

(11) Patent numeris: **3615**

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

(21) Paraiškos numeris: **IP608**

(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: **9211668, 1992 06 02, GB**

(72) Išradėjas:  
**Kjell Undheim, NO**  
**Peter Kremminger, AT**  
**Michael Hartmann, AT**

(73) Patent savininkas:  
**HAFLUND 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:

Čia atskleisti viengrandžiai peptidiniai junginiai, pakeisti ties negalinės amino rūgšties C  $\alpha$ -atomu grupe -A-.  
Natyvios C  $\alpha$ -atomo  $\alpha$ -šoninės grandinės, sujungtos su grupe -A-, nėra.  
Peptidiniai junginiai pagal šį išradimą yra naudingi ląstelių proliferacijos, ypač mielopoezės ir kaulų čiulpų ląstelių, inhibicijai.

Šis išradimas yra apie ląstelių proliferaciją skatinančių peptidų panaudojimą ir naujus peptidus, pasižyminčius specifiniu ir/ar bendrus 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

15 vienokią ar kitokią morfologinę pakitimą ir vėliau išsivysto į ląsteles, atliekančias reikiamą funkciją.

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

20 epidermio sistemos.

Kamieninių ląstelių dalijimosi valdymas ar reguliavimas yra labai perspektyvi terapijos sritis, todėl daugelio tyrimų tikslas tebėra mechanizmų išaiškinimas ir

25 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 dalyvau-

30 jiančios molekulės: kolonijas stimuliuojantys faktoriai (KSF), kaip antai, granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-KSF), makrofagų kolonijas sti-

35 muliuojantis faktorius (M-KSF), granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-KSF), įvairiakilmes kolonijas stimuliuojantis faktorius (multi-KSF; IL-3) [žr. ...], interleukinas 11 (IL-11) [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, Blood Cells, 11: 429 (1989)], prostaglandinai [žiūr. Pelus et al, J. Immunol. 140: 479 (1988)], rūgštinis (H-subvienetas) feritinas [žiūr. Broxmeyer et al, Blood 68: 1257 (1986)], interferonai ( $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$ ) [žiūr. Pelus et al aukščiau, ir Broxmeyer et al, J. Immunol., 131: 1300 (1983)], auglio nekrozės faktoriai ( $\alpha$  ir  $\beta$ ) [žiūr. Broxmeyer et al, J. Immunol. 136: 4487 (1986)], transformuojantis augimą faktorius  $-\beta$  [žiūr. Ottman et al, J. Immunol., 140: 2661 (1988)], ir aktivinas 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, 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 [žiūr. Laerum et al, Exp. Hematol., 16: (1988)].
- 20 (pEEDCK)<sub>2</sub> 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 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 stimuliaciją.

ciją arba inhibiciją per kitus išaiškinamus faktorius. Tuo būdu manoma, kad dimerai indukuoja arba pagreitina stimuliuojančių ląstelinių reguliuojančių faktorių stromos gamybą, tuo tarpu kai monomeriniai peptidai  
 5 gali arba inhibuoti šį procesą, arba sukelti faktorių, kurie užkerta kelią ar trukdo ląstelės dalijimuisi, gamybą. Tuo būdu pagal tokią galvosena stromos ląstelės gali sustiprinti dimerų ir monomerinių peptidų atitinkamai stimuliuojanti arba inhibicinę poveikį.

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

Šis išradimas pateikia peptidinį darinį, sudarytą iš  
 20 viengrandžio hemoreguliacinio, pavyzdžiui, inhibuojančio hemopoezę, peptido, kur negalinės aminorūgšties  $\text{Ca}$  atomas pakeistas -A grupe, prie minėto  $\text{Ca}$  atomo nesant natyvos  $\alpha$ - šoninės grandinės, kur A yra  $-\text{CR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{A}'}-\text{Z}$ ,

25 kur kiekvienas  $\text{R}^{\text{A}}$  yra nepriklausomai vandenilio atomas arba  $-\text{R}^{\text{A}''}$ ,  $-\text{OR}^{\text{A}''}$ ,  $-\text{SR}^{\text{A}''}$ ,  $-\text{NR}^{\text{A}''}\text{R}^{\text{A}''}$ ,  $\text{CONR}^{\text{A}''}\text{R}^{\text{A}''}$  arba  $-\text{COOR}^{\text{A}''}$  grupė;

$\text{R}^{\text{A}'}$  yra vandenilio atomas arba  $\text{R}^{\text{A}''}$  grupė;

30  $\text{R}^{\text{A}''}$  yra alkilas, cikloalkilas, alkanoilas, hidroksialkilas, anido grupė arba karbociklinė ar heterociklinė grupė;

35 Z yra grupė  $-\text{OR}^{\text{B}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{C}}\text{R}^{\text{C}}$ ,  $-\text{CR}^{\text{D}}\text{R}^{\text{E}}\text{R}^{\text{F}}$  arba pakeistas ar nepakeistas, aromatinis ar nearomatinis, karbociklinis

ar heterociklinis žiedas, kitoks nei nepakeistas fenilas;

5 kur kiekviena  $R^B$  yra linijinės arba šakotos grandinės, prisotinta arba neprisotinta angliavandenilio grupė, tokia kaip alkilo, aralkilo arba arilo grupė, pasirinktinai pakeista viena ar daugiau  $R^A$  grupėmis, kur  $R^A$  yra kaip nurodyta aukščiau, ir į kurią paprastai įterptas vienas ar daugiau -N-, -O- ar -S- heteroatomų;

10

$R^C$  yra vandenilio atomas arba  $R^B$  grupė;

$R^D$  yra vandenilio atomas arba  $R^F$  grupė;

15  $R^E$  yra vandenilio atomas arba  $R^F$  grupė, arba kartu su  $R^D$  grupe sudaro  $>C=O$  grupę; ir

20  $R^F$  yra grupė  $-R^B$ ,  $-OR^B$ ,  $-NR^C R^C$  arba  $-SR^B$ , arba hidroksilo, karboksilo, aminokarboksilo ar alkoksi grupė, arba metileno grupė, prijungta prie azoto atomo, sujungto su  $C\alpha$  atomu, arba kartu su  $R^D$  sudaro alkilideno grupę, arba yra vandenilio atomas, kur vienas iš  $R^A$ ,  $R^{A'}$ ,  $R^D$  ir  $R^E$  yra ne vandenilis.

25 Kai bet kuri iš grupių  $R^A$  ir  $R^B$  yra C-prijungta organinė grupė, geriau, kai turi nuo 1 iki 10 anglies atomų, ypač nuo 1 iki 6 anglies atomų. Alkilo grupės gali būti linijinių ar šakotų grandinių ir gali būti pakeistos arilo grupėmis, turinčiomis 6 - 10 anglies atomų (t.y. sudarančiomis aralkilo grupę), alkoksi, hidroksilo, aciloksi, amino, azido, acilamino, aminokarbonilo arba karboksilo grupėmis. Arilo grupės apima 5- ar 6-nares heterociklines arilo grupes, turinčias vieną ar daugiau heteroatomų, parinktų iš O, N, ar S, tokias kaip furilo, imidazolilo, pirolilo, piridinilo ir tienilo grupės. Arilo grupės pakaitalai gali būti  $C_{1-6}$  alkilo grupės, hidroksilo ir karboksilo grupės. Pavyzdžiui

30

35

apima metilo, etilo, propilo, t-butilo, pentilo, karboksietilo ir benzilo grupes.

5 Viename įgyvendinime Z reiškia pakeistą arba nepakeistą, aromatinį arba nearomatinį, karbociklinį arba heterociklinį žiedą, kitoki nei nepakeistas fenilas.

10 Ypač tinkančios Z grupės yra benzilo, indolilo, hidrokisifenilo, imidazolilo, naftilo, tienilo, piridinilo, furanilo, izoksazolilo, 3,5-dimetilizoksazolilo ar cikloheksilo grupės.

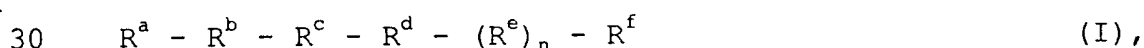
15 Kitame įgyvendinime Z grupė  $-OR^B$  (kur  $R^B$  -kaip nurodyta aukščiau) arba  $-CHR^D R^F$  (kur  $R^D$  reiškia vandenilio atomą arba  $-CH_3$  - grupę;  $R^F$  reiškia alkilo grupę, paprastai pakeistą hidroksilo, amino ar azido grupėmis, arba  $R^D$  ir  $R^F$  kartu sudaro alkilidino grupę).

20 Geriau, kai ir  $R^A$ , ir  $R^{A'}$  reiškia vandenilį, taip, kad -A yra grupė  $-CH_2-Z$ .

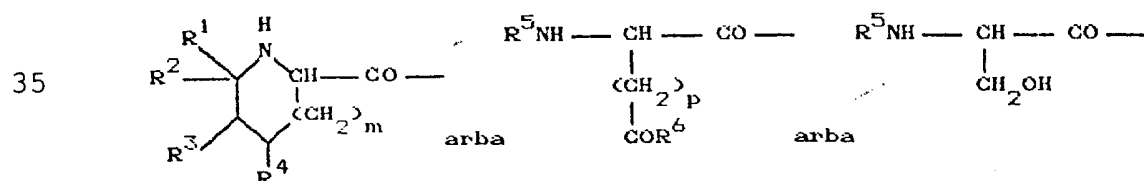
Bet koks viengrandis peptidas, kuris rodo hemoreguliacinį poveikį, yra tinkamas kaip peptidas, pakeistas pagal šį išradimą.

25

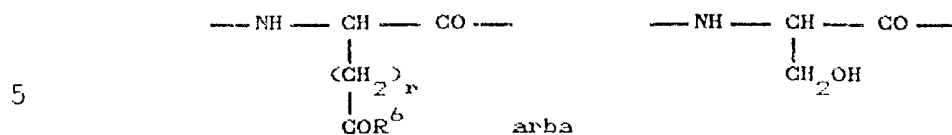
Alternatyviai išreikštas, išradimas pateikia junginius pagal šį išradimą, kuriame minėto hemoreguliacinio peptido grandinė apima grandines pagal formulę:



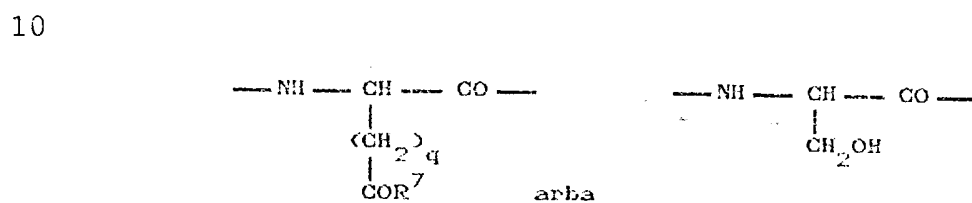
kurioje  $R^a$  reiškia



R<sup>b</sup> reiškia

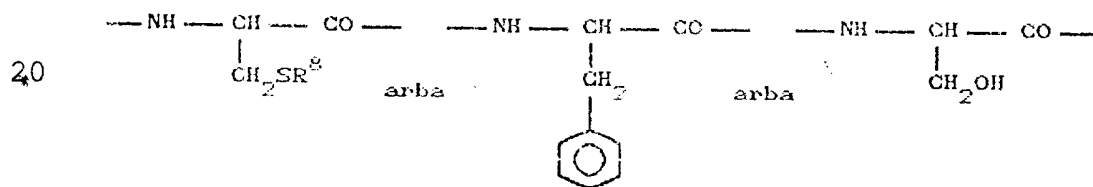


R<sup>c</sup> reiškia



15

R<sup>d</sup> reiškia

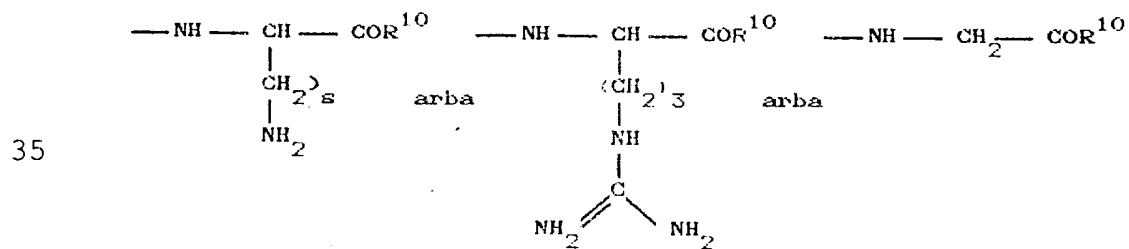


R<sup>e</sup> reiškia



30

R<sup>f</sup> reiškia



(kurioje

n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

5 p, q ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2;

s reiškia 3 arba 4;

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

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

15  $R^5$  yra vandenilis arba acilo grupė;

kiekvienas  $R^6$  ir  $R^7$  nepriklausomai reiškia hidroksilo grupę arba amino grupę, bet tinkamesnės yra hidroksilo grupės;

20  $R^8$  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;

25  $R^9$  reiškia vandenilį arba metilo grupę; ir

30  $R^{10}$  reiškia hidroksilo arba pakeistą ar nepakeistą amino grupę, aminorūgšties glutamino liekaną arba peptidą, turintį N-galinį glutamino fragmento ir jų druskas.

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

35 Kur yra N-galinė apsauganti grupė  $R^5$ , tai gali būti, kaip pažymėta aukščiau, acilo grupė, turinti 1-20 ang-

lies atomų, pvz., žemesniojo alkanolio grupė, turinti 1-5 anglies atomus, tokia kaip acetilo grupė, arba aroilo ar aralkanoilo grupė, turinti nuo 7 iki 20 anglies atomų, tokia kaip benzoilo arba fenilacetato grupė.

$R^5$  gali taip pat būti acilo grupė, išvesta iš amino rūgšties arba peptidinės 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 aminorūgštis:

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

Yra geriau, kai bendro (I) formulės peptido galinė amino grupė yra apsaugota, pvz., aciliniu su alkanolio, aralkanoilo arba aroilo grupe.

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 kaip benzilas, difenilmetilas arba trifenilmetilas. Kur  $R^8$  yra metaboliškai labili grupė, tai gali, pvz., būti ariltio grupė, turinti nuo 5 iki 10 anglies atomų, pvz., piridiltio grupė arba acilo grupė, kaip apibrėžta aukščiau.

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

30

Geriau, kai ciklinės grupės  $R^a$  liekanoje yra penkinarės, t.y. m yra geriau 0.

Nors bet kuris iš peptidų, apibrėžtų (I) formule aukščiau, yra žemo arba nereikšmingo hemoreguliacinio aktyvumo, nepaisant to, jie gali būti efektyvūs peptidinio

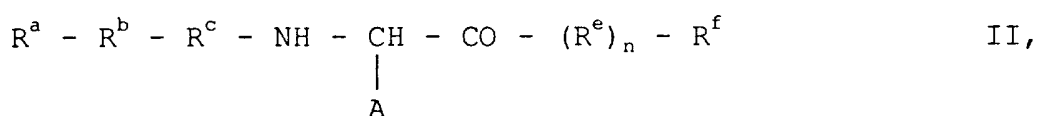
35

junginio darinyje pagal šį išradimą, inhibuojant ląstelių proliferaciją.

5 Peptidinio junginio dariniuose, suformuotuose iš peptidinės grandinės pagal I formulę, grandinės pakaitalas turi būti ties  $R^d$ .

Ypač tinkami peptidinio junginio dariniai pagal šį išradimą yra II formulės dariniai:

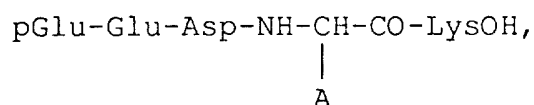
10



15 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 grupės  $-A$  tokiu būdu, kad jos natyvios šoninės grandinės nėra. Išradimas taip pat apima II formulės junginius, kuriuose A  
20 kartu su jos gretima  $-N-CH-CO-$  grupe sudaro prolino liekaną.

Vienas ypač tinkamas peptidinis II formulės junginys yra

25



30 kurioje grupė  $-A$  yra grupė, kaip aptarta aukščiau.

Šio išradimo peptidinių darinių sugebėjimas inhibuoti visos eilės ląstelių proliferaciją ar net pašalinti hemopoetinę sistemą yra labai vertingas medicinai arba  
35 kai reikia gydyti pernelyg stiprią ląstelių proliferaciją, kaip psoriazės atveju, arba kai atrodo, kad vėžio terapija pažeis tam tikrą ląstelių populiaciją. Daugelis ląstelių tipų yra ypač jautrūs citotoksiniams

- vaistams arba radiacijai, panaudotai priešvėžinėje terapijoje, ir vienas iš žinomų metodų yra panaudoti vaistą inhibuoti ląstelių -tokių kaip hemopoetinės sistemos-proliferaciją priešvėžinės terapijos metu, o
- 5 pasibaigus inhibuojančio vaisto veikimui, normali proliferacija atsinaujina. Šio išradimo peptidai turi tinkamą tokiai terapijai trumpą biologinį gyvenimo pusperiodį. Panašiai tam tikrų ląstelių populiacijų, jautrių vėžio terapijai, proliferacija gali būti inhi-
- 10 buota kartu su vėžinėmis ląstelėmis, ir antivėžinė terapija yra pradedama tik tada, kai vėžinės ląstelės jau pasiekusios jautrią proliferacijos fazę, tuo tarpu kai normalios ląstelės yra mažiau jautrioje fazėje.
- 15 Vienas ląstelių proliferacijos tipas pasitaiko tada, kai tokios ląstelės, kaip kaulų čiulpų ląstelės, fagocitai ar granulocitai, terapijos metu yra stimuliuojamos KSF vaistais. Tokių ląstelių augimo inhibicija gali atstatyti normalius jų augimo greičius.
- 20 Daugelio autoimuninių ligų metu subjektas gamina aktyvius leukocitus prieš savo audinius. Inhibuojant leukocitų funkciją, bent jau kuriam laikui tokios autoimuninės reakcijos gali būti atitinkamai susilpnintos.
- 25 Kitas klinikinis pritaikymas bus kombinacijoje su atitinkamais dimerais arba susietas mielopoezės stimulatoriais, kaip atskleista WO-A-88/03535 indukuoti alternatyviu aukšto ir žemo aktyvumo pikus kaulų čiulpų ląstelėse, taip sustiprinant natūralų hemopoezės cik-
- 30 kadinį ritmą. Tuo būdu citostatinė terapija gali būti suteikta žemo kaulų čiulpų aktyvumo periodais, taip sumažinant kaulų čiulpų pažeidimo riziką, tuo tarpu regeneracija bus pagreitinta po to einančiu aktyvumo
- 35 piko pakilimu.

Apskritai tam, kad būtų sukeltas inhibicinis efektas, šio išradimo peptidai gali būti paskirti pacientams vartoti per burną ar injekcijomis dozėmis, svyruojančiomis tarp 0.001-100 mg, pvz., 1-5 mg 70 kg kūno svorio per dieną. Paskyrus intravenines arba paodines injekcijas, dozė gali svyruoti 1-10 mg 70-kg kūno svorio per dieną, pvz., apie 6 mg, iki 10 dienų. Paskyrimai per nosį, per odą ar per tiesiąją žarną taip pat galimi. Iš esmės pageidautina sudaryti maždaug nuo  $10^{-13}$  M iki  $10^{-5}$  M peptido koncentraciją nelasteliniam paciento skystyje.

Pagal tolesnį šio išradimo požymį yra pateikiamos farmacinės kompozicijos, turinčios kaip aktyvią komponentę vieną ar daugiau peptidinio junginio darinių, kaip čia apibūdinta anksčiau, arba fiziologiškai suderinamų jų druskų kartu su farmaciniu nešikliu arba užpildu. Mišiniai pagal šį išradimą gali būti pateikti, pvz., pavidalu, tinkamu oraliniam, nazaliniam, parenteraliniam arba rektaliniam paskyrimui.

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

Junginiai pagal šį išradimą gali būti įprastų vaistų formų, tokių kaip tabletės, apvilktos tabletės, aerozoliai nosiai, tirpalai, emulsijos, milteliai, kapsulės 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 krakmolai arba algininė rūgštis, rišikliais, tokiais kaip krakmolai arba želatinas, tepalais, tokiais kaip magnio stearatas arba talko milteliai, ir/arba agentais ilga-

laikio atpalaidavimo gavimui, tokiais kaip karboksipolimetilenas, karboksimetilceliuliozė, celiuliozės acetato ftalatas arba polivinilacetatas.

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

Organinės specifinės nešiklių sistemos gali būti panaudotos taip pat.

- 20 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.
- 25

- 30 Nazaliniai aerosoliai gali būti sudaryti 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, tokiais kaip laktozė arba sorbitolis, ir užpildant mišinį į želatino kapsules.
- 35

Tinkamos žvakutės gali, pvz., būti pagamintos, sumaišant aktyvią komponentę arba aktyvių komponentių kom-

binacijas su įprastais nešikliais, numatytais šiam tikslui, tokiais kaip natūralūs riebalai arba polietilenglikolis ar jo dariniai.

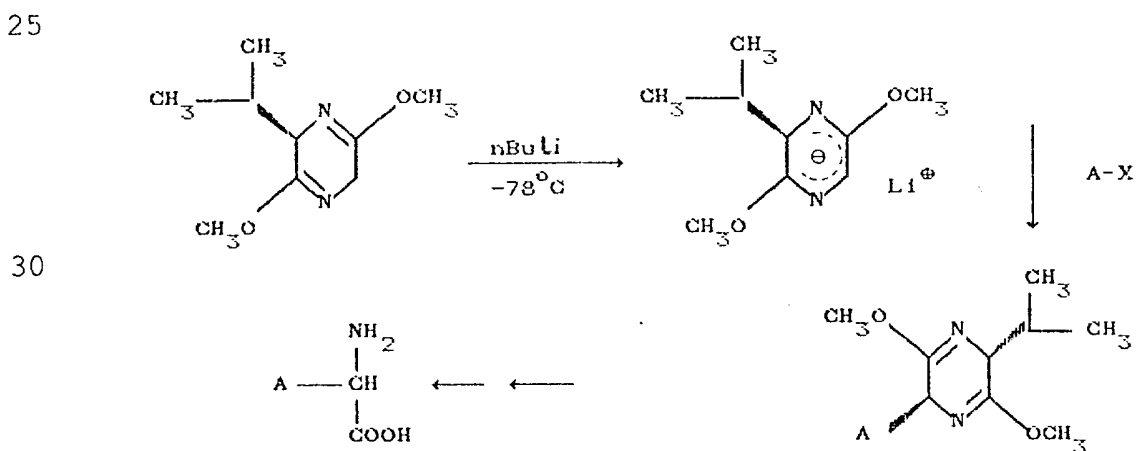
- 5 Tinkami dozavimo vienetai, turintys savyje šio išradimo junginius, turi 0.1-10 mg, pvz., 1-5 mg (I) formulės peptido arba jo druskos.

10 Šis išradimas apima peptidinius junginius ir mišinius, išaiškintus aukščiau, naudojimui ląstelių dalijimosi, ypač mielopoezės ir kaulų čiulpų ląstelių regeneracijos, inhibicijai. Peptidinių junginių pagal šį išradimą panaudojimas vaistų gamyboje ląstelių dalijimosi, tokio kaip mielopoezė ar kaulų čiulpų regeneracija, inhibicijai taip pat sudaro tolimesnį šio išradimo aspektą.

20 Tolimesnis svarbus naujų peptidinių junginių darinių pritaikymas yra medžiagų, tinkančių imunologinių tyrimų metodams gamybai. Peptidas tuomet gali būti kovalentiškai prijungtas prie tinkamo stambiamolekulinio nešiklio kaip albuminas, polilizinas arba poliprolinas, tam, kad būtų suleistas antikūnus produkuojantiems gyvūnams (pvz., triušiams, jūrų kiaulytėms ar ožkoms). In  
25 vitro imunizacijos metodai taip pat gali būti panaudoti. Aukšto specifiškumo antiserumai yra gauti, panaudojant gerai žinomus absorbcijos metodus, naudojant stambiamolekulinius nešiklius. Įvedant radioaktyvumą ( $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) į peptido molekulę, gali  
30 būti suprojektuotas radioimuninis tyrimas ir panaudotas peptido nustatymui įvairiuose biologiniuose skysčiuose, tokiuose kaip serumas (plazma), šlapimas ir cerebrospinalinis skystis.

35 Išradimo peptidai gali būti sintezuoti bet koku patogiu būdu. Tinkami metodai aminorūgščių liekanų formavimui yra aprašyti, pav., Robert. M. Williams

- "Synthesis of Optically Active  $\alpha$ -Amino Acids" (Pergamon Press, 1989). Apskritai esančios reaguojančios šoninės grandinės grupės (amino, tiolo ir/arba karboksilo) bus apsaugotos bendros sintezės prijungimo reakcijų metu, bet įmanoma palikti keletą šoninių grandinių neapsaugotų (hidroksilo grupes, imidazolo grupes, pirmines amido grupes, amido grupes ciklinėse aminorūgštyse, kaip piroGlu).
- 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 sintezę bis-laktimo eterių metalinimu ir po to alkiliniu (žiūr., pvz., Tetrahedron 39: (1983) ir Topics Curr. CHEM., 109: 65 (1983). Šio metodo pritaikymas pasirodė ypač naudingas pakeistų aminorūgščių, kurios sudaro išradimo pagrindą, sintezę. Konkrečiai, bis-laktimo eteris, išvestas iš valino-glicino dipeptido, sudaro naudingą pradinį junginį pakeitimo reakcijai, kuri gali būti susumuota taip:



(kurioje X yra paliekanti grupė, pvz., bromo atomas).

(S)  $\alpha$ -Aminorūgšties dariniai gali būti gauti šiuo būdu, jei D-valinas yra pradžioje panaudotas bis-laktimo eterio sudarymui. Taip pat (R)- $\alpha$ -aminorūgšties dariniai gali būti sudaryti, panaudojant L-valiną.

5

Tokiu būdu, šis išradimas taip pat pateikia būdą peptidinio junginio pagal šį išradimą gamybai, apimančią jo pilnai ar dalinai apsaugoto darinio blokavimą.

10 Šis išradimas toliau pateikia būdą peptidinio junginio pagal šį išradimą gamybai, apimančią

a) bis-laktimo eterio metalinimą ir po to einanti alkilimą bis-laktimo dipeptido eterio suformavimui;

15

b) (a) stadijos bis-laktimo dipeptido eterio hidrolizę gauti  $\text{NH}_2\text{-CH(A)-COOH}$  formulės aminorūgštį, kur A yra kaip nurodyta aukščiau,

20

c) likusių aminorūgščių įvedimą į peptidinę grandinę; ir

d) bet kurios apsaugotos grupės deblokavimą.

25

Pakeisti bis-laktimo dipeptido eteriai ir pakeista  $\alpha$ -amino rūgštis, pagaminti šiuo metodu, sudaro tolimesni šio išradimo aspekta.

30

Be to, šis išradimas taip pat apima amino-apsaugotus, hidroksilo apsaugotus ir/arba karboksilo apsaugotus šio išradimo peptidinius darinius.

35

Sudarius kartą pakeistą  $\alpha$ -amino rūgštį, likusios amino rūgštys į peptidinę grandinę gali būti įvestos, naudojant įprastus metodus.

Formuojant peptidines grandines, galima iš principo pradėti arba nuo C-galo, arba nuo N-galo, nors tik C-galinio pradėjimo būdas yra visuotinai priimtas.

- 5 Tokiu būdu galima pradėti C-gale tinkamai apsaugoto pirmos aminorūgšties darinio reakciją su apsaugotu antrosios aminorūgšties dariniu. Pirmosios aminorūgšties darinys turės laisvą  $\alpha$ -amino grupę, tuo tarpu kitas reagentas turės arba laisvą, arba aktyvuotą karboksilo grupę ir apsaugotą aminogrupę. Po sujungimo, 10 tarpinis produktas gali būti išgrynintas, pvz., chromatografija, ir tada N-deblokuojamas tam, kad leistų tolesnės N-apsaugotos ir laisvos arba aktyvuotos aminogrupės liekanos prijungimą. Šis procedūra yra tęsiama, kol reikiama aminorūgščių seka yra užbaigiama. 15

- Karboksiliniai rūgščių aktyvuojantys pakaitalai, kurie gali, pav., būti panaudoti, apima simetrinius arba mišrius anhidridus, arba aktyvuotus esterius, tokius kaip, 20 pvz., p-nitrofenilo esteris, 2,4,5, - trichlorofenil-esteris, N-hidroksibenzotriazolo esteris (OBt), N-hidroksisukcinimidilesteris (OSu) arba pentafluorofenilesteris (OPFP).

- 25 Laivų amino ir karboksilo grupių sujungimas gali būti, pvz., atliktas, panaudojant dicikloheksilkarbodiimidą (DCK). Kitas sujungiantis faktorius, kuris pvz., gali būti panaudotas, yra N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrochinolinas (EEDQ).

- 30 Apskritai, yra patogų atlikti prijungimo reakcijas žemose temperatūrose, pvz., nuo  $-20^{\circ}\text{C}$  iki kambario temperatūros, patogiai tinkamoje tirpiklio sistemoje, pvz., tetrahidrofurane, dioksane, dimetilformamide, metileno chloride arba šių tirpiklių mišinyje. 35

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

Eilė tinkamų kietos fazės metodų yra aprašyta Eric Atherton, Christopher J. Logan, and Robert C. Sheppard, J. Chem. Soc. Perkin I, 538-46 (1981); James P. Tam, 10 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).

15

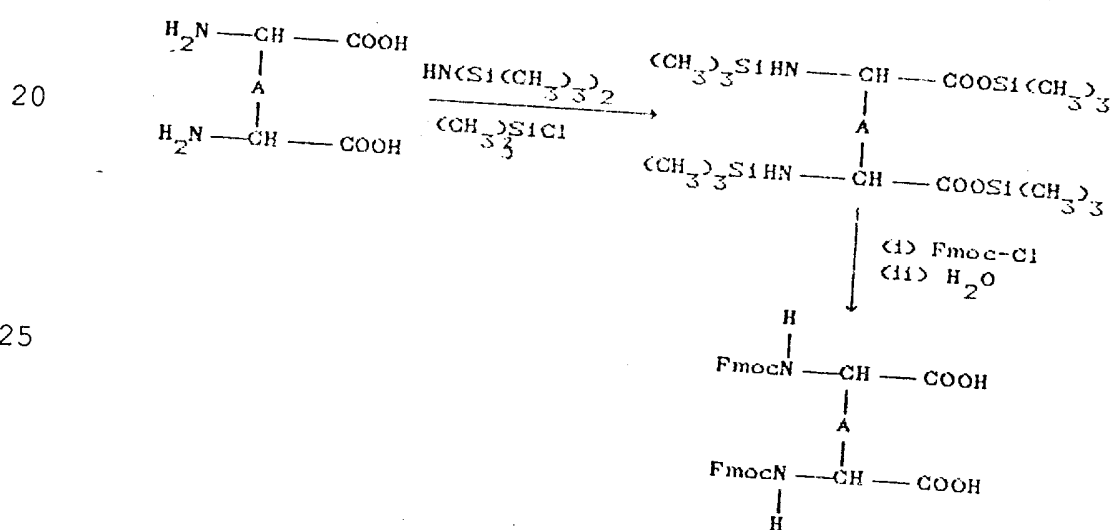
Prijungimo reakcijos taip pat gali būti atliktos tirpale.

Yra žinomas platus apsauginių grupių aminorūgštims pasirinkimas ir pateikta pavyzdžių Schroder. E. and 20 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, 25 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 Francisco, London; Solid phase peptide synthesis 2nd 30 ed., John M. Stewart, Janis D. Young. Pierce Chemical Company.

Tuo būdu, pvz., amino apsauginės grupės, kurios gali būti panaudotos, apima apsaugines grupes, tokias kaip 35 karbobenzoksi (Z-), t-butoksikarbonilas (Boc-), 4-metoksi-2,3,6-trimetilbenzeno sulfonilas (Mtr-) ir 9-fluorenilmetoksikarbonilas (Fmoc-). Bus suprantama, kad kai

peptidas sudarytas nuo C-galo, amino apsauginė grupė bus kiekvienos naujos pridedamos liekanos  $\alpha$ -amino grupėje ir ją reikės pašalinti selektyviai prieš kitą jungimo stadiją. Kietos fazės sistemoms viena ypač naudinga grupė tokiai laikinai amino apsaugai yra Fmoc-grupė, kuri gali būti pašalinta selektyviai, paveikiant piperidinu organiniame tirpiklyje. Sintzei tirpale Boc- yra tinkamesnė apsauginė grupė, kuri gali būti išvesta ir pašalinta įprastu būdu.

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



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.

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

5 Bus suprantama, kad egzistuoja daug kitų tokių grupių, kaip, pvz., smulkiai aprašyta aukščiau nurodytoje literatūroje, ir visų tokių grupių panaudojimas čia aukščiau aprašytuose procesuose įeina į šio išradimo sritį.

10 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  $\alpha$ -amino apsaugines  
15 grupes 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., trifluoroacto rūgštimi. Tiolo apsauginės grupės, tokios kaip  
20 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.  
30

## 1 PAVYZDYS

(S)-2-(9-Fluorenilmetoksikarbonilamino)-5-fenil-4-(E)-penten-1-o rūgštis

5

(S)-2-Amino-5-fenil-4-(E)-penten-1-oinė rūgštis susintetinta iš (R)-(-)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino ir cinamilo bromido analogiškai metodikai, aprašytai U. Schollkopf, U. Groth and C. Deng, Angew. Chem. 93 (1981) 793. Aminorūgštis (4.0 mmol), gauta tokiu būdu, yra pridedama į heksametildisilizano (15 ml) ir trimetilchlorsilano (2.0 ml) mišinį, mišinys per naktį šildomas 100°C temperatūroje, maišant N<sub>2</sub> atmosferoje. Tada sililinančio reagento perteklius nudistiliuotas, likutis ištirpintas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml), pridėta 9-fluorenilmetoksikarbonilo chlorido (4,1 mmol) tirpalo sausame CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), mišinys maišytas kambario temperatūroje azoto atmosferoje 3 valandas, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> išgarintas, likutis ištirpintas THF (9 ml) ir vandenyje (1 ml), tirpalas 30 minučių maišytas, nugarintas, likutis ištirpintas EtOAc, išdžiovintas (MgSO<sub>4</sub>) ir nugarintas, kad būtų gautas pavadinimo junginys tolimesnei peptido sintezei.

25

## 2 PAVYZDYS

(2S,4R,5R)-N-9-Fluorenilmetiloksikarbonil-N'-benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-O,O-izopropilidenlizinas

30

a) (2R,3R)-1-Brom-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas

35

(2R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas (3,24 g, 17,36 mmol) ištirpintas 60 ml bevandenio THF ir tirpalas atšaldytas iki -78°C. Buvo pridėta BuLi tirpalo heksane (10,85 ml, 17,36 mmol), ir tirpalas

30 minučių maišomas. Pridėjus 7.8 ml 1,3-dimetil-2-imidazolidinono, maišymas tęsiamas dar 15 minučių. Buvo sulašintas (2R,3R)-1,4-dibrom-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutano (5.0 g, 17,36 mmol) tirpalas 10 ml THF, ir tirpalas per naktį įgijo kambario temperatūrą. Po hidrolizės fosfato buferiu (pH 7), reakcijos mišinys keletą kartų ekstrahuotas dietilo eteriu, organiniai tirpalai išdžiovinti ( $\text{MgSO}_4$ ), sukonzentruoti, o likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1).

Išeiga: 3.00 g (44.1%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

0.7 (d, 3H), 1.04 (d, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.95-2.30 (m, 3H), 3.40-3.58 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.97 (dd, 1H), 4.03-4.20 (m, 3H);

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

16.74, 19.03, 27.29, 27.46, 31.88, 32.66, 37.83, 52.40, 52.42, 52.55, 60.76, 79.80, 109.22, 163.21, 164.00

FAB-MS signalai prie m/z 391.2(72), 141.1(100).

**b) (2R,3R)-1-Azido-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas**

30

(2R,3R)-1-Brom-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas (5.51 g, 14.11 mmol) ištirpintas 50 ml DMF ir 2.93 g  $\text{NaN}_3$  (45 mmol), ir pridėta 0.1 g  $\text{NBu}_4\text{I}$ . Tirpalas per naktį laikytas tarp 70 ir 80°C ir praskiestas 50 ml vandens. Po ekstrakcijos chloroformu, organiniai sluoksniai surinkti ir išdžiovinti ( $\text{MgSO}_4$ ).

Likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 7/3).

Išeiga: 4.06 g (81.5%).

5

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

0.68 (d, 3H), 1.03 (d, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.42 (s, 3H),  
1.95-2.30 (m, 3H), 3.20-3.80 (m, 2H), 3.65 (s, 3H),  
10 3.68 (s, 3H), 3.95 (dd, 1H), 4.00-4.15 (m, 3H);

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

16.72, 19.02, 26.92, 27.27, 31.85, 52.10, 52.36, 52.41,  
15 52.47, 60.70, 75.09, 109.13, 163.17, 164.00

FAB-MS signalai prie  $m/z$  354.3(100), 141.1(75).

c) (2R,3R)-1-Benziloksikarbonilamino-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas

(2R,3R)-1-Azido-4-((2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil)-2,3-dihidroksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas (3.57 g, 10.12 mmol) ištirpintas 60 ml EtOH ir pridėta 1.3 g Pd/C. Į tirpalą pučiamas argonas. Per tirpalą buvo perleistas vandenilis, ir jis per naktį išlaikytas vandenilio atmosferoje ir perfiltruotas per celitą. Likutis išdžiovintas vakuumu ir ištirpintas 30 ml dioksano. Buvo pridėta 15 ml 1 M  $\text{NaHCO}_3$  tirpalo (15 mmol) ir  $0^\circ\text{C}$  temperatūroje pridėta 1.84 ml CbzCl (13 mmol). Tirpalas 1 valandą maišytas šioje temperatūroje, praskiestas vandeniu ir ekstrahuotas chloroformu. Likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 8/2).

35

Išeiga: 2.20 g (44.1%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

0.67 (d, 3H), 1.03 (d, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.38 (s, 3H),  
1.90-2.05 (m, 1H), 2.10-2.30 (m, 2H), 3.30-3.55 (m,  
5 2H), 3.64 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.92-4.15 (m, 4H),  
5.09 (s, 2H), 5.45 (m, 1H), 7.26-7.38 (m, 5H);

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

10 16.70, 19.05, 27.17, 31.83, 37.69, 42.94, 52.26, 52.41,  
52.52, 60.65, 66.72, 75.69, 79.41, 108.61, 128.02,  
128.07, 128.47, 136.54, 156.40, 163.24, 164.11.

FAB-MS signalai prie m/z 462.3(56), 141.1(47),  
15 91.0(100).

$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$  (461.6): Pask. %: C, 62.45; H, 7.64; N, 9.10.

Rasta %: C, 62.99; H, 7.67; N, 8.77.

d) (2S,4R,5R)-N'-Benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-  
20 O,O-izopropilidenlizino metilo esteris

(2R,3R)-1-Benziloksikarbonilamino-4-[(2R,5S)-3,6-dime-  
toksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-2,3-dihid-  
roksi-2,3-O,O-izopropilidenbutanas (0.5 g, 1.08 mmol)  
25 ištirpintas 5 ml dioksano, įlašinta 4.20 ml 0.5 M HCl  
(2.10 mmol), ir mišinys maišomas argono aplinkoje  
kambario temperatūroje 5 valandas. Buvo pridedama amo-  
niako tirpalo, kol buvo pasiektas pH 9, ir tirpalas po  
to ekstrahuotas chloroformu, išdžiovintas ( $\text{MgSO}_4$ ), ir  
30 valino metilo esteris pašalintas distiliacija iš kolbos  
(0.05 torų,  $25^\circ\text{C}$ ).

Išeiga: 0.40 g (100%).

35  $^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

1.35 (s, 6H), 1.70-2.20 (m, 4H), 3.20-3.60 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.73-3.90 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.32 (m, 1H), 7.26-7.40 (m, 5H).

5  $^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

27.01, 27.05, 37.56, 42.11, 51.99, 52.38, 66.79, 75.79, 79.82, 108.99, 128.00, 128.44, 136.39, 156.46, 175.30.

10 (2S,4R,5R)-N'-Benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-O,O-izopropilidenlizinas

(2S,4R,5R)-N'-Benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-O,O-izopropilidenlizino metilo esteris (0.40 g, 1.08 mmol) ištirpintas 3.5 ml vandens ir 4 ml dioksano ir atšaldytas iki 0°C. Buvo pridėta 0.54 ml 2 N LiOH tirpalo (1.08 mmol), ir tirpalas buvo per naktį maišomas argono aplinkoje. PSC kontrolė parodė kiekybinį (2S,4R,5R)-N'-benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-O,O-izopropilidenlizino susidarymą. Šis nevalytas tirpalas buvo tiesiai panaudotas kitoje stadijoje.

(2S,4R,5R)-N'-Fluorenilmetiloksikarbonil-N'-benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-O,O-izopropilidenlizinas

25

1.5 ml 1 M NaOH tirpalo (2.5 mmol) ir 0.518 g 9-fluoreniloksikarbonilchlorido (2.00 mmol) tirpalas 3 ml dioksano pridėtas į nevalytą (2S,4R,5R)-N'-benziloksikarbonil-4,5-dihidroksi-4,5-izopropilidenlizino tirpalą, ir šis mišinys maišytas per naktį. Tirpalas parūgštintas iki pH 2, pridedant  $\text{KHSO}_4$  tirpalo, ekstrahuotas etilo acetatu, išdžiovintas ( $\text{MgSO}_4$ ), ir šis išgrynintas impulsine chromatografija (chloroformas/MeOH 8/2).

35

Išeiiga: 310 mg (50.0%).

<sup>1</sup>H BMR (DMSO/D<sub>2</sub>O) δ:

1.19 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.60-2.10 (m, 2H), 2.90-3.30 (m, 2H), 3.50-4.00 (m, 3H), 4.00-4.40 (m, 3H),  
5 4.95 (s, 2H), 7.20-8.00 (m, 13H).

<sup>13</sup>C BMR (DMSO/D<sub>2</sub>O) δ:

27.59, 27.81, 37.14, 43.15, 53.94, 65.92, 66.01, 76.98,  
10 80.16, 108.40, 120.61, 125.67, 125.79, 127.66, 128.16,  
128.22, 128.32, 128.89, 137.55, 141.18, 144.36, 156.14,  
156.87, 176.09.

FAB-MS signalai prie m/z 497.1(3), 429.1(3), 179.1(31),  
15 91.0(64)

C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (574.6): Pask. %: C, 66.89; H, 5.96; N, 4.88.

Rasta %: C, 62.53; H, 5,60; N, 5.03.

### 3 PAVYZDYS

20

**(S)-2-(9-Fluorenilmetiloksikarbonilamino)-6-azidoheksano rūgštis**

a) **1-Brom-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil-butan**  
25 **as**

(2R)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazinas  
(3.76 g, 20.43 mmol) ištirpintas 60 ml bevandenio THF,  
ir tirpalas atšaldytas iki -78°C. Buvo pridėta nBuLi  
30 tirpalo heksane (20.43 mmol, 12.77 ml), ir tirpalas  
maišomas 30 minučių. Buvo sulašintas 1,4-dibrombutano  
(4.41 g, 20.45 mmol) tirpalas 10 ml THF, ir per naktį  
tirpalas įgijo kambario temperatūrą. Po hidrolizės  
fosfato buferiu (pH 7), reakcijos mišinys keletą kartų  
35 ekstrahuotas dietilo eteriu, organinis tirpalas iš-  
džiovintas (MgSO<sub>4</sub>), o likutis išgrynintas impulsine  
chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1).

Išeiga: 3.88 g (59.6%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

5 0.68 (d, 3H), 1.04 (d, 3H), 1.23-1.47 (m, 2H), 1.63-1.91 (m, 4H), 2.25 (m, 1H), 3.38 (t, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.90-4.05 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

10

16.58, 19.03, 23.29, 31.75, 32.63, 33.13, 33.58, 52.33, 55.13, 60.78, 163.60.

15 **b) 1-Azido-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-butanas**

1-Bromo-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-butanas (3.81 g, 11.95 mmol) ištirpintas 40 ml DMF ir 3.25 g  $\text{NaN}_3$  (50 mmol), ir pridėta 20 0.1 g  $\text{NBu}_4\text{I}$ . Tirpalas per naktį laikytas tarp 70 ir 80°C ir praskiestas 50 ml vandens. Po ekstrakcijos chloroformu, organiniai sluoksniai surinkti ir išdžiovinti ( $\text{MgSO}_4$ ). Likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas 9/1).

25

Išeiga: 2.17 g (64.6%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

30 0.68 (d, 3H), 1.04 (d, 3H), 1.20-1.50 (m, 2H), 1.53-1.91 (m, 4H), 2.26 (m, 1H), 3.25 (t, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.90-4.07 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

35

16.58, 19.05, 21.83, 28.72, 31.76, 33.56, 51.32, 52.35, 55.16, 60.79, 163.63.

**c) Metil (S)-2-amino-6-azidoheksanoatas**

1-Azido-4-[(2R,5S)-3,6-dimetoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]-butanas (2.17 g, 7.72 mmol) ištirpintas 30 ml dioksano ir buvo sulašintas 1.28 ml konc. HCl tirpalas 30 ml vandens (15.45 mmol), mišinys argono aplinkoje per naktį buvo maišomas kambario temperatūroje. Buvo dedama amoniako tirpalo, kol pasiekta pH 9, po to tirpalas ekstrahuotas chloroformu, išdžiovintas ( $\text{MgSO}_4$ ), ir valino metilo esteris pašalintas distiliacija iš kolbos į kolbą (0.05 torų, 25°C).

Išeiga: 1.44 g (100%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

1.40–1.87 (m, 8H), 3.28 (t, 2H), 3.43 (dd, 1H), 3.73 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

22.93, 28.63, 34.36, 51.22, 51.98, 54.26, 176.37.

**d) (S)-2-Amino-6-azidoheksano rūgštis**

25

Metil-(S)-2-amino-6-azidoheksanoatas (1.44 g, 7.73 mmol) ištirpintas 4 ml dioksano ir atšaldytas iki 0°C. Buvo pridėta 3.87 ml 2N LiOH tirpalo (7.74 mmol), ir tirpalas buvo maišomas per naktį azoto aplinkoje. PSC (plonasluoksnės chromatografijos) kontrolė parodė kiekybinį (S)-2-amino-6-azidoheksano rūgšties susidarymą. Šis nevalytas tirpalas buvo panaudotas kitoje stadijoje.

e) (S)-2-(9-Fluorenilmetiloksikarbonilamino)-6-azido-heksano rūgštis

11.6 ml 1N NaHCO<sub>3</sub> tirpalo (11.6 mmol) ir 3.00 g 9-fluoreniloksikarbonilchlorido (11.6 mmol) tirpalo 12 ml dioksano buvo pridėta prie nevalyto (S)-2-amino-6-azido-heksano rūgšties (7.73 mmol) tirpalo ir toliau per naktį maišoma argono aplinkoje. Tirpalas parūgštinamas iki pH 2, pridedant KHSO<sub>4</sub> tirpalo, ekstrahuotas etilo acetatu, išdžiovintas (MgSO<sub>4</sub>), ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 7/3/0.5).

Išeiga: 2.0 g (65.6%).

<sup>1</sup>H BMR (DMSO) δ:

1.20-1.80 (m, 2H), 3.31 (t, 2H), 3.94 (m, 1H), 4.27 (m, 3H), 7.20-8.00 (m, 8H).

<sup>13</sup>C BMR (DMSO) δ:

23.32, 28.26, 30.73, 47.10, 50.94, 54.09, 66.01, 120.48, 125.65, 127.44, 128.02, 141.11, 144.19, 144.25, 156.54, 174.22.

#### 4 PAVYZDYS

(S)-N-(9-Fluorenilmetiloksikarbonil)-O-metil-serinas

a) (2R,5S)-3,6-dimetoksi-5-(metoksimetil)-2-izopropil-2,5-dihidropirazinas

I (R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-pirazino (5.53 g, 30 mmol) tirpalą bevandeniame THF (80 ml) -78°C temperatūroje pridėta 1.6 M nBuLi tirpalo heksane (10.85 ml, 17.36 mmol). Po 30 minučių sulašintas bro-

mometilo eterio tirpalas (4.5 g, 36 mmol) THF-e. (20 ml). Reakcijos mišiniui per naktį leista įgyti 20°C temperatūrą, ir jis buvo užgesintas, pridėjus 1 M fosfato buferio (pH 7, 80 ml). Drumstas mišinys maišomas 10 minučių, praskiestas vandeniu (250 ml) ir dietilo eteriu (180 ml). Sluoksniai atskirti, o vandeninė fazė ekstrahuota dietilo eteriu (2 x 150 ml). Sujungtas organinis sluoksnius išdžiovintas ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sukonzentruotas ir išgrynintas impulsine chromatografija (silikagelis; heksanas : dietilo eteris 5:1), davė 5.61 g produkto. Kito diastereohero galutinių priemaišų pašalinimui, medžiaga kristalizuota iš acetonitrilo -30°C temperatūroje ir šaltos nuosėdos vėl ištirpintos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , išdžiovintos ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ir sukonzentruotos.

Išeiga: 4.24 g (18.6 mmol, 62%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

4.05 (kv, 1H, J 3.5 Hz), 3.99 (t, 1H, J 3.5 Hz), 3.80-3.64 (m, 8H), 3.34 (s, 3H), 2.29 (d sept, 1H, J 3.5, 7.0 Hz), 1.05 (d, 3H), 0.68 (d, 3H).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

164.79, 161.58, 74.13, 60.76, 59.51, 56.82, 52.42.

FAB-MS signalai prie m/z 229 [ $\text{M}^+ + 1$ ].

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$  (228.29).

**b) Metil (S)-2-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-3-metoksipropionatas**

I (2R,5S)-3,6-dimetoksi-5-(metoksimetil)-2-izopropil-2,5-dihidropirazino (2.1 g, 9.2 mmol) tirpalą dioksane (18 ml) pridėta 1 M HCl (18.4 ml, 18.4 mmol), ir

mišinys per naktį maišomas kambario temperatūroje. La-  
 kūs komponentai išgarinti, likutis vėl ištirpintas di-  
 oksane ir vėl išgarintas. Nevalytas likutis ištirpintas  
 dioksane ir pridėta FmocCl (5.71 g, 2.21 mmol). Po  
 5 2 minučių pridėta 1 M NaHCO<sub>3</sub> (44.2 ml, 44.2 mmol). Po  
 15 minučių mišinys praskiestas vandeniu (50 ml) ir  
 CHCl<sub>3</sub> (100 ml). Sluoksniai atskirti ir vandeninė fazė  
 ekstrahuota CHCl<sub>3</sub> (2 x 75 ml). Sujungtas organinis  
 sluoksnis išdžiovintas (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sukonzentruotas ir iš-  
 10 grynintas impulsine chromatografija (silikagelis; hek-  
 sanas : etilo acetatas 2:1).

Išeiga: 2.68 g (7.54 mmol, 82%).

15 <sup>1</sup>H BMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ

7.78 (d, 2H, J 7 Hz), 7.63 (t, 2H, J 7 Hz), 7.41 (t,  
 2H, 7Hz), 4.56-4.35 (m, 3H), 4.25 (t, 1H, J 3.0, 9.3  
 Hz), 3.84 (dd, 1H, J 3.0, 9.3 Hz), 3.70 (s, 3H), 3.65  
 20 (dd, 1H, J 3.6, 9.3 Hz), 3.36 (s, 3H).

<sup>13</sup>C BMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ

170.77, 156.01, 143.88, 143.75, 141.25, 127.66, 127.02,  
 25 125.12, 125.07, 119.92, 72.27, 67.11, 59.23, 54.37,  
 53.44, 52.54, 47.12.

c) (S)-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-3-metoksi-  
 propiono rūgštis

30

I metilo (S)-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-3-me-  
 toksipropionato (2.18 g, 6.13 mmol) tirpalą dioksane  
 (31 ml) pridėta 6 M HCl (31 ml, 184 mmol). Mišiniui  
 leista atšalti ir jis buvo koncentruotas. Likutis iš-  
 35 grynintas impulsine chromatografija (silikagelis; hek-  
 sanas : etilo acetatas; acto rūgštis 10:10:1).

Išeiga: 1.91 g (5.60 mol, 91%) po liofilizacijos.

$^1\text{H}$  BMR (DMSO- $d_6$ ): $\delta$

5 7.87 (d, 2H, J 7.5 Hz), 7.74 (d, 2H, J 7.5 Hz), 7.41 (dt, 2H, J 0.6 Hz, 7.5 Hz), 7.31 (dt, 2H, J 0.6 Hz, 7.5 Hz), 4.29-4.19 (m, 4H), 3.65-3.54 (m, 2H), 3.24 (s, 3H).

10  $^{13}\text{C}$  BMR (DMSO- $d_6$ ): $\delta$

172.07, 156.46, 144.23, 144.21, 141.11, 128.03, 127.46, 125.73, 120.48, 71.80, 66.19, 58.60, 54.47, 47.05.

15 **5 PAVYZDYS**

**(S)-6-(Benziloksikarbonilamino)-2-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-heks-4-ino rūgštis**

20 **a) 1-Chloro-4-[(2R,5S)-3,6-dietoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5 pirazinil]but-2-inas:**

I (R)-2,5-dihidro-3,6-dietoksi-2-izopropilpirazino (21.23 g, 100 ml) tirpalą/THF (200 ml)  $-78^\circ\text{C}$  temperatūroje su-  
 25 lašinta 1.6 M nBuLi (62.5 ml, 100 mmol). Po 30 minučių šis tirpalas  $-78^\circ\text{C}$  temperatūroje perpiltas į 1,4-dichlorobut-2-ino (49.2 g, 400 mmol) tirpalą THF (400 ml). Mišiniui per naktį buvo leista įgyti  $20^\circ\text{C}$  temperatūrą. Reakcija užgesinta, pridedant 1 M fosfato buferio tir-  
 30 palo (250 ml). Mišinys praskiestas dietilo eteriu (300 ml) ir vandeniu (300 ml). Vandeningis sluoksnis atskirtas ir ekstrahuotas dietilo eteriu (2 x 300 ml). Sujungtas organinis sluoksnis išdžiovintas ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), perfilt-  
 35 ruotas, sukonzentruotas ir išgrynintas impulsine chro-  
 matografija (silikagelis; heksanas:dietilo eteris 10:1).

Išeiga: 24.8 g (83 mmol, 83%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

4.39-4.00 (m, 8H), 2.78 (m, AA'X, 2H), 2.30 (d sept, 1H, J 3.5, 9.5 Hz), 1.38-1.20 (m, 6H), 1.05 (d, 3H, 7Hz), 0.70 (d, 3H, 7Hz).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

161.03, 159.25, 83.78, 60.90, 54.21, 31.68, 30.95, 25.48, 20.62, 19.03, 15.85, 14.21.

**b) 1-Azido-4-[(2R,5S)-3,6-dietoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]but-2-inas**

15 1-(chloro)-4-[(2R,5S)-3,6-dietoksi-2-izopropil-2,5-dihidro-5-pirazinil]but-2-ino (19.4 g, 65 mmol) ir tetrabutylamino jodido (2 g) tirpalas bevandeniame DMF (200 ml) per naktį maišomas 20°C temperatūroje. Didžioji dalis DMF pašalinta sumažintame slėgyje (0.01 torr). Likutis paskirstytas tarp dietilo eterio (250 ml) ir vandens (250 ml). Vandeninis sluoksnis ekstrahuotas eteriu (2 x 250 ml). Sujungtas organinis sluoksnis išdžiovintas ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sukonzentruotas ir išgrynintas impulsine chromatografija (silikagelis; heksanas:dietilo eteris 8:1).

Išeiga: 18.06 g (59 mmol, 91%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

30

4.25-3.99 (m, 4H), 3.84 (m, 6H), 3.84 (m, 2H), 2.83-2.77 (m, AA'X, 2H), 2.33-2.26 (m, 1H), 1.35-1.27 (m, 6H), 1.05 (d, 3H, 7.2 Hz), 0.71 (d, 3H, J 7.2 Hz).

35  $^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

164.24, 161.16, 84.54, 73.50, 61.00, 60.74, 54.31,  
40.20, 31.84, 25.31, 19.03, 16.62, 14.27, 14.21.

5 **c) 1-Benziloksikarbonilamino-4-[(2R,5S)-3,6-dietoksi-  
2,5-dihidro-2-izopropil-5-pirazinil]but-2-inas**

10 Į 1-azido-4-[(2R,5S)-3,6-dietoksi-2-izopropil-2,5-di-  
hidro-5-pirazinil]but-2-ino (3.6 g, 11.8 mmol) tirpalą  
THF (236 ml) 20°C pridėti trifenilfosfinas (3.7 g,  
14.16 mmol) ir H<sub>2</sub>O (680 ml, 37.8 mmol). Iškart paste-  
bėtas N<sub>2</sub> išsiskyrimas. Reakcijos mišinys 2 valandas  
maišomas ir tada koncentruojamas. Prie likučio tirpalo  
dioksane (29 ml) 0°C temperatūroje buvo pridėti 1 M  
NaHCO<sub>3</sub> (14.2 ml, 14.2 mmol) ir Cbz-chloridas (2.42 g,  
15 14.2 mmol). Mišinys laikytas šioje temperatūroje 1 va-  
landa, tada ekstrahuotas dietilo eteriu (3 x 50 ml).  
Sujungtas organinis sluoksnis išdžiovintas (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), per-  
filtruotas, sukcentruotas ir išgrynintas impulsine chro-  
matografija (silikagelis; heksanas:etilo acetatas 4:1).

20

Išeiga: 4.1 g (9.92 mmol, 84%).

<sup>1</sup>H BMR (CDCl<sub>3</sub>):δ

25 7.37-7.33 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.24-4.03 (m, 6H),  
3.97-3.90 (m, 4H), 2.70-2.67 (m, AA'X, 2H), 2.32-2.25  
(m, 1H), 1.27 (t, 4H, J 7 Hz), 1.04 (d, 3H, J 7 Hz),  
0.69 (d, 3H, J 7 Hz).

30 <sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>):δ

164.11, 161.35, 136.31, 128.46, 128.42, 128.05, 127.53,  
126.89, 80.41, 66.85, 65.25, 60.85, 60.69, 60.65,  
54.43, 31.66, 25.32, 19.054, 16.53, 14.29, 14.21.

35

d) Etil (S)-2-Amino-6-(benziloksikarbonilamino)-2-heksinoatas

Į 1-benziloksikarbonilamino-4-[ (2R,5S)-3,6-dietoksi-2,5-dihidro-2-izopropil-5-pirazinil]but-2-ino (4 g, 9.67 mmol) tirpalą dioksane (38 ml) pridėta 1 M HCl (38.7 ml, 38.70 mmol). Šis mišinys per naktį maišytas kambario temperatūroje. Didžioji dalis dioksano pašalinta su mažintame slėgyje, o vandeninis likutis praskiestas vandeniu iki 100 ml. Šis mišinys ekstrahuotas eteriu (100 ml). Tada tirpalo pH buvo sureguliuota iki 9, pridėant koncentruoto  $\text{NH}_3$  iki kol susiformavo baltas aliejus. Šis mišinys ekstrahuotas  $\text{CHCl}_3$  (3 x 50 ml), sujungtas  $\text{CHCl}_3$ -sluoksnius išdžiovintas ( $\text{MgSO}_4$ ), perfiltruotas ir sukonzentruotas. Likutis pajungtas Kugelrohr'o distiliacijai tam, kad būtų pašalintas etilo valinatas  $50^\circ\text{C}$  temperatūroje (0.1 torų). Likusi medžiaga buvo grynas produktas.

20 Išėiga: 2.57 g (8.44 mmol, 87.3%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

25 7.34 (s, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.18 (q, 2H, J 7Hz), 3.96 (m, 2H), 3.57 (t, 1H, J 6 Hz), 2.60 (AA'X, 2H), 1.27 (t, 3H, J 7 Hz).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

30 173.73, 160.35, 136.24, 128.44, 128.10, 128.05, 79.02, 78.66, 66.93, 61.19, 53.22, 31.15, 25.10, 14.15.

e) (S)-6-(Benziloksikarbonilamino)-2-(9-fluorenilmetiloksikarbonilamino)-4-heksino rūgštis

35

Į etilo (S)-2-amino-6-(benziloksikarbonilamino)-4-heksinoato. HCl (520 mg, 1.71 mmol) tirpalą dioksane (5 ml)

5 pridėta 1 M NaHCO<sub>3</sub> (2.05 ml, 2.05 mmol) ir vandens (3 ml). Po 5 valandų pridėta FmocCl (530 mg, 2.05 mmol) dioksane (5 ml). Beveik iš karto susidarė nuosėdos. Šis mišinys parūgštinamas, pridedant 1 M HCl ir ekstrahuotas CHCl<sub>3</sub> (3 x 30 ml). Organinis sluoksnis sukonzentruotas ir išgrynintas impulsine chromatografija (silikagelis; heksanas:etilo acetatas:acto rūgštis 10:10:1).

Išeiga: 720 mg (1.44 mmol, 84.5%).

10

<sup>1</sup>H BMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ

15 7.87 (d, 2H, J 7.5 Hz), 7.71 (d, 2H, J 7.5 Hz), 7.42-7.28 (m, 9H), 5.00 (s, 2H), 4.30-4.20 (m, 3H), 4.10 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.58 (m, 2H).

<sup>13</sup>C BMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ

20 172.41, 156.28, 144.20, 141.10, 137.35, 128.73, 128.21, 128.03, 127.48, 125.68, 120.49, 100.09, 79.37, 79.03, 66.21, 65.93, 53.49, 47.04, 30.63, 21.78.

## 6 PAVYZDYS

25 (S)-2-Amino-3-(2-furil)propiono rūgštis

a) (2R,5S)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-furilpirazinas

30 1.55 M butillio (6.45 ml, 10 mmol) tirpalas heksane švirkštu suleistas į maišomą (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-pirazino (1.84 g, 10 mmol) tirpalą THF (50 ml) -78°C temperatūroje, ir tirpalas 1 valandą buvo maišomas -78°C temperatūroje. Laipsniškai  
35 pridėtas 2-chlorometilfurano (1.3 g, 11 mmol) tirpalas THF (10 ml), ir maišymas buvo tęsiamas per naktį. Tirpiklis sumažintame slėgyje pašalintas, likutis iš-

tirpintas etilo acetate (50 ml) ir ekstrahuotas fosfato buferiu (pH 7). Vandeningė fazė du kartus ekstrahuota etilo acetatu (2 x 20 ml). Organinis sluoksnis išdžiovintas ( $\text{MgSO}_4$ ), tirpiklis sumažintame slėgyje išgarintas ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (dietilo eteris/heksanas 15/1, silikagelis).

Išeiga: 2.00 g (76%), bespalvis klampus skystis.

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

0.65 (d, 3H, J 6.7 Hz), 1.00 (d, 3H, J 6.7 Hz), 2.20 (m, 1H), 3.11 (d, 2H, J 5 Hz), 3.62 (t, 1H, J 3.5 Hz), 3.65 (d, 3H, J 0.9 Hz), 3.70 (d, 3H, J 0.9 Hz), 4.26 (dd, 1H, J 5, J 8.5 Hz), 5.96 (d, 1H, J 3.1 Hz), 6.23 (dd, 1H, J 1.8, J 3.1 Hz), 7.26 (dd, 1H, J 1.0, J 0.8 Hz).

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

16.54, 19.07, 31.43, 33.03, 52.33, 52.41, 54.95, 60.48, 107.10, 110.24, 141.28, 152.27, 162.53, 164.10.

#### b) Metil (S)-2-amino-3-(2-furil)propionatas

(2R,5S)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-furfurilpirazino (2 g, 7.6 mmol), 1 M HCl (7.6 ml, 7.6 mmol) ir dioksano (7.6 ml) mišinys per naktį maišomas  $\text{N}_2$  atmosferoje kambario temperatūroje. Dioksaną pašalinamas sumažintame slėgyje, o vandeningą fazę ekstrahuota dietilo eteriu (20 ml). Į vandeningą fazę iki pH 9 dedamas skystas amoniakas, po to ekstrahuota  $\text{CHCl}_3$  (3 x 30 ml), išdžiovinta ( $\text{MgSO}_4$ ) ir tirpiklis pašalintas sumažintame slėgyje. Valino metilo esteris pašalintas 40-50°C temperatūroje (0.05 mbar) distiliacija iš kolbos į kolbą. Visas neišdistiliuotas junginys panaudotas be tolimesnio valymo.

Išeiga: 1.00 g (86%).

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

5 1.5 (s, 2H), 2.92 (dd, 1H, J 15, J 7,2 Hz), 3.04 (dd, 1H, J 15, J 5 Hz), 3.68 (d, 3H, J 0.5 Hz), 3.73 (dd, 1H, J 7.2, J 5.1 Hz), 6.06 (dd, 1H, J 0.7, J 3.2 Hz), 6.24 (dd, 1H, J 2.9, J 2 Hz), 7.28 (dd, 1H, J 0.7, J 1.9 Hz).

10

$^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

33.45, 52.00, 53.67, 107.44, 110.20, 141.83, 151.32, 174.97.

15

**c) (S)-2-(9-Fluorenilmetiloksikarbonilamino)-3-(2-furil)-propiono rūgštis**

20 Metil (S)-2-amino-3-(2-furil)propionatas (1 g, 6.5 mmol) sumaišytas su 2M LiOH (3.27 ml, 6.5 mmol) ir dioksanu (3.37 ml) 0°C temperatūroje ir per naktį maišomas  $\text{N}_2$  atmosferoje. Kitą dieną reakcijos mišinio PSC kontrolė ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  sk 1/1/0.1) esterio buvimo nerodė 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (9.75 ml, 9.75 mmol) ir 9-fluorenilmetiloksikarbonilo chloridas (2.5 g, 9.75 mmol), ištirpinti dioksane (10 ml), pridėti į aukščiau minėtą tirpalą, ir maišymas tęsiamas dar 1 valandą. Dioksanas sumažintame slėgyje pašalintas, o vandeninis tirpalas rūgštinamas 10%  $\text{KHSO}_4$  tirpalu iki pH 2. Tirpalas ekstrahuotas  $\text{CHCl}_3$  (3 x 20), išdžiovintas, išgarintas ir išgrynintas impulsine chromatografija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 10/10/1).

30

Išeiga: 1.3 g (53%), balti kristalai.

35

$^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$

2.95 (dd, 1H, J 9.9, J 15.2 Hz), 3.08 (dd, 1H, J 4,4, J 15.2 Hz), 3.6 (pls, 1H), 4.16-4.26 (m, 4H), 6.12 (d, 1H, J 2.9 Hz), 6.33 (t, 1H, J 2.3 Hz), 7.29 (t, 2H, J 7.32 Hz), 7.39 (t, 2H, J 7.48 Hz), 7.49 (pls, 1H), 7.64 (dd, 2H, J 7.17, J 2.14 Hz), 7.85 (d, 2H, J 7.48 Hz).

<sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>): δ

29.8, 46.98, 66.04, 107.45, 110.85, 120.48, 125.57, 125.63, 127.50, 128.07, 141.06, 142.21, 144.09, 151.84, 156.26, 160.35.

# 7 PAVYZDYS

(S)-2-Amino-3-(3,5-dimetil-4-izoksazolil)propiono rūgštis

a) (2R,5S)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-(3,5-dimetil-4-izoksazolilmetil)pirazinas

20

1.55 M butylličio tirpalas (10 ml, 15.5 mmol) heksane švirkštu suleistas į maišomą (2R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropilpirazino (2.85 g, 15.5 mmol) tirpalą THF (50 ml) -78°C temperatūroje. Tirpiklis sumažintame slėgyje pašalintas, likutis ištirpintas etilo acetate (50 ml) ir išekstrahuotas fosfato buferiu (pH 7). Vandinė fazė du kartus ekstrahuota etilo acetatu (2 x 20 ml). Organinis sluoksnis išdžiovintas (MgSO<sub>4</sub>), tirpiklis išgarintas sumažintame slėgyje ir likutis išgrynintas impulsine chromatografija (dietilo eteris/heksanas 4/1, silikagelis).

30

Išeiga: 3 g (64%), bespalvis klampus skystis.

35

<sup>1</sup>H BMR (CDCl<sub>3</sub>): δ

0.60 (d, 3H, J 6.7 Hz), 0.97 (d, 3H, J 6.7 Hz), 2.17 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.73 (dd, 1H, J 5.9, J 14.6 Hz), 2.86 (dd, 1H, J 4.4, J 14.7 Hz), 3.59 (t, 1H, J 3.4 Hz), 3.63 (d, 3H, J 0.3 Hz), 3.68 (d, 3H, J 0.3 Hz), 4.11 (m, 1H).

<sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>):δ

10.21, 11.16, 16.41, 18.99, 26.99, 31.29, 52.26, 52.33, 55.93, 60.46, 109.82, 160.18, 162.33, 164.24, 166.34.

**b) Metil (S)-2-amino-3-(3,5-dimetil-4-izoksazolil)-propionatas**

(2R,5S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoksi-2-izopropil-5-(3,5-dimetil-4-izoksazolilmetil)pirazino (2 g, 6.8 mmol), 1.0 M HCl (13.6 ml, 13.6 mmol) ir dioksano (13.6 ml) mišinys per naktį maišomas kambario temperatūroje N<sub>2</sub> atmosferoje. Dioksaną sumažintame slėgyje pašalintas, o vandeninė fazė ekstrahuota dietilo eteriu (20 ml). Į vandeninę fazę iki pH 9 dedamas skystas amoniakas, ekstrahuojama CHCl<sub>3</sub> (3 x 30 ml), išdžiovinama (MgSO<sub>4</sub>), ir tirpiklis sumažintame slėgyje pašalintas. Valino metilo esteris 40-50°C (0.05 mbar) pašalintas distiliacija iš kolbos į kolbą. Visas nenudistiliuotas junginys panaudotas be tolesnio valymo.

Išeiga: 1.3 g.

<sup>1</sup>H BMR (CDCl<sub>3</sub>):δ

1.52 (pls, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.56 (dd, 1H, J 7.5, J 14.6 Hz), 2.74 (dd, 1H, J 6.2, J 14.6 Hz), 3.55 (t, 1H, J 6.7 Hz), 3.69 (s, 3H).

<sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>):δ

0.18, 11.06, 27.94, 52.06, 54.45, 109.45, 159.63,  
166.31, 175.18.

5 c) (S)-2-(9-Fluorenilmetiloksikarbonilamino-3-(3,5-di-  
metil-4-izoksazolil)propiono rūgštis

10 Metil (S)-2-amino-3-(3,5-dimetil-4-izoksazolil)-propio-  
natas (1,3 g, 6.6 mmol) sumaišytas su 2 M LiOH (3.3 ml,  
6.6 mmol) ir dioksanu (3.3 ml), 0°C temperatūroje mai-  
šomas per naktį N<sub>2</sub> atmosferoje. Kitą dieną reakcijos  
mišinio PSC kontrolė (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> sk 1/1/0.1) nerodė  
esterio buvimo. 1 M NaHCO<sub>3</sub> (10 ml, 10 mmol) ir 9-fluo-  
15 renilmetiloksikarbonilo chloridas (2.6 g, 10 mmol), iš-  
tirpinti dioksane (10 ml), pridėti prie aukščiau apra-  
šyto tirpalo, ir maišymas tęsiamas dar valandą. Diok-  
sanas pašalintas sumažintame slėgyje, o vandeninis  
tirpalas rūgštinamas 10% KHSO<sub>4</sub> tirpalu iki pH 2. Tir-  
palas ekstrahuotas CHCl<sub>3</sub> (3 x 20 ml), išdžiovintas  
20 (MgSO<sub>4</sub>), išgarintas ir išgrynintas impulsine chromato-  
grafija (heksanas/etilo acetatas/acto rūgštis 10/10/1).

Išeiga: 1.6 g (59%), balti kristalai.

<sup>1</sup>H BMR (CDCl<sub>3</sub>): δ

25

2.10 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.65 (dd, 1H, J 9.46, J  
14.65 Hz), 2.76 (dd, 1H, J 5.4, J 14.65 Hz), 3.5-4.2  
(m, 4H), 7.24-7.40 (m, 4H), 7.63 (d, 2H, J 7.32 Hz),  
7.82 (t, 2H, 7.63 Hz).

30

<sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>): δ

10.02, 10.90, 24.27, 46.94, 53.81, 66.73, 110.16,  
120.44, 125.51, 127.46, 128.06, 141.06, 144.12, 156.27,  
35 159.83, 166.51, 173.02.

**Peptidų kietos fazės sintezė**

Kietos fazės peptido sintezė buvo atliekama iš esmės pagal fluorenil, metoksikarbonilo (Fmoc)-poliamido sintezės principus (Atherton and Sheppard, Solid phase peptide synthesis: a practical approach, Oxford IRL Press at Oxford University Press, 1989). Buvo panaudotos prekyboje 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 buvo sudaryti 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 turėjo apsaugotą reikalingą C-galo 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 su t-butiloksikarbonilo funkcija, glutamino arba asparagino rūgšties šoninės grandinės karboksilo grupės buvo apsaugotos kaip t-butilo esteriai.

Užbaigus norimų sekų kietos fazės surinkimą, peptidai atskirti nuo sintezės dervų, kartu vykstant šoninių grandinių deblokavimui, panaudojant trifluoracto rūgštį, prie kurios buvo pridėti jai tinkami valantys chemikalai (King et. al., Int. J. Peptide Protein Res.,

35, 255-268, 1980). Po išgarinimo, peptidai buvo atskirti, nusodinant dietilo eteriu ir išdžiovinti. Gryninimas atliktas preparatyvine atvirkščios fazės aukšto slėgio skystine chromatografija.

## 1 LENTELĖ

Bendros struktūros monomerinių peptidų Pyr-Glu-Asp-Xaa-Lys-OH analizės duomenys

5

| Xaa <sup>a</sup>        | HPLC Metodas <sup>b</sup><br>(Užlaikymo<br>laikas, min) | Grynumas <sup>c</sup><br>(%) | FAB-MS<br>[ M+ H ] <sup>+</sup> |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Valinas                 | 0-30-20 (17)                                            | 100                          | 601.4                           |
| Norleucinas             | 0-30-20 (23)                                            | 99                           | 615.4                           |
| Leucinas                | 0-30-20 (22)                                            | 98                           | 615.4                           |
| Triptofanas             | 20-50-20 (14)                                           | 96                           | 688.3                           |
| Tirozinas               | 0-30-20 (13)                                            | 98                           |                                 |
| Lizinas                 | 0-30-20 (10)                                            | 100                          | 630.4                           |
| Glutamino rūgštis       | 0-30-20 (12)                                            | 99                           | 631.6                           |
| Glutaminas              | 0-30-20 (12)                                            | 100                          | 630.3                           |
| Histidinas              | 0-30-20 (13)                                            | 99                           | 639.4                           |
| Prolinas                | 0-30-20 (15)                                            | 99                           | 599.3                           |
| 1-Naftilalaninas        | 30-90-20 (15)                                           | 99                           | 699                             |
| Tien-2-ilalaninas       | 0-30-20 (20)                                            | 100                          | 655.3                           |
| Piridin-2-ilalaninas    | 0-30-20 (12)                                            | 95                           |                                 |
| Furan-2-ilalaninas      |                                                         |                              |                                 |
| 3,5-Dimetilizoksa-      |                                                         |                              |                                 |
| zol-4-ilalaninas        |                                                         |                              |                                 |
| Cikloheksilalaninas     | 10-40-20 (23)                                           | 98                           | 655.4                           |
| Alilglicinas            |                                                         |                              |                                 |
| O-Metilserinas          |                                                         |                              |                                 |
| 2-Amino-6-azidohek-     |                                                         |                              |                                 |
| sano rūgštis            |                                                         |                              |                                 |
| 2-Amino-4,5-dihidroksi- |                                                         |                              |                                 |
| 6-benziloksikarbonil-   |                                                         |                              |                                 |
| amino heksano rūgštis   |                                                         |                              |                                 |

<sup>a</sup> Visos aminorūgštys yra L konfigūracijos, t.y. kaip randamos gamtinėse aminorūgštyse.

<sup>b</sup> Metodai yra išreiškiami kaip mobilios fazės B fazėje A gradientai per tam tikrą laiką, tokiu būdu, pvz., 10-40-20 nurodo gradientą, prasidedantį 10 ir besibai-giantį 40% B per 20 minučių. Mobilios fazės: A) 0.1% TFA B) 0.1% TFA 40-tyje % MeCN. Stulpelis: Vydac TP54, C18, 0.46X25 cm, 5µm dalelės, 100 Å pora; srautas 1 mL/min.

<sup>c</sup> Nurodo HPLC chromatogramos pikų integraciją ( $\lambda = 215$  nm)

## 10 2 LENTELĖ

### Aminorūgščių analizės duomenys peptidams

Peptidas su Xaa peptide Pyr-Glu-Asp-Xaa-Lys-OH  
15 Xaa=Val Xaa=Leu Xaa=Nle Xaa=Ser Xaa=Trp

#### Randomas liekanų skaičius (teoriškai)

|     |          |          |          |          |                       |
|-----|----------|----------|----------|----------|-----------------------|
| Val | 0.81 (1) |          |          |          |                       |
| Nle |          |          | 0.94 (1) |          |                       |
| Leu |          | 0.97 (1) |          |          |                       |
| Trp |          |          |          |          | 0.51 <sup>a</sup> (1) |
| Lys | 0.77 (1) | 0.68 (1) | 0.89 (1) | 0.90 (1) | 1.00 (1)              |
| Glu | 2.09 (2) | 2.01 (2) | 2.11 (2) | 2.11 (2) | 2.33 (2)              |
| Asp | 1.00 (1) | 1.00 (1) | 1.00 (1) | 1.00 (1) | 0.68 (1)              |

<sup>a</sup> Triptofanas rūgštinės hidrolizės metu dalinai suardomas.

20 HOBt = Hidroksibenzotriazolas

Pfp =Pentafluorfenilas

Fmoc = 9-Fluotetilmetoksikarbonilas

Boc = t-Butoksikarbonilas

DCC = Dicikloheksilkarbodiimidas

25 Cin = (S)-2-Amino-5-fenil-4-(E)-penten-1-o rūgštis

BuLi = n-butillitis

THF = tetrahidrofuranas

DMF = dimetilformamidas

## 5 **pGlu-Glu-Asp-[Cin]-Lys**

Peptidas sintezuojamas, naudojant Labortec peptidų sintezatorių. Į reakcijos kolbą įdedamas Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin polimeras (1.0 g, 0.6 mmol; Bachem A.G. pakeitimas 0.6 mmol/g). Prie polimero pridėta (S)-2-(9-fluorenilmetoksikarbonilamino)-5fenil-4-(E)-penten-1-o rūgšties (578 mg, 1.4 mmol), DCC (290 mg, 1.4 mmol) ir HOBt (211 mg, 1.4 mmol) DMF'e ir reakcijai leista vykti 9 valandas. Tada polimeras nuplautas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 30% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ir DMF (neigiamas Kaiser'io testas).

Likusi sintezės dalis atliekama pagal standartinę metodiką, panaudojant Fmoc-Asp(tBu)-Opfp (0.89 g, 1.5 mmol), Fmoc-Glu(OtBu)-Opfp (0.90 g, 1.5 mmol) ir pGlu-pentachlorfenilo esterį (0.57 g, 1.5 mmol). Kiekvienoje sujungimo stadijoje, kuriai leidžiama vykti 1 valandą, pridėdama HOBt (0.23 mg, 1.5 mmol). Sujungimo pabaiga yra nustatoma Kaiser'io testu. Po sujungimo su Fmoc-aminorūgštimi, polimeras nuplaunamas DMF, apsauginė grupė atskeliama 20% piperidinu/DMF ir polimeras vėl nuplaunamas MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bei CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ir išdžiovinamas. Peptidas yra atskeliamas nuo polimero TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, perfiltruojamas (0.45 μ) ir filtratas išdžiovinamas šaldant. Tolimesniam gryninimui nevalytas peptidas ištirpinamas vandenyje ir nukreipiamas preparatyvinei HPLC (aukšto slėgio skystinė chromatografija Beckman'io Ultrasferos ODS kolonėlėje ir tirpalas A 0.1% TFA vandenyje, B 0.1% TFA/MeCN:H<sub>2</sub>O 40:60. Grynus peptidas (>95%) gaunamas po surinktų frakcijų, kuriose yra homogeniško peptido, išdžiovinimo šaldant.

## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidinio junginio darinys, sudarytas iš vien-  
 grandžio hemoreguliacinio peptido, kurio negalinės ami-  
 5 norūgšties C $\alpha$  atomas yra pakeistas grupe -A ir prie  
 minėto C $\alpha$  atomo nėra natyvios -šoninės grandinės, kur  
 -A yra grupė CR<sup>A</sup>R<sup>A'</sup>-Z,

kurioje kiekvienas R<sup>A</sup> nepriklausomai yra vandenilio  
 10 atomas arba -R<sup>A''</sup>, -OR<sup>A''</sup>, -SR<sup>A''</sup>, -NR<sup>A''</sup>R<sup>A''</sup>, -CONR<sup>A''</sup>R<sup>A''</sup> arba  
 -COOR<sup>A''</sup> grupė;

R<sup>A'</sup> yra vandenilio atomas arba R<sup>A''</sup> grupė;

15 R<sup>A''</sup> yra alkilas, cikloalkilas, alkanoilas, hidroksi-  
 alkilas, anido grupė arba karbociklinė ar heterociklinė  
 grupė;

20 Z yra grupė -OR<sup>F</sup>, -NR<sup>C</sup>R<sup>C</sup>, -CR<sup>F</sup>R<sup>F</sup> arba pakeistas arba  
 nepakeistas, aromatinis arba nearomatinis, karbocikli-  
 nis arba heterociklinis žiedas, kitoks nei nepakeistas  
 fenilas;

25 kur kiekviena R<sup>B</sup> yra linijinės arba šakotos grandinės,  
 prisotinta arba neprisotinta angliavandenilio grupė,  
 tokia kaip alkilo, aralkilo arba arilo grupė, pasi-  
 rinktinai pakeista viena ar daugiau R<sup>A</sup> grupėmis, kur R<sup>A</sup>  
 yra tokia, kaip nurodyta aukščiau, ir į kurią pasi-  
 rinktinai įterptas vienas arba daugiau -N-, -O- ar -S-  
 30 heteroatomų;

R<sup>C</sup> yra vandenilio atomas arba R<sup>B</sup> grupė;

R<sup>D</sup> yra vandenilio atomas arba R<sup>F</sup> grupė;

35

R<sup>E</sup> yra vandenilio atomas arba R<sup>F</sup> grupė, arba kartu su R<sup>D</sup>  
 grupe sudaro >C=O grupė; ir

5  $R^F$  yra grupė  $-R^B$ ,  $-OR^B$ ,  $-NR^C R^C$  arba  $-SR^B$ , arba hidroksilo, karboksilo, aminokarbonilo ar alkoksi grupė, arba metileno grupė, prijungta prie azoto atomo, sujungto su  $C\alpha$  atomu, arba kartu su  $R^D$  sudaro alkilideno grupę, arba yra vandenilio atomas, kur vienas iš  $R^A$ ,  $R^{A'}$ ,  $R^D$  ir  $R^E$  yra ne vandenilis.

10 2. Peptidinis junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad  $-A$  yra  $-CH_2-Z$ ,

kurioje  $Z$  yra pakeistas arba nepakeistas, aromatinis arba nearomatinis, karbociklinis arba heterociklinis žiedas, kitoks nei nepakeistas fenilas.

15 3. Peptidinis junginys pagal 2 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad  $Z$  yra benzilo, indolilo, hidroksifenilo, imidazolilo, naftilo, tienilo, piridinilo, furanilo, izoksazolilo, 3,5-dimetilizoksazolilo arba cikloheksilo grupė.

20 4. Peptidinis junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad  $-A$  yra grupė  $-CH_2-Z$ ,

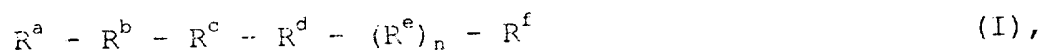
25 kurioje  $Z$  yra grupė  $-OR^B$  (kur  $R^B$  yra tokia, kaip nurodyta 1 punkte) arba  $-CHR^D R^F$ ;

$R^D$  yra vandenilio atomas arba grupė  $-CH_3$ ;

30  $R^F$  yra alkilo grupė, pasirinktinai pakeista hidroksilo, amino ar azido grupėmis; arba

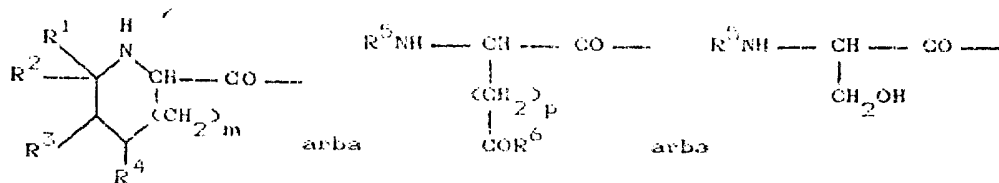
$R^D$  ir  $R^F$  kartu sudaro alkilidino grupę.

35 5. Peptidinis junginys pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas viengrandis hemoreguliacinis peptidas yra aprašomas I formule



kurioje  $R^a$  reiškia

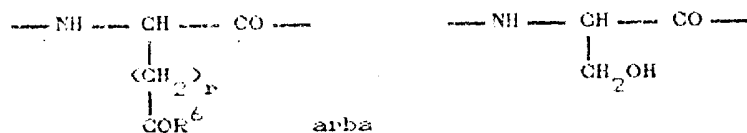
5



10

$R^b$  reiškia

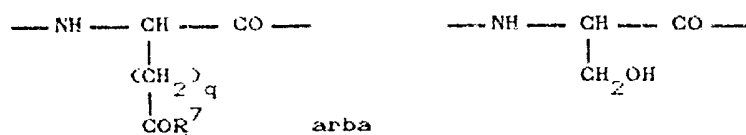
15



20

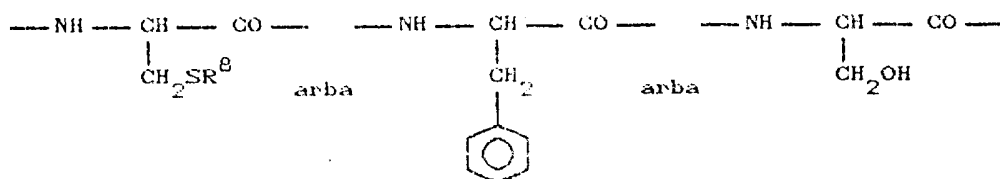
$R^c$  reiškia

25



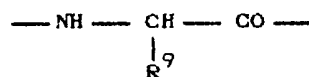
30

$R^d$  reiškia



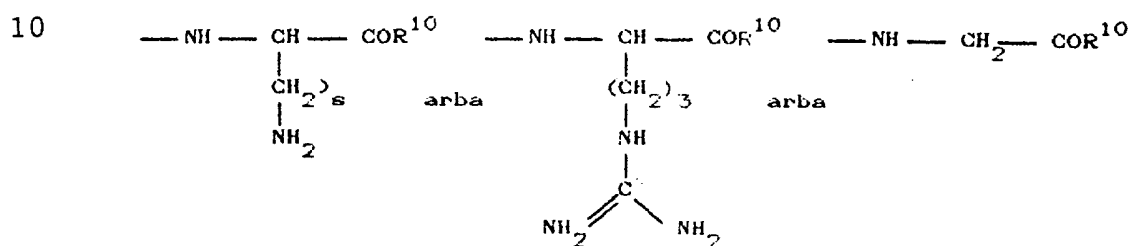
35

R<sup>e</sup> reiškia



5

R<sup>f</sup> reiškia



15

(kuriose

n ir m nepriklausomai reiškia 0 arba 1;

20

p, q ir r nepriklausomai reiškia 1 arba 2;

s reiškia 3 arba 4;

25 R<sup>1</sup> ir R<sup>2</sup> abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia okso grupę;

R<sup>3</sup> ir R<sup>4</sup> abu yra vandenilio atomai arba kartu reiškia anglis-anglis jungtį;

30

R<sup>5</sup> yra vandenilis arba acilo grupė;

kiekvienas R<sup>6</sup> ir R<sup>7</sup> nepriklausomai reiškia hidroksilo grupę arba amino grupę, bet tinkamesnės yra hidroksilo grupės;

35

$R^8$  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 labiliai S-apsauginę grupę;

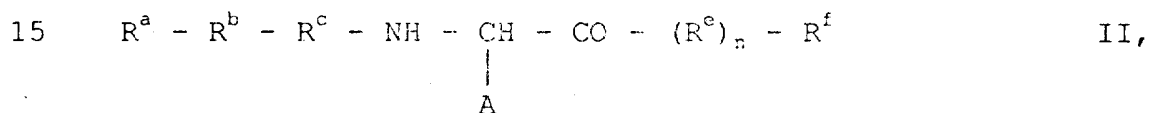
5

$R^9$  reiškia vandenilį arba metilo grupę; ir

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

10

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



kurioje -A yra tokia, kaip nurodyta bet kuriame iš 1-4 punktų ir  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^f$  bei n yra tokie, kaip nurodyti 5 punkte.

20

7. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ją sudaro peptidinis junginys pagal bet kuri iš 1-5 punktų ir farmacinis nešiklis arba užpildas.

25

8. Peptidinis junginys pagal bet kuri iš 1-5 punktų, skirtas naudoti mielopoezės arba kaulų čiulpų regeneracijos inhibicijai.

30

9. 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, gaudami bis-laktimo dipeptido eterį;

35

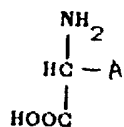
b) vykdo a) stadijos bis-laktimo dipeptido eterio hidrolizę, gaudami  $\text{NH}_2\text{-CH(A)-COOH}$  formulės aminorūgštį, kur A yra kaip nurodyta bet kuriame iš 1-4 punktų;

5 c) likusias aminorūgštis įveda į peptidinę grandinę; ir

d) vykdo bet kurios apsaugotos grupės deblokavimą.

10. Aminorūgšties darinys pagal formulę

10



15

kurioje -A yra tokia, kaip nurodyta bet kuriame iš 1-4 punktų.

20