]-4-oksaheptandikarboksirūgštis

Reakcija buvo atliekama azoto atmosferoje. (S,S)-2,6-diamino-4-oksaheptandioinės rūgšties dihidrochlorido (200 µg, 0.75 mmol) suspensija heksametildisilazane (10 ml) ir chlorotrimetilsilane (1 ml) šildoma, esant 120°C, tris valandas ir gautas skaidrus tirpalas. Sililinančių reagentų perteklius atskirtas vakuumu, o likutis ištirpintas sausame dichlormetane (5 ml). Tirpalas atšaldytas iki 0°C ir pridėta 9-fluorenilchloroformiato (425 mg, 1.65 mmol) tirpalo sausame dichlormetane (2 ml). Mišinys maišomas 2 valandas ir tada išgarintas. Likutis užpiltas THF (5 ml), ir pridėta 1 ml 0.1 M hidrochloro rūgšties. Mišinys maišomas 15 minučių ir tada išgarintas. Likutis užpiltas etilo acetatu. Organinė fazė plauta vandeniu, išdžiovinta (MgSO₄) ir išgarinta. Produktas išgrynintas kolonėlės chromatografija (silicio dioksidas, chloroformas/ metanolis/ acto rūgštis 85:10:5).

Išeiga: 310 mg (65 %), balta kieta medžiaga.

¹H BMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ:

3.7 (4H, m), 4.1 (2H, m), 4.25 (6H, m), 7.2-7.4 (10H, m), 7.7 (4H, d), 7.8 (4H, d).

15 PAVYZDYS

(S,S)-2,7-Diamino-4-azaoktandikarboksirūgštis

a) (S,S)-2,7-Bis(tret-butiloksikarbonilamino)-4-azaoktandikarboksirūgštis

(S)-4-Amino-2-tret-butiloksikarbonilamino sviesto rūgšties (1.03 g, 4.70 mmol) tirpalas acetonitrile (50 ml)

pridėtas į (S)-*boc*-serino- β -laktono (0.8 g, 4.27 mmol) tirpalą acetonitrile (50 ml) ir degazuotame H_2O . Reakcijos terpės pH palaikomas apie 5,5 lašinant 1 M $NaHCO_3$ ir maišant. Mišinys buvo maišomas 5 dienas kambario temperatūroje. pH buvo reguliuojamas, pridedant $NaHCO_3$, ir reakcija valdoma PSC. Tirpikliai nudistiliuoti, likutis sutrintas į miltelius su chloroformu (5 ml), į kurią pridėta acto rūgšties, kad būtų gautas pH 5. Chloroformo tirpalas išgarintas, o produktas atskirtas chromatografija ant silikagelio ($CHCl_3$: MeOH 2:1).

Išėiga: 0.92 g (53 %) baltos kietos medžiagos.

1H BMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ

7.33 (d, J 6.3 Hz; 1H), 6.27 (d, J 5.7 Hz; 1 H), 4.42 (d, J 7.5 Hz; 1 H), 4.15 (dd, J_1 10.5 Hz, J_2 3.9 Hz; 1 H), 4.01 (d, J 6.3 Hz; 1H), 3.87 (pl s; 1 H), 2.78 (pl s; 1 H), 1.78-2.21 (m; 4H), 1.36 ir 1.35 (2 s; 18 H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.43 MHz): δ

174.95, 155.74, 155.25, 79.58, 78.22, 78.04, 62.97, 56.42, 56.00, 51.17, 48.99, 38.14, 28.62, 28.46.

$C_{17}H_{31}N_3O_8$ (405.45).

b) (S,S)-2,7-Bis(tret-butyloksikarbonilamino)-4-(benziloksikarbonil)-4-azaoktandikarboksirūgštis

1 M $NaHCO_3$ (5.9 ml, 5.92 mmol) ir benziloksikarbonilo chloridas (0.5 g, 0.42 ml, 2.96 mmol) pridėtas į (S,S)-2,7-bis(tret-butyloksikarbonilamino)-4-azaoktandikarboksirūgštis (0.6 g, 1.48 mmol) tirpalą dioksane (40 ml) ir H_2O (30 ml), esant $0^\circ C$. Mišinys buvo maišomas, esant $0^\circ C$, tris valandas kambario temperatūroje - 6 valandas, išgarintas, likutis sutrintas į miltelius su chlo-

roformu (5 ml) ir acto rūgštimi iki pH 5. Chloroformo tirpalas išgarintas, o produktas atskirtas chromatografija ant silikagelio (CHCl_3 :MeOH 4:1).

5 Išeiga: 0.39 g (50 %) baltos kietos medžiagos.

^1H BMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ

10 7.21-7.37 (m, 5H), 7.18 (d, J 7.8 Hz; 1 H), 6.23 (d, J 6.3 Hz; 1 H), 4.98 (s, 2H), 4.43 (dd, J 10.8 Hz, J 3.3 Hz; 1 H), 4.09 (dd, J 10.2 Hz, J 6.3 Hz; 1H), 3.88-4.02 (m; 2H), 3.01 (d, J 5.7 Hz; 2H), 1.74-1.88 (m, 1H), 1.59-1.72 (m, 1H), 1.35 ir 1.33 (2d, 18H).

15 ^{13}C BMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75.43 MHz): δ

177.42, 177.38, 161.20, 160.63, 160.16, 142.20, 133.48, 132.91, 132.78, 83.55, 83.14, 70.76, 70.40, 59.39, 56.44, 53.61, 42.30, 36.01, 33.28.

20

$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (539.58).

c) (S,S)-2,7-Diamino-4-benziloksikarbonil-4-azaoktan-dikarboksirūgštis

25

(S,S)-2,7-Bis(tret-butiloksikarbonilo)-4-benzoloksikarbonil-4-azaoktandikarboksirūgštis (0.29 g, 0.37 mmol) ištirpinta THF (10 ml), tirpalas maišomas kambario temperatūroje 2 valandas, ir TFA buvo nudistiliuotas, 30 gautas pavadinimo junginys, kuris naudojamas kitoje stadijoje be tolesnio gryninimo.

d) (S,S)-Benziloksikarbonil-2,7-bis(9-fluorenil-metoksi-karbonil)-4-azaoktandikarboksirūgštis

5 (S,S)-2,7-Diamino-4-benziloksikarbonil-4-azaoktandikarboksirūgštis

10 (0.2 g, 0.37 mmol) ištirpinta dioksane (10 ml) ir H₂O (10 ml), pridėta 9-fluorenilmetilchloroformiato (0.29 g, 1.11 mmol) ir 1M NaHCO₃ (2.96 ml, 2.96 mmol), maišant 0°C temperatūroje, ir maišymas tęsiama 10 valandų kambario temperatūroje, po to tirpikliai nugarinti. Likusi kieta medžiaga buvo sutrinta į miltelius su chloroformu (5 ml), o pH buvo palaikomas apie 5, pridant acto rūgšties. Tirpalas paskui išgarintas ir 15 produktas atskirtas chromatografija ant silikagelio (AcOEt:heksanas:AcOH 10:10:1).

Išeiga: 0.1 g (35 %) kaip balta medžiaga.

20 ¹H BMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ

7.21-7.44, 7.61-7.91 (m, 22H), 6.88 (d, J 6.3 Hz; 1H), 4.96 (s, 2H), 4.56 (dd, J 10.8 Hz, J 3.3 Hz; 1H), 3.94-4.28 (m, 8H), 3.08 (d, J 5.7 Hz; 2H), 1.86-1.98 (m, 1H), 1.69-1.82 (m; 1H). 25

¹³C BMR (DMSO-d₆, 75.43 MHz): δ

172.98, 172.49, 156.49, 156.04, 144.32, 144.24, 144.17, 142.97, 141.07, 139.81, 137.82, 137.55, 129.30, 128.66, 128.06, 127.99, 127.66, 127.46, 125.68, 121.75, 120.39, 110.06, 66.22, 65.60, 55.26, 52.20, 47.08, 47.04, 36.63, 37.74. 30

35 C₄₅H₄₁N₃O₁₀ (783.83).

Kietos fazės peptidų sintezė

Kietos fazės peptido sintezė atliekama iš esmės pagal fluorenilmetoksi karbonilo (Fmoc)-poliamido sintezės principus (Atherton and Sheppard, Solid phase peptide synthesis: a practical approach, Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1989). Buvo panaudotos prekybos turimos sintetinės dervos; periodine sinteze arba rankomis, arba naudojant pusiau automatinį prietaisą (Labortec Peptide Synthesizer 5P 650) jos buvo polistireno su rūgšties labilaus (Wang, J. Amer. Chem. Soc., 95, 1328-1333, 1973) arba rūgšties hiperlabilaus ryšio agentais (Merger et al., Tetrahedron Letters 29, 4005-4008, 1988). Alternatyviai, peptidai sukonstruoti visiškai automatiškai ant takių dervų (Atherton et al., J. Chem. Soc.. Chem. Commun., 1151-2, 1981), panaudojant LKB Biolynx 4170 automatinį peptidų sintezatorių. Buvo išgytos dervos, kurios jau turėjo apsaugotą reikalingą C-galinę Fmoc-aminorūgšties liekaną. Grandinės pailginimas pasiektas įvairiai su šoninės grandinės apsaugotais Fmoc-aminorūgšties pentafluorenilo esteriais (Kisfaludy and Schoen, Synthesis. 325-327, 1983), panaudojant aktyvaciją su dicikloheksilkarbodiimido (DDC)/1-hidroksibenzotriazolu (HOBt) (Koenig and Geiger, Chem Ber., 103, 2034-2040, 1970) arba panaudojant prijungimo reagentą PyBOP (Coste et al., Tetrahedron Lett. 31, 205-208, 1990). Lizino šoninės grandinės amino grupė buvo apsaugota t-butiloksikarbonilu, glutamino arba asparagino rūgšties šoninės grandinės karboksilo grupės buvo apsaugotos kaip t-butilo esteriai.

Sintetinės dervos, nešančios reikalingą N-deblokuotą C-galinę liekaną, buvo acilintos 1/2 ekvivalento, Fmoc-apsaugota diaminokarboksilo rūgštimi, pridodant DCC ir HOBt. Reakciją užbaigus, reagentų perteklius buvo nuplautas. Peptidilinė derva paveikta dar kartą DCC/HOBt,

5 kad būtų prijungtos karboksilo grupės, kurios galėjo likti laisvos. Po šios stadijos derva nuplauta metanoliu, kad būtų dezaktyvuotos bet kurios karboksilo grupės, negalinčios susijungti su derva sujungtomis amino grupėmis. Galiausiai, amino grupių perteklius acetilinamas. Peptido sintezė paskui buvo tęsiama kaip įprasta.

10 Po visiško reikalingų sekų ant kietos fazės sudarymo, peptidai skaldomi iš sintezės dervų su kartu einančiu šoninės grandinės deblokavimu, panaudojant trifluoracto rūgštį, į kurią buvo pridėti tinkami valantys chemikalai (King et al., Int. J. Peptide Protein Res., 35, 255-268, 1990). Po išgarinimo, peptidai atskirti, 15 nusodinant dietilo eteriu ir išdžiovinant. Gryninimas atliktas preparatyvine atvirkščios fazės skystine chromatografija

1 Lentelė

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

Tiltelio liekanos tipas ^a	AVSC metodas ^b (Užlaikymo laikas, min.)	Grynumas ^c (%)	FAB-MS [M+H] ⁺
1	2	3	4
C-6	10-40-20 (16)	95	1199.5
C-5	0-30-20 (17)	95	1185
C-1			
C-0 (mezo)	0-20-20 (19)	98	1115.4
C-0 (1 izomeras)	0-20-20 (19)	98	1115.4
C-0 (2 izomeras)	0-20-20 (19)	97	1115.4
C-4-trans-enas	0-30-20 (12)	98	1169.4

I Lentelė (tęsinys)

1	2	3	4
C-4-cis-enas	10-40-20 (13)	100	1170.6
C-4-inas	0-30-20 (10)	98	1167.5
C-4-vic-glikolis (1 izomeras)	0-30-20 (14)	98	1203.2
C-4-vic-glikolis (2 izomeras)	0-30-20 (13)	98	1203.4
C-4-vic-glikolis (3 izomeras)			
C-3-Aminas			
C-3-Eteris			

^aNurodo pavyzdžius

^bMetodai yra išreikšti kaip mobilios fazės B A gradientai per laiką, pvz., 10-40-20 nurodo gradientą, prasidedantį ties 10 ir besibaigiantį ties 40 % B per 20 minučių. Mobilios fazės: A) 0.1 % TFA B) 0.1 % TFA 40 % MeCN. Kolonėlė: Vydac TP54, 0.x25 cm, 5 µm dalelės, 100A pora; srautas 1 ml/min.

10

^cNurodo HPLC pikų integraciją ($\lambda=215$ nm)

2 Lentelė

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

5

Tiltelio liekanos tipas	Asp rasta (teor.)	Glu rasta (teor.)	Lys rasta (teor.)
C-6	1.0 (1)	2.15 (2)	0.93 (1)
C-5	1.0 (1)	2.18 (2)	0.94 (1)
C-1			
C-O (mezo)	1.0 (1)	2.15 (2)	0.93 (1)
C-O (1 izomeras)	1.0 (1)	2.18 (2)	0.93 (1)
C-O (2 izomeras)			
C-4-trans-enas	1.0 (1)	2.15 (2)	0.93 (1)
C-4-cis-enas	1.0 (1)	2.17 (2)	0.93 (1)
C-4-inas	1.0 (1)	2.17 (2)	0.95 (1)
C-4-vic-glikolis (1 izomeras)	1.0 (1)	2.15 (2)	0.93 (1)
C-4-vic-glikolis (2 izomeras)			
C-4-vic-glikolis (3 izomeras)			
C-3-Aminas			
C-3-Eteris			

^aNurodo pavyzdžius

16 PAVYZDYS

Peptido sintezė: (pGlu-Glu-Asp)₂-(E)-DHs(Lys)₂

5 Peptidas sintezuotas, panaudojant Labortec peptidų
sintezatorių. Fmoc-Lys(Boc)-Sasrino polimeras (1.0 g,
0.6 mmol; BACHem A.G.; pakeitimas 0.6 mmol/g) sudėtas į
100 ml reakcijos kolbą. Fmoc-DHs (150 mg; 0.23 mmol),
DCC (290 mg, 1.4 mmol) ir HOBt (211 mg, 1.4 mmol) DMF'e
10 (20 ml) pridėta į polimerą, ir reakcijai leista vykti 9
valandas. Papildomai buvo pridėta DCC (1.4 mmol) ir
HOBt (1.4 mmol), ir reakcijai leista vykti dar 2 va-
landas. Tada polimeras nuplautas CH₂Cl₂, 30 % MeOH/CH₂Cl₂
ir DMF. Laisvos amino grupės polimere acetilintos, pa-
15 naudojant 10 % Ac₂O / DMF (3x per 1 valandą; neigiamas
Kaiser'io testas).

Likusi sintezė buvo atliekama pagal standartinę me-
todiką panaudojant Fmoc-Asp (OtBu)-Opfp (1.35 g, 2.3 mmol),
20 Fmoc-Glu (OtBu)-Opfp (1.35 g, 2.3 mmol) ir pGlu-
pentachlorfenilo esterį (0.86 g, 2.3 mmol). HOBt (35 mg,
2.3 mmol) pridėta kiekvienoje prijungimo stadijoje,
kuriai leista vykti 1 valandą. Prijungimo pabaiga nu-
statyta neigiamu Kaiser'io testu. Po sujungimo su Fmoc-
25 amino rūgštimi, polimeras nuplautas DMF'u, apsauginė
grupė atskelta 20 % piperidino tirpalu DMF'e ir po-
limeras vėl nuplautas DMF'u. Po galutinio prijungimo,
polimeras nuplautas MeOH/CH₂Cl₂ ir CH₂Cl₂. Išdžiovinto
polimero-peptido svoris buvo 1 g. Peptidas atskeltas
30 nuo polimero TFA: CH₂Cl₂ 1:1, tirpalas išdžiovintas
užšaldant, likutis ištirpintas vandenyje, filtruotas
(0.45 μ), o filtratas išdžiovintas užšaldant; išeiga
430 mg. Tolesniam gryninimui 100 mg šio produkto
ištirpinta vandenyje (0.5 ml) ir nukreipta prepa-
35 ratyvinei AVSC, panaudojant 2.1x15 cm Beckman Ultras-
phere ODS kolonėlę ir tirpalus A 0.1 % TFA H₂O, B 0.1 %
TFA MeCN:H₂O 40:60. Gradientas buvo 0-15 % B, 120 mi-

nučių, srauto greitis 5 ml/min. 19 mg gryno peptido (>95 %) buvo gauta po išdžiovinimo šaldant. FAB-MS: [M+H] 1169.3.

- 5 HOBt = Hidroksibenzotriazolas
Pfp = Pentafluorfenilas
Fmoc = 9-Fluorenilmetoksikarbonilas
Boc = t-Butoksikarbonilas
DCC = Dicikloheksilkarbodiimidas
- 10 (E)-DHs = (S,S)-2,7-Diamino-(E)-okt-4-eno-1,8-dikarboksilo rūgštis

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidinis junginys, sudarytas iš dviejų vienos
 5 grandinės hemoreguliacinių peptidų, prijungtų kartu
 prie negalinių aminorūgščių C atomų ekvivalentiškose
 vietose kiekviename minėtame peptide per anglis- anglis
 jungtį arba per divalentę jungiančią tilteliu grupę
 -A-, kur A yra C₁₋₆ anglies grandinė, kuri yra

10

i) a) mono- arba poli-pakeista grupė -R^A, -OR^A, -SR^A,
 -NR^AR^A arba -COOR^A, arba halogeno atomu, tokiu
 kaip fluoras, chloras, bromas arba jodas (kur
 kiekviena R^A nepriklausomai reiškia vandenilio
 15 atomą arba C₁₋₆-alkilo, -alkanoilo arba -alkok-
 sialkilo grupę, kuri gali būti mono- arba poli-
 hidroksilinta)

ir/arba

20

b) į kurią įterpta viena arba daugiau anglis-anglis
 dvigubų arba trigubų jungčių

ir/arba

25

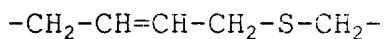
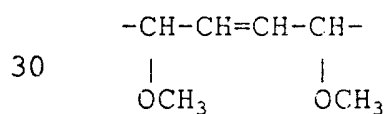
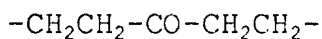
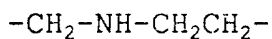
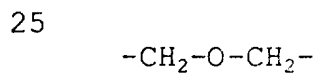
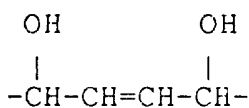
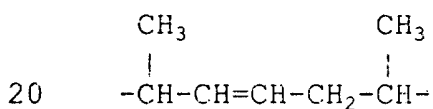
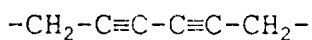
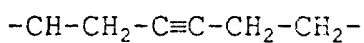
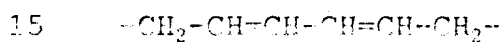
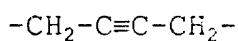
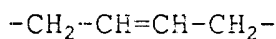
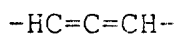
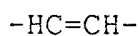
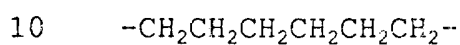
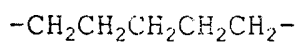
c) į kurią įterpta viena arba daugiau grupių -Z-,
 kur kiekviena -Z- yra nepriklausomai -O-, -CO-,
 $\text{>C} = \text{NR}^{\text{B}}$ arba -NR^B- (kur kiekvienas R^B yra
 nepriklausomai vandenilio atomas arba C₁₋₆-alkilo
 arba C₁₋₆-arilo grupė) arba kur vienas arba
 30 daugiau pakaitalų, arba neprisotintų anglis-
 anglis jungčių yra grupėje -A-, -Z- taip pat
 gali būti -S-
 arba

35

ii) (CH₂)_y, kur y yra 1, 5 arba 6,

prie kiekvieno iš minėtų $C\alpha$ atomų nėra natyvios α -šoninės grandinės.

2. Peptidinis junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i -
 5 r i a n t i s tuo, kad minėta jungianti tiltelių grupė
 -A- yra parenkama iš



$-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ arba

$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2-$.

3. Peptidinis junginys pagal 2 punktą, b e s i s k i -
5 r i a n t i s tuo, kad minėta jungianti tiltelių grupė
-A- yra parenkama iš

(E)-buten-2-enileno,

(Z)-buten-2-enileno,

10 buten-2-inileno,

metileno,

n-pentileno ir

heksileno.

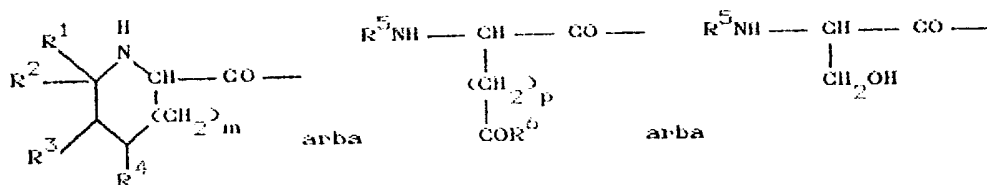
4. Peptidiniai junginiai pagal bet kurį 1-3 punktą, b e -
15 s i s k i r i a n t y s tuo, kad minėti vienos
grandinės homoreguliaciniai peptidai yra aprašomi I for-
mule



20

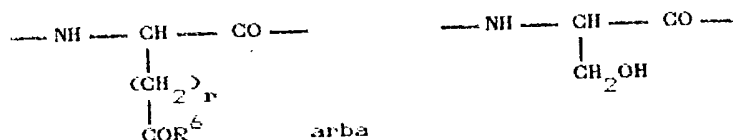
kurioje R^a reiškia

25

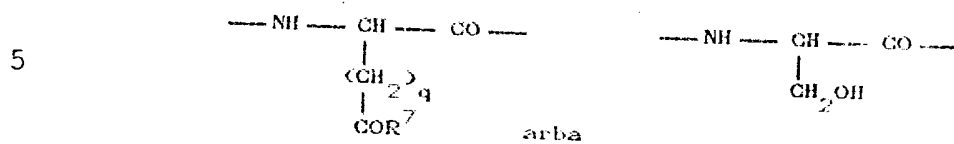


R^b reiškia

30

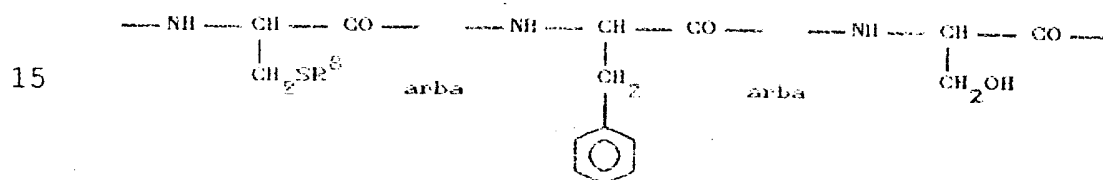


R^c reiškia



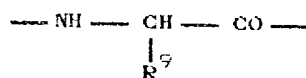
10

R^d reiškia



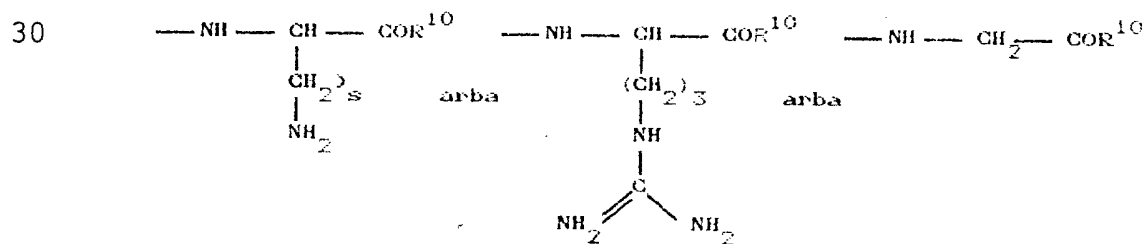
20

R^e reiškia



25

R^f reiškia



(kuriose n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

p, q, ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2; s reiškia 3 arba 4;

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

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

10 R^5 yra vandenilis arba acilo grupė;

kiekvienas R^6 ir R^7 nepriklausomai reiškia hidroksilo grupę arba amino grupę, bet geriau -hidroksilo grupė;

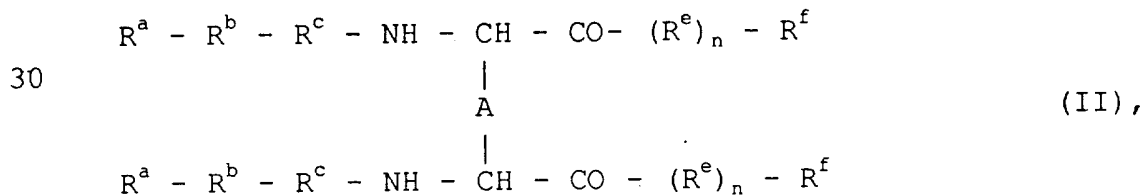
15 R^8 reiškia vandenilį; C_{2-6} -alkilo grupę; C_{7-20} -aralkilo grupę, kuri gali turėti vieną arba daugiau hidroksilo, amino arba metoksi pakaitalų; arba metaboliškai labilia S-apsauginę grupę;

20 R^9 reiškia vandenilį arba metilo grupę; ir

R^{10} reiškia hidroksilo arba amino grupę, aminorūgšties glutamino liekaną arba peptidą, turintį N-galo glutamino fragmentą.

25

5. Peptidiniai junginiai pagal 4 punktą, b e s i s k i - r i a n t y s tuo, kad jie aprašomi II formule



35 kurioje -A- yra tokia, kaip apibrėžta 1 punkte, o R^a , R^b , R^c , R^e , R^f ir n yra tokie, kaip apibrėžta 4 punkte.

6. Farmacinė kompozicija, kurią sudaro peptidinis junginys kartu su farmaciniu nešikliu arba užpildu, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad peptidinis junginys yra junginys pagal bet kuri iš 1-5 punktų.

5

7. Peptidinis junginys pagal bet kuri iš 1-5 punktų, skirtas panaudoti stimuliuojant mielopoezę arba kaulų čiulpų regeneraciją.

10

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

a) bis-laktimo eterį metalina ir po to alkilina, kad sudarytų bis-laktimo dipeptidinį eterį;

15

b) bis-laktimo dipeptidinį eterį iš a) stadijos hidrolizuoja, kad sudarytų tiltelinę α, α' -diaminorūgštį;

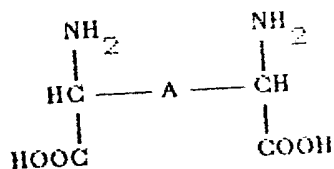
20

c) likusias aminorūgštis įveda į peptidines grandines; ir

d) bet kurią apsaugotą grupę deblokuoja.

25

9. Tiltelinės α, α' -diaminorūgštys pagal formulę



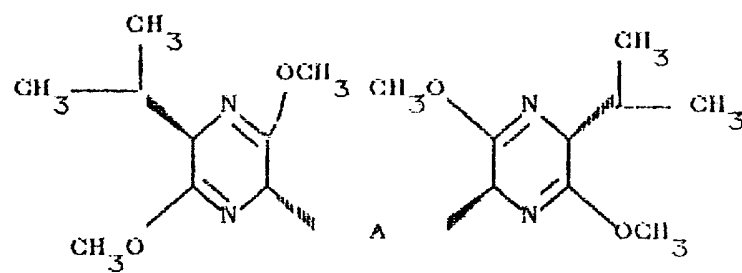
30

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

35

10. Bis- laktimo dipeptidiniai eteriai pagal formulę

5



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