

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

---

(11) Patent numeris: **3714**

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

(21) Paraiškos numeris: **IP610**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 02 26**

(60) SU duomenys: **PCT/EP 89/01071, 1989 09 13 SU 4895033, 1991 03 15**

(31,32,33) Prioritetas: **8821785, 1988 09 16, GB**

(72) Išradėjas:  
**Ole Didrik Laerum, NO**

(73) Patent savininkas:  
**NYCOMED IMAGING AS, Nycovelen 1-2, N-0401 Oslo 4, NO**

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

---

(54) Pavadinimas:  
**Ląstelių proliferacijos inhibitoriai, farmacinė kompozicija ir junginių gavimo būdas**

(57) Referatas:

Nustatyta, kad pentapeptidai ir jų dariniai, įskaitant darinius, turinčius vieną ar daugiau papildomų aminorūgščių, įvestų į seką ir/arba prijungtų C- arba N-gale, pasižymi dideliu efektyvumu inhibuojant kamieninių ląstelių proliferaciją.

Be to, atskleidžiamos naujų peptidų grupės, pasižyminčios pagerintu ir/arba specifiskai nukreiptu inhibuojančiu poveikiu.

Išradimas skirtas pritaikymui peptidų pasižyminčių inhibuojančiu veikimu į ląstelių proliferazę ir naujiems peptidams, pasižymintiems specifiniu ir/arba bendru inhibuojančiu poveikiu.

5

Daugelis tyrimų nukreipti pieno liaukų ląstelių, kurių struktūra ir funkcijos pasižymi didele įvairove, vystymosi ir diferenciacijos mechanizmų nustatymui.

10

Žinoma, kad nuolat kintančių ląstelių sistemos mechanizmas paprastai apima rezervą polipotentinių kamieninių ląstelių, kurios dalosi ir pastoviai tiekia naujas ląsteles į sistemą. Tuo tarpu pradžioje homogeninės kamieninės ląstelės, tiekiamos iš "rezervo", greitai  
15 įgauna vieną ar kitą morfologiją ir to pasekoje tampa reikiamomis funkcinėmis ląstelėmis.

20

Tokių kamieninių ląstelių sistemų pavyzdžiai apima kaulų čiulpų hemopoetinę (kraujodaros) sistemą ir epitelinę bei epiderminę sistemas.

25

Yra žinoma, kad ribotos bendros formulės peptidai gali inhibuoti hemopoezę (kraujo susidarymą) (žiūrėti EP-A-0112656), o tuo tarpu nežymiai išplėstos bendros  
25 formulės dimerinių peptidų, surištų disulfidiniais tilteliai, grupė gali stimuliuoti hemopoezę (žiūrėti WO 088/03535). Vienok, abiem atvejais nepastebėta jokio poveikio kitoms sistemoms, išskyrus hemopoezę.

30

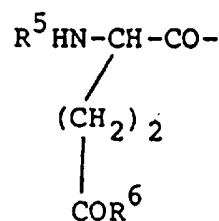
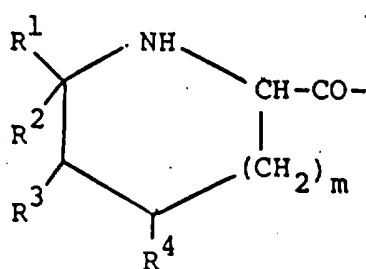
Šiuo metu netikėtai rasta, kad peptidų klasė, įskaitant kai kuriuos peptidus, atskleistus EP-A-01126256, gali inhibuoti ląstelių proliferaciją ir, kad nežymi amino-  
rūgščių sekos modifikacija ir/arba esminių grupių blo-  
kavimas šoninėje grandinėje, gali nukreipti peptidų po-  
35 veikį specifinėms sistemoms.

Mūsų duomenys remiasi pastebėjimu, kad tam tikros pentapeptidinės sekos, atskleistos aukščiau nurodytuose patentų paraiškų aprašymuose, randamos tam tikruose, vadinamuose G-baltymuose, būtent  $G_{\alpha i}$  baltymuose. G baltymai buvo aptikti vidinėje ląstelių membranų pusėje ir jie užtikrina būtiną ryšį tarp transmembraninių receptorių ir efektorių, išsidėsčiusių apie G baltymus ląstelės viduje. Priklausomai nuo efektorių, su kuriais jie surišti, jie dalyvauja daugelyje ląstelių funkcijų. Jie susideda iš trijų susijusių subvienetų  $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$ , be to,  $\alpha$  subvienetas dalyvauja aktyvuojant kaimyninį efektorių. G baltymai skiriasi pagal jų funkciją ir G baltymų subklasė yra pradžioje rasti baltymai, inhibuojantys adenilatciklazę. Šie duomenys leidžia laikyti aplamai peptidus epitelinių ir epiderminių sistemų proliferacijos ir ląstelių sistemų inhibitoriais.

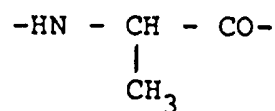
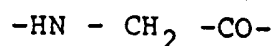
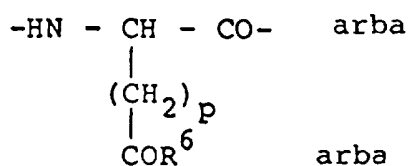
Tokiu būdu, išradime siūlome naudoti junginį, kurio formulė (I):



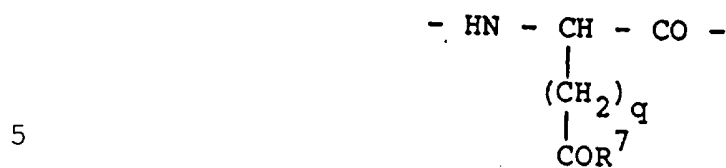
kurioje  $R^a$  yra



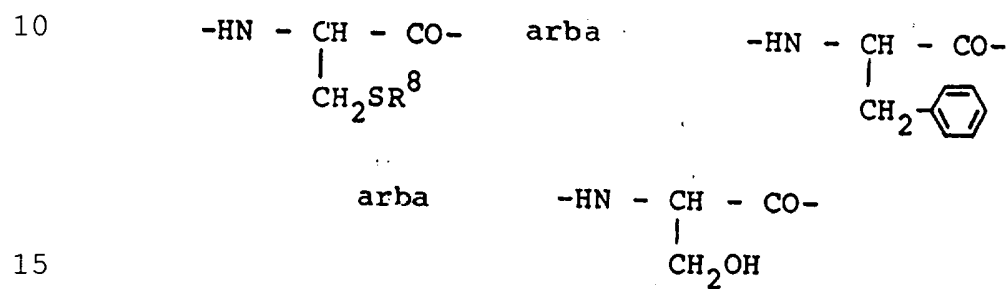
$R^b$  yra



R<sup>c</sup> yra



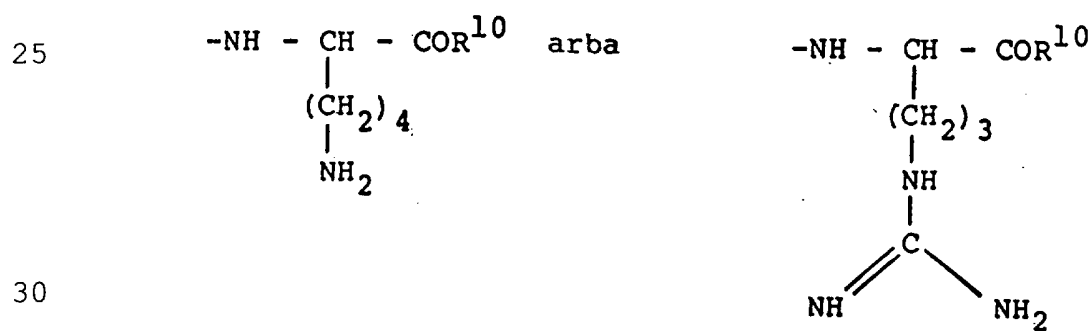
R<sup>d</sup> yra



R<sup>e</sup> yra



ir R<sup>f</sup> yra



arba-NH-CH<sub>2</sub>-COR<sup>10</sup>

kuriose n ir m nepriklausomai yra 0 arba 1;

35

p ir q nepriklausomai yra 1 arba 2;

$R^1$  ir  $R^2$  abu yra anglies atomai arba kartu sudaro okso grupę;

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

$R^5$  yra vandenilis arba acilo grupė;

10  $R^6$  ir  $R^7$  nepriklausomai yra hidroksilo grupė arba amino grupė;

$R^8$  yra vandenilis,  $C_{2-6}$  alkilo grupė;

15  $C_{7-20}$  yra aralkilo grupė, kuri gali turėti vieną arba daugiau hidroksilo, amino arba metoksi pakaitų arba metaboliškai labiliaią S-apsauginę grupę;

$R^9$  yra vandenilis arba metilo grupė;

20  $R^{10}$  yra hidroksilo arba amino grupė, aminorūgšties glutamino liekana arba peptidas, turintis glutamino grandį N-gale, išskyrus alaniną, kuris gali būti D arba L formos, ir gliciną, visos nurodytos aminorūgščių liekanos yra L-formos) gaunant vaistinę medžiagą nehemopoetinės ląstelės proliferacijos inhibavimui.

25

Tais atvejais, kai dalyvauja  $R^5$  grupė, apsauganti N-galą, ji gali būti, kaip nurodyta aukščiau, acilo grupė, turinčia 1-20 anglies atomų, pavyzdžiui, žemesniojo alkanoilo grupė, turinčia 1-5 anglies atomus, tokia kaip acetilo grupė, turinti 7-20 anglies atomus, tokia kaip benzoilo arba fenilacetilo grupė.

30

35  $R^5$  taip pat gali būti acilo grupė, gauta iš aminorūgšties arba peptidinės grandinės. Pavyzdžiui,  $R^5$  gali būti acilo grupė, gauta iš serino arba bet kurio iš

peptidų, gautų iš aminorūgščių eilės pašalinus vieną po kitos sekančias N-galines aminorūgštis:

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

5

Žemiau smulkiai išaiškinta, kad aukščiau užrašytos eilės arba jos dalies peptidai yra aukšto homologijos laipsnio  $G_{\alpha i}$  baltymams, kurie, kaip žinoma, kontroliuoja ląstelės funkcijų skaičių, įskaitant augimo inhibavimą.

10 (I) bendros formulės peptido galinė grupė geriau apsaugoma, pavyzdžiui, acilinant alkanoilo, aralkanoilo arba aroilo grupę.

15 Tais atvejais, kai  $R^8$  yra  $C_{2-6}$  alkilo grupė, tai gali būti, pavyzdžiui, etilo, butilo arba heksilo grupė. Kai  $R^8$  yra aralkilo grupė, paprastai ji gali būti arilmetilo grupė, tokia kaip benzilo, difenilmetilo arba trifenilmetilo. Tais atvejais, kai  $R^8$  yra metaboliškai labili grupė, ji gali būti, pavyzdžiui, ariltiogrupė,

20 turinčia 5-10 anglies atomus, pavyzdžiui, piridiltio grupė arba acilo grupė, kaip nurodyta aukščiau.

Geriau, kai išradimo junginiai yra pentapeptidai, tai yra n yra geriau 0.

25

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

30 Išradimo pentapeptidų savybės inhibuojant didelio ląstelių skaičiaus proliferaciją kartu su hemopoetine sistema arba netgi be hemopoetinės sistemos yra vertingos medicinai, pavyzdžiui, žvynelinės atveju, kai reikia paveikti ypač didelę ląstelių proliferaciją, pvz. psoriazės atveju arba kai pageidautina vėžio terapija, kai reikia pažeisti atskirą ląstelių populiaciją. Daugelis ląstelių tipų ypač jautrūs citotoksinėms vaistinėms

35 medžiagoms arba švitinimui, naudojamam priešvėžinėje

- terapijoje, ir, taikant vieną žinomą metodiką, naudo-  
jamas vaistinis preparatas, inhibuojantis hemopetinės  
sistemos ląstelių proliferaciją priešvėžinės terapijos  
metu, po to atstatant normalią proliferaciją, kai inhi-  
5 buojančios vaistinės medžiagos veikimas baigiasi. Ma-  
tyt, duoto išradimo peptidų biologinis gyvavimo puspe-  
riodis yra atitinkamai trumpas tokiai terapijai. Ana-  
logiškai, pasirinktų ląstelių, jautrių vėžinei tera-  
pijai, populiacijos proliferacija gali būti inhibuojama  
10 kartu su vėžinėmis ląstelėmis ir priešvėžinė terapija  
iniciuojama tik tada, kai vėžinės ląstelės pasiekia  
jautrią proliferacijos fazę, tuo metu, kai normalios  
ląstelės yra mažiau jautrioje fazėje.
- 15 Gali būti toks ląstelių proliferacijos tipas, kai kaulų  
čiulpu ląstelės, fagocitai arba granulocitai stimuliuo-  
jami CSF vaistiniais preparatais terapijos metu. Ląs-  
telių augimo inhibavimas gali atstatyti normalų tokių  
ląstelių augimo greitį.
- 20 Esant daugeliui autoimuninių susirgimų, subjektas ga-  
mina leukocitus, veikiančius prieš jų pačių medžiagą.  
Inhibuojant leukocitinę funkciją, bent tam tikram lai-  
kui tokios autoimuninės reakcijos gali būti žymiai  
25 sumažintos.
- Ijungiant į  $G_{\alpha i}$  baltiminį tarpląstelinį signalinį me-  
chanizmą, kitos funkcijos, kontroliuojamos  $G_{\alpha i}$  baltymų,  
gali būti modifikuojamos aktyvių peptidų pagalba, pa-  
30 vyzdžiui, ląstelės judrumas kalcio metabolizmo procese  
ir citoplazminiai ląsteliniai procesai medijuojami  $G_{\alpha i}$   
baltymu.
- Tokiu būdu išradimas taip pat skirtas naujiems po-  
35 lipeptidams, kurių pilnos arba dalinės sekos yra iš es-  
mės homologiškos  $G_{\alpha i}$  baltymams, aprašytiems aukščiau,  
būtent ---Lys-Ile-Ile-His-Glu-Asp-Gly-Tyr-Ser- $R^a$ - $R^b$ - $R^c$ -

- $R^d-R^e-R^f$ -Glu-Tyr---arba jų daliai arba nedidelėms jų variacijoms, tokioms kaip polipeptidai, aprašyti Ann. Rev. Biochem. 56, pp. 624-625 (1987) ir Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 3066-3070 (1988). Tokios sekos
- 5 geriau turi bent vieną Tyr liekaną, kuri padeda markiruoti polipeptidą. Kaip nurodyta žemiau,  $NH_2$  N-gale geriau apsaugomas, pavyzdžiui, N-aciliniu. Ten, kur aminorūgšties liekana N-gale turi būti Glu, tokioje homologinėje sekoje ją galima geriau pakeisti p - Glu.
- 10 Tokius polipeptidus reikėtų pažymėti (Ia) formule ir juos galima apibūdinti, kaip (I) formulės junginius, kur  $R^5$  yra acilo grupė, gauta iš serino amino rūgšties liekanos arba peptidinės grandinės, kurioje serino
- 15 grandis yra C-gale, ir/arba  $R^{10}$  yra glutamino aminorūgšties arba peptido, turinčio glutamino grandį N-gale, liekana. Geriau jei jie turi sumoje iki 12 aminorūgščių liekanų, dar geriau 10 arba mažiau.
- 20 Bendrai, geriau, kai  $NH_2$  bet kurios prijungtos peptidinės sekos N-gale būtų apsaugota, pavyzdžiui, acilinant. Tai padeda išvengti fermentatyvinės peptido degradacijos. Daugeliį iš  $R^a$  liekanų, galimų (I) formulėje, neišmanoma sujungti į aminorūgščių seką be deblokavimo arba analogiško pavertimo liekanomis, turinčiomis laisvą  $NH_2$  grupę. Tokiu būdu, ten, kur  $R^5$  yra
- 25 acilo grupė, kita, nei acilo grupė, gautą iš aminorūgšties arba peptido, būtina deacilinti. Analogiškai, ten, kur  $R^1$  ir  $R^2$  kartu sudaro okso grupę, kaip p-Glu
- 30 grandyse, būtina paversti atitinkama atviros grandinės liekana, tokia kaip Glu arba Gln.
- Tokiu būdu, išradime pritaikomas peptidų poveikis citoplazminiams ląsteliniams procesams, medijuojamiems  $G_{\alpha i}$
- 35 baltymu.

Tik junginiai, aprašyti mūsų ankstesnio EP Nr. 112656 aprašyme, anksčiau buvo aprašyti, kaip tinkami medicinoje. Visi kiti (I) formulės junginiai, kaip nurodyta anksčiau, yra arba nauji, arba buvo aprašyti tik kaip tarpiniai junginiai. Todėl, pagal kitą išradimo požymį, mes siūlome (I) formulės junginius, apibūdintus aukščiau, išskyrus

10 pGlu - Asp - Asp - Cys - Lys

pGlu - Glu - Asp - Cys - Lys

pGlu - Gln - Asp - Cys - Lys

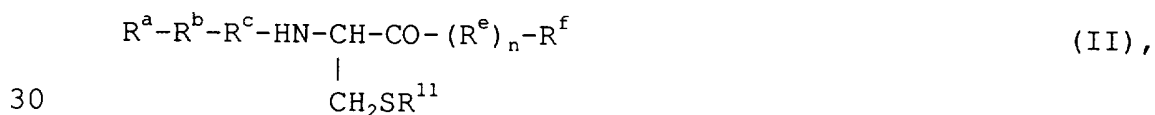
15 pGlu - Glu - Asp - Glu - Lys

pGlu - Glu - Asp - Ala - Lys

20 pGlu - Glu - Asp - Cys - Lys NH<sub>2</sub>

naudoti ląstelių proliferacijos kontrolei.

Kai kurie peptidai, išrinkti iš aukščiau minėtos (I) formulės, yra nauji ir, kaip nustatyta, pasižymi reikiamų savybių kombinacijomis. Tokiu būdu, pagal vieną iš išradimo aspektų, mes siūlome junginius, kurių formulė:



kurioje R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup> ir n yra pažymėti (I) formulėje, R<sup>11</sup> yra C<sub>2-6</sub> alkilo arba C<sub>7-20</sub> aralkilo grupė, kuri gali turėti vieną arba daugiau hidroksilo, amino arba metilo pakaitų, ir visos aminorūgštys yra chiralinės formos, nustatytos (I) formulei. Atskiru atveju, geresni šios formulės junginiai yra:

PGlu-Glu-Asp-benzil Cys-Lys

ir

5 pGlu-Ala-Asp-benzil Cys-Lys.

Rasta, kad junginiai, turintys blokuotas šio tipo cisteino liekanas, pasižymi žymiai didesniu stabilumu in vivo ir efektyvumu, inhibuojant ląstelių proliferaciją.

10

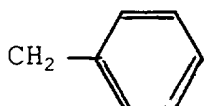
Gali būti gauti aukščiau minėtų benzil-cisteino junginių analogai, kur fenil-pakeitimas yra mažiau labilus, be to, tokie junginiai turi fenilalanino liekaną, vietoje cisteino liekanos 4-padėtyje.

15

Tokiu būdu sekančiu išradimo aspektu mes siūlome junginius, kurių formulė:



20



25

kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra pažymėti (I) formulėje ir visos aminorūgštys yra chiralinės formos, nustatytos (I) formulei. Tokie junginiai taip pat patvirtina savo efektyvumą in vivo ir ypač geri pavyzdžiai yra:

30

pGlu- Gly - Asp - Phe - Lys

ir

35

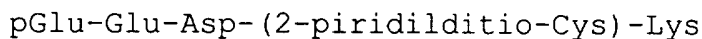
PGlu - Gly - Asp - Cys - Lys.

Atvirkščiai, taip pat galima gauti peptidus su metaboliškai labilia blokuojančia grupe, kad galima būtų lėtai atpalaiduoti neblokuotą peptidą in vivo. Tokiu būdu, sekančiu išradimo aspektu mes siūlome junginius, kurių formulė:



kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$  ir  $n$  yra pažymėti (I) formulėje,  $R^{12}$  yra metaboliškai labili grupė, pavyzdžiui, 2-piridilditio grupė, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, nustatytos (I) formulei.

Geresnis yra

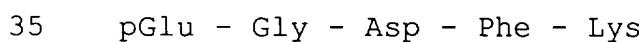


junginys, kuris pasižymi sulėtintu inhibuojančiu poveikiu hemopoezei, pasireiškiančiu po 3 dienų in vivo, palyginus su 1 diena neblokuotam analogui.

Leukocitinės funkcijos inhibavimas (įskaitant imuninę sistemą) kartu su hemopoeze gali būti pasiekiamas lengvai modifikuojant aminorūgšties seką, pavyzdžiui, pakeičiant  $Glu^2$  į  $Gly^2$ . Tokiu būdu, sekančiu išradimo aspektu mes siūlome junginius, kurių formulė:



kurioje  $R^a$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra pažymėti (I) formulėje, o visos aminorūgščių liekanos yra chiralinės formos, nustatytos (I) formulės. Geresni šios formulės junginiai yra:



ir

pGU - Gly - Asp - Cys - Lys,

5 o pastarasis, kaip rasta, inhibuodamas hemopoezę, papildomai inhibuoja granulocitų ir makrofagų migraciją in vivo (suformuojant jūros kiaulyčių odoje langą ir stimuliuojant BCG vietiniu būdu) ir absorbuoja granulocitais staphylococcus aureus in vitro (išmatuota citometriškai sraute).

Peptidų grupė, kuri nepasižymi inhibuojančiu poveikiu hemopoezei, o inhibuoja epiderminę ir epitelinę ląstelių proliferazę, gali būti gaunama pakeičiant 4  
15 padėtyje cisteino liekana. Tokių išradimo junginių formulė:



20 kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra pažymėta (I) formulėje, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, nustatytos (I) formulei. Geresni yra:

25 pGlu - Glu - Asp- Ser - Lys

pGlu - Asp - Glu - Ser - Lys

ir pGlu - Glu - Glu - Ser - Lys.

30 Šie junginiai ypač tinka inhibuojant nehemopoetinę ląstelių proliferaciją, veikiant piktybines hemopoetines ląsteles selektyviu citostatiniu būdu, o taip pat slopinant piktybines epidermines ir epitelines ląsteles, kurios atsiranda, pavyzdžiui, progresuojančiais  
35 žvynelinės karcinomos ir psoriazės atvejais.

Pagaliau, pagal išradimą peptidus galima naudoti "taikiniu" kitoms molekulėms, surišant molekules su peptidine grandine.

5 Tokiu būdu mes siūlome:

(a) junginius terapiniam naudojimui, diagnostikai ir analizei, įskaitant radioizotopą arba pažymėtą radioizotopu ligandą, tiesiogiai ar netiesiogiai kovalentiškai sujungtą su išradimo peptidu,

(c) junginius diagnostikai ir analizei, įskaitant fluorochrominį ligandą, kovalentiškai sujungtą su išradimo peptidu.

15 Bendrai, norint išryškinti apsauginį poveikį citotoksinių vaistinių medžiagų fone, išradimo peptidai gali būti įvedami žmogui injekcijoms 1-10 mg dozės ribose, pavyzdžiui, 4-5 mg 70 kg kūno svorio per dieną. Naudojant infūzinį būdą arba panašias metodikas, dozė gali būti 30-300 mg diapazone 70 kg kūno svorio, pavyzdžiui, apie 100 mg šešių dienų bėgyje. Aplamai, pagedaujama peptido koncentracija yra apytiksliai  $10^{-11}$  -  $10^{-7}$ M nelasteliniam paciento skystyje.

25 Bendrai, taikant kombinuotą terapiją su citotoksinais vaistinėmis preparatais, tokiais kaip citozin-arabinozidas, reikia kruopščiai chronometruoti, užtikrinant mielopoetinės sistemos apsaugojimą, kol dar veikia citotoksinis vaistinis preparatas.

35 Pagal dar vieną išradimo tikslą sukuriamą farmacinę kompoziciją, apimanti iš (Ia), (II), (III), (IV), (V) arba (VI) formulės junginį arba fiziologiškai tinkamą jo druskų su farmaciniu nešikliu arba užpildu. Išradimo kompozicijos gali būti formoje, kuri, pavyzdžiui, tin-

kama peroraliniam, nazaliniam, parenteriniam ar rektaliniam įvedimui.

5 Naudojamas terminas "farmacinis" apima išradimo taikymą veterinarijoje.

Išradimo junginiai gali būti įprastose farmakologinėse formose, tokiose kaip tabletės, padengtos tabletės, aerozoliai nosiai, tirpalai, emulsijos, milteliai, kapsulės arba prailginto veikimo formos. Šių formų gavimui gali būti naudojami įprasti farmaciniai užpildai, o taip pat įprasti gavimo būdai. Tabletės gali būti gaunamos, pavyzdžiui, sumaišant aktyvų ingredientą arba ingredientus su žinomais užpildais, tokiais kaip, pavyzdžiui, skiedikliai, tokie kaip kalcio karbonatas, kalcio fosfatas arba laktozė, dezintegruojančiomis medžiagomis, tokiomis kaip kukurūzų krakmolos arba algino rūgštis, surišikliais, tokiais kaip krakmolos arba želatina, tepalais, tokiais kaip magnio stearatas arba talkas, ir/arba medžiagomis prailginto veikimo formai, tokiomis kaip karboksipolimetilenas, karboksimetilceliuliozė, celiuliozės ftalatacetas arba polivinilacetatas.

25 Jeigu reikia, tabletės gali būti kelių sluoksnių. Padengtos tabletės gali būti gaunamos, padengiant branduolį, gautą tabletėms įprastu būdu medžiagomis, paprastai naudojamomis tablečių padengimui, pavyzdžiui, polivinilpirolidonu arba šelaku, arabiškais sakais, titano dioksidu arba cukrumi. Norint gauti prailginto veikimo efektą arba išvengti nesuderinamumo, branduolys taip pat gali būti kelių sluoksnių. Padengta tabletė taip pat gali būti kelių sluoksnių tam, kad būtų gautas prailgintas išskyrimas, ir tuo atveju gali būti naudojami užpildai, minėti aukščiau tabletėms.

5 Tirpalai injekcijoms gali būti gauti įprastu būdu, pavyzdžiui, pridedant konservuojančių medžiagų, tokių kaip p-hidroksibenzoatai, arba stabilizatoriai, tokie kaip EDTA. Po to tirpalais užpildomi mėgintuvėliai arba ampulės injekcijoms. Prailgintas injekcijų išskyrimas gali būti užtikrinamas taip vadinamais minisiurbliais.

10 Aerosoliai nosiai gali būti sukomponuojami analogiškai vandeniniame tirpale ir įpakuojami konteineriuose išpurškimui arba su priemone aerosoliniam išpurškimui, arba su priemone rankiniam suspaudimui. Kapsulės su vienu ar keliais aktyviais ingredientais gali būti gaunamos, pavyzdžiui, sumaišant aktyvius ingredientus su inertiškais nešikliais, tokiais kaip laktozė arba sorbitas ir užpildant mase želatinines kapsules.

20 Tinkamos žvakutės gali, pavyzdžiui, būti gaunamos, sumaišant aktyvų ingredientą arba kombinuojant aktyvų ingredientą su įprastais nešikliais tam tikslui, tokiais kaip natūralūs riebalai arba polietilenglikolis arba jų dariniai.

25 Vienkartinėse šio išradimo junginių dozėse yra geriau, kai yra 1-10 mg, pavyzdžiui, 4-5 mg peptido.

30 Išradimo peptidai gali būti sintetinami bet kuriuo patogiu būdu. Paprastai, šoninių grandinių chemiškai aktyvios grupės (amino, tiolo ir/arba karboksilo) turi būti apsaugomos sąveikos reakcijos metu visos sintezės eigoje, bet galima palikti kelias neapsaugotas grupes atšakose (hidroksilo grupės, imidazolo grupės, pirminės amidinės grupės, amidinės grupės ciklinėse amino rūgštyse, kaip piro Glu) visos sintezės eigoje.

35 Tokiu būdu, galutinė stadija turi būti pilnai apsaugoto ar dalinai apsaugoto (I) bendros formulės peptido da-

rinio deprotekcija (apsaugos pašalinimas) ir šie būdai nagrinėjami toliau.

5 Peptidinių grandinių didinimą iš principo galima pradėti arba nuo C-galo, arba nuo N-galo, nors paprastai naudojama metodika, kai didinimas pradedamas nuo C-galo.

10 Tokiu būdu, galima pradėti nuo C-galo, reaguojant tinkamam apsaugomam dariniui, pavyzdžiui, lizinui, su tinkamu apsaugotu cisteino dariniu. Lizino darinys turi turėti laisvą  $\alpha$ -amino grupę, tuo tarpu kitas reaktantas turi turėti arba laisvą, arba aktyvuotą karboksilo grupę ir apsaugotą amino grupę. Po sąveikos tarpinis  
15 junginys gali būti išvalomas, pavyzdžiui, chromatografiškai, o po to selektyviai pašalinama N-apsauga, kad galėtų prisijungti kita N-apsaugota ir laisva arba aktyvuota aminorūgšties liekana. Ši procedūra tęsiasi tol, kol susidaro reikiama aminorūgščių seka.

20

Pakaitai, aktyvuojantys karboninę rūgštį, kuriuos, pavyzdžiui, galima naudoti, apima simetrinius ir mišrius anhidridus arba aktyvuotus esterius, tokius kaip, pavyzdžiui, p-nitrofenilesterį, 2,4,5-trichlorfenilo esterį, N-hidroksibenzotriazolo esterį (OBt), N-hidroksi-  
25 sukcinimidilo esterį (OS<sub>4</sub>) arba pentafluormetilo esterį (OPFP).

30 Laisvų amino ir karboksilinių grupių sąveika gali vykti, pavyzdžiui, dalyvaujant dicikloheksilkarbodiimidui (DCK). Gali būti naudojama kita jungianti medžiaga, pavyzdžiui, N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrocholino-  
linas (EEDCH).

35 Paprastai patogų sąveikos reakcijas vykdyti žemose temperatūrose, pavyzdžiui, -20°C - aplinkos temperatūroje, tinkamame tirpiklyje, pavyzdžiui, tetrahidrofu-

rane, dioksane, dimetilformamide, metilenchloride arba tų tirpiklių mišinyje.

- 5 Ypač patogų sintetinti ant kietafazinio polimerinio pagrindo. Vienas tinkamiausių pagrindų tipų yra chlor-  
metilintas polistirenas (susiūtas su 1 % divinilben-  
zeno), tuo atveju sintezė prasidės nuo C-galo, pavyz-  
džiui, sujungiant N-apsaugotą liziną su pagrindu.
- 10 Eilė tinkamų kietafazinių metodikų aprašyta Eric  
Atherton, Christopher I. 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  
15 R. B. Merrifield Int. J. Peptide Protein Res 16 412-25  
(1980); Manfred Mutter and Dieter Bellof, Helvetica  
Acta 67 2009-16 (1984).
- 20 Žinomas platus aminorūgščių apsauginių grupių pasi-  
rinkimas ir jos iliustruojamos Schröder, E., and Lübke,  
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, Jojannes Meienhofer, Academic Press, NY, San  
Fransisco, London; Solid phase peptide sintesis 2nd  
30 ect., John M. Stewaet, Janis D. Youg, Pierce Chemical  
Company.

Tokiu būdu, pavyzdžiui, grupės, kurios gali būti nau-  
dojamos amino apsaugojimui, apima apsaugines grupes,  
35 tokias kaip karbобензокси (Z-), t-butoksikarbonilo  
(Bok-), 4-metoksi-2,3,6- trimetilbenzensulfonilo (Mtr-),  
ir 9-fluormetilfenoksi-karbonilo (F moc-). Reikia

- turėti omenyje, kad, kai peptidas pradedamas nuo C-galo, grupė, apsauganti aminą, turi būti prie kiekvienos pridedamos naujos liekanos  $\alpha$ -amino grupės ir turi būti selektyviai pašalinama iki kitos prijungimo stadijos. Viena iš labiausiai tinkamų tokiame laikinam amino apsaugojimui yra  $F_{moc}$  grupė, kuri gali būti selektyviai pašalinama, veikiant piperidinu organiniame tirpiklyje.
- Grupės, kurias galima panaudoti karboksilo apsaugojimui, apima lengvai skylančias esterių grupes, tokias kaip benzilo (-OBzl), p-nitrobenzilo (-ONB) arba t-butilo (-tOBu), o taip pat sąveiką su kietais pagrindais, pavyzdžiui, metilo grupėmis, sujungtomis su polistirenu.
- Tirolą apsaugančios grupės apima p-metoksibenzilą (MOB), tritilą (Trt) ir acetamidometilą (Acm).
- Reikia turėti omenyje, kad egzistuoja daug kitų tokių grupių, pavyzdžiui, smulkiai aprašytų aukščiau minėtoje literatūroje, ir visų tokių grupių naudojimas čia ir anksčiau aprašytuose būduose, yra duoto išradimo apimties ribose.
- Egzistuoja daugybė metodikų amino ir karboksilo apsauginių grupių pašalinimui. Tačiau, jos turi būti derinamos su naudojama sintetinimo strategija. Apsauginės grupės atšakose turi būti stabilios tomis sąlygomis, kai pašalinamas laikinai  $\alpha$ -aminą apsaugančios grupės iki kitos prijungimo stadijos.
- Aminą apsaugančios grupės, tokios kaip Boc, ir karboksilą apsaugančios grupės, tokios kaip tOBu, gali būti pašalinamos kartu, veikiant rūgštimi, pavyzdžiui, trifluoracto rūgštimi.

Tiola apsaugančios grupės, tokios kaip Trt, gali būti selektyviai pašalinamos, naudojant oksiduojančią medžiagą, tokią kaip jodas.

5 Cisteinas, turintis peptidų, gali būti sintetinamas tekste aprašytais metodais, pašalinant visas apsaugines grupes, įskaitant tiolą apsaugančias grupes paskutinėje sintezės stadijoje.

10 Sekantys pavyzdžiai pateikti iliustravimo tikslu.

Tirpikliai buvo pakartotinai nudistiliuoti iš komercinės medžiagos ir buvo laikomi tokiu būdu: dimetilformamidas (DMF) virš 4A molekulinio sieto, dichlorometanas (DCHM) virš  $\text{CaCl}_2$ , trietilaminas (TEA) virš Na/Pb lydinio (Baker) ir trifluoracto rūgštis (TFK) virš 4A molekulinio sieto.

TLC sistemos buvo tokios:

20

$S_1$ : silicio dioksidas/ $\text{CHCl}_3$ : MeOH (98:2)

$S_2$ : silicio dioksidas/ $\text{CHCl}_3$ : MeOH (95:5)

25  $S_3$ : silicio dioksidas RP 8/0 1% TFA 5% EtOH (vand.)

Išvalyti galutiniai produktai analizuojami grįžtamos fazės labai efektyvia skysta chromatografija (HPLC). HPLC sistema susideda iš HP 1090M chromatografo su įstatytu automatiniu mėginių surinkikliu ir HP 1040 diodų masyvu (Hewlett-Packard, Waldbronn, FRG), ir kolonėlės supelcosil LC-18 (250X4,6 mm, 6 m dalelės). Pavyzdžiai ištirpinami 0,1% (tūris/tūris) TFR (vand.) ir išplaunami linijiniu 0-30% acetonitrilo 0,1% TFR (vand.) gradientu. Srauto greitis 2 ml/min. Eliuentas stebimas 214 nm, esant 4 nm linijos pločiui. Tirpiklio

35

chromatograma atskaitoma elektronikos pagalba, o rezultatai pateikiami procentiniais ploto vienetais.

Aminorūgščių analizė:

5

Cistinas, turintis peptidų, oksiduojamas perskrūzdžių rūgštimi, pakeičiant rūgščių cistino liekaną rūgščia stabilia cisteino rūgštimi, be to, vykdant 16 valandų rūgštinę hidrolizę 6M HCl 110°C temperatūroje. Po to sausi hidrolizatai pakeičiami naudojant fenilizocianatą ir analizuojami, kaip aprašyta Heinrikson (Anal. Bioch. 136, 65-74, 1984) metodikoje.

# 1 pavyzdys

15

**L-pirolglutamil-L-glubamil-L-aspartil-L-cisteinil-L-lizinas:**

## (1) Junginys

20

**(a) t-Bok-(S-p-metoksibenzil)-L-cisteinil-(E-benziloksikarbonil)-L-lizino benzilo esteris (I)**

E - benziloksikarbonil-lizino benzilo esterio hidrochloridas ištirpinamas 3 ml DMF ir TEA dedamas tol, kol laisvas TEA bus aptinkamas garų fazėje popieriniu pH indikatoriumi. Į šį tirpalą pridedama 491 mg t-Bok-(s-p-metoksi-benzil)-L-cistein-N-hidroksisukcinimido esterio, ištirpinto 3 ml DMF. Silpna šarminė terpė palaikoma, pridedant atitinkamais laiko intervalais TEA porcijas. Mišinys paliekamas nakčiai kambario temperatūroje, patikrinama, ar ninhidrininė reakcija neigiama, po to mišiniu užkraunama 2,5x75 cm kolonėlė su Sephadex LH-20, supusiausvyrinta DMF ir kalibruota standartiniais reagentais (pavyzdžiui, duotame pavyzdyje t-Bok-(γ-benzil)-L-glutamino rūgštis-p-nitrofenilo esteris ir p-nitrofenolis). Srautas kolonėlėje palai-

35

komas gravitaciniu tekėjimu ir išbégantis srautas analizuojamas, esant 280 nm, kol surenkamos frakcijos apytiksliai po 10 ml. Produktas gali būti identifi-  
kuojamas kiekvieną frakciją tiriant plonasluoksnės  
5 chromatografijos metodu (p.s.ch.), be to surenkamos atitinkamos frakcijos ir vakuumuojamos, išeiga: 700 mg (100%) riebalinio, homogeniško produkto (p.s.ch., chlo-  
roformas/acetonas) (9/1),  $R_f=0,64$ .

10 **(b) t-Bok-( $\beta$ -benzil)-L-aspartil-(S-p-metoksibenzil)-L-cisteinil-(E-benziloksikarbonil)-L-licino benzilo esteris (II)**

700 mg blokuoto ir apsaugoto dipeptido (I) ištirpinama  
15 25 ml bevandenio DChM ir pridedama 25 ml bevandenės TFR. Rūgštis ir tirpiklis pašalinami vakuume po 30 mi-  
nučių. Liekana ištirpinama DChM ir vėl išgarinama. Tir-  
palo likutis DMF (3 ml) lengvai pašarminamas TEA, pri-  
dedamas (488 mg) t-Bok-( $\beta$ -benzil)-aspargino rūgšties p-  
20 nitrofenilo esterio tirpalas 3 ml DMF. Šarmingumas daž-  
nai tikrinamas ir palaikomas, pridedant nedidelius TEA  
kiekius. Kai inhidridinė reakcija tampa neigiama (apy-  
tiksliai po 2 valandų), reakcijos mišiniu užkraunama  
kolonėlė su Sephadex LH-20 (2,5x75 cm) ir išvaloma  
25 aukščiau aprašytu būdu. Vakuumuojama gaunant 900 mg  
(100%) kristalinio, homogeninio produkto (p.s.ch.,  
chloroformas/acetonas (9/1)),  $R_f=0,70$ .

30 **(c) t-Bok-( $\gamma$ -benzil)-L-glutamin-( $\beta$ -benzil)-L-aspartil-(S-p-metomsibensil)-L-cisteinil-(E-benziloksikarbonil)-L-lizino benzilo esteris (III)**

900 mg blokuoto II tripeptidino darinio deblokuojama  
TFR aukščiau aprašytu būdu, ištirpinama 3 ml DMF ir  
35 lengvai pašarminama TEA. Į šį tirpalą pridedama 504 mg  
t-Bok-( $\gamma$ -benzil)-L-glutamino rūgšties p-nitrofenilo  
esterio (3 ml DMF). Po 2,5 valandos ninhidrininė reak-

- cija tampa neigiama ir mišinys išvalomas per kolonėlę su Sephadex LH-20 anksčiau aprašytu būdu. Šio reakcijos mišinio komponentų išskyrimas ir kontroliavimas p.s.ch. gali būti vykdomas aukščiau aprašytu būdu. Surenkamos atitinkamos frakcijos (9-15 šiuo atveju), išgarinamos ir išdžiovinamos. Išeiga: 1140 mg (100%) šviesiai geltonos, homogeniškos alyvos (p.s.ch., chloroformas/acetonas (9/1)),  $R_f=0,53$ .
- 10     **(d) Benziloksikarbonil-L-piroglutamil-( $\gamma$ -benzil-L-glutamil-( $\beta$ -benzil)-L-aspartil-(S-p-metoksibenzil)-L-cisteinil-(E-benzil-oksikarbonil)-L-licino benzilo esteris (IV).**
- 15     1140 mg III tetrapeptidinio darinio deblokuojama TFR DChM-e pagal I dariniui aprašytą metodiką ir ištirpinama 3 ml DMF. Tirpalas lengvai pašarminamas TEA ir pridedama 423 mg benziloksikarbonil-L-piroglutamino rūgšties p-nitrofenilo esterio tirpalo 3 ml DMF. Reakcijos mišinio šarminimas pastoviai tikrinamas ir, jei reikia, pridedama TEA. Po apytiksliai 3 valandų gaunamas neigiamas ninhidrininis testas ir IV pentopeptidinis darinys išvlomas aukščiau aprašytu būdu.
- 20
- 25     Išeiga 1230 mg (96%) vos vos geltonos homogeninės alyvos (p.s.ch., chloroformas/acetonas (9/1)),  $R_f=0,44$  (su galine frakcija).
- 30     **(e) L-piroglutamil-L-glutamil-L-aspartil-L-cisteinil-L-lizinas**
- 35     50 mg apsaugoto IV pentapeptidinio darinio ištirpinama 50 ml skysto fluoro vandenilio 0°C temperatūroje, pridedant 500 mg metionino akceptorius ir paliekama 1 valandai. Po to fluoro vandenilis sausai išgarinamas vakuume 0°C temperatūroje ir liekana sumaišoma su etilacetatu. Etilacetatinė dalis nupilama. Likusi medžiaga

ištirpinama praskiestoje acto rūgštyje ir liofilizuojama.

5 Liofilizuota medžiaga (2 mg) gali būti išvaloma grįžtamos fazės HPLC, naudojant C 18-kolonėlę 10 mm x 10 cm, esant 2,8 ml/min srauto greičiui, išplaunant tirpalo A:0,1% vandeninio trifluoracto rūgšties tirpalo ir  
10 tirpalo B:0,1% trifluoracto rūgšties tirpalo acetonitrile gradientu, be to, 0,10% B tirpalas pridedamas 30 minučių bėgyje. Nustatoma, absorbuojant 214 nm ultraviolete ir naudojant piridindisulfidinį reagentą (SH-grupėms).

15 Kitų peptidų eilė gali būti sintetinama pagal 1 Pavyzdžiui aprašytą metodiką. Jie identifikuoti ir apibūdinti toliau pateikiamoje lentelėje.

## LENTELĖ

|    | Pavyzdys                              | Aminorūgščių analizė                                  |  | Grynumas/<br>HPLC |
|----|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|--|-------------------|
|    |                                       |                                                       |  |                   |
| 2  | pGlu-Gln-Asp-Cys-Lys                  | Glu: 2.00; Asp: 1.07; Cys: 0.87; Lys: 1.15            |  | 95%               |
| 3  | Ac-Glu-Glu-Asp-Cys-Lys                | Glu: 2.00; Asp: 1.11; Cys: 0.84; Lys: 1.11            |  | 94%               |
| 4  | pGlu-Glu-Glu-Cys-Lys                  | Glu: 2.98; Cys: 1.00; Lys: 1.19                       |  | 93%               |
| 5  | pGlu-Glu-Asp-Cys-D-Ala-Lys            | Glu: 1.99; Asp: 1.00; Cys: 0.89; Lys: 1.12; Ala: 1.01 |  | 94%               |
| 6  | pGlu-Glu-Asp-Cys-Lys-NH <sub>2</sub>  | Glu: 2.00; Asp: 1.07; Cys: 0.87; Lys: 1.14            |  | 94%               |
| 7  | pGlu-Asp-Asn-Cys-Lys                  | Glu: 0.94; Asp: 2.00; Cys: 0.85; Lys: 1.10            |  | 96%               |
| 8  | pGlu-Glu-Asp-Cys-Gly-Lys              | Glu: 2.05; Asp: 0.90; Cys: 0.95; Lys: 0.99; Gly: 1.07 |  | 98%               |
| 9  | pGlu-Glu-Asp- (Benzyl-Cys) -Lys       | Glu: 1.91; Asp: 1.06; Cys: -; Lys: 1.00;              |  | 99%               |
| 10 | pGlu-Ala-Asp- (Benzyl-Cys) -Lys       | Glu: 1.00; Asp: 1.00; Cys: 1.13; Lys: 0.97; Ala: 0.97 |  | 95%               |
| 11 | pGlu-Ala-Asp-Cys-Lys                  | Glu: 1.08; Asp: 0.95; Cys: 0.99; Lys: 1.03; Ala: 0.94 |  | 98%               |
| 12 | pGlu-D-Ala-Asp-Cys-Lys                | Glu: 1.10; Asp: 0.95; Cys: 0.89; Lys: 1.03; Ala: 0.92 |  | 98%               |
| 13 | Gln-Glu-Asp-Cys-Lys                   | Glu: 2.00; Asp: 0.98; Cys: 0.81; Lys: 1.16            |  | 97%               |
| 14 | pGlu-Glu-Asp-Cys-Glv                  | Davinių nėra                                          |  | 88%               |
| 15 | pGlu-Glu-Asp- (2-pyridylthio-Cys) Lys | Davinių nėra                                          |  | 97%               |
| 16 | pGlu-Gly-Asp- (Benzyl-Cys) -Lys       | Glu: 1.00; Asp: 1.00; Cys: 1.16; Lys: 0.99; Gly: 1.04 |  | 98%               |

## LENTELĖ (tęsinys)

| Pavyzdys                          | Aminorūgščių analizė                                  | Grynumas/<br>HPLC |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| 17 pGlu-Glu-Glu- (Benzyl-Cys)-Lys | Glu: 3.00; Cys: 1.1; Lys: 1.0                         | 93%               |
| 18 pGlu-Gly-Asp-Phe-Lys           | Glu: 1.00; Asp: 1.00; Gly: 1.00; Phe: 1.00; Lys: 1.00 | 99%               |
| 19 pGlu-Gly-Asn-Cys-Lys           | Glu: 2.10; Asp: 1.00; Cys: 1.00; Lys: 1.00            | 70%               |
| 20 pGlu-Gln-Asn-Cys-Lys           | Glu: 2.06; Asp: 0.94; Cys: 1.01; Lys: 0.99            | 75%               |
| 21 pGlu-Glu-Asp-Ser-Lys           | Davinių nėra                                          | >92%              |
| 22 pGlu-Gly-Asp-Cys-Lys           | Davinių nėra                                          | >95%              |
| 23 pGlu-Asp-Asp-Cys-Lys           | Glu: 1.92; Asp: 1.08; Cys: 1.02; Lys: 1.00            | 100%              |
| 24 pGlu-Asp-Asp-Cys-Arg           | Glu: 1.96; Asp: 1.12; Cys: 1.00; Arg: -               | 99%               |
| 25 Glu-Glu-Asp-Cys-Lys            | Glu: 2.00; Asp: 0.98; Cys: 0.81; Lys: 1.10            | 97%               |
| 26 Pro-Glu-Asp-Cys-Lys            | Glu: 0.99; Asp: 1.04; Cys: 1.01; Lys: 0.99; Pro: -    | 98%               |
| 27 pGlu-Glu-Glu-Cys-Arg           | Glu: 2.93; Cys: 1.01; Arg: 1.03                       | 100%              |
| 28 Ser-Glu-Glu-Glu-Cys-Arg        | Glu: 2.98; Ser: 0.97; Cys: 0.98; Arg: 1.08            | 95%               |
| 29 Ser-Gln-Glu-Glu-Cys-Arg        | Glu: 2.96; Ser: 0.96; Cys: 0.96; Arg: 1.11            | 98%               |

Peptidai apibūdinti PSCH; HPLC ir aminorūgščių analize.

### 30 Pavyzdys

#### pGlu-Glu-Asp-Ser-Lys-OH

5 Peptidas sintetinamas LKB Biolynx 4170 pilnai automa-  
tiniame peptidų sintezatoriuje, tikrinant 304 nm UV.  
Laikina N-apsaugine grupe ir UV indikatoriumi naudo-  
jamas F<sub>moc</sub>. C-galo aminorūgštis sujungiama su polimeru  
rūgščių labiliu indikatoriumi anm.

10

Standartinis protokolas:

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Sujungimas ir percirkuliavimas  | 30 min |
| Praplovimas DMF                 | 10 min |
| Deblokavimas 20% piperidinu/DMF | 10 min |
| Praplovimas DMF                 | 10 min |

15

C-galo aminorūgštis aktyvuojama kaip simetrinis anhi-  
dridas DCK ir sujungiama su katalizatoriumi polimeru  
N,N-dimetila-minopiridinu. Po 60 minučių percirkulia-  
vimo visos sintezės eigoje naudojama standartinė me-  
todika.

20

Naudojami aminorūgščių dariniai:

F<sub>moc</sub>-Lys (E-N-Boc) -OH

F<sub>moc</sub>-Ser (O-tBu) -ODBH

25

F<sub>moc</sub>-Asp (β-tOBu) -OPfp

F<sub>moc</sub>-Glu (V-tOBu) -OPfp

30

pGlu-OPClP

Pilnai apsaugotas pentapeptidas pagaliau praplaunamas, polimeras pašalinamas etilo eteriu ir džiovinamas ore. Peptidas pilnai deblokuojamas ir atskiriamas nuo polimero viena operacija 1 valandą apdirbant 95% vandeniniu TFR. Filtruojama, praplaunama TFR ir išgari-  
 5 nama, o galutinis peptidas išvalomas RP 8 kolonėlėje ir išplaunamas etanoliu 0,1% TFR.

Išeiga: 44%

10

Grynumas: Daugiau, negu 92% (HPLC RP18, 214 nm)

Aminorūgščių analizė: patenkinamai.

15

20

25

30

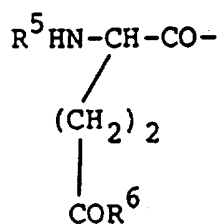
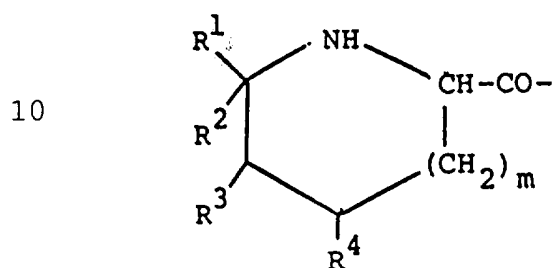
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. (I) formulės junginiai, turintys bendrą formulę (I)

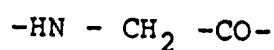
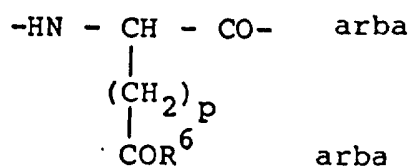
5



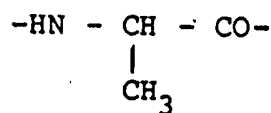
kurioje  $R^a$  yra



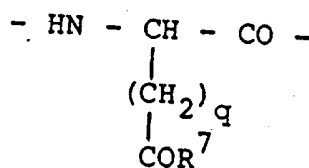
15  $R^b$  yra



20

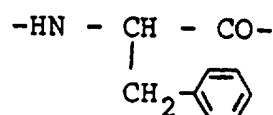
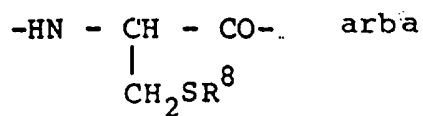


$R^c$  yra



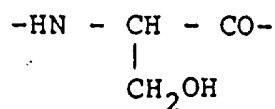
25

$R^d$  yra



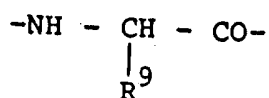
30

arba



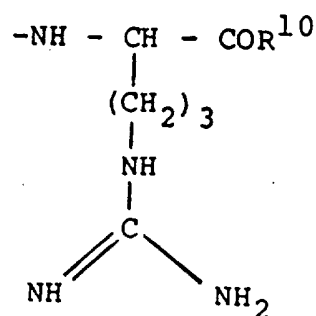
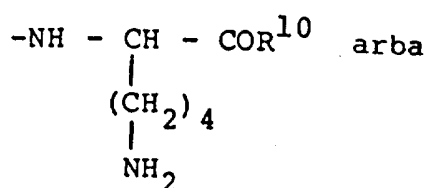
35

$R^e$  yra



5

ir  $R^f$  yra



10

15

arba-NH-CH<sub>2</sub>-COR<sup>10</sup>

20 (kuriose n ir m yra nepriklausomi 0 arba 1;

p ir q yra nepriklausomi 1 arba 2;

25  $R^1$  ir  $R^2$  abu yra vandenilio atomai arba kartu sudaro okso grupę;

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

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

$R^6$  ir  $R^7$  nepriklausomai yra hidroksilo grupė arba aminogrupė;

35  $R^8$  yra vandenilis, C<sub>2-6</sub>alkilo grupė;

C<sub>7-20</sub>aralkilo grupė, kuri gali turėti vieną ar daugiau hidroksilo, amino arba metoksi pakaitų, arba metaboliškai labiliają S-apsauginę grupę;

5 R<sup>9</sup> yra vandenilis arba metilo grupė;

R<sup>10</sup> yra hidroksilo arba aminogrupė, aminorūgšties glutamino arba peptido, turinčio glutaminą N-gale, liekana; ir, išskyrus alaniną, kuris gali būti D arba L-formos, ir gliciną, visos nurodytos aminorūgščių liekanos yra L-formos), skirti naudoti vaistinio preparato nehomopoetinės ląstelių proliferacijos inhibavimui, gamybai.

15 2. (I) formulės junginiai pagal 1 punktą, išskyrus

pGlu - Asp - Asp - Cys - Lys,

pGlu - Glu - Asp - Cys - Lys,

20

pGlu - Gln - Asp - Cys - Lys,

pGlu - Glu - Asp - Cys - Gly - Lys,

25 pGlu - Glu - Asp - Cys - Ala - Lys ir

pGlu - Glu - Asp - Cys - LysNH<sub>2</sub>,

30 skirti naudoti ląstelių proliferacijos reguliavimui, gamybai.

3. (I) formulės junginiai, nurodyti 1 punkte, b e s i - s k i r i a n t y s tuo, kad R<sup>5</sup> yra serino aminorūgšties arba peptido, turinčio seriną C-gale, liekana ir/arba R<sup>10</sup> yra glutamino aminorūgšties arba peptido, turinčio N-gale glutaminą, liekana.

35

4. Junginiai, kurių formulė (II):

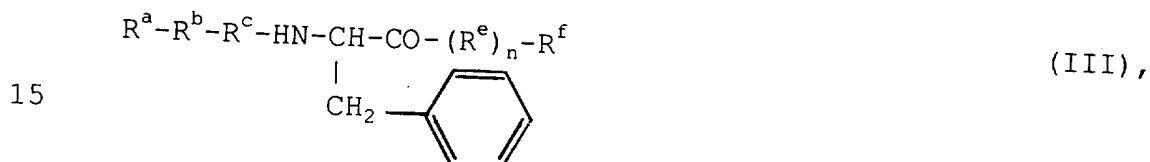


5

kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra tokie, kaip nurodyti 1 punkte, o  $R^{11}$  yra  $C_{2-6}$  alkilo arba  $C_{7-20}$  aralkilo grupė, kuri gali turėti vieną ar daugiau hidroksilo, amino arba metilo pakaitų, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, kaip nurodyta 1 punkte.

10

5. Junginiai, kurių formulė (III)



15

kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra tokie, kaip nurodyti 1 punkte, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, kaip nurodyta 1 punkte.

20

6. Junginiai, kurių formulė (IV):

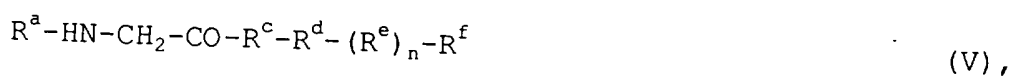


25

kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra tokie, kaip nurodyti 1 punkte, o  $R^{12}$  yra metaboliškai labili grupė, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, kaip nurodyta 1 punkte.

30

7. Junginiai, kurių formulė (V):



kurioje  $R^a$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra tokie, kaip nurodyti 1 punkte, o visos aminorūgščių liekanos yra chiralinės formos, kaip nurodyta 1 punkte.

5 8. Junginiai, kurių formulė (VI):



10

kurioje  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^e$ ,  $R^f$  ir  $n$  yra tokie, kaip numatyti 1 punkte, o visos aminorūgštys yra chiralinės formos, kaip nurodyta 1 punkte.

15 9. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina bent vienas junginys pagal bet kuri iš 3 - 8 punktų arba jo fiziologiškai tinkama druska su farmaciniu nešikliu arba užpildu.

20 10. Junginio pagal 3 - 8 punktus gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gauna pilnai arba dalinai apsaugotą nurodyto junginio darinį, o po to jį deblokuoja.

25 11. Junginiai, nurodyti 1 punkte, skirti panaudoti žmogaus arba gyvūno nehemopoetinės ląstelių proliferacijos slopinimui.

30 12. Junginys pagal bet kuri iš 3-6 punktų, skirtas panaudoti žmogaus arba gyvūno ląstelių proliferacijos ir/arba leukocitinės funkcijos slopinimui.

35 13. Junginys pagal 7 punktą, skirtas žmogaus arba gyvūno ląstelių proliferacijos ir/arba leukocitinės funkcijos slopinimui.

14. Junginys pagal 8 punktą, skirtas panaudoti žmogaus arba gyvūno epiderminės ir/arba epitelinės ląstelių proliferacijos slopinimui.