PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1996 - 1586**

(22) Přihlášeno: **12.12.1994**

(30) Právo přednosti:
15.12.1993 US 1993/168013

(40) Zveřejněno: **13.11.1996**
(Věstník č. 11/1996)

(47) Uděleno: **27.03.2001**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US94/14187**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/16688**

(11) Číslo dokumentu:

288 312

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:

C 07 D 405/06
C 07 D 491/048
C 07 D 307/77
A 61 K 31/496
A 61 P 31/18

(73) Majitel patentu:
MERCK AND CO., INC., Rahway, NJ, US;

(72) Původce vynálezu:
Huff Joel R., Rahway, NJ, US;
Vacca Joseph P., Rahway, NJ, US;
Dorsey Bruce D., Rahway, NJ, US;

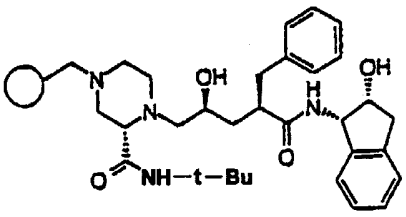
(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

Inhibitory HIV-proteázy a farmaceutické prostředky s jejich obsahem

(57) Anotace:

Inhibitory proteázy HIV obecného vzorce I, v němž obecné symboly mají specifický význam, je možno použít k léčení AIDS, prevenci a léčení infekce HIV a k inhibici HIV-proteázy. Tyto látky se užívají ve formě farmaceutických prostředků, které rovněž tvoří součást řešení.



(I)

CZ 288312 B6

Inhibitory HIV–proteázy a farmaceutické prostředky s jejich obsahem

Oblast techniky

Vynález se týká inhibitorů HIV–proteázy, které způsobují inhibici proteázy, pro niž je kódem virus lidské imunodeficience, HIV. Vynález se rovněž týká farmaceuticky přijatelných solí těchto látek, které je možno použít k prevenci a léčení infekce HIV a k léčení výsledného syndromu získané imunodeficience, AIDS. Vynález se rovněž týká farmaceutických prostředků s obsahem uvedených látek.

Dosavadní stav techniky

Retrovirus, způsobující u lidí deficienci imunitního systému, HIV, je příčinou komplexních onemocnění, při nichž dochází k progresivní destrukci celého imunitního systému a ke vzniku syndromu AIDS, spojeného s degenerací centrálního i periferního nervového systému. Virus byl dříve označován také LAV, HTLV–III nebo ARV. Společnou vlastností replikace retrovirů je rozsáhlé posttranslační zpracování prekurzorových polypropteinů proteázou, pro niž je virus kódem, za vzniku virových bílkovin, nezbytných pro funkci viru. Při inhibici tohoto postupu dochází k blokování produkce úplného infekčního viru. Například v publikaci Kohl N.E. a další, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 4686, 1988 se prokazuje, že při genetické inaktivaci proteázy, pro niž je kódem HIV, dochází k produkci nezralých, neinfekčních částic viru. Tyto výsledky prokazují, že inhibice proteázy HIV představuje slibný postup v případě léčení AIDS a při prevenci a léčení infekce HIV.

Z nukleotidové sekvence HIV je zřejmé, že v jednom z otevřených čtecích rámců se nachází gel pol, jak bylo popsáno v publikaci Ratner L., a další, Nature, 313, 217, 1985. Homologie řetězce aminokyselin prokazují, že sekvence genu pol je kódovým řetězcem pro reverzní transkriptázu, endonukleázu a proteázu HIV, jak bylo popsáno v publikacích Toh, H a další, EMBO J., 4, 1267, 1985, Power M. D. a další, Science, 231, 1567, 1986, Pearl L. H. a další, Nature, 329, 351, 1987.

V popisu budou použity některé zkratky, které jsou dále vysvětleny:

Ochranné skupiny:

BOC (Boc)	terc. butyloxykarbonyl
CBZ (Cbz)	bezyloxykarbonyl (karbobenzoxyskupina)
TBS (TBDMS)	terc.butyldimethylsilyl

Aktivační skupina:

HBT (HOBT nebo HOBt)	1–hydroxybenzotriazolhydrát

Vazná činidla:

BOP	benzotriazol–1–yloxytris(dimethylamino)fosfoniumhexafluorfosfát
BOP–Cl	bis(2–oxo–3–oxazolidinyl)fosfinchlorid
EDC	1–ethyl–3–(3–dimethylaminopropyl)karbodiimidhydrochlorid

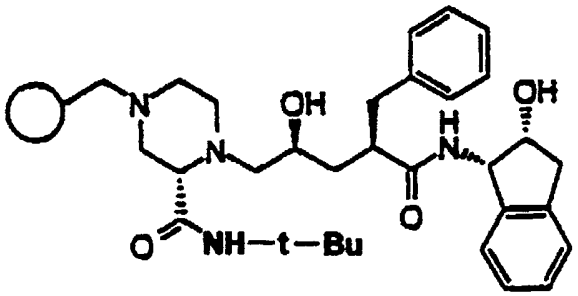
Jiné látky:

$(BOC)_2O$, (BOC_2O)	di–terc.butyldikarbonát
$n–Bu_4N^+F^-$	tetrabutylaminiumfluorid
nBuLi (n–Buli)	n–butyllithium
DMF	dimethylformamid
Et_3N	triethylamin
EtOAc	ethylacetát
TFA	kyselina trifluoroctová
TFA	kyselina trifluoroctová
DMAP	dimethylaminopyridin
DME	dimethoxyethan
LDA	lithiumdiizopropylamid
THF	tetrahydrofuran
t	t–butyl (t–Bu)

Podstata vynálezu

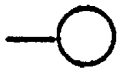
Podstatu vynálezu tvoří inhibitory HIV proteázy, které je možno použít k inhibici HIV–proteázy, k prevenci a léčení infekce HIV a k léčení AIDS. Sloučeniny je možno užít jako takové, ve formě farmaceuticky přijatelných solí a jako složky farmaceutických prostředků, popřípadě v kombinaci s dalšími protivirovými látkami, imunomodulátory, antibiotiky nebo vakcínami.

Podstatu vynálezu tedy tvoří inhibitory HIV–proteázy obecného vzorce I

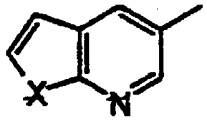


(I)

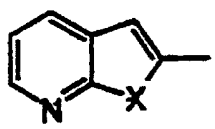
nebo farmaceuticky přijatelné soli těchto látek, v nichž



znamená



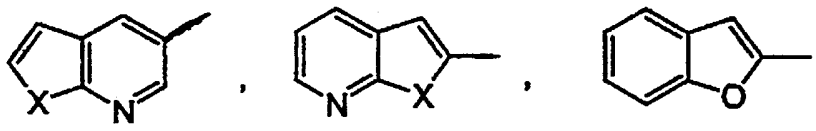
nebo



kde X znamená atom kyslíku nebo síry.

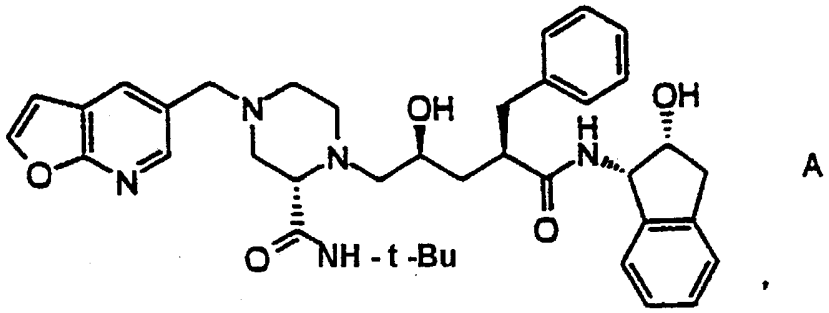
V jednom z možných provedení se vynález týká inhibitorů HIV–proteázy obecného vzorce I, v nichž


znamená



a farmaceuticky přijatelných solí těchto látek.

Další provedení vynálezu představuje výhodná sloučenina vzorce A



A

N–(2–(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–hydroxy–5–(1–(4–(3–furo[2,3–b]pyridylmethyl)–2(S)–N'–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamid a její soli, přijatelné z farmaceutického hlediska.

Sloučeniny podle vynálezu obsahují středy chirality a mohou se vyskytovat jako racemáty, racemické směsi a jednotlivé diastereomery nebo enantiomery, přičemž všechny tyto izomery formy jsou do rozsahu vynálezu zahrnuty. Racemické směsi zahrnují směsi stereoizomerů v poměru 50 : 50 i v jakýchkoliv jiných poměrech.

V případě, že se kterákoliv ze skupin, například  vyskytuje v molekule účinné látky obecného vzorce I více než jednou, je význam této skupiny při každém dalším výskytu nezávislý na významu při ostatních výskytech. Kombinace subtituentů a/nebo skupin jsou však přípustné pouze v případě, že při použití těchto kombinací vznikají stálé výsledné látky.

V průběhu popisu znamená pojem „alkyl“ nasycený alifatický uhlovodíkový zbytek s přímým nebo rozvětveným řetězcem s uvedeným počtem uhlíkových atomů. Me = methyl, Et = ethyl, pr = propyl, Bu = butyl. Atomem halogenu může být atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu.

Farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I ve formě produktů , rozpustných nebo dispergovatelných ve vodě nebo v oleji, zahrnují běžné netoxické soli nebo kvartérní amoniové soli. Tyto soli mohou být vytvořeny například s anorganickými nebo organickými kyselinami nebo bázemi. Jako příklady adičních solí s kyselinami je možno uvést acetáty, adipáty, algináty, aspartáty, benzoáty, benzensulfonáty, hydrogensulfáty, butyráty, citráty, soli kyseliny kafrové nebo kafrosulfonové, cyklopentanpropionáty, diglukonáty, dihydrochloridy, difosfáty, dodecyl-

sulfáty, ethansulfonáty, fumaráty, glukoheptanoáty, glutamáty, glycerofosfáty, hemisulfáty, heptanoáty, hexanoáty, hydrochloridy, hydrobromidy, hydrojodidy, 2–hydroxyethansulfonáty, laktáty, maleáty, methansulfonáty, 2–naftalensulfonáty, nikotináty, nitráty, oxaláty, pamoáty, pektináty, persírany, 3–fenylpropionáty, fosfáty, pikráty, pivaláty, propionáty, jantarany, vinany, thiokyanáty, tosyláty a undekanoáty. Soli s bázemi zahrnují amonné soli, soli s alkalickými kovy, jako sodné a draselné soli, soli s kovy alkalických zemin, jako vápenaté a hořečnaté soli, soli s organickými bázemi, například s dicyklohexylaminem nebo N–methyl–D–glukaminem a také soli s aminokyselinami, například s argininem nebo lysinem. Bázické skupiny, které obsahují dusík, mohou být také kvarternizovány například nižšími alkylhalogenidy, jako methyl–, ethyl–, propyl– a butylchloridy, –bromidy a –jodidy, dialkylsulfáty, jako dimethyl–, diethyl–, dibutyl– a diamylsulfáty, halogenidy s dlouhým řetězcem, jako decyl–, lauryl–, myristyl– a stearylchloridy, –bromidy a –jodidy, aralkylhalogenidy, jako benzyl– a fenethylbromidy a podobně. Další farmaceuticky přijatelné soli jsou sulfáty ethanolátů a sulfáty.

Dále budou uvedeny reakční schémata I a II pro výrobu nových sloučenin podle vynálezu. V následujících příkladech pak budou uvedeny aplikace postupů podle těchto schémat na jednotlivé sloučeniny.

Amidové vazby, při nichž se vytvářejí sloučeniny podle vynálezu se typicky uskuteční karbodiimidovým postupem, například při použití dicyklohexylkarbodiimidu nebo 1–ethyl–3–(3–dimethylaminopropyl)karbodiimidu. Další postupy pro tvorbu amidové nebo peptidové vazby zahrnují některé syntetické postupy přes chlorid kyseliny, azid, směsný anhydrid nebo aktivovaný ester. Typicky se tyto reakce provádějí v roztoku, je však možno je uskutečnit i v pevné fázi, například podle Merrifielda. Adice a odstranění jedné nebo většího počtu ochranných skupin patří rovněž k běžným postupům.

Další informace o běžných syntetických postupech je možno nalézt v EP 377 714 a EP 541 168.

Ve schématu I je uveden postup, při němž se připraví dihydro–5(S)–(terc.butyldimethylsilyloxymethyl)–3(2H)–furanon, sloučenina 1 běžnými postupy s běžně dodávaného dihydro–5(S)–(hydroxymethyl)–2(3H)–furanonu. Po aplikaci sloučeniny 1 na sloučeninu 2 se ochranná skupina z laktonu vzorce 2 odstraní vodným roztokem NH za vzniku sloučeniny 3.

Alkoholová skupina sloučeniny 3 se aktivuje přeměnou na odštěpitelnou skupinu, jako mesylát, toxylát nebo triflát tak, že se na alkohol působí sulfonylchloridem nebo s výhodou anhydridem kyseliny sulfonové, například trifluormethansulfonové v přítomnosti báze typu aminu, jako triethylaminu, diethylizopropylaminu nebo 2,6–lutidinu za vzniku sloučeniny vzorce 4. Odštěpitelná skupina této látky se nahradí aminem vzorce 5, například 4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)piperazin–2(S)–karboxamidem v rozpouštědle, například DMF nebo xylenu za vzniku sloučeniny vzorce 6. Trifluormethansulfonyloxyskupinu je možno nahradit aminem při teplotě místnosti v rozpouštědle, například v izopropanolu nebo methylenchloridu působením N,N–diizoporpylethylaminu.

Sloučenina vzorce 6 se hydrolyzuje vodným roztokem hydroxidu lithného nebo sodného a výsledná hydroxykyselina vzorce 7 se převede na chráněnou hydroxykyselinu vzorce 8. K ochraně hydroxylové skupiny se běžně užívá silylová skupina, například terc.butyldimethylsilyl nebo terc.butyldifenylsilyl.

Chráněná hydroxykyselina vzorce 8 se pak naváže na požadovaný R^{12}–amin za vzniku sloučeniny 9, silylová ochranná skupina se odstraní fluridem, čímž vznikne výsledný produkt vzorce 10.

Schéma I

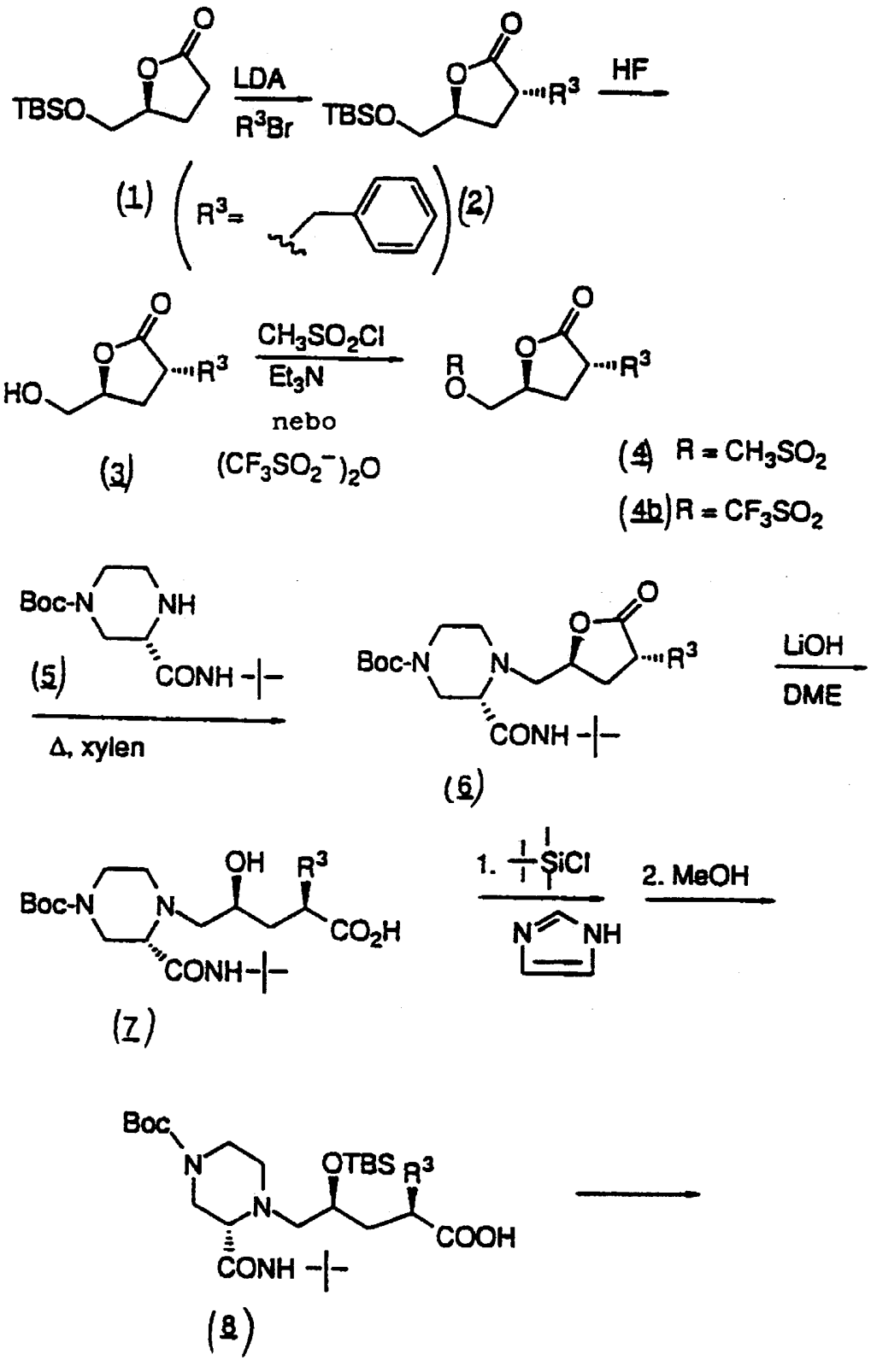
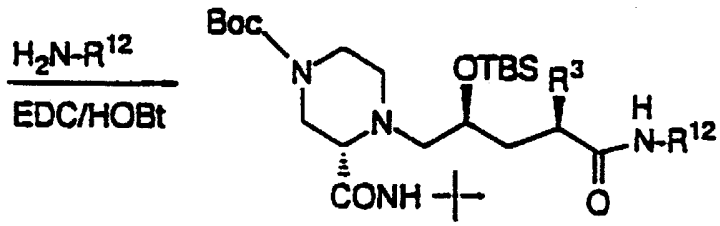
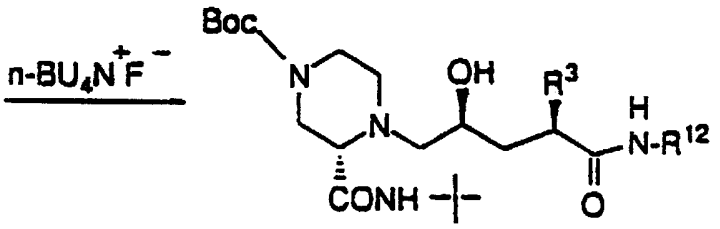

TBSO
LDA
R3Br
HF
(1)
R3=
(2)
HO
CH3SO2Cl
Et3N
nebo
(CF3SO2−)2O
(3)
R
O
(4) R = CH3SO2
(4b) R = CF3SO2
Boc-N
NH
(5)
CONH
Δ, xylen
LiOH
DME
(6)
OH
CO2H
1.
SiCl
2. MeOH
(7)
Boc
OTBS
COOH
(8)

Schéma I - pokrač.

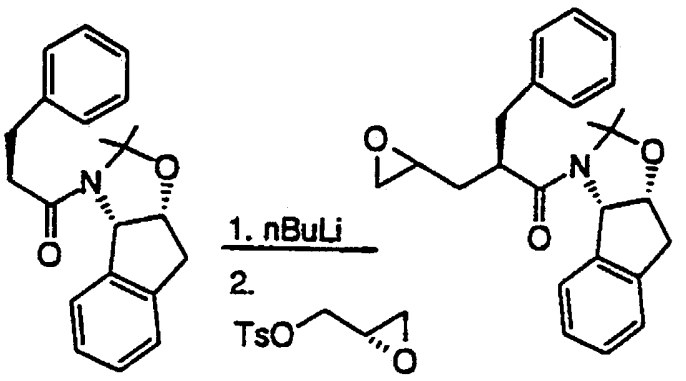


(9)

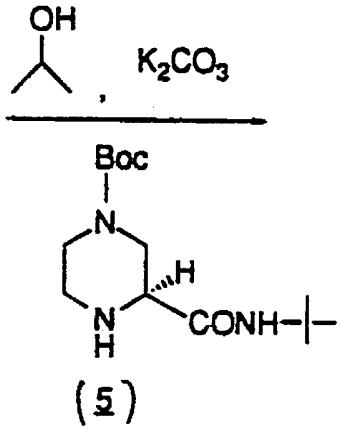


(10)

Schéma II

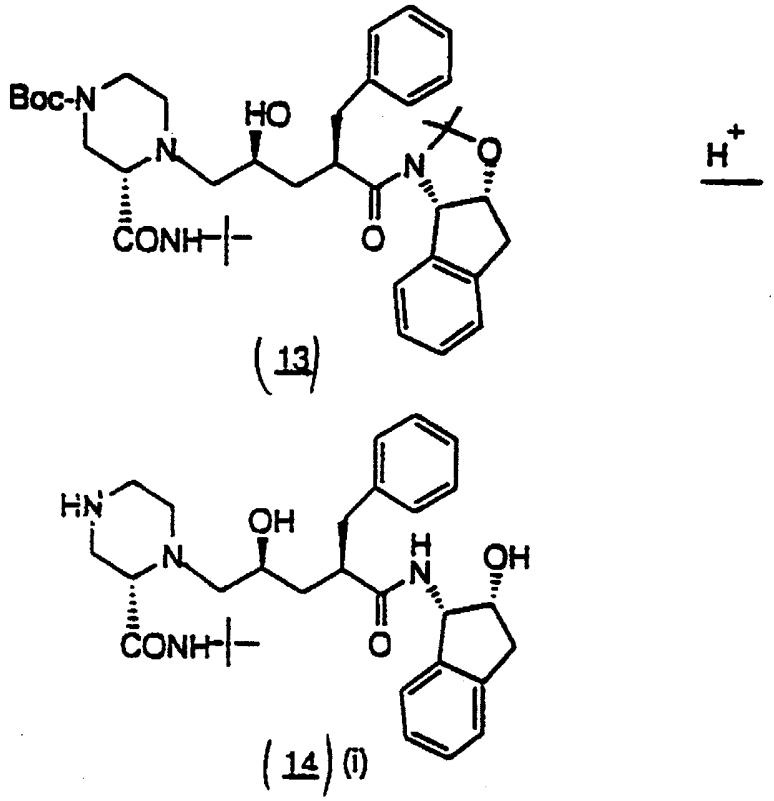


(11) (12)



(5)

Schéma II – pokračování



Jedním z výhodných postupů je syntéza epoxidů vzorce 12 reakcí sloučeniny vzorce 11 v přítomnosti silné báze. Tato silná báze musí být báze s obsahem kovu a užije se v inertním bezvodém organickém rozpouštědle, například v cyklickém nebo acyklickém uhlovodíku včetně hexanu, pentanu, cyklohexanu a podobně. Z vhodných silných bází je možno uvést $LiN/(CH_3)_3Si/_2$, $KN/(CH_3)_3Si/_2$ $NAN/(CH_3)_3Si/_2$, n–butyllithium (n–BuLi), s–BuLi, t–BuLi, terc.butoxid draslíku, lithiumdiizopropylamid LDA, lithiumizopropylcyklohexylamid, lithium-pyrrolidid, lithiumtetramethylpyperidid, fenyllithium, izopropylmagnesiumchlorid, izobutyl-magnesiumchlorid a další známé podobné silné báze. Z výhodných silných bází je možno uvést n–Buli, s–Buli, $LiN/(CH_3)_3Si/_2$ a LDA, nejvýhodnějšími bázemi jsou n–Buli a $LiN/(CH_3)_3Si/_2$.

Na jeden molární ekvivalent sloučeniny vzorce 11 se s výhodou užijí 1 až dva molární ekvivalenty silné báze.

Sloučeniny vzorce 13 je možno získat reakcí sloučeniny vzorce 12 s N–terc.butyl–4(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)piperazin–2(S)–karboxamidem vzorce 5. S výhodou se užití jedna až tři molární ekvivalenty amonu vzorce 5 na jeden molární ekvivalent epoxidu vzorce 12, přičemž velmi výhodné je použít 1,05 : 1 molárních ekvivalentů V : IV.

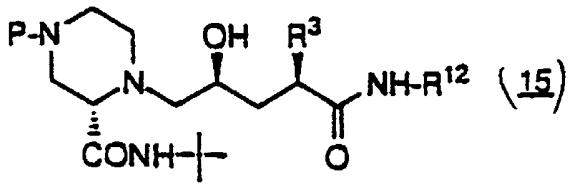
Reakci je možno uskutečnit v jakémkoliv vhodném rozpouštědle, například uhlovodíku, jako toluenu, v etheru, jako diethyletheru, v alkoholech, jako methanolu, ethanolu nebo izopropanolu, v nitrilu, jako acetonitrilu nebo v esteru, jako ethylacetátu nebo ve směsi těchto rozpouštědel, výhodnými rozpouštědly jsou alkoholy a z nich zvláště izopropanol. Reakční teplotu je možno volit od teploty místnosti až do teploty varu použitého rozpouštědla pod zpětným chladičem, s výhodou se však reakce provádí při vyšší teplotě, například v rozmezí 80 až 90, s výhodou 83 až 85 °C.

Aktivované glycidoly je možno připravit známým způsobem, například podle publikace J Klunder a další, J. Org. Chem., 1989, 54, 1295 – 1304 a podle citací, které jsou v této publikaci uvedeny.

Amidy, například vzorce 11 je možno připravit běžnými postupy, například způsobem, který bude dále popsán v příkladu 10, při použití příslušných výchozích látek.

Ochranné skupiny, například na atomu dusíku, je možno použít v případě potřeby. Například je možno chránit atom dusíku v poloze 4 ve 2–terc.butylkarboxamidpiperazinu, například skupinou BOC, CZB, benzylovou, 4–methoxybenzylovou, 2,4–dimethoxybenzylovou, trifluoracetamidovou, trialkylsilylovou nebo jinou známou skupinou.

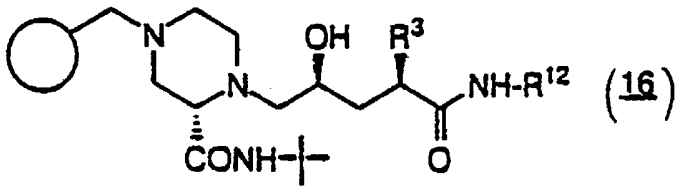
Sloučeniny obecného vzorce 15



(15)

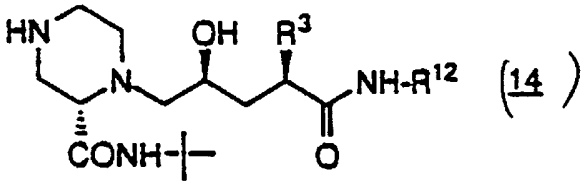
v nichž P znamená ochrannou skupinu na dusíkovém atomu, například –BOC nebo –CBZ, je rovněž možno připravit způsobem podle schématu I, s výhodou při použití 5–trifluormethansulfonyloxymethylového analogu laktonu vzorce 4.

Sloučeniny vzorce 16



(16)

je možno získat celou řadou postupů ze sloučenin obecného vzorce 14



(14)

které je možno připravit po odstranění ochranné skupiny na atomu dusíku ve sloučenině vzorce 15 při použití známých postupů, například katalytické hydrogenace k odstranění skupiny CBZ nebo působením trimethylsilyltriflátu a 2,6–lutidinu při teplotě přibližně 0 °C v rozpouštědle,

jako methylenchloridu nebo působením 6N roztoku HCl v izopropanolu k odstranění skupiny BOC.

Atom dusíku v poloze 4 piperazinylové skupiny ve sloučenině vzorce 14 je možno alkylovat působením sloučeniny obecného vzorce R^1–X v rozpouštědle, například DMF v přítomnosti Et_3N při teplotě místnosti, ve sloučenině znamená symbol X atom chloru, bromu nebo jodu. Postup se provádí známým způsobem.

Sloučeniny podle vynálezu jsou jednotlivě uvedeny také v tabulce, připojené k následujícímu příkladu 3.

Sloučeniny podle vynálezu je možno použít k řádovému vyšetření účinnosti protivirových látek, k izolaci mutantů enzymů, které lze využít k vyhledávání účinnějších protivirových látek a mimoto k určení vazných míst dalších protivirových látek na HIV–proteázu, například kompetitivní inhibicí.

Sloučeniny podle vynálezu je možno použít k inhibici HIV–proteázy a tím i k prevenci nebo léčení infekce virem HIV a k léčení následných patologických stavů, například syndromu AIDS. Léčení AIDS nebo prevence nebo léčení infekce HIV zahrnuje ošetření široké škály stavů, které jsou důsledkem této infekce. Jde zejména o syndrom AIDS, ARC, který je příbuzný předchozímu syndromu, a to dosud bez příznaků i po vzniku příznaků, mimoto jde také o případy při nichž došlo k expozici viru HIV nebo je na tuto expozici vážné podezřené. Může jít například o stavy po transfuzi krve, transplantaci orgánů, výměně tělesných tekutin, o pokousání člověkem, o náhodné poranění špičkou injekční jehly nebo po expozici krvi nemocného v průběhu chirurgického zákroku.

K uvedenému účelu je možno podávat sloučeniny podle vynálezu perorálně, parenterálně, včetně podkožního, nitrožilního, nitrosvalového a intrasterálního podání ve formě injekce nebo infuze, o podání inhalací nebo rektální podání, přičemž lékové formy mohou obsahovat běžné netoxické, z farmaceutického hlediska přijatelné nosiče, pomocné látky a nosná prostředí.

Farmaceutické prostředky mohou mít formu suspenzí nebo tablet pro perorální podání, sprejů do nosu, sterilních injekčních prostředků, například roztoků nebo suspenzí ve vodě nebo v oleji nebo formu čípků.

V případě suspenzí pro perorální podání se tyto prostředky připravují známým způsobem a mohou obsahovat mikrokrystalickou celulózu pro zvětšení objemu, alginovou kyselinu nebo alginát sodný, jako činidlo, napomáhající vzniku suspenze, methylcelulózu pro zvýšení viskozity a mimoto ještě další látky, například sladidla a látky pro úpravu chuti. Tablety, z nichž se účinná látka uvolňuje okamžitě, mohou obsahovat mikrokrystalickou celulózu, hydrogenfosforečnan vápenatý, škrob, stearan hořečnatý, laktózu a/nebo další nosiče, pojiva, dezintegrační činidla, ředidla a kluzné látky, tak jak jsou v oboru běžně používány.

Pro podání ve formě aerosolů do nosu nebo inhalací se farmaceutické prostředky rovněž připravují známými postupy. Může jít o roztoky ve fyziologickém roztoku chloridu sodného, obsahující benzylalkohol nebo jiná vhodná konzervační činidla, látky, podporující vstřebávání pro zvýšení biologické dostupnosti, fluorované uhlovodíky a/nebo jiná solubilizační nebo dispergační činidla.

Injekční roztoky nebo suspenze mohou obsahovat běžná netoxická, pro parenterální podání vhodná ředidla nebo rozpouštědla, jako jsou mannitol, 1,3–butandiol, voda, Ringerův roztok nebo izotonický roztok chloridu sodného, nebo také dispergační činidlo, smáčedla, a suspenzní činidlo, například sterilní fixované oleje včetně syntetických mono– nebo diglyceridů a mastné kyseliny včetně kyseliny olejové.

V případě rektálního podání ve formě čípků je možno farmaceutické prostředky připravit smísením účinné látky s vhodným nedráždivým základem, například s kakaovým máslem, syntetickými glyceridy nebo polyethylenglykoly, které se nacházejí v pevném stavu při běžných teplotách, jsou však kapalné a/nebo se rozpouštějí v konečníku za současného uvolnění účinné látky.

Pro léčení nebo prevenci svrchu uvedených stavů se užívá dávek 0,02 až 5,0 nebo 10,0 g denně, přičemž při perorálním podání se užívají dávky 2x až 5x vyšší. například je možno infekci HIV účinné léčit podáním 1,0 až 50 mg účinné látky/kg tělesné hmotnosti 1 až 4x denně. Při výhodném způsobu podávání se perorálně podávají dávky 100 až 400 mg každých 6 hodin perorálně. Je zřejmé, že specifické dávky a frekvence jejich podání budou u každého nemocného proměnlivé a budou záviset na celé řadě faktorů včetně účinnosti použité látky, její metabolické stálosti a délce jejího účinku a také na věku nemocného, jeho hmotnosti, zdravotním stavu, pohlaví, způsobu stravování, způsobu podání, rychlosti vylučování, na použité kombinaci užitých látek a také na závažnosti léčení choroby.

Nové látky podle vynálezu je také možno kombinovat s dalšími látkami, které se rovněž užívají k léčení svrchu uvedených chorob, zejména syndromů AIDS. Je například možno podávat sloučeniny podle vynálezu po vystavení infekci virem, avšak také před předpokládaným vystavením této infekci v kombinaci s protivirovými látkami, imunomodulátory, látkami proti původcům různých infekcí nebo s vakcínami, například s prostředky, které jsou uvedeny v následující tabulce C.

Tabulka C

Protivirové látky

Účinné látka	výrobce	indikace
Al–721	Ethigen Los Angeles, CA	ARC, PGL, HIV pozitivita, AIDS
Rekombinantní lidský interferon beta	Triton Biosciences Almeda, CA	AIDS, Kaposiho sarkom, ARC
Acemannan	Carrington Labs Irving, TX	ARC, viz též imunomodulátory
Cytoven	Syntex Palo Alto, CA	CMV, ohrožující zrak
Ganciclovir	Syntex Palo Alto, CA	periferní CMV retinitis
d4T, didehydrodeoxythymidin	Bristol–Myers New York, NY	AIDS, ARC
ddI dideoxyinosin	Bristol–Myers New York, NY	AIDS, ARC
EL10	Elan Corp., PLC Gainesville, GA	infekce HIV, viz též imunomodulátory
fosfonomravenčan sodný	Astra Pharm. Products, Ind. Westborough, MA	CMV retinitis, infekce HIV, jiné CMV infekce
dideoxycytin ddC	Hoffman–La Roche Nutley, NJ	AIDS, ARC
Novapren	Novaferon Labs., Ind. Akron, OH, Diapren, Inc. Rosevile, MN dodavatel	HIV inhibitor
Peptid T, oktapeptidový řetězec	Peninsula Labs Belmont, CA	AIDS
Zidovudin, AZT,	Burrough Wellcome Rsch. Triangle Park, NC	pokročilý AIDS, ARC, pediatrický AIDS, Kaposiho sarkom, infekce HIV bez příznaků nebo méně závažná, zasažení nervové tkáně, v kombinaci s dalšími látkami
Ansamycin LM 427	Adria Laboratoires Dublin, OH Erbamont Stamford, CT	ARC
Dextransulfat	Ueno Fine Chem. Ing. Ltd., Osaka, Japonsko	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez příznaků
Virazol, Ribavirin	Viratek/ICN Costa Mesa, CA	HIV pozitivita bez příznaků, LAS, ARC
Alfa–interferon	Burroughs, Wellcome Rsch. Triangle Park, NC	Kaposiho sarkom, HIV, v kombinaci s Retrovirem
Acyclovir	Burroghs Wellcome	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez příznaků, v kombinaci s AZT

protilátka, neutralizující pH–labilní alfa–aberantní interferon v imunoadsorpčním sloupci	Advences Biotherapy Concepts Rockville, MD	AIDS, ARC
B [6–chlor–4(S) cyklo-propyl–3,4–dihydro–4–((2–pyridyl)ethinyl)-chinazolin–2–(1H)–on]	Merck Rahway, NJ	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez příznaků, také v kombinaci s AZT
C–[(–)–6–chlor–4(S)–trifluormethyl–1,2–dihydro–4(1H)–3,1–benzoxazin–2–on]	Merck Rahway, NJ	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez příznaků, také v kombinaci s AZT
Nevirapin	Boahring Ingelheim	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez příznaků, také v kombinaci s AZT
Imunomodulátory		
AS–101	Wyeth–Ayerst Labs. Philadelphia, PA	AIDS
Bropirimin	Upjohn Kalamazoo, MI	pokročilý AIDS
Acemannan	Carrington Labs, Ind., Irving, TX	AIDS, ARC, viz též protivirové látky
CL246 738	American Cyanamid Pearl River, NY Lederle Labs Wayne, NJ	AIDS, Kaposiho sarkom
EL 10	Elan Corp., PLC Gainesville, GA	infekce HIV, viz též protivirové látky
Gamma interferon	Genentech S. San Francisco, CA	ARC, v kombinaci s TNF (faktor nekrózy nádoru)
faktor, stimulující tvorbu kolonií granulocytů a makrofágů	Genetics Institute Cambridge, MA Sandos East Hanover, NJ	AIDS
faktor, stimulující tvorbu kolonií granulocytů a makrofágů	Hoeschst–Roussel Sommerville, NJ Immunex Seattle, WA	AIDS
faktor stimulující tvorbu kolonií a granulocytů a makrofágů	Schering–Plough Madison, NJ	AIDS, v kombinaci s AZT
imunostimulační částice jádra HIV	Reror Ft. Washington, PA	séropozitivní HIV
IL–2 Interleukin–2	Cetus Emeryviolle, CA	AIDS, v kombinaci s AZT
IL–2 Interleukin–2	Hoffman–La Roche Nutley, MJ Immunex, Seattle, WA	AIDS, ARC, HIV v kombinaci s AZT
imunoglobulin pro nitrožilní podání, lidský	Cutter Biological Berkeley, CA	pediatrický AIDS, v kombinaci s AZT
IMREG–1	Imreg New Orleans, LA	AIDS, Kaposiho sarkom, ARC, PGL
IMREG–2	Imreg New Orleans, LA	AIDS, Kaposiho sarkom, ARC, PGL
Imuthiol diethyldithiokarbamát	Marieus Institute Miami, FL	AIDS, ARC
Alfa–2–interferon	Schering Plough, Madison, NJ	Kaposiho sarkom, v kombinaci s AZT, AIDS
Methioninenkefalin	TNI Pharmaceutical Chicago, IL	AIDS, ARC
MTP–PE, muramyltripeptid	Ciba–Geigy, Corp., Summint, NJ	Kaposiho sarkom
faktor, stimulující kolonit granulocytů	Amgen Thousand Oaks, CA	AIDS, v kombinaci s AZT
rCD4, rekombinantní rozpustný lidský CD4	Genentech S. San Francisco, CA	AIDS, ARC
rCD4–IgG–hydridy	Genentech S. San Francisco, CA	AIDS, ARC
rekombinantní rozpustný lidský CD4	Biogen Cambridge, MA	AIDS, ARC
Interferon alfa 2a	Hoffman–La Roche Nutley, NJ	Kaposiho sarkom, AIDS, ARC, v kombinaci s AZT

SK a F106528 rozpustný T4	Smith, Kline a French Laboratories Philadelphia, PA	infekce HIV
Thymopentin	Immunobiology Research Institute Annandale, NJ	infekce HIV
faktor nekrózy nádorů FNF	Genentech S. San Francisco, CA	ARC, v kombinaci s gamma–interferonem
Látky s protiinfekčním účinkem		
Clindamycin s Primaquinem	Upjohn Kalamozoo, MI	PCP
Fluconazol	Pfizer New York, NY	kryptokoková meningitis, kandidiáza
Pastille nystatinové pastilky	Squibb Corp., Princeton, NJ	prevence kadidiázy v ústech
Ornidyl Eflomithin	Merrell Dow Cincinnati, OH	PCP
Pentamidin Insethionát, IM a IV	LyphoMed Rosemont, IL	léčení PCP
Trimethoprim	LyphoMed Rosemont, IL	antibakteriální látka
Trimethiprim/sulfa	LymphoMed Rosemont, IL	antibakteriální látka
Piritrexim	Burroughs Wellcome Rsch. Triangle Park, NC	léčení PCP
Pentamidinisethionát pro inhibici	Fisons Corporation Bedford, MA	profylaxe PCP
Spiramycin	Rhone–Poulenc Pharmaceuticals Princeton, NJ	cryptosporidiální průjem
Intraconazol R51211	Jansyen Pharm. Piscataway, NJ	histoplazmóza, kryptokoková meningitis
Trimetrexat	Warner–Lambert	PCP
Jiné látky		
rekombinantní lidský erythropoetis	Ortho Pharm. Corp. Raritan, NJ	těžká anemie spojená s léčbou AZT
Megestrolacetát	Bristol–Myers New York, NY	léčení anorexie, spojené s AIDS
úplná enterální výživa	Norwich Eaton Pharmaceuticals Norwich, NY	průjem a špatné vstřebávání, spojené s AIDS

Je zřejmé, že možné kombinace sloučenin podle vynálezu s protivirovými látkami proti AIDS, imunomodulátory, antiinfekčními látkami nebo vakcínami nejsou vyčerpány látkami ze svrchu uvedené tabulky, avšak zahrnují v principu kombinaci s jakoukoliv látkou, která je při léčení AIDS nějakým způsobem užitečná a může stav zlepšit.

Některé sloučeniny ze svrchu uvedené tabulky jsou následující: sloučenina B je 6–chlor–4–(S)–cyklopropyl–3,4–dihydro–4–((2–pyridyl)ethinyl)chinazolin–2(1H)–on, sloučenina C je (–)–6–chlor–4–(S)–trichlormethyl–1,2–dihydro–4(H)–3,1–benzoxazin–2–on, nevirapin je 11–cyklopropyl–5,11–dihydro–4–methyl–6H–dipyrido/3,2–b:2′,3′–e//1,4–diazepin–6–on.

Sloučeniny B a C je možno připravit podle EP 569 083. Nevirapin je možno připravit podle publikací Klunder J. M. a další, J. Med. Chem., 35, 1887, 1992, Hargrave K. D. a další J. Med. Chem. 34, 2231, 1991, Cohen K. A. a další, J. Biol. Chem., 266, 14670, 1991.

Výhodnými kombinacemi jsou zejména případy, kdy se současně nebo střídavě podává inhibitor proteázy HIV a inhibitor reverzní transtriptázy HIV nenukleosidové povahy. Případnou třetí složkou v kombinaci může být nukleosidový inhibitor reverzní traskriptázy HIV, jako AZT, ddC nebo ddI, výhodným inhibitorem proteázy HIV je sloučenina A. Výhodné nenukleosidové

inhibitory reverzní transkriptázy HIV zahrnují sloučeninu B, sloučeninu C nebo nevirapin. Svrchu uvedené kombinace mohou mít synergní účinky na omezení rozšíření HIV. Výhodnými kombinacemi jsou zejména 1) sloučenina A a výhodný nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy HIV a popřípadě ještě AZT nebo ddI nebo ddC nebo 2) sloučenina A a kterákoliv ze sloučenin AZT nebo ddI nebo ddC.

Zkouška na inhibici proteázy HIV po její expresi v mikroorganismech

Inhibiční zkoušky s proteázou, jejíž exprese byl dosažena v Escherichia coli, byly provedeny při použití peptidového substrátu Val–Ser–Gln–Asn–(betanaftyl)Ala–Pro–Ile–Val v koncentraci 0,5 mg/ml na začátku reakce. Zkouška byla provedena v 50 mM octanu sodného o pH 5,5 při teplotě 30 °C po dobu 1 hodiny.

K 25 mikrolitrům roztoku peptidu ve vodě byly přidány různé koncentrace inhibitorů v 1,0 mikrolitru DMSO. Reakce byla zahájena přidáním 15 mikrolitrů 0,33 nM roztoku proteázy (0,11 ng) v roztoku v 0,133 M octanu sodného o pH 5,5 s 0,1 % sérového albuminu skotu. Reakce byla ukončena přidáním 160 mikrolitrů 5% kyseliny fosforečné. Produkty reakce byly od sebe odděleny pomocí HPLC (VYDAC, 5 cm C–18 v reverzní fázi, gradient acetonitrilu, 0,1% kyseliny fosforečná). Roztah inhibice se stanoví z vrcholů pro jednotlivé produkty. HPLC potvrdila předpokládané složení produktů. Hodnota IC_{50} pro sloučeninu A je přibližně 0,27 nM.

Zkouška na šíření v buněčném materiálu

Inhibice rozšíření HIV v buněčné kultuře byla měřena podle publikace Nunberg. J. H. a další. J. Vitol, 65, 4887, 1991. Při této zkoušce byly lymfoidní buňky MT–4 T infikovány HIV–1 (šlo o divoký typ, není-li výslovně uvedeno jinak) při použití předem stanoveného množství a kultury pak byly inkubovány 24 hodin. Po této době bylo méně než 1 % nebo nejvýše 1 % buněk pozitivní při nepřímé imunofluorescenční zkoušce. Buněčný materiál pak byl důkladně promyt a rozdělen do jednotlivých vyhloubení plotny s 96 vyhloubeními.

Do jednotlivých vyhloubení pak bylo přidáno řádové, vždy dvojnásobné ředění inhibitoru a kultury byly pěstovány ještě 3 dny. 4 dny po infekci bylo 100 % buněk v kontrolních kulturách infikováno. Nahromadění p24 viru HIV–1 bylo přímo úměrné rozšíření viru. Inhibiční koncentrace byla stanovena jak ta koncentrace inhibitoru v nanomolech/litr, která snížila šíření infekce o alespoň 95 %, tato koncentrace se uvádí jak CIC_{95}. Hodnota CIC_{95} pro sloučeninu je 25 nM.

Inhibice šíření viru

A. Příprava suspenze buněk MT–4, infikovaných HIV

Buňky MT byly infikovány ve dni 0 v koncentraci 250 000/ml při použití zásobního kmene IIIb viru HIV–1 v ředění 1 : 1000 (konečné množství 125 pg p24/ml, dostatečné pro menší až 1 % infikovaných buněk ve dni 1 a 25 až 100 % ve dni 4). Infikovaný buněčný materiál byl pěstován v prostředí RPMI 1640 (Whittaker BioProducts), s 10 % inaktivovaného fetálního séra skotu, 4 mM glutaminu (Gibco Labs) a 1 : 100 penicilin–streptomycin (Gibco Labs).

Buněčný materiál byl v této směsi inkubován přes noc při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO_2.

B. Přidání inhibitorů

Byla připravena séra párových kombinací koncentrací v nanomolární oblasti. Ve dni 1 bylo přidáno 125 mikrolitrů roztoku inhibitorů ke stejnému objemu buněk MT-4, infikovaných HIV při počtu 50 000 buněk v jednom vyhloubení mikrotitrační plotny s 96 vyhloubeními. Inkubace trvala 3 dny při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO_2.

C. měření šíření viru

Při použití vícekanálové pipety byl usazený buněčný materiál znovu uveden do suspenze a 125 mikrolitrů materiálu bylo přeneseno na oddělenou mikrotitrační plotnu. Pak byl supernatant zkoumán na přítomnost antigenu p24 HIV.

Koncentrace uvedeného antigenu byla měřena imunologickou zkouškou s použitím enzymu. Podíly antigenu p24, který měl být měřen, byly přidány do vyhloubení nitrotitrační plotny, opatřené povlakem monoklonální protilátky, specifické pro antigen jádra HIV. Pak byla vyhloubení promyta. Pak byla přidána biotinylovaná protilátka, specifická proti HIV a pak konjugát streptavidinu a peroxidázy z křenu. V důsledku přidání peroxidu vodíku a přítomnosti tetramethylbenzidinového substrátu se vytvoří barevná reakce. Intenzita této reakce je úměrná koncentrace antigenu p24 HIV.

Vypočítání stupně synergie nebo zvýšení inhibice

V případě, že dojde k synergii, je možno prokázat vyšší inhibici pro párové kombinace s obsahem inhibitorů ve srovnání s použití jednotlivých inhibitorů nebo ve srovnání s pouze aditivním účinkem těchto inhibitorů.

Údaje byla zpracovány tak, že inhibiční koncentrace pro jednotlivé frakce, FIC, byly vypočítány podle publikace Elion a další, J. Biol. Chem., 208, 477, 1954. Nejmenší součet FICS, který zaznamená maximální synergii se pak určí pro různé párové kombinace. Čím nižší je získaný výsledek, tím vyšší je synergie.

Pokud jde o účinnost sloučeniny podle vynálezu, uvádíme v následující tabulce srovnání účinnosti sloučenin L–754,394 a L–756,423 podle vynálezu s účinností sloučeniny J ze spisu EP 541 168. Z uvedených výsledků je zcela zřejmá vyšší účinnost sloučenin podle vynálezu proti HIV.

Sloučenina	IC_{50} (nM)[a]	CIC_{95} (nM)[a]	Rozpust.[b]	C_{max} (μM)[c]	C_{8h} (μM)[c]
Sloučenina J (indinavir)	0,59 ± 0,2 (n = 169)	25–100 (n = 106) Ave. = 50,5	70,0	11.4 ± 2,3 (n = 4)	0,00
L–756,423	0,18 ± 0,02 (n = 4)	25–50 (n = 6) Ave. = 29	7,8	28,3 ± 17,4 (n = 5)	0,80 ± 0,2
L–754,394	0,35 ± 0,18 (n = 8)	6–25 (n = 5) Ave = 17,4	9,1	14,99 ± 1,65 (n = 4)	9,428 ± 1,62

a. Hodnoty IC_{50} a CIC_{95} byly stanoveny způsobem, uvedeným na str. 26 až 28 popisu vynálezu.

b. Rozpustnost, stanovená při pH 7,4 v μg/ml.

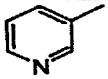
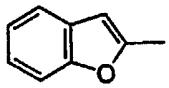
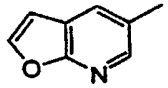
c. C_{max} je maximální koncentrace v plazmě, C_{8h} je koncentrace po 8 hodinách. Při zkoušce na biologickou dostupnost u psů byly sloučeniny podávány perorálně v 0,05 M roztoku kyseliny citronové v dávce 10 mg/kg.

Mimoto však mají sloučeniny podle vynálezu nižší výskyt závažných vedlejších účinků než sloučenina J. Bylo prokázáno, že sloučenina L–756,423 na rozdíl od sloučeniny J nevyvolává inhibici substrátů, metabolizovaných jaterními enzymy CYP3A, CYP2C9, CYP2D6 a CYP1A2 a nejde tedy o účinný inhibitor jaterních mikrosomů.

Po nitrožilním podání (2 mg/kg) u opic má uvedená látka nižší clearance CL_p v plazmě a delší $t_{1/2}$ než indinavir a tedy delší biologický poločas.

Indinavir se již podává pod názvem Crixivan^R, při jehož podávání je zvýšené riziko nefrolithiázy, limitující podávané dávky. K tomuto jevu dochází zřejmě proto, že se indinavir po perorálním i nitrožilním podání z 10 % vylučuje beze změny ledvinami. V případě sloučeniny L–756,423 však nebylo možno sloučeninu v moči vůbec prokázat, takže bude prostá uvedeného vedlejšího účinku.

Rozdíly v účinnosti sloučeniny podle vynálezu a indinaviru jsou patrně způsobeny rozdílem ve struktuře. U sloučenin podle vynálezu je na rozdíl od indinaviru na CH_2–piperazinylovou skupinu vázána bicyklická skupina, tento rozdíl je zcela zřejmý z následující tabulky:

Sloučenina	
Sloučenina J (indinavir)	
L–756,423	
L–754,394	

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava N–(2–(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–(hydroxy)–5–(1–(2–(S)–N––(terc.butylkarboxamido)–piperazinyl)pentanamidu, sloučeniny 14

Stupeň 1: Příprava dihydro–5(S)–((terc.butyldifenylsilyl)oxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)––furanonu

Roztok lithiumdiizopropylamidu, LDA, se získá tak, že se přidá 1,55 ml 2,5 M roztoku n–BuLi v hexanu k 0,55 ml, 3,9 mmol diizopropylaminu v 10 ml THF při teplotě –78 °C. Po 30 minutách se přidá roztok 1,38 g, 3,89 mmol dihydro–4(S)–((terc.butyldifenylsilyl)–oxymethyl)–3(2H)––furanonu v 5 ml THF. Po dalších 30 minutách míchání se přidá ještě 0,68 g, 3,9 mmol benzylbromidu a směs se míchá ještě 3 hodiny. Po této době se reakce zastaví přidáním 10% vodného roztoku kyseliny citronové. Roztok se extrahuje 2 x 50 ml ethylacetátu, extrakt se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší, zfiltruje a odpaří na olej. Tento produkt se čistí chromatografií na oxidu křemičitém při použití 20% ethylacetátu v hexanu, čímž se získá výsledný produkt.

Stupeň 2: příprava dihydro–5(S)–(hydroxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)furanonu

K 5,26 g dihydro–5(S)–((terc.butyldifenylsilyl)oxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–furanonu ve 40 ml acetonitrilu se přidá 1,34 ml 49% vodného roztoku HF. Po 18 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs odpaří do sucha a odparek se dělí mezi 50 ml vody a 50 ml ethylacetátu. Organická vrstva se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší, zfiltruje a odpaří do sucha, čímž se získá výsledný produkt jako špinavě bílá pevná látka s teploto tání 69 až 72 °C.

Stupeň 3: Příprava dihydro–5(S)–((trifluormethylsufonyl)oxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–-furanonu

K roztoku 18,4 g, 89,2 mmol dihydro–5(S)–(hydroxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–furanonu ve 350 ml methylenchloridu, zchlazenému na 0 °C se přidá 13,51 ml, 115,98 mmol 2,6–lutidinu a pak se po kapkách přidá 16,51 ml, 98,1 mmol anhydridu kyseliny trifluormethansulfonové. Směs se nechá 1,5 hodiny stát při teplotě 0 °C a pak se vlije do 300 ml směsi ledu a nasyceného roztoku chloridu sodného a vzniklá směs se míchá ještě půl hodiny. Pak se vodná vrstva extrahuje 3 x 150 ml methylenchloridu, organická vrstva se promyje 2 x 75 ml 10% HCl, 100 ml nasyceného hydrogenuhličitanu sodného a 100 ml vody, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří na pevný odparek. Tento odparek se čistí rychlou chromatografií na sloupci 120 x 150 mm, k eluci se užije gradient hexanů a ethylacetátů v poměru 4 : 1 až 3 : 1, čímž se získá produkt s teplotou tání 53 až 54 °C.

Stupeň 4: Příprava kyseliny 4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)–1–fenylmethylkarbonyl-amino)–piperazin–2S–karboxylové

Výsledná látka se připraví podle publikace Bigge C. F., Hays S. J., Novak P. M., Drummond J. T., Johnson G, Bobovski T. P., Tetrahedron Lett., 1989, 30, 5193, přičemž se vychází z kyseliny 2(S)–piperazinkarboxylové podle publikace Felder E., Maffei S., Pietra S., Pitre D., Helv. Chim. Acta, 1960, 117, 888:

Stupeň 5: Příprava N–terc.butyl–4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)–1–(fenylmethyl-karbonylamino)–piperazin–2(S)–karboxamidu

K 9,90 g, 27,16 mmol produktu ze stupně 4 v roztoku v 75 ml DMF, zchlazeného na 0 °C se přidá 5,73 g, 29,88 mmol EDC, 4,03 g, 29,88 mmol HOBT, 3,14 ml, 29,88 mmol terc.butylaminu a nakonec 4,16 ml, 29,88 mmol tiethylaminu. Reakční směs se míchá 8 hodin a pak se odpaří na polovinu svého objemu. Pak se směs zředí 600 ml ethylacetátu a postupně se promyje 2 x 75 ml 10% HCl, 1 x 75 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 3 x 75 ml vody a 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří do sucha. Odparek se rozetře se směsí ethylacetátu a hexanu v poměru 1 : 2 a vzniklý roztok se zfiltruje, čímž se získá výsledný produkt jako bílá pevná látka s teplotou tání 134 až 135 °C.

Stupeň 6: Příprava N–terc.butyl–4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)piperazin–2(S)–karbox-amidu

K 1,20 g, 2,86 mmol N–terc.butyl–4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)–1–(fenylmethyl-karbonylamino)piperazin–2(S)–karboxamidu a 1,1 g, 0,086 mmol 10% palladia na aktivním uhlí se přidá 15 ml methanolu. Do nádoby se přivádí vodík a směs se míchá ještě 2 hodiny, pak se zfiltruje přes vrstvu celitu a promyje se ethanolem. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu, čímž se získá produkt ve formě pěny.

^{1}H–NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 6,65 (br, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,81 (br, 1H), 3,21 (dd, J = 18 a 7 Hz, 1H), 3,02 – 2,70 (m, 4H), 2,10 – 2,0 (br, 1H), 150 (s, 9H), 1,41 (s, 9H).

Stupeň 7: Příprava dihydro–5(S)–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino))–2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl)methyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H))–furanonu

K roztoku 22,40 g, 0,0662 mol dihydro–5(S)–((trifluormethansulfonyl)oxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–furanonu ze stupně 3 a 18,0 g, 0,063 mol N–terc.butyl–4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)piperazin–2(S)–karboxamidu, rozpuštěného ve 180 ml izopropanolu se přidá 11,53 ml, 0,0662 mol N,N–diizopropylethylaminu. Po 2,5 hodinách se přidá ještě 1,2 g dihydro–5(S)–((trifluormethansulfonyl)oxymethyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–furanonu. Podle chromatografie na tenké vrstvě je reakce ukončena po 3,5 hodinách a pak se odpaří na hustý olej. Tento olej se rozetře s 200 ml směsi ethylacetátu a hexanu v poměru 1 : 2, čímž vznikne bílá pevná látka, která se odfiltruje a odloží. Olej se čistí rychlou chromatografií na sloupci s rozměry 120 x 150 mm při eluci gradientem ethylacetátu a hexanů v poměru 1 : 1, 2 : 1 až 3 : 1 a nakonec ethylacetátem, čímž se získá výsledný produkt.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,34–7,17 (m, 5H), 6,31 (br s, 1H), 4,38 (br m, 1H), 3,96–3,92 (m, 1H), 3,79 (br m, 1H), 3,16 (dd, J=13,6 a 4,4 Hz, 1H), 3,08–2,99 (m, 3H), 2,90–2,81 (m, 1H), 2,80 (dd, J=13,5 and 8,9 Hz, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,67–2,61 (m, 1H), 2,58–2,49 (m, 1H), 2,38–2,32 (m, 1H), 2,32–2,04 (m, 1H), 1,99–1,92 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,29 (s, 9H).

Stupeň 8: Příprava 2(R)–fenylmethyl–4(S)–(terc.butyldimethylsilyloxy)–5–(1–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)))–2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamidu

K 25,50 g, 52,50 mmol dihydro–5(S)–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino))–2(S)–N–-(terc.butylkarboxamido)piperazinyl)methyl)–3(R)–fenylmethyl–3(2H)–furanonu, rozpuštěnému ve 120 ml DME o teplotě 0 °C se přidá roztok 60 ml vody a 1,512 g, 63,01 mmol hydroxidu lithného. Po půl hodině se reakce zastaví přidáním 10% HCl do pH 6 a roztok se odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí v 50 ml vody a roztok se extrahuje 4 x 75 ml ethylacetátu, organický podíl se promyje 20 ml vody a 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Vodná vrstva se zpětně extrahuje 2 x 75 ml ethylacetátu, organické extrakty se spojí, vysuší síranem hořečnatým a odpaří na žlutou pevnou látku. Tento surový produkt se rozpustí ve 100 ml DHF, přidá se 17,87 g, 0,262 mol imidazolu, směs se zchladí na 0 °C a přidá se 31,50 g, 0,21 mol terc.butyldimethylsilylchloridu. Pak se směs ještě 1 hodinu míchá při teplotě 0 °C, načež se nechá zteplat na teplotu místnosti. Po 20 hodinách se k reakční směsi přidá 10 ml methanolu a směs se odpaří na polovinu svého objemu. Pak se přidá ještě 100 ml vody s pufrem o pH 7 a vodná vrstva se extrahuje 4 x 10 ml ethylacetátu, organické podíly se spojí, promyjí se 2 x 50 ml 10% HCl, 3 x 75 ml vody a 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a-odpaří, čímž se získá výsledný produkt, který se přímo použije v následujícím stupni.

Stupeň 9: Příprava N–(2–(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–(terc.butyldimethylsilyloxy)–5–(1–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)))–2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamidu

Ke 27,0 g, 0,0446 mol surového materiálu ze stupně 6, rozpuštěného ve 180 ml DMF s teplotou 0 °C se přidá 8,98 g, 0,0468 mol EDC, 6,32 g, 0,0468 mol HOBT a 7,31 g, 0,049 mol aminohydroxyindanu. Pak se přidá ještě 6,52 ml, 0,0468 mol triethylaminu, reakční směs se 2 hodiny míchá při teplotě 0 °C a pak se ještě 16 hodin při teplotě místnosti, načež se reakce zastaví přidáním 500 ml ethylacetátu. Organická vrstva se promyje 2 x 100 ml 10% HCl, 100 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 3 x 150 ml vody a 75 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří, čímž se získá výsledný produkt ve formě bílé pěny.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,4–7,17 (m, 9H), 6,51 (br s, 1H), 5,79 (br s, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,23 (br s, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,96–3,84 (m, 2H), 3,07–2,78 (m, 8H), 3,65 (dd, J=9,6 and 4,1 Hz, 1H), 2,56–2,44 (m, 2H), 2,29 (dd, J=12,0 a 4,5 Hz, 1H), 2,17–2,09 (m, 1H), 1,79 (br s, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,10 (s, 1H), 0,84 (s, 9H), 0,12 (s, 3H), 0,08 (s, 3H).

Stupeň 10: Příprava N–2(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–(hydroxy)–5–(1–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)))–2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))-pentanamidu

K 32,20 g, 0,0437 mol N–(2–(R)–hydroxy–1–(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–(terc.butyl-dimethylsilyloxy)–5–(1–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)))–2(S)–N–(terc.butylkarbox-amido)piperazinyl))pentanamidu se přidá 437 ml, 0,437 mol tetrabutylamoniumfloridu ve formě 1,0 M roztoku v THF (Aldrich). Reakční směs se míchá 18 hodin pak se odpaří na objem 200 ml a zředí 700 ml ethylacetátu. Vzniklá směs se promyje 2 x 100 ml vody a 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vodná vrstva se zpětně extrahuje 2 x 200 ml ethylaceetátu. Organické vrstvy se spojí, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří na olej, který se čistí chromatografií na sloupci s rozměry 120 x 150 mm při eluci gradientem methylenchloridu, chloroformu nasycené amoniakem a methanolu, v němž se podíl methanolu zvyšuje z 1 % na 1,5 % a pak až na 2 %, čímž se získá produkt jako bílá pěna.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,31–7,11 (m, 9H), 6,41 (br s, 1H), 6,23 (d, J=8,6 Hz, 1H), 5,25 (dd, J=8,6 a 4,7 Hz, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,83–3,82 (m, 2H), 3,78–3,61 (m, 2H), 3,22–3,19 (m, 2H), 3,03–2,78 (m, 8H), 2,62–2,58 (m, 1H), 2,41–2,35 (m, 2H), 2,04–2,02 (m, 1H), 1,57–1,50 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

Stupeň 11: Příprava N–(2–(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenyl–methyl–4(S)–hydroxy)–5–(1–(2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl)pentanamidu, sloučenina 14

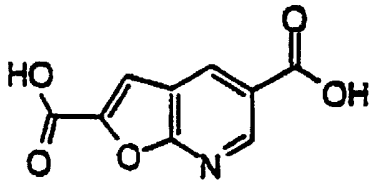
Ke 21,15 g, 0,034 mol N–(2(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–(hydroxy)–5–(1–(4–(1,1–dimethylethoxykarbonylamino)))–2(S)–N–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))-pentanamidu, rozpuštěného ve 350 ml methylenchloridu a zchlazeného na 0 °C se přidá 22,43 ml, 0,204 mol 2,6–lutidinu a pak 32,85 ml, 0,170 mol trimethylsilyltriflátu v průběhu 5 minut. Po půl hodině se reakce zastaví přidáním 80 ml 10% HCl a směs se ještě půl hodiny míchá. Pak se ke směsi přidá 100 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a pak ještě pevný hydrogenuhličitan sodný až do pH 8. Pak se vodná vrstva extrahuje 4 x 100 ml ethylacetátu, organické vrstvy se spojí, promyjí se 50 ml vody a 75 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří. Odparek se čistí chromatografií na sloupci s rozměrem 120 x 150 mm, eluce se provádí při použití gradientu methylenchoridu, chloroformu, nasyceného amoniakem a methanolu v němž se podíl methanolu pomalu zvyšuje ze 2 % na 3 %, 4 %, 5 %, 6 % až 10 %. Tímto způsobem se získá výsledný produkt ve formě bílé pěny.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,53 (s, 1H), 7,29–7,99 (m, 9H), 6,52 (d, J=8,3 Hz, 1H), 5,24 (dd, J=8,2 a 4,9 Hz, 1H), 4,23 (dd, J=4,7 a 4,03 Hz, 1H), 4,25–4,00 (br s, 1H), 3,83–3,81 (m, 1H), 3,03–2,88 (m, 4H), 2,82–2,72 (m, 7H), 2,50–1,60 (br s, 2H), 2,45 (d, J=6,2 Hz, 2H), 2,32–2,29 (m, 1H), 1,98 (m, 1H), 1,51 (m, 1H), 1,33 (s, 9H).

Příklad 2

Příprava N–(2–(R)–hydroxy–1(R)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(R)–hydroxy–5–(1–(4–3furo-[2,3–b]pyridylmethyl)–2(R)–N'–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamidu

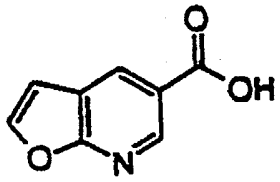
Stupeň 1: Příprava kyseliny furo[2,3–b]pyridin–2,5–dikarboxylové



K roztoku 1,22 g, 4,923 mmol diethylfuro/2,3–b/pyridin–2,5–dikarboxylátu, známého z publikace Snyder H. R., Ebetino F. F., J. Het. Chem., 3, 202 – 205, 1966 v 10 ml 95% ethanolu se přidá roztok 0,66 g, 11,81 mmol hydroxidu draselného, rozpuštěného v 10 ml vody. Reakční směs se 3 hodiny zahřívá na teplotu 80 °C, pak se zchladí na teplotu místnosti a zfiltruje. Sůl se rozpustí ve vodě a roztok se okyselí 10% HCl až na pH 2. Vzniklá sraženina se odfiltruje a suší ve vakuu, čímž se získá 850 mg bílé pevné látky.

^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8,98 (d, J=2,2 Hz, 1H), 8,76 (d, J=2,2 HZ, 1H), 7,69 (s, 1H), 4,25 (br s, 3H).

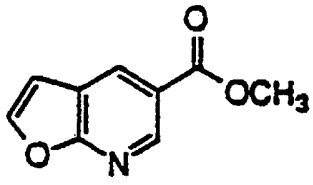
Stupeň 2: Příprava furo[2,3–b]pyridin–5–karboxylové kyseliny



K suspenzi 0,36 g, 1,484 mmol kyseliny furo/2,3–b/pyridin–2,5–dikarboxylové ve 3 ml chinolinu se pod argonem přidá 180 ml, 2,82 mmol práškové mědi a směs se zahřívá 1,5 hodiny na 210 °C. Reakční směs se zchladí na teplotu místnosti a zředí se 50 ml methylenchloridu a pak se zfiltruje přes celit. Organická vrstva se extrahuje 2 x 40 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného, okyselí se 3 N HCl až na pH 3 a pak se zfiltruje, čímž se získá 80 mg špinavě bílé pevné látky. Vodná vrstva se extrahuje 3 x 50 ml směsi etheru a methanolu v poměru 85 : 15, promyje se 10 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří, čímž se získá 35 mg produktu.

^{1}H NMR (400 MHz, (CD_3OD) δ 8,89 (s, 1H), 8,67 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,97 (d, J=2,5 Hz, 1H), 7,01 (d, J=2,4 Hz, 1H).

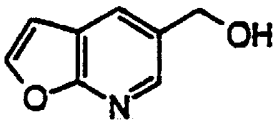
Stupeň 3: Příprava methylfuro/2,3–b/pyridin–5–karboxylátu



K 3,0 g, 18,40 mmol kyseliny furo/2,3–b/pyridin–5–karboxylové, rozpuštěné ve 40 ml methanolu se přidá 160 ml chloroformu a pak ještě 42 ml 10% roztoku v hexanech pomalu po jednotlivých podílech. Po půl hodině se přidá ještě čtyři kapky ledové kyseliny octové a reakční směs se odpaří, získá se 3,20 g špinavě bílé pevné látky.

^{1}H NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) δ 9,02 (d, J=2,0 Hz, 1H), 8,60 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,79 (d, J=2,5 Hz, 1H), 6,87 (d, J=2,5 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

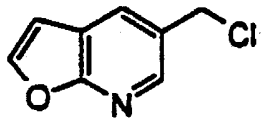
Stupeň 4: Příprava 5–hydroxymethylfuro/2,3–b/pyridinu



Do baňky s okrouhlým dnem s objemem 500 ml, vysušené plamenem se vloží 3,20 g, 18,08 mmol methylfuro/2,3–d/–pyridin–5–karboxylátu, rozpuštěného v 90 ml THF o teplotě 0 °C. K roztoku se přidá 46 ml, 1M roztoku diizobutylaluminiumhydridu v hexanech (46,1 mmol) v průběhu 10 minut a pak se chladicí lázeň odstraní. Po 4 hodinách se reakční směs zchladí na 0 °C a pomalu se přidá 100 ml roztoku vínanu sodnadraselného. Po dalších 18 hodinách se vrstvy oddělí a vodná vrstva se extrahuje 4 x 40 ml ethylacetátu. Organické vrstvy se spojí, promyjí se 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, vysuší síranem hořečnatým, zfiltrují a odpaří. Odparek se čistí rychlou chromatografií na sloupci s rozměrem 40 x 150 mm při eluci gradientem 1000 ml směsi methylenchloridu, methylenchloridu nasyceného amoniakem a methylenolu, 1000 ml téže směsi s poměrem 60 : 38 : 2, 1000 ml téže směsi s poměrem 60 : 37 : 3 a 100 ml téže směsi v poměru 60 : 36 : 4. Tímto způsobem se získá 2,16 g bílé pevné látky.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,19 (d, J=2,0 HZ, 1H), 7,92 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,64 (d, J=2,5 Hz, 1H), 6,69 (d, J=2,4 Hz, 1H), 4,78 (d, J=3,8 Hz, 2H), 4,69 (br s, 1H).

Stupeň 5: Příprava 3–chlormethylfuro/2,3–b/pyridinhydrochloridu

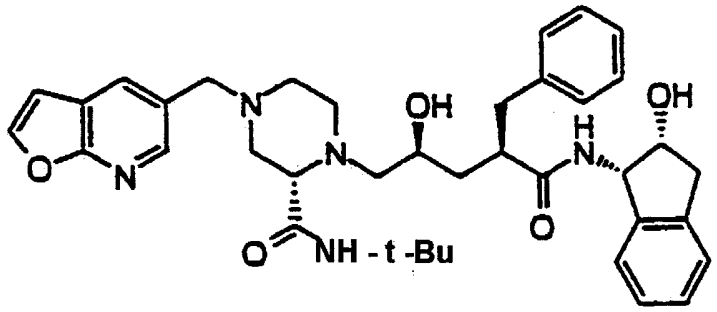


HCl

K roztoku 5–hydroxymethylfuro/2,3–b/pyridinu v 9 ml methylenchloridu, zchlazenému na 0 °C se přidá 4,23 ml, 57,99 mmol thionylchloridu. Ledová lázeň se odstraní a po jedné hodině se reakční směs odpaří, čímž se získá 2,86 g špinavě bílé pevné látky.

^{1}H NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) δ 8,40 (d, J=2,0 Hz, 1H), 8,13 (d, J=2,2 Hz, 1H), 7,80 (d, J=2,4 Hz, 1H), 6,86 (d, J=2,4 Hz, 1H), 4,74 (s, 2H).

Stupeň 6: Příprava N-(2-(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2(R)-fenylmethyl-4(S)-hydroxy-5-(1--(4-(3-furo/2,3-b/-pyridylmethyl)-2(S)-N'-(terc.butylkarboxymido)piperazinyl))pentanamidu



K roztoku 6,50 g, 12,48 mmol N-(2(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2(R)-fenylmethyl-4(S)-hydroxy-5-(2(S)-N'-(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamidu, rozpuštěného ve 12 ml dimethylformamidu se pod argonem přidá 2,80 g, 13,72 mmol 3-chlormethylfuro/2,3-b/pyridinhydrochloridu a 5,21 ml, 37,44 mmol triethylaminu. Po 18 hodinách se reakční směs zředí 400 ml ethylaceetátu a promyje se 25 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 5 x 20 ml vody a 25 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Roztok se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří na olej. Tento olej se čistí rychlou chromatografií na sloupci s rozměrem 60 x 150 mm, eluce se provádí gradientem, při němž se nejprve užije 1000 ml směsi methylenchloridu, methylenchloridu nasyceného amoniakem a methanolu v poměru 60 : 39 : 1, pak 1500 ml téže směsi v poměru 60 : 38 : 2, 1500 ml téže směsi v poměru 60 : 37 : 3 a nakonec 1500 ml téže směsi v poměru 60 : 36 : 4. Výsledná pěna se rozetře s ethylacetátem, výsledný produkt se odfiltruje a suší přes noc ve vysokém vakuu při teplotě 65 °C, čímž se získá 5,30 g bílé krystalické látky. Směsné frakce ze sloupce je možno spojit a přečistit, čímž se získají další podíly produkt s teplotou tání 183,5 až 184,5 °C.

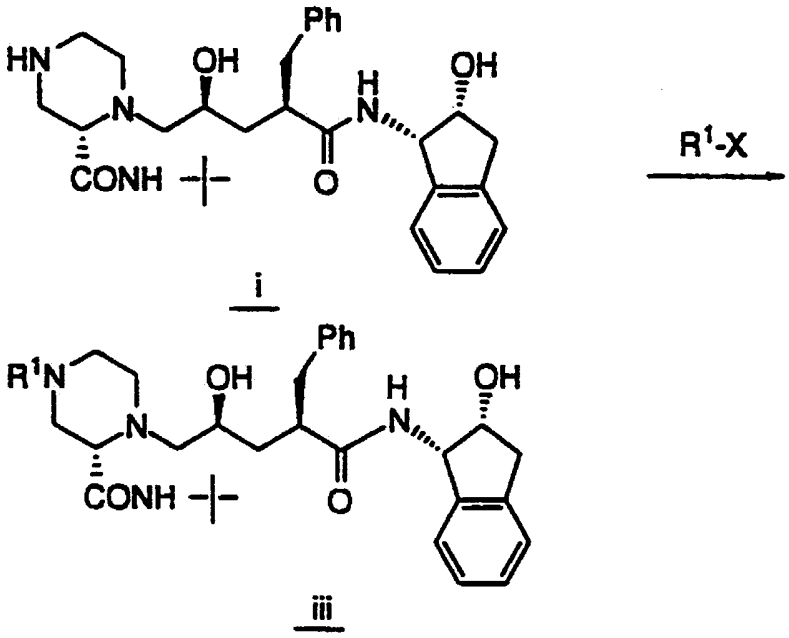
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,25 (d, J=2,2 Hz, 1H), 7,85 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,73 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,32-7,10 (m, 9H), 6,75 (d, J=2,4 Hz, 1H), 5,95 (d, J=8,6 Hz, 1H), 5,27 (dd, J=8,5, a 4,8 Hz, 1H), 4,27-4,26 (m, 1H), 4,12 (br s, 1H), 3,89-3,83 (m, 1H), 3,51 (s, 2H), 3,29 (dd, J=17,5 a 4,0 Hz, 1H), 3,16 (dd, J=3,66 a 3,48 Hz, 1H), 3,15 (dd, J=6,6 a 5,1 Hz, 1H), 2,94-2,50 (m, 11H), 2,36-2,34 (m, 1H), 1,66 (s, 1H), 1,62-1,47 (m, 1H), 1,35 (s, 9H).

Analýza pro $C_{38}H_{47}N_5O_5$:

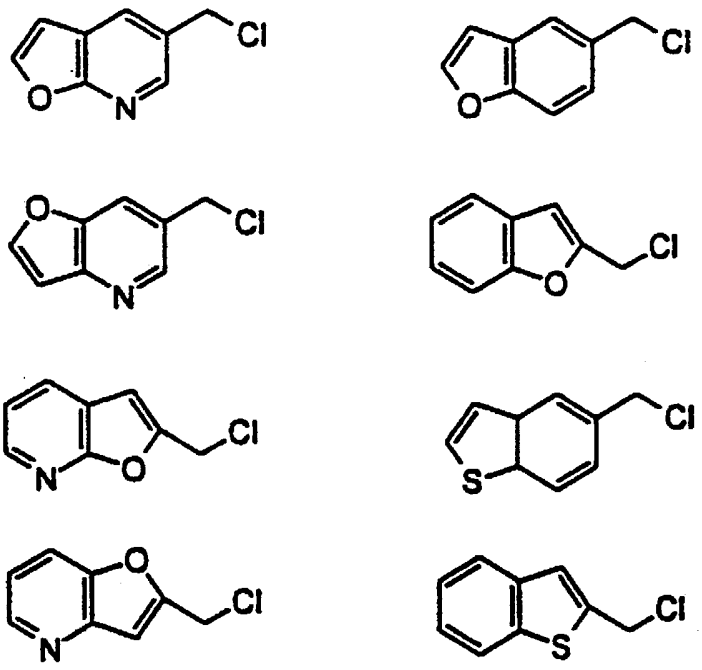
vypočteno: C 69,81, H 7,25, N 10,71 %,
nalezeno: C 69,46, H 7,22, N 10,69 %.

Příklad 3

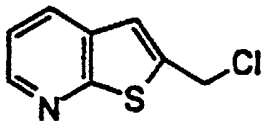
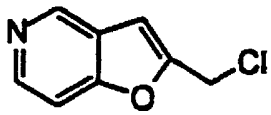
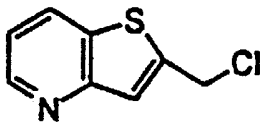
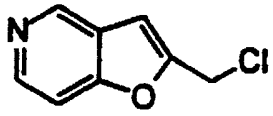
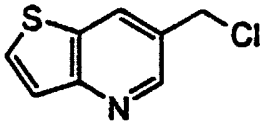
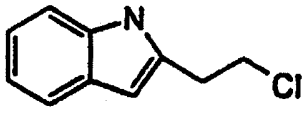
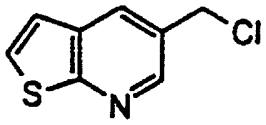
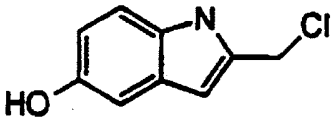
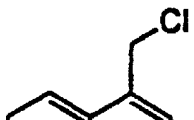
Při použití v podstatě téhož postupu jako v příkladu 2, avšak v případě, že se na N-(2(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2(R)-fenylmethyl-4(S)-hydroxy-5-(1-(2(R)-N'-(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamid, použitý jako sloučenina i) působí dále uvedeným alkylačním činidlem ii) místo alkylačním činidlem, použitým ve stupni 6, je možno přiopravit produkty, definované vzorcem iii).

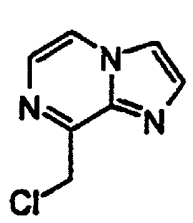

HN
OH
Ph
N
H
N
OH
CONH
O
R1-X
i
R1N
OH
Ph
N
H
N
OH
CONH
O
iii

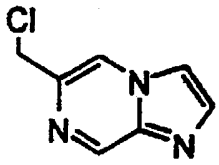
R1-X

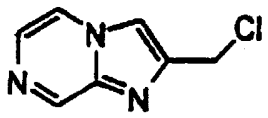

Cl
O
N
Cl
O
Cl
O
N
Cl
O
Cl
N
O
Cl
S
Cl
O
N
Cl
S
Cl

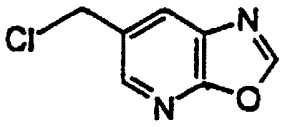
R^1-X

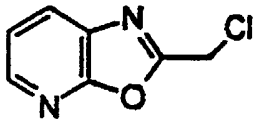










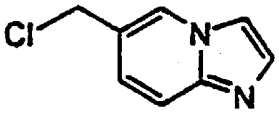


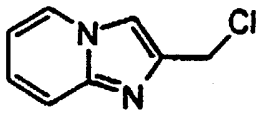


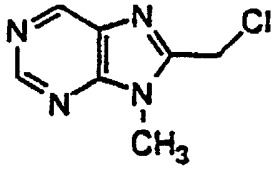


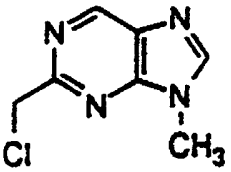






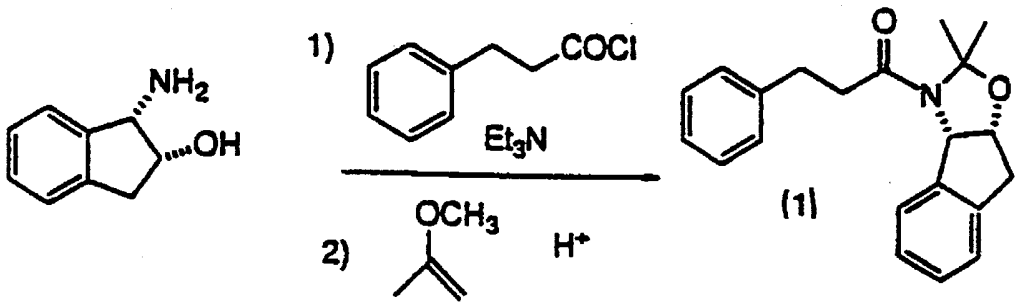






Příklad 4

Příprava amidu vzorce 1



Roztok 884 g, 5,93 mol (–)–cis–1–aminoindan–2–olu v 17,8 l bezvodého THF (KF = 55 mg/ml, jde o Karl Fisherovu titraci na vodu) a 868 ml, 6,22 mol triethylaminu se vloží do baňky s okrouhlým dnem s objemem 50 litrů, opatřené termočlánkem, mechanickým míchadlem, přívodem pro dusík a probublávacím zařízením a zchladí se na 15 °C. Pak se v průběhu 75 minut přidá 1000 g, 5,93 mol 3–fenylpropyionylchloridu, přičemž se vnitřní teplota směsi udržuje na hodnotě 14 a 24 °C pomocí chladicí lázně se směsí ledu a vody. Po skončení přidávání se směs nechá 30 minut stát při teplotě 18 až 20 °C, pomocí HPLC se současně sleduje vymizení (–)–cis–1–aminoindan–2–olu.

Průběh reakce se sleduje pomocí HPLC: sloupec Dupont C8–RX s výškou 25 cm, acetonitrol a 10 mM směsi hydrogenfosforečnanu a dihydrogenfosforečnanu draselného v poměru 60 : 40, rychlost průtoku 1 ml za minut, vstřikovaný objem 20 ml, detekce při 200 nm, vzorek se 500x zředí. Přibližná doba retence cis–aminoindalu je 6,3 minut.

Reakční směs se pak zpracuje přidáním 241 g, 0,96 mol, 0,16 ekvivalentu pyridinium–p–toluensulfonátu, míchá se 10 minut, pH směsi po zředění 1 ml vzorku stejným objemem vody je v rozmezí 4,3 až 4,6. Pak se přidá 1,27 litru, 13,24 mol, 2,2 ekvivalentu 2–methoxypropenu a reakční směs se zahřívá 2 hodiny na teplotu 38 až 40 °C. Pak se reakční směs zchladí na 20 °C a dělí se mezi 12 litrů ethylacetátu a 10 litrů 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Směs se promíchá a vrstvy se oddělí. Ethylacetátový extrakt se promyje 10 litry 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 4 litry vody. Ethylacetátový extrakt se vysuší destilací za atmosférického tlaku a rozpouštědlo se nahradí cyklohexanem v objemu přibližně 30 litrů. Na konci destilace a zahuštění (20 % objemových extrakčního objemu ethylacetátu) se horký cyklohexanový roztok nechá pomalu zchladnout na 25 °C k zahájení krystalizace produktu. Výsledná suspenze se chladí až na 10 °C a při této teplotě se nechá 1 hodinu stát. Produkt se oddělí filtrací a vlhký filtrační koláč se promyje 2 x 800 ml cyklohexanu s teplotou 10 °C. Promytý filtrační koláč se vysuší ve vakuu při tlaku 3 kPa při teplotě 40 °C, čímž se ve výtěžku 86,4 % získá 1,65 kg acetonidu vzorce 1, plocha pod křivkou při HPLC je 98 %.

^{1}H–NMR (300,13 MHZ, $CDCl_3$, hlavní rotamer): 7,36–7,14 (m, 9H), 5,03 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,66 (m, 1H), 3,15 (m, 2H), 3,06 (br s, 2H), 2,97 (m, 2H), 1,62 (s, 3H), 1,37 (s, 3H),

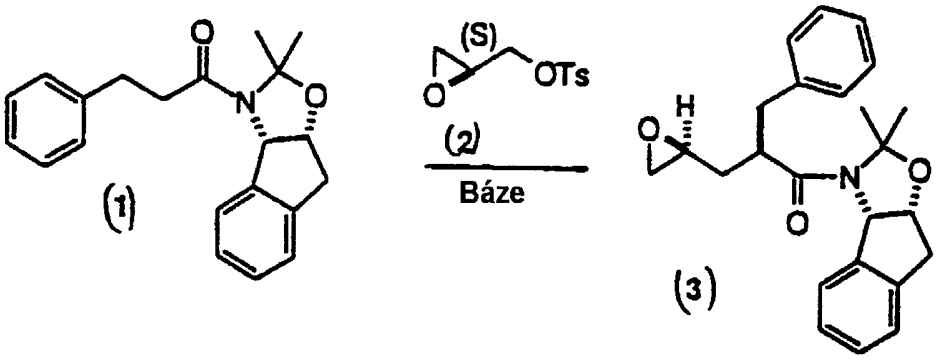
^{13}C–NMR (75,5 MHz, $CDCl_3$, hlavní rotamer): 168,8, 140,9, 140,8, 140,6, 128,6, 128,5, 128,4, 127,1, 126,3, 125,8, 124,1, 96,5, 78,6, 65,9, 38,4, 36,2, 31,9, 26,5, 24,1.

Analýza pro $C_{21}H_{23}NO_2$:

vypočteno: C 78,47, H 7,21, N 4,36 %,
nalezeno: C 78,65, H 7,24, N 4,40 %.

Příklad 5

Příprava epoxidu vzorce 3



Roztok 1000 g, 3,11 mol acetonidu vzorce 1 a 853 g, 3,74 mol, 1,2 ekvivalentu 2(S)–glycidyltosylátu v 15,6 l THF (KF = 22 mg/ml) se vloží do baňky s okrouhlým dnem s objemem 50 litrů se čtyřmi hrdly, opatřené termočlánkem, mechanickým míchadlem, přidávací nálevkou s přívodem pro dusík, směs se zbaví plynů trojím propláchnutím dusíkem ve vakuu a pak se zchladí na –56 °C. Pak se v průběhu 2 hodin přidá 2,6 litru, 1,38M roztoku lithiumhexamethyldisilazidu (1,15 ekvivalentu) v průběhu 2 hodin a současně se vnitřní teplota směsi udržuje v rozmezí –50 až –45 °C. Reakční směs se 1 hodinu míchá při teplotě –45 až –40 °C a pak se v průběhu jedné hodiny nechá zteplat na –25 °C. Pak se směs míchá 4 hodiny při teplotě –25 až –22 °C nebo tak dlouho, až plocha pro výchozí acetonid je pouze 3,0 %.

Průběh reakce se sleduje pomocí HPLC při použití sloupce Zorbax Silica s rozměry 25 cm x 4,6 cm, 20 % ethylacetátu v hexanu, při rychlosti průtoku 2,0 ml/min, vstřikovaný objem je 20 ml, detekce se provádí při 254 nm, vzorek se ředí 100x. Doby retence jsou uvedeny v následující tabulce.

doba retence (min)	sloučenina
5,5	amid vzorce 1
6,5	glycidyltosylát vzorce 2
13,5	epoxid vzorce 3

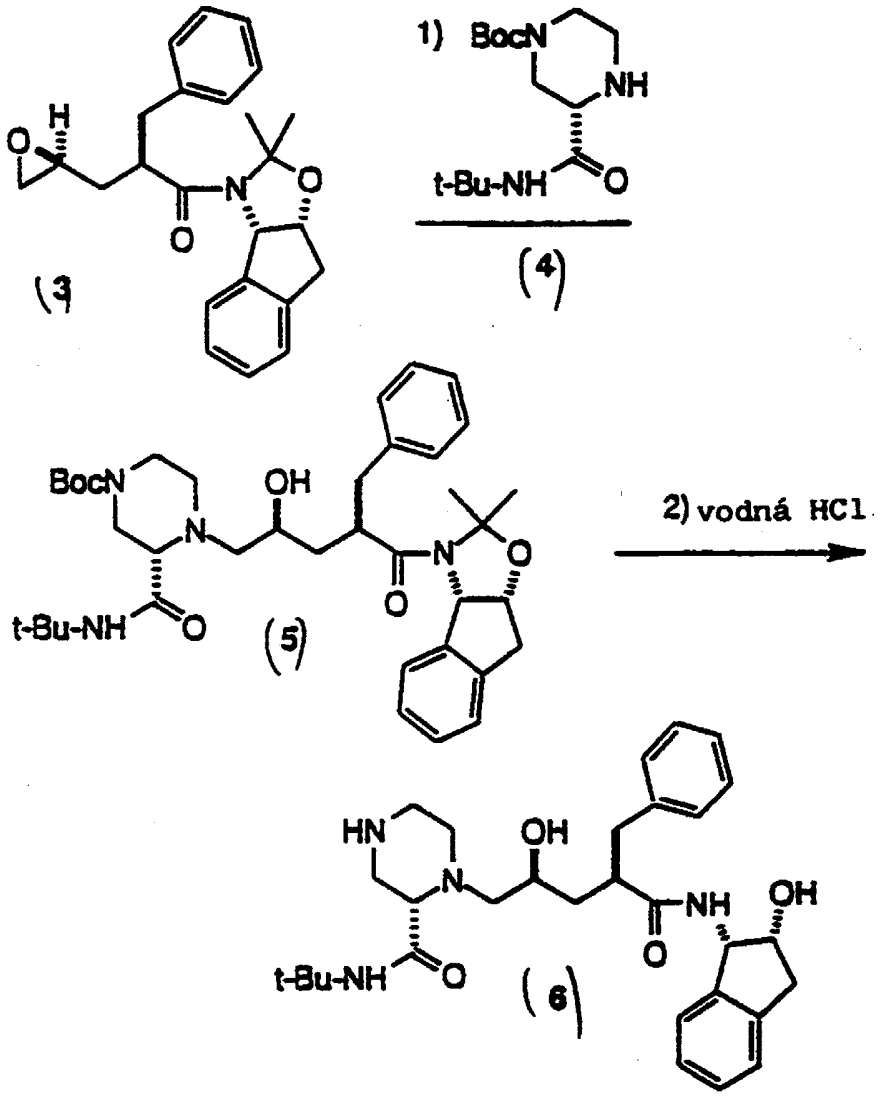
K reakční směsi se přidá při teplotě –15 °C celkem 6,7 litrů deionizované vody a pak se přidá ještě 10 litrů ethylacetátu k rozdělení směsi na dvě fáze. Směs se promíchá a vrstvy se od sebe oddělí. Ethylacetátový extrakt se promyje směsí 5 litrů 1% vodného hydrogenuhličitanu sodného a 0,5 litru nasyceného chloridu sodného. 28,3 litru ethylacetátového extraktu se odpaří destilací při tlaku přibližně 3 kPa a přidá se další ethylacetát k výměně rozpouštědla za ethylacetát, konečný objem roztoku je 11,7 litru. Ethylacetátový koncentrát se zpracuje nahrazením rozpouštědla methanolem tak, aby došlo ke krystalizaci produktu a současně se směs odstraní tak, že se přidá 10 litrů methanolu a oddestiluje se 10 litrů rozpouštědla. Výsledná suspenze se míchá

1 hodinu při teplotě 22 °C, pak se zchladí na teplotu 5 °C a při této teplotě se nechá ještě půl hodiny stát. Produkt se oddělí filtrací a vlhký filtrační koláč se promyje 2 x 250 ml chladného methanolu. Pak se filtrační koláč suší ve vakuu při tlaku přibližně 3 kPa při teplotě 25 °C, čímž se ve výtěžku 61,2 % získá 727 g epoxidu vzorce 3, plocha pod křivkou při HPLC pro tento hlavní produkt je 98,7 %.

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 171,1, 140,6, 140,5, 139,6, 129,6, 128,8, 128,2, 127,2, 126,8, 125,6, 124,1, 96,8, 79,2, 65,8, 50,0, 48,0, 44,8, 39,2, 37,4, 36,2, 26,6, 24,1.

Příklad 6

Příprava výsledného produktu vzorce 6



Suspenze 1950 g, 6,83 mol 2(S)–terc.butylkarboxamid–4–N–Boc–piperazinu vzorce 4 s přebytkem enantiomeru vyšším než 99,5 % a 2456 g, 6,51 mol oxidu vzorce 3, ve formě směsi forem 4S/4R v poměru 97,5 : 2,5 v 18,6 litrech izopropanolu se vloží do baňky s okrouhlým

dnem s objemem 72 litrů se čtyřmi hrdly, opatřené mechanickým míchadlem, zpětným chladičem a parní lázní, mimoto ještě termočlánkem s teflonovým povlakem a přívodem pro dusík. Směs se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem, vnitřní teplota směsi je 84 až 85 °C. Po 40 minutách se získá homogenní roztok. Směs se zahřívá 28 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem.

Vnitřní teplota v průběhu varu pod zpětným chladičem byla 84 až 85 °C. Průběh reakce se sleduje pomocí HPLC při použití sloupce Dupont C8–RX s výškou 25 cm při použití směsi acetonitrilu a 10 mM směsi hydrogenfosforečnanu a dihydrogenfosforečnanu draselného 60 : 40, rychlost průtoku 1 ml/min, detekce při 220 nm, objem vzorku 2 mikrolitry, vzorek se ředí na 1 ml acetonitrilem. Doby retence jsou uvedeny v následující tabulce:

doba retence (min)	sloučenina
4,8	piperazin vzorce 4
8,9	epoxid vzorce 3
15,2	produkt vzorce 5

Po 28 hodinách byla plocha pro zbývající epoxid vzorce 3 1,5 % a plocha pro produkt vzorce 5 při analýze pomocí HPLC byla 91 až 93 %. Směs byla zchlazena na 0 až 5 °C a po přidání 20,9 litrů 6N HCl byla teplota udržována pod 15 °C. Po skončeném přidávání byla směs zahřáta na 22 °C. Pak bylo možno pozorovat vývoj plynu (izobutylen). Pak byla směs ponechána 6 hodin při teplotě 20 až 22 °C.

Průběh reakce byl sledován pomocí analýzy HPLC za stejných podmínek jako svrchu. Doby retence jsou uvedeny v následující tabulce:

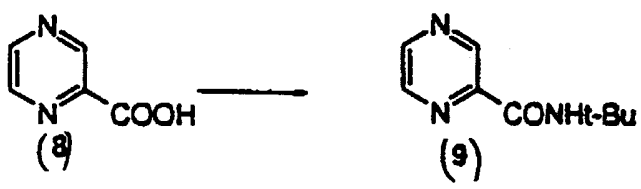
doba retence (min)	sloučenina
7,0	cis–aminoindazol
11,9	produkt vzorce 6
15,1	produkt vzorce 5

Směs se zchladí na 0 °C a pomalu se přidá 7,5 litrů 50% NaOH k úpravě pH směsi na 11,6, v průběhu přidávání se teplota udržuje na hodnotě nižší než 25 °C. Pak se směs dělí mezi 40 litrů ethylacetátu a 3 litry vody. Směs se promíchá a vrstvy se oddělí. 60 litrů organické fáze se odpaří za sníženého tlaku 4 kPa a rozpouštědlo se nahradí DMF a směs se odpaří na konečný objem 10,5 litrů, KF = 1,8 mg/ml. Plocha pro produkt 6 v ethylacetátu při analýze HPLC je 86,5 %. Produkt vzorce 6 v DMF se přímo užije v následujícím stupni bez dalšího čištění. NMR–spektrum pro izolovaný produkt vzorce 6:

^{13}C NMR (75,4 MHz, $CDCl_3$) δ 175,2, 170,5, 140,8, 140,5, 139,9, 129,1, 128,5, 127,9, 126,8, 126,5, 125,2, 124,2, 73,0, 66,0, 64,8, 62,2, 57,5, 49,5, 47,9, 46,4, 45,3, 39,6, 39,3, 38,2, 28,9.

Příklad 7

Pyrazin–2–terc.butylkarboxamid vzorce 9



kyselina 2–pyrazinkarboxylová vzorce 8	3,35 kg, 27 mol
oxalylchlorid	3,46 kg, 27,2 mol
terc.butylamin, KF = 460 μg/ml	9,36 l, 89 mol
Eethylacetát, KF = 56 μg/ml	27 l
DMF	120 ml
1–propanol	30 l

Karboxylová kyselina vzorce 8 se uvede do suspenze ve 27 litrech ethylacetátu a 120 ml DMF v nádobě s objemem 72 litrů se třemi hrdly s mechanickým míchadlem a pod dusíkem a suspenze se zchladí na teplotu 2 °C. Přidá se oxalylchlorid a současně se teplota udržuje v rozmezí 5 až 8 °C.

Přidávání je ukončeno po 5 hodinách. V průběhu exotermního přidávání se uvolní oxid uhelnatý a uhličitý. Vytvořená HCL převážně zůstává v roztoku. Malé množství vytvořené sraženiny je pravděpodobně hydrochlorid chloridu pyrazinové kyseliny. Zkouška na tvorbu chloridu kyseliny byla provedena smísením bezvodého vzorku směsi s terc.butylaminem. Po ukončení reakce zbývalo méně než 0,7 % kyseliny vzorce 8.

Zkouška na ukončení tvorby chloridu kyseliny je důležitá vzhledem k tomu, že neukončená reakce vede ke tvorbě bis–terc.butyloxamidu jako nežádoucí nečistoty.

Průběh reakce je možno sledovat pomocí HPLC při použití sloupce Dupont Zorbac RXC8 při průtoku 1 ml/min a při detekci při 250 nm. Užije se lineární gradient od 98 %, 0,1% vodné kyseliny fosforečné a 2 % methylkyanidu až do 50 % kyseliny a 50 % methylkyanidu v průběhu 30 minut. Doba retence je 10,7 minut pro kyselinu vzorce 8 a 28,1 minut pro amid vzorce 9.

Reakční směs se nechá stát 1 hodinu při teplotě 5 °C. Výsledná suspenze se zchladí na 0 °C a pak se přidá terc.butylamin tak, aby vnitřní teplota směsi v průběhu přidávání zůstala pod 20 °C.

Přidávání trvá 6 hodin vhledem k tomu, že reakce je velmi exotermní. Malý podíl vzniklého terc.butylamoniumhydrochloridu se z reakce vyloučí jako vločkovitá bílá pevná látka.

Směs se nechá stát ještě 30 minut při teplotě 18 °C. Vysrážené amonné soli se odfiltrují a filtrační kláč se promyje 12 litry ethylacetátu. Organická fáze se spojí promyjí se 6 litry 3% hydrogenuhličitanu sodného a 2 x 2 litry nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. K organické fázi se přidá 200 g aktivního uhlí Darco G60 a směs se zfiltruje přes Solka Flok a filtrační koláč se promyje 4 litry ethylacetátu.

Aktivní uhlí účinně zbaví výsledný produkt příměsi purpurového barviva.

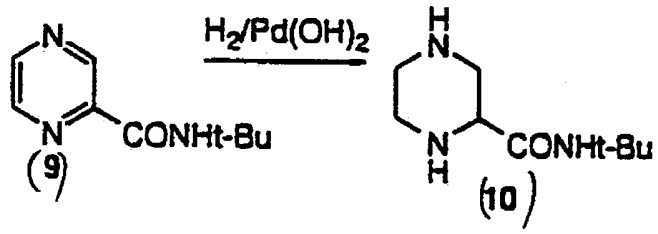
Ethylacetátový roztok sloučeniny vzorce 9 se zahustí při tlaku 1 kPa na 25 % původního objemu. Přidá se 30 litrů 1–propanolu a v destilaci se pokračuje až do konečného objemu reakční směsi 20 litrů.

V tomto okamžiku je množství ethylacetátu již pod hranicí detekce při ^{1}H–NMR, to znamená méně než 1 %. Vnitřní teplota směsi při výměně rozpouštědel byla nižší než 30 °C. Roztok sloučeniny vzorce 3 ve směsi 1–propanolu a ethylacetátu byl při varu pod zpětným chladičem za atmosférického tlaku stálý po dobu několika dnů.

Odpařením podílu reakční směsi se získá špinavě bílá pevná látka s teplotou tání 87 až 88 °C.
^{13}C–NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): 161,8, 146,8, 145,0, 143,0, 142,1, 51,0, 28,5.

Příklad 8

Racemický 2–terc.butylkarboxamidpiperazin vzorce 10



(9) (10)

Materiály

2,4 kg, 13,4 mol pyrazin–2–terc.butylkarboxamidu vzorce 9 ve 12 litrech 1–propanolu a 144 g 20% palladia na aktivním uhlí se 16 % hmotnostními vody.

Roztok pyrazin–2–terc.butylkarboxamidu vzorce 9 v 1–propanolu se uloží do autoklávu s objemem přibližně 15 l. Přidá se katalyzátor a směs se hydrogenuje při tlaku 0,3 MPa a teplotě 65 °C v atmosféře vodíku.

Po 24 hodinách došlo ke spotřebování teoretického množství vodíku a plynovou chromatografií bylo možno prokázat méně než 1 % původního množství sloučeniny vzorce 9. Směs byla zchlazena, promyta dusíkem a katalyzátor byl odstraněn filtrací přes Folka Floc. Katalyzátor se pak promyje 2 litry teplého 1–propanolu.

Bylo zjištěno, že použití teplého 1–propanolu v průběhu promývání filtračního koláče zlepší výsledek filtrace a sníží ztráty produktu ve filtračním koláči.

Reakce se sleduje plynovou chromatografií na sloupci Megabore, 30 m, při teplotě 100 až 160 °C při gradientu 10 °C/min při udržování teploty po dobu 5 minut, načež se teploty zvyšuje po 10 °C/min až na 250 °C. Doba retence je 7,0 minut pro sloučeninu vzorce 9 až 9,4 minut pro sloučeninu vzorce 10. Reakce je také možno sledovat pomocí PLC při použití směsi ethylacetátu a methanolu jako rozpouštědla a inhydridu jako detekčního činidla.

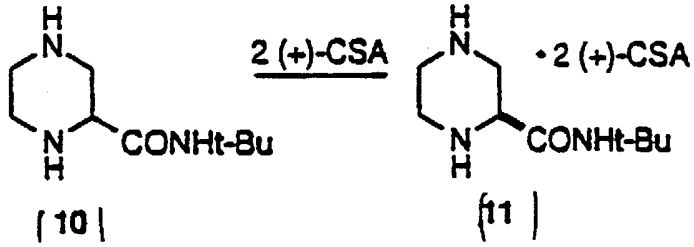
Odpařením podílu směsi je možno prokázat, že výtěžek amidace a hydrogenace je 88 % a koncentrace sloučeniny vzorce 10 je 133 g/l.

Odpařením podílu se získá produkt vzorce 10 jako bílá pevná látka s teplotou tání 150 až 151 °C.

^{13}C–NMR (75 MHz, D_2O, ppm): 173,5, 59,8, 52,0, 48,7, 45,0, 44,8, 28,7.

Příklad 9

(S)–2–terc.butylkarboxamidpiperazinbis(S)–kafrosulfonát vzorce 11



(10) (11)

materiály	množství
rac.2–terc.butylkarboxamidpiperazin vzorce 10 v 1–propanolu	4,10 kg, 22,12 mol v 25,5 kg rozpouštědla
kyselina (S)–(+)–10–kafrosulfonová	10,0 kg, 43,2 mol
1–propanol	12 l
acetonitril	39 l
voda	2,4 l

Roztok aminu vzorce 10 v 1–propanolu se vloží do baňky s objemem 100 l s koncentračním zařízením. Roztok se zahustí při tlaku 1 kPa a teplotě nižší než 25 °C na objem přibližně 12 litrů.

Dojde k vysrážení produktu z roztoku, avšak po zahřátí na 50 °C se materiál znovu rozpustí.

Analýzou homogenního podílu směsi je možno prokázat obsah sloučeniny vzorce 10 celkem 341 g/l. Koncentrace se stanoví pomocí HPLC při použití sloupce Dupont Zorbax RXC8 s délkou 25 cm, rychlost průtoku 1,5 ml/min, detekce při 210 nm, izokratická směs methylkyanidu a 0,1% vodného roztoku kyseliny fosforečné 98 : 2. Doba retence sloučeniny vzorce 10 je 2,5 minut.

Pak se přidá 39 litrů acetonitrilu a 2,4 litry vody, čímž vznikne čirý světlehnědý roztok.

Po stanovení obsahu vody titrací KF a poměru methylkyanidu a 1–propanolu pomocí ^{1}H–NMR je možno prokázat, že poměr methylkyanidu, 1–propanolu a vody je 26 : 8 : 1,6. Obsah sloučeniny v roztoku byl 72,2 g/l.

Kyselina (S)–10–karfosulfonová byla přidána v průběhu 30 minut při teplotě 20 °C ve 4 podílech. Po přidání stoupla teplota směsi na 40 °C. Po několika minutách se vytvořila masivní sraženina. Bílá suspenze byla zahřívána na teplotu 76 °C k rozpuštění veškerého pevného podílu a světlehnědý roztok byl pak v průběhu 8 hodin pomalu zchlazen až na teplotu 21 °C.

Produkt se vysrážel při teplotě 62 °C a byl odfiltrován při teplotě 21 °C, filtrační koláč byl promyt 5 litry směsi methylkyanidu, 1–propanolu a vody v poměru 26:8:1,6. Produkt byl sušen při teplotě 35 °C ve vakuu pod dusíkem, ve výtěžku 39 % bylo získáno 5,6 g sloučeniny vzorce 11 ve formě bílé krystalické pevné látky s teplotou tání 288 až 290 °C za rozkladu.

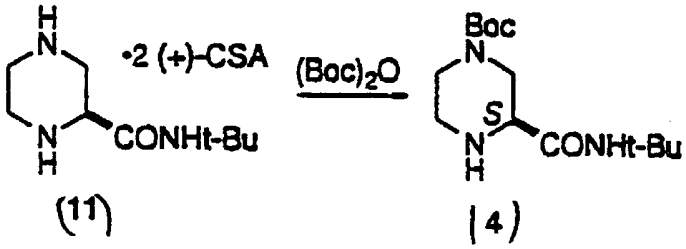
$/alfa/_D^{25} = 18,0°$, (c = 0,37, voda).

^{13}C–NMR (75 MHz, D_2O, ppm): 222, 0, 164,0, 59,3, 54,9, 53,3, 49,0, 48,1, 43,6, 43,5, 43,1, 40,6, 40,4, 28,5, 27,2, 25,4, 19,9, 19,8.

Přebytek enantiomeru v produktu byl 95 % podle výsledků chirální HPLC: podíl 33 mg produktu vzorce 11 byl uveden do suspenze ve 4 ml ethanolu a 1 ml triethylaminu. Pak bylo přidáno 11 mg Boc_2O a reakční směs byla ponechána 1 hodinu, načež bylo rozpouštědlo úplně odpařeno ve vakuu, odparek byl rozpuštěn přibližně v 1 ml ethylacetátu a zfiltrován přes Pasteorovu pipetu s oxidem křemičitým při použití ethylacetátu jako elučního činidla. Frakce s obsahem produktu byly odpařeny a produkt byl znovu rozpuštěn v hexanech v množství přibližně 1 mg/ml. Enantiomery byly odděleny na sloupci Daicel Chiracell AS při použití směsi hexanu a IPA 97 : 3 při rychlosti průtoku 1 ml/min a při detekci při 228 nm. Doba retence pro S–antipod je 7,4 min., a pro R–antipod je 9,7 min.

Příklad 10

Příprava (S)–2–terc.butylkarboxamid–4–terc.butoxykarbonylpiperazinu vzorce 4 ze soli vzorce 11



(11) (4)

materiály	množství
(S)–2–terc.butylkarboxamidpiperazin–bis(S)–(+)–karfosulfonát vzorce 11, 95% ee (enantiomerní čistota)	5,54 kg, 8,53 mmol
Di–terc.butyldikarbonát	1,86 kg, 8,53 mol
triethylamin	5,95 l, 42,6 mol
čistý EtOH (200 proof)	55 l
ethylacetát	2 l

K soli vzorce 11 v baňce s objemem 100 litrů se třemi hrdly, opatřené přidávací nálevkou se pod dusíkem přidá při teplotě 25 °C ethanol pak triethylamin. Pevný podíl se po přidání triethylaminu dobře rozpustí. Pak se Boc_2O rozpustí v ethylacetátu a přidává se nálevkou tak rychle, aby teplota směsi byla nižší než 25 °C. Přidávání trvá 3 hodiny. Pak se reakční směs nechá ještě 1 hodinu stát.

Průběh reakce je možno sledovat pomocí HPLC při použití sloupce Dupont Zorbax RXC8 s výškou 25 cm, rychlost průtoku 1 ml/min, detekce se provádí při 228 nm a užije se izokratická směs methylkyanidu a 0,1 M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného v poměru 50 : 50 úpravě pH hydroxidem sodným na 6,8. Doba retence produktu vzorce 4 je 7,2 minut. Chirální zkouška byla provedena při použití téhož systému. Reakci je možno sledovat také s použitím TLC a 100% ethylacetátu jako rozpouštědla, $R_f = 0,7$.

Pak se roztok odpaří na objem přibližně 10 litrů při vnitřní teplotě nižší než 20 °C při použití koncentračního zařízení při tlaku 1 kPa. Výměna rozpouštědel byla uskutečněna tak, že směs byla velmi pomalu vlita do 20 litrů ethylacetátu a pak byla znovu odpařena až na objem 10 litrů. Pak byla reakční směs promyta v extrakčním zařízení při použití 60 litrů ethylacetátu. Organická fáze byla promyta 16 litry 5% vodného roztoku uhličitanu sodného, 2 x 10 litry deionizované vody a pak 2 x 6 litry nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. Vodné fáze, užité k promytí byly zpětně extrahovány 20 litry ethylacetátu, organická fáze pak byla promyta

2 x 3 litry vody a 2 x 4 litry nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. Ethylacetátové extrakty byly po spojení odpařeny při tlaku 1 kPa a při vnitřní teplotě směsi nižší než 20 °C v koncentračním zařízení s objemem 100 litrů až přibližně na 8 litrů. Výměna rozpouštědel za cyklohexan se uskuteční tak, že se koncentrovaný roztok pomalu vlije do přibližně 20 litrů cyklohexanu a vzniklá směs se znovu odpaří až na objem přibližně 8 litrů. K suspenzi se přidá 5 litrů cyklohexanu a 280 ml ethylacetátu a směs se vaří pod zpětným chladičem, čímž dojde k rozpuštění veškerého pevného podílu. Roztok se zchladí a při teplotě 58 °C se přidá 10 g krystalků výsledného produktu. Pak se suspenze v průběhu 4 hodin zchladí až na 22 °C a po 1 hodině stání při uvedené teplotě se výsledný produkt oddělí filtrací. Filtrační koláč se promyje 1,8 litry cyklohexanu a pak se suší ve vakuu při teplotě 35 °C pod proudem dusíku, čímž se ve výtěžku 77 % získá 1,87 kg výsledného produktu 4 ve formě špinavě bílého prášku. Plocha pod křivkou při HPLC je větší než 99,9 %, množství R–izomeru je pod hranicí detekce.

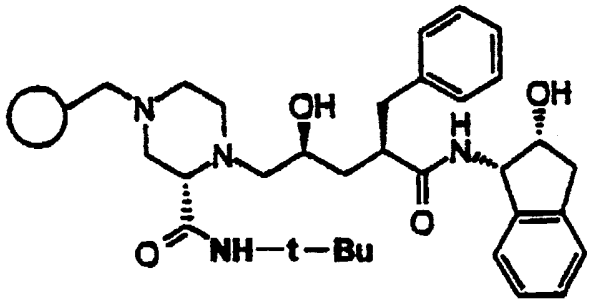
$/alfa/_D^{25}$ = 22,0°, (c = 0,20, methanol), teplota tání 107 °C.

^{13}C–NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): 170,1, 154,5, 79,8, 58,7, 50,6, 46,6, 43,6, 43,4, 28,6, 28,3.

Vynález byl osvětlen v textu rozpisu a v jednotlivých příkladech provedení na některých výhodných provedeních, je však zřejmé, že do rozsahu vynálezu je možno zahrnout také všechny běžné variace nebo modifikace, neodchylující se od smyslu vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Inhibitory HIV proteázy obecného vzorce I

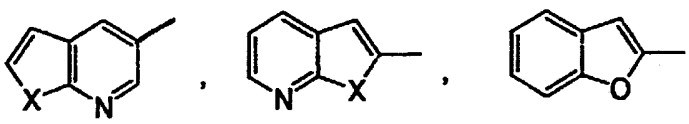


(I)

nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli, v nichž

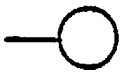


znamená

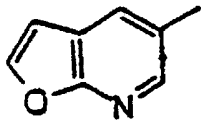


t–Bu znamená terc.butyl a
X znamená atom kyslíku nebo síry.

2. Inhibitory HIV proteázy obecného vzorce I podle nároku 1, v nichž

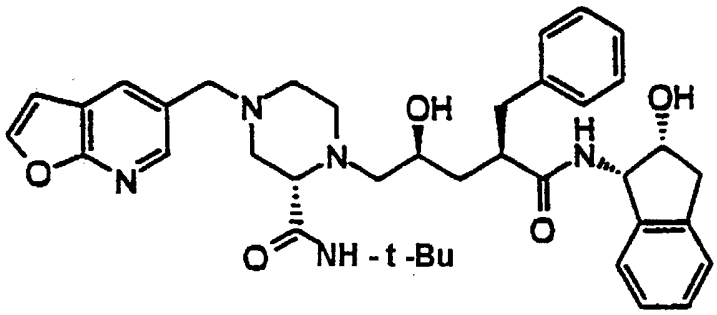


znamená



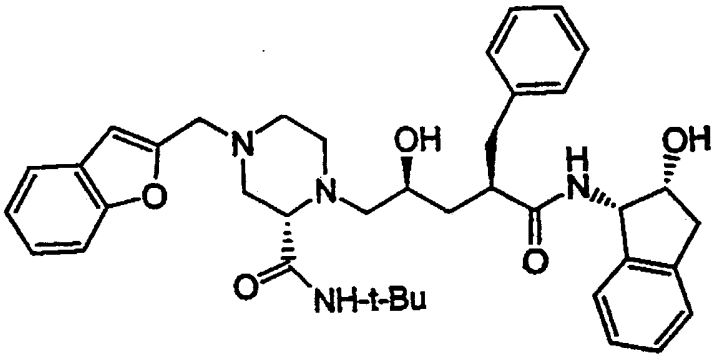
a farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin.

3. Inhibitor HIV proteázy podle nároku 1 vzorce



kterým je N–(2(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–hydroxy–5–(1–(4–(3–furo-[2,3–b]pyridylmethyl)–2(S)–N′–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl)pentanamid a jeho farmaceuticky přijatelné soli.

4. Inhibitor HIV proteázy podle nároku 1, vzorce



kterým je N–(2(R)–hydroxy–1(S)–indanyl)–2(R)–fenylmethyl–4(S)–hydroxy–5–(1–(4–(2–benzo[b]furanylmethyl)–2(S)–N′–(terc.butylkarboxamido)piperazinyl))pentanamid a jeho farmaceuticky přijatelné soli.

5. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že jako účinnou látku obsahuje inhibitor proteázy podle některého z nároků 1 až 4 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

6. Farmaceutický prostředek podle nároku 5 pro léčení AIDS, k prevenci infekce HIV, k léčení infekce HIV nebo k inhibici HIV proteázy.

7. Farmaceutický prostředek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že jako účinnou látku obsahuje inhibitor HIV proteázy podle nároku 4 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že jako účinnou složku obsahuje inhibitor proteázy podle nároku 4 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, a nenukleosidový inhibitor HIV reverzní transkriptázy, zvolený ze skupiny 6–chlor–4–(S)–cyklopropyl–3,4–dihydro–4((2–pyridyl)ethinyl)chinazolin–2–(1H)–on, (–)–6–chlor–4(S)–trifluormethyl–1,2–dihydro–4(1H)–3,1–benzoxazin–2–on a nevirapin a popřípadě azidothymidin, dideoxyinosin nebo dideoxycytidin.

9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že jako účinnou složku obsahuje inhibitor HIV proteázy podle nároku 4 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl a azidothymidin, dideoxyinosin nebo dideoxycytidin.

Konec dokumentu