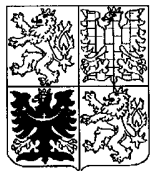


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.03.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.03.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/GB9800754**
(33) Země priority: **WO**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/GB98/00754**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/46241**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3317

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 259/06
C 07 D 333/24
A 61 K 31/22
A 61 K 31/38
A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:
**BRITISH BIOTECH PHARMACEUTICALS
LIMITED, Cowley, GB;**

(72) Původce:
Pearson Lindsey Ann, Cowley, GB;
Ayscough Andrew Paul, Cowley, GB;
Huxley Philip, Cowley, GB;
Drummond Alan Hastings, Cowley, GB;

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

(54) Název přihlášky vynálezu:
Cytostatické látky

(57) Anotace:

Sloučeniny zvolené ze skupiny: cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxyhydroxykarbamoylmethyl)-4-methylpentanoylamin]-2-fenylethanové, isopropylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-fenylethanové, cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylethanové, cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(4-methoxyfenyl)ethanové, cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-2-yl)ethanové, cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-3-yl)-ethanové a jejich použití jako látek inhibujících proliferaci tumorových buněk u savců.

CZ 2000 - 3317 A3

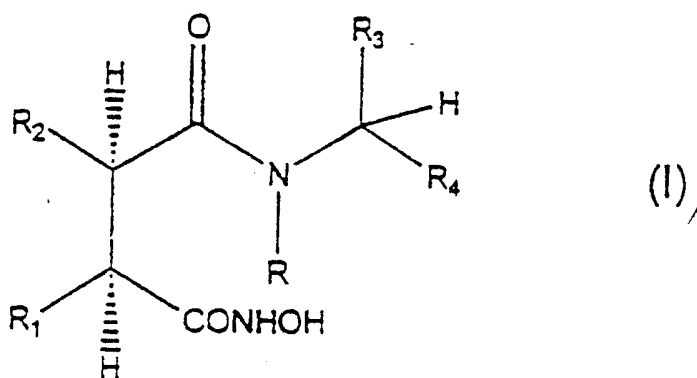
Cytostatické látky

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká terapeuticky účinných esterových a thioesterových derivátů, způsobů jejich výroby, farmaceutických prostředků s jejich obsahem a použití těchto látek v lékařství. Tyto sloučeniny jsou konkrétně inhibitory proliferace celé řady rychle se dělících tumorových buněk, například melanomových a/nebo lymfomových buněk.

Dosavadní stav techniky

Mezinárodní patentová přihláška přihlašovatelů PCT/GB97/02389 popisuje a nárokuje způsob inhibice proliferace nádorových buněk u savců, který zahrnuje podávání savci trpícímu touto proliferací množství sloučeniny obecného vzorce (I) nebo farmaceuticky přijatelného hydrátu soli nebo solvátu dostatečného pro inhibici takové proliferace:



kde

R je atom vodíku nebo (C₁-C₆)alkyl;

R₁ je atom vodíku;

(C₁-C₆)alkyl;

(C₂-C₆)alkenyl;

fenyl nebo substituovaný fenyl;

fenyl (C₁-C₆)alkyl nebo substituovaný fenyl(C₁-C₆)alkyl;

fenyl (C₂-C₆)alkenyl nebo substituovaný fenyl(C₂-C₆)alkenyl;

heterocyklyl nebo substituovaný heterocyklyl;

heterocyklyl(C₁-C₆)alkyl nebo substituovaný heterocyklyl(C₁-C₆)alkyl;

skupina BSO_nA-, kde n je 0, 1 nebo 2 a B je atom vodíku nebo skupina (C₁-C₆)alkyl, fenyl, substituovaný fenyl, heterocyklylem substituovaný heterocyklyl, (C₁-C₆)acyl, fenacyl nebo substituovaná fenacylová skupina, a A znamená (C₁-C₆)alkylen;

hydroxy nebo (C₁-C₆)alkoxy;

amino, chráněný amino, acylamino, (C₁-C₆)alkylamino nebo di-(C₁-C₆)alkylamino;

merkpto nebo (C₁-C₆)alkylthio;

amino(C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkylamino(C₁-C₆)alkyl, di(C₁-C₆)alkylamino(C₁-C₆)alkyl, hydroxy(C₁-C₆)alkyl, merkpto(C₁-C₆)alkyl nebo karboxy(C₁-C₆)alkyl, kde skupina amino, hydroxy, merkpto nebo karboxyl jsou popřípadě chráněné nebo je karboxylová skupina amidována;

nižší alkyl substituovaný skupinou karbamoyl, mono(nížší alkyl)karbamoyl, di(nížší alkyl)karbamoyl, di(nížší alkyl)amino, nebo karboxy-nížší alkanoylamino; nebo

cykloalkylový, cykloalkenylový nebo nearomatický heterocyklický kruh obsahující až tři heteroatomy, z nichž kterýkoli může být (i) substituovaný jedním nebo více substituenty zvolenými ze skupiny C₁-C₆ alkyl, C₂-C₆ alkenyl, halo, kyano (-CN), -CO₂H, -CO₂R, -CONH₂, -CONHR, -CON(R)₂, -OH, -OR, oxo-, -SH, -SR, -NHCOR, a -NHCO₂R, kde R je C₁-C₆ alkyl nebo benzyl a/nebo (ii) fuzovaný s cykloalkylovým nebo heterocyklickým kruhem;

R₂ je C₁-C₁₂ alkyl,

C₂-C₁₂ alkenyl,

C₂-C₁₂ alkynyl,

fenyl(C₁-C₆ alkyl)-,

heteroaryl(C₁-C₆ alkyl)-,

fenyl(C₂-C₆ alkenyl)-,

heteroaryl(C₂-C₆ alkenyl)-,

fenyl(C₂-C₆ alkynyl)-,

heteroaryl(C₂-C₆ alkynyl)-,

cykloalkyl(C₁-C₆ alkyl)-,

cykloalkyl(C₂-C₆ alkenyl)-,

cykloalkyl(C₂-C₆ alkynyl)-,

cykloalkenyl(C₁-C₆ alkyl)-,

cykloalkenyl(C₂-C₆ alkenyl)-,

cykloalkenyl(C₂-C₆ alkynyl)-,

fenyl(C₁-C₆ alkyl)O(C₁-C₆ alkyl)-, nebo

heteroaryl(C₁-C₆ alkyl)O(C₁-C₆ alkyl)-,

příčemž jakákoli z výše uvedených skupin může být popřípadě substituována skupinou

C₁-C₆ alkyl,
C₁-C₆ alkoxy,
halo,
kyano (-CN),
fenyl, nebo
fenyl substituovaný skupinou

C₁-C₆ alkyl,
C₁-C₆ alkoxy,
halo, nebo
kyano (-CN);

R₃ je charakterizující skupina přírodní nebo nepřírodní α -aminokyseliny, ve které mohou být jakékoli funkční skupiny chráněné; a

R₄ je esterová nebo thioesterová skupina;
nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, hydrát nebo solvát.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká určitých konkrétních sloučenin, které jsou inhibitory proliferace tumorových buněk u savců. Tyto sloučeniny se specificky neuvádějí v dokumentu PCT/GB77/02398, a mají cenné farmakologické a farmakokinetické vlastnosti jako inhibitory tumorových buněk.

Podrobný popis vynálezu

Podle předkládaného vynálezu se poskytuje sloučenina zvolená ze skupiny:

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxyhydroxy-
-karbamoylmethyl)-4-methylpentanoylamin]-2-fenylethanové,

isopropylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-
-isobutylhex-5-enoylamino)-2-fenylethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxykarbamoyl-
-methoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-
-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(4-methoxyfenyl)ethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-
-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-2-yl)ethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-
-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-3-yl)ethanové,

a její farmaceuticky nebo veterinárně přijatelné soli, hydráty
nebo solváty.

Výhodné jsou 2-S diastereomery výše uvedených sloučenin.

Soli sloučenin podle předkládaného vynálezu zahrnují
fyzilogicky přijatelné adiční soli s kyselinami, například hydrochloridy,
hydrobromidy, sulfáty, methansulfonáty, p-toluensulfonáty, fosfáty,
acetáty, citráty, sukcináty, laktáty, tartráty, fumaráty a maleáty. Soli se
také mohou tvořit s bázemi, například jako soli se sodíkem, draslíkem,
hořčíkem a vápníkem.

V dalším provedení zahrnuje vynález způsob inhibice proliferace
tumorových buněk u savců, při kterém se savci trpícímu takovou
proliferací podává množství sloučeniny uvedené výše nebo její
farmaceuticky nebo veterinárně přijatelné soli, hydrátu nebo solvátu,
dostatečné pro inhibici takové proliferace.

V dalším provedení zahrnuje vynález použití sloučeniny uvedené
výše nebo její farmaceuticky nebo veterinárně přijatelné soli, hydrátu

nebo solvátu při výrobě farmaceutického prostředku pro inhibici proliferace tumorových buněk u savců.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou použitelné v humánním nebo veterinárním lékařství, protože působí jako inhibitory proliferace rakovinných buněk. Použití vynálezu tedy spočívá v léčení onemocnění rakovinou, jako jsou například onemocnění způsobená nadměrnou proliferací lymfomu, leukemie, myelomu, adenokarcinomu, karcinomu, mezotheliomu, teratokarcinomu, choriokarcinomu, karcinomu z malých buněk, karcinomu z velkých buněk, melanomu, retinoblastomu, fibrosarkomu, leiomyosarkomu, glioblastomu nebo endotheliomu. Je třeba rozumět, že různé sloučeniny podle tohoto vynálezu budou mít různé účinnosti jako inhibitory proliferace v závislosti na typu léčené rakoviny. Aktivita jakékoli konkrétní sloučeniny podle vynálezu při inhibici proliferace jakéhokoli konkrétního typu buněk může být rutinně stanovena standardními způsoby, například způsoby analogickými s těmi, které se popisují v biologických příkladech této přihlášky.

V dalším provedení předkládaného vynálezu se poskytuje farmaceutický prostředek pro humánní nebo veterinární použití obsahující sloučeninu podle vynálezu spolu s farmaceuticky nebo veterinárně přijatelnou pomocnou látkou nebo nosičem. Ve farmaceutickém prostředku může být spolu s jednou nebo více pomocnými látkami nosiči použita jedna nebo více sloučenin podle předkládaného vynálezu.

Farmaceutické prostředky podávané ústy mohou být ve formě tablet, kapslí, prášků, granulí, pastilek, kapalných nebo gelových preparátů, jako jsou orální, topické nebo sterilní parenterální roztoky nebo suspenze. Tablety a kapsle pro orální podávání mohou být ve formě jednotkových dávek a mohou obsahovat běžné pomocné látky jako jsou pojiva, například sirup, akácie, želatina, sorbitol, tragakant nebo polyvinylpyrrolidon; plniva, například laktóza, cukr, kukuřičný

škrob, fosforečnan vápenatý, sorbitol nebo glycin; tabletovací kluzné látky, například stearan hořečnatý, talek, polyethylenglykol nebo oxid křemičitý; rozvolňovadla, například bramborový škrob nebo přijatelná smáčedla jako je laurylsulfát sodný. Tablety mohou být potahovány známými způsoby farmaceutické praxe. Orální kapalně preparáty mohou být například ve formě vodných nebo olejových suspenzí, roztoků, emulzí, sirupů nebo elixírů nebo mohou být ve formě suchého produktu pro rekonstituci s vodou nebo jiným vhodným vehikulem před použitím. Tyto kapalně prostředky mohou obsahovat běžná aditiva jako jsou suspendující činidla, například sorbitol, sirup, methylcelulóza, glukózový sirup, želatina, hydrogenované jedlé tuky; emulgační látky, jako například lecitin, sorbitanmonooleát nebo akácie; nevodná vehikula (mezi která mohou patřit jedlé oleje), například mandlový olej, frakcionovaný kokosový olej, olejovité estery jako estery glycerolu, propylenglykolu nebo ethylalkoholu; ochranné látky, například methyl- nebo propyl-p-hydroxybenzoát nebo kyselina sorbová a v případě potřeby běžné ochucující prostředky nebo barviva.

Pro místní podání na kůži může být léčivo převedeno do formy krému, omývacího roztoku nebo masti. Krém nebo mast použitelné pro léčivo podle vynálezu jsou běžné v oboru známé formulace, které se například popisují ve standardních farmaceutických učebnicích jako je britský lékopis.

Účinné složky mohou být také podávány parenterálně ve sterilním prostředí. V závislosti na použitém vehikulu a koncentraci může být léčivo buď suspendováno nebo rozpuštěno ve vehikulu. S výhodou mohou být ve vehikulu rozpuštěny pomocné látky jako jsou lokální anestetika, ochranné látky a puify.

Je zřejmé, že konkrétní dávkování pro každého pacienta bude záviset na řadě faktorů včetně aktivity konkrétní použité sloučeniny, věku, tělesné hmotnosti, celkového zdravotního stavu, pohlaví, diety,

doby podávání, způsobu podávání, rychlosti vylučování, kombinace léčiv a vážnosti léčeného onemocnění.

Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny podle vynálezu (příklady 1 až 6) byly připravovány postupy podobnými postupům popisovaným v příkladech 8, 16, 3 a 41 mezinárodní patentové přihlášky přihlašovatelů PCT/GB97/02398. Tyto příklady jsou zde reprodukovány jako preparativní příklady A - D. Produkty získané ve formě směsí diastereoisomerů byly děleny HPLC s reverzní fází. V příkladech byly použity následující zkratky:

DCM - Dichlormethan

DMF - N,N-Dimethylformamid

NMM - N-Methylmorfolin

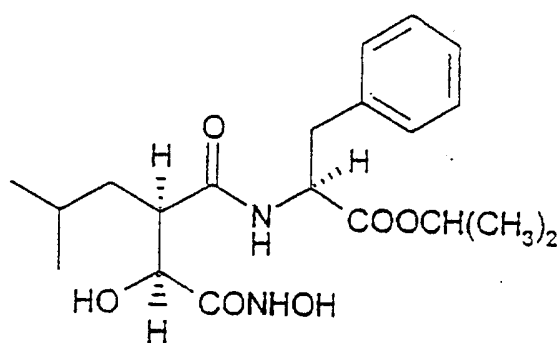
TFA - Kyselina trifluorooctová

HOBT - 1-Hydroxybenztriazol

Chromatografie na koloně byla prováděna na silikagelu pro bleskovou chromatografii. Spektra $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ byla zaznamenávána na spektrometru Bruker AC 250E při 250,1, popř. 62,9 MHz. Jako rozpouštědla a vnitřní standardy byly použity CDCl_3 , methanol- d_4 a dimethylsulfoxid- d_6 (DMSO-d_6); spektra se uvádějí jako δ ppm vzhledem k TMS.

Preparativní příklad A

Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxyhydroxykarbamoylmethyl)-4-methyl-pentanoylamin]-3-fenylpropionové



- (a) Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(2,2-dimethyl-5-oxo-[1,3]-
-dioxolan-4S-yl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové

Roztok pentafluorfenylesteru kyseliny 2R-(2,2-dimethyl-5-oxo-[1,3-dioxolan-4S-yl)-4-methylpentanové (WO 95/19956) (2,87 g, 7,3 mmol) a isopropylesteru L-fenylalaninu (1,5 g, 7,3 mmol) v DCM byl ponechán stát při pokojové teplotě 96 hod. Reakční směs byla zředěna DCM a promyta 1M vodným uhlíčanem sodným, 1M kyselinou chlorovodíkovou a roztokem soli před sušením nad síranem hořečnatým, filtrací a koncentrací za sníženého tlaku. Produkt byl rekrystalizován ze směsi ethylacetát/hexan za získání isopropylesteru kyseliny 2S-[2R-(2,2-dimethyl-5-oxo-[1,3]-dioxolan-4S-yl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové jako jemných bílých jehliček (810 mg, 29 %).

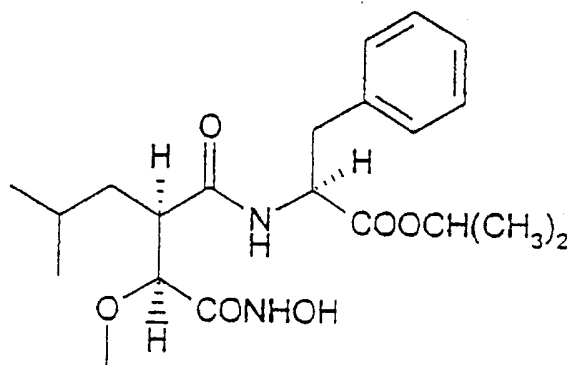
- (b) Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxyhydroxykarbamoyl-methyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové

Roztok methoxidu sodného (325 mg, 6,1 mmol) a hydroxylaminhydrochloridu (396 mg, 6,1 mmol) v methanolu (15 ml) byl míchán při pokojové teplotě 2 hod. Roztok byl potom ziltrován do roztoku isopropylesteru kyseliny 2S-[2R-(2,2-dimethyl-5-oxo-[1,3]-dioxolan-4S-yl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové (800 mg, 2,1 mmol) v methanolu (10 ml). Reakční směs byla ponechána stát při pokojové teplotě 18 hod. Reakční směs byla zakoncentrována za

sníženého tlaku a zbytek byl rozdělen mezi ethylacetát a vodu. Organická vrstva byla promyta vodou, sušena nad síranem hořečnatým, zfiltrována a zakoncentrována za sníženého tlaku. Rekrytalizace z ethylacetátu poskytla isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxyhydroxykarbamoylmethyl)-4-methyl-pentanoylamin]-3-fenyl-propionové jako krystalický materiál, který byl sušen ve vakuu (465 mg, 58 %).

Preparativní příklad B

Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové



- (a) Kyselina 2R-(S-benzyloxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methyl-pentanová

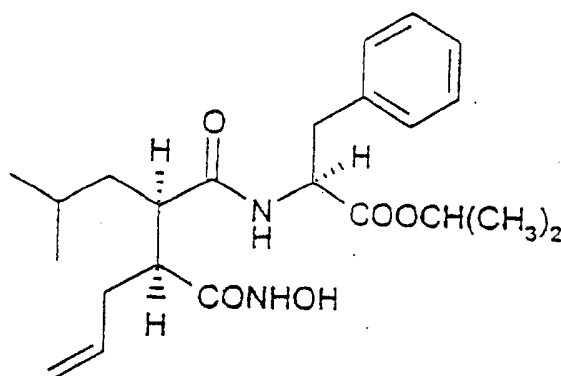
Roztok 3R-isobutyl-4S-methoxydihydrofuran-2,5-dionu (WO 97/02239) (609 mg, 3,27 mmol) a O-benzylhydroxylaminu (403 mg, 3,27 mmol) v ethylacetátu (5 ml) byl míchán při pokojové teplotě 1 hod. Reakční směs byla koncentrována za sníženého tlaku za poskytnutí kyseliny 2R-(S-benzyloxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanové jako bílé pěny (1,01 g, 100 %).

- (b) Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-benzyloxykarbamoylmethoxy-methyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové

Roztok kyseliny 2R-(S-benzyloxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanové (1,01 g, 3,3 mmol) v tetrahydrofuranu (15 ml) byl při 0 °C smísen s isopropylesterem L-fenylalaninu (810 mg, 3,9 mmol) a N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidhydrochloridem (750 mg, 3,9 mmol). Reakční směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu a byla míchána 18 hod. Roztok byl zakoncentrován za sníženého tlaku a zbytek byl převeden do DCM. Tento roztok byl promyt 1M kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným hydrogenuhlíčanem sodným a roztokem soli. Organická fáze byla sušena nad síranem sodným, zfiltrována a zakoncentrována za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn chromatografií na koloně s elucí směsí 2% methanol/DCM. Frakce s obsahem produktu byly spojeny a zakoncentrovány za sníženého tlaku za poskytnutí isopropylesteru kyseliny 2S-[2R-(S-benzyloxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methyl-pentanoylamino]-3-fenylpropionové jako bílé pevné látky (1,39 g, 85 %).

(c) Isopropylester kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxykarbamoylmethoxy-methyl)-4-methyl-pentanoylamino]-3-fenylpropionové

Roztok isopropylesteru kyseliny 2S-[2R-(S-benzyloxykarbamoyl-methoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylpropionové (1,37 g, 2,8 mmol) v ethanolu (30 ml) byl smísen s paladiovým katalyzátorem (274 mg, 10% Pd/uhlí) ve formě kaše v ethylacetátu (5 ml). Suspenzí byl probubláván plynný vodík po dobu 2 hod. Reakční směs byla zfiltrována a zakoncentrována za sníženého tlaku. Produkt byl rekrystalizován ze směsi ethylacetát/hexan za získání isopropylesteru kyseliny 2S-[2R-(S-hydroxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methyl-pentanoylamino]-3-fenylpropionové jako bílé pevné látky (778 mg, 70 %).

Preparativní příklad CIsopropylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové

- (a) Isopropylester kyseliny 2S-(3S-terc-butoxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové

Roztok isopropylesteru L-fenylalaninu (3,9 g, 18,8 mmol) v DMF (15 ml) byl ochlazen v lázni led-voda a smísen s pentafluorfenylesterem kyseliny 3S-terc-butoxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enové (9,03 g, 20,7 mmol). Reakční směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu a byla míchána přes noc. Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku. Zbytek byl převeden do ethylacetátu a promyt 1M kyselinou chlorovodíkovou, 1M uhličitánem sodným a roztokem soli. Roztok byl sušen nad síranem sodným, zfiltrován a zakoncentrován za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn chromatografií na koloně s použitím gradientové eluce 100% DCM až 10% methanol/DCM. Frakce obsahující produkt byly spojeny a rozpouštědlo odstraněno za získání isopropylesteru kyseliny 2S-(3S-terc-butoxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenyl-propionové jako žluté pevné látky (3,5 g, 41 %).

- (b) Isopropylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové

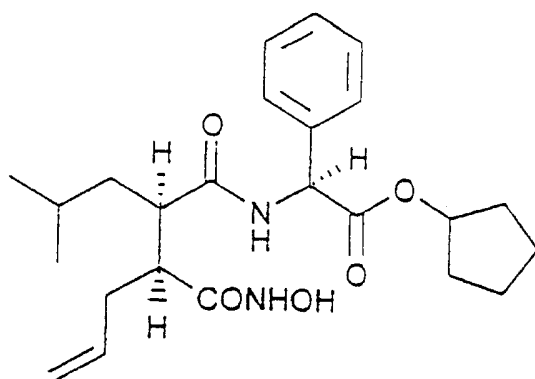
Roztok isopropylesteru kyseliny 2S-(3S-terc-butoxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové (3,5 g, 7,6 mmol) ve směsi TFA a DCM (1:1, 10 ml) byl ponechán stát při 5 °C přes noc. Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku. Příkladavek etheru ke zbytku poskytl isopropylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové jako bílou pevnou látku (261 mg, 8 %).

(c) Isopropylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové

Roztok isopropylesteru kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbonyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové (260 mg, 0,64 mmol) v DMF (10 ml) byl ochlazen v lázni ledu s vodou. Za míchání byl přidán N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidhydrochlorid (148 mg, 0,77 mmol) a HOBT (104 mg, 0,77 mmol). Reakční směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu a po 2 hod byl přidán roztok hydroxylaminhydrochloridu (67 mg, 0,96 mmol) a NMM (0,1 ml, 0,96 mmol) v DMF (5ml). Po míchání přes noc byla reakční směs koncentrována za sníženého tlaku a produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu promytém kyselinou s použitím 5 - 10% methanolu v DCM. Rekrystalizace ze směsi ethylacetát/hexan poskytla isopropylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-3-fenylpropionové jako bílou pevnou látku (12 mg, 4 %).

Preparativní příklad D

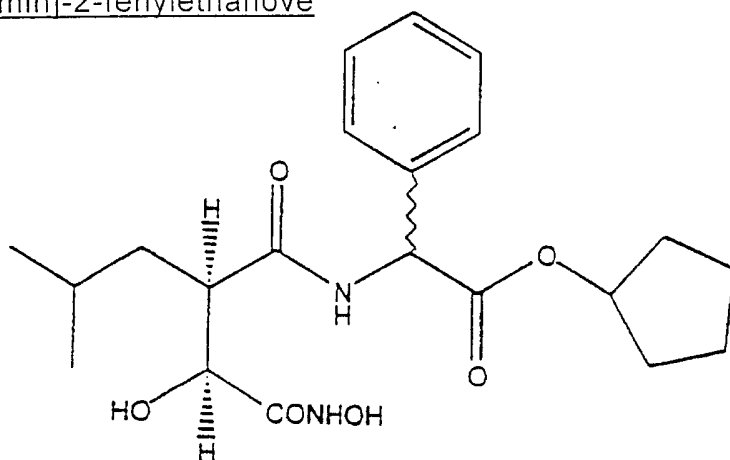
Cyklopentylester kyseliny 2S-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-fenylethanové



V názvu uvedená sloučenina byla připravena analogickým způsobem jako byl popsán v preparativním příkladu C s použitím cyklopentylesteru L-fenylglycinu namísto isopropylesteru L-fenylalaninu.

Příklad 1

Cyklopentylester kyseliny 2-[2R-(S-hydroxyhydroxycarbonylmethyl)-4-methylpentanoylamin]-2-fenylethanové



Tato sloučenina byla vyrobena podobnými způsoby jak bylo popsáno v preparativním příkladu A s použitím cyklopentylesteru fenylglycinu.

Diastereoisomer A

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,4-7,29 (5H, m), 5,43 (1H, s), 5,2-5,14 (1H, m), 4,02 (1H, d, $J=6,9\text{Hz}$), 2,94-2,85 (1H, m), 1,91-1,34 (10H, bm), 1,25-1,14 (1H, m) a 0,86 (6H, dd, $J=6,5, 11,5\text{Hz}$).

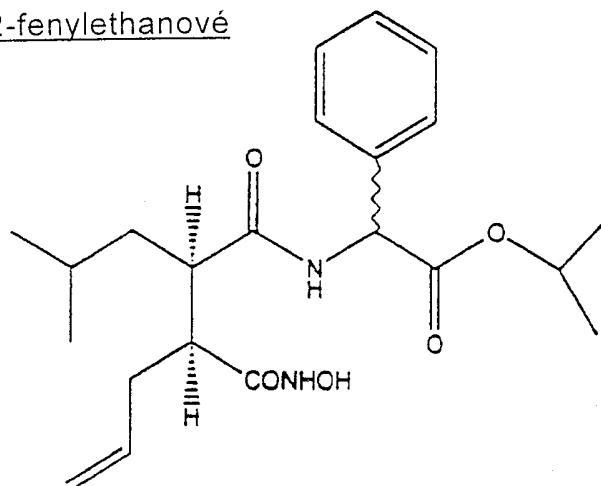
^{13}C -NMR; δ (MeOD), 175,6, 171,8, 171,4, 137,8, 129,8, 129,4, 128,6, 80,0, 73,2, 58,5, 49,2, 39,1, 33,3, 33,3, 26,8, 24,5, 24,4, 23,7 a 22,1.

Diastereoisomer B

^1H -NMR; δ (MeOD), 7,33-7,19 (5H, m), 5,3 (1H, s), 5,11-5,06 (1H, m), 3,81 (1H, d, $J=7,3\text{Hz}$), 2,83-2,74 (1H, m), 1,83-1,45 (10H, bm), 1,12-1,03 (1H, m) a 0,88-0,81 (6H, dd, $J=6,4, 12,3\text{Hz}$).
 ^{13}C -NMR; δ (MeOD), 175,8, 171,8, 171,5, 137,3, 129,8, 129,5, 128,8, 79,9, 73,3, 58,7, 48,9, 39,2, 33,3, 33,3, 26,7, 24,5, 24,5, 24,0 a 22,2.

Příklad 2

Isopropylester kyseliny 2-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-fenylethanové



Tato sloučenina byla připravena podobným způsobem jako se popisuje v preparativním příkladu D s použitím isopropylesteru fenyglycinu.

Diastereoisomer A

^1H -NMR; δ (MeOD), 7,34-7,24 (5H, m), 5,59-5,42 (1H, m), 5,36 (1H, s), 5,02-4,77 (3H, m), 2,63-2,53 (1H, m), 2,17-2,02 (2H, m),

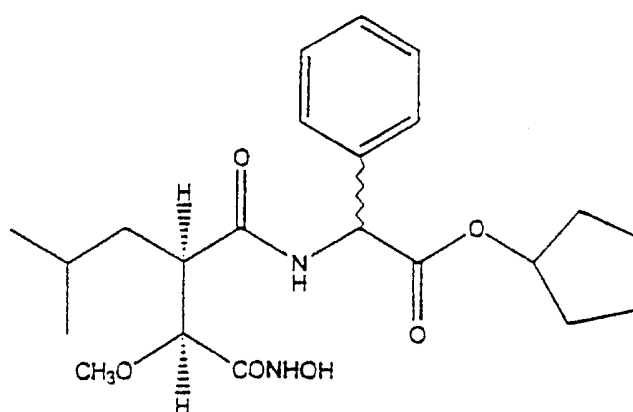
1,89-1,78 (1H, m), 1,63-1,45 (2H, m), 1,18 (3H, d, $J=6,3\text{Hz}$), 1,05 (3H, d, $J=6,2\text{Hz}$), 1,00-0,93 (1H, m), 0,88 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$) a 0,81 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,2, 172,4, 171,3, 137,6, 136,0, 129,9, 129,6, 129,0, 117,4, 70,5, 58,7, 47,4, 41,5, 36,0, 26,7, 24,5, 21,9, 21,7 a 21,7.

Diastereoisomer B

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,4-7,34 (5H, m), 5,77-5,61 (1H, m), 5,42 (1H, s), 5,1-4,98 (3H, m), 2,7-2,6 (1H, m), 2,44-2,17 (3H, m), 1,61-1,5 (1H, m), 1,42-1,29 (1H, m), 1,25 (3H, d, $J=6,3\text{Hz}$), 1,13 (3H, d, $J=6,2\text{Hz}$), 1,09-1,00 (1H, m) a 0,81 (6H, d, $J=6,4\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,4, 172,5, 171,5, 137,2, 136,4, 129,9, 129,6, 129,0, 117,5, 70,5, 58,8, 48,4, 47,4, 41,3, 36,0, 27,1, 24,3, 21,9, 21,8 a 21,6.

Příklad 3

Cyklopentylester kyseliny 2-[2R-(S-hydroxykarbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-fenylethanové



Tato sloučenina byla připravena podobným způsobem jako se popisuje v preparativním příkladu D cyklopentylesteru fenylglycinu.

Diastereoisomer A

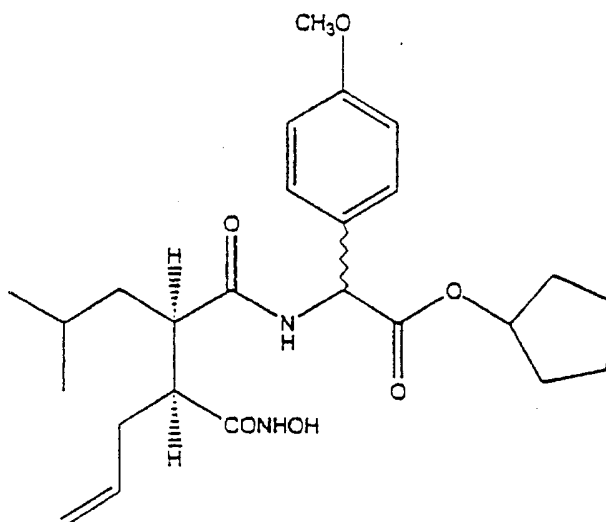
$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 8,83 (1H, d, $J=6,6\text{Hz}$), 7,48-7,29 (5H, m), 5,44-5,42 (1H, m), 5,20-5,16 (1H, m), 3,53 (1H, d, $J=9,7\text{Hz}$), 3,17 (3H, s), 2,89-2,79 (1H, m), 1,90-1,54 (10H, bm), 1,06-0,99 (1H, m), 0,95 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$) a 0,90 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 175,3, 171,6, 169,4, 137,5, 129,7, 129,4, 128,7, 83,1, 79,9, 58,7, 58,1, 48,5, 38,4, 33,4, 33,3, 26,7, 24,6, 24,5, 24,3 a 21,8.

Diastereoisomer B

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,39-7,30 (5H, m), 5,45 (1H, s), 5,21-5,15 (1H, m), 3,59 (1H, d, $J=9,4\text{Hz}$), 3,29 (3H, s), 2,89-2,79 (1H, m), 1,93-1,49 (9H, bm), 1,42-1,21 (1H, m), 1,01 (1H, ddd, $J=3,7, 9,9, 13,3\text{Hz}$), 0,83 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$) a 0,79 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 175,1, 171,5, 169,5, 137,9, 129,7, 129,4, 128,7, 83,0, 79,8, 58,5, 58,3, 48,6, 38,5, 33,3, 27,8, 24,5, 24,4, 24,1 a 21,7.

Příklad 4

Cyklopentylester kyseliny 2-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(4-methoxyfenyl)ethanové



Tato látka byla připravena podobným způsobem jako byl popsán v preparativním příkladu D s použitím cyklopentylesteru 4-methoxyfenylglycinu.

Diastereoisomer A

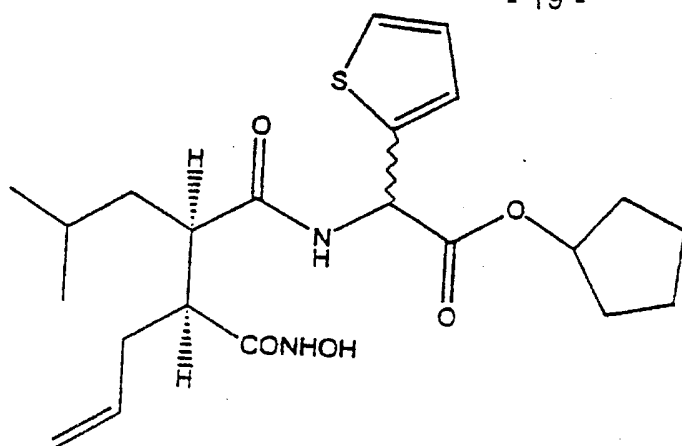
$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 8,94 (1H, d, $J=6,4\text{Hz}$), 7,32 (2H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 6,93 (2H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 5,67-5,50 (1H, m), 5,36-5,33 (1H, m), 5,20-5,14 (1H, m), 4,93-4,87 (2H, m), 3,79 (3H, s), 2,68-2,59 (1H, m), 2,24-2,09 (2H, m), 1,97-1,55 (11H, bm), 1,11-1,00 (1H, m), 0,95 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$) a 0,88 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,2, 172,4, 171,9, 161,4, 136,0, 130,2, 129,4, 117,4, 115,2, 79,7, 58,2, 55,8, 48,3, 47,3, 41,5, 36,0, 33,4, 33,3, 26,7, 24,6, 24,5 a 21,7.

Diastereoisomer B

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 8,96 (1H, d, $J=6,7\text{Hz}$), 7,29 (2H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 6,93 (2H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 5,77-5,61 (1H, m), 5,32 (1H, s), 5,20-5,15 (1H, m), 5,09-4,97 (2H, m), 3,80 (3H, s), 2,64 (1H, dt, $J=3,3, 11,4, 13,5\text{Hz}$), 2,43-2,16 (3H, m), 1,91-1,49 (9H, bm), 1,42-1,29 (1H, m), 1,05 (1H, ddd, $J=3,3, 10,1, 13,2\text{Hz}$) a 0,81 (6H, d, $J=6,5\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,3, 172,5, 172,0, 161,4, 136,4, 130,2, 129,0, 117,5, 115,2, 79,8, 58,2, 55,8, 48,4, 47,4, 41,3, 36,1, 33,4, 27,1, 24,5, 24,3 a 21,6.

Příklad 5

Cyklopentylester kyseliny 2-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-2-yl)ethanové



Tato sloučenina byla připravena podobným způsobem jako bylo popsáno v preparativním příkladu D s použitím cyklopentylesteru thien-2-ylglycinu.

Diastereoisomer A

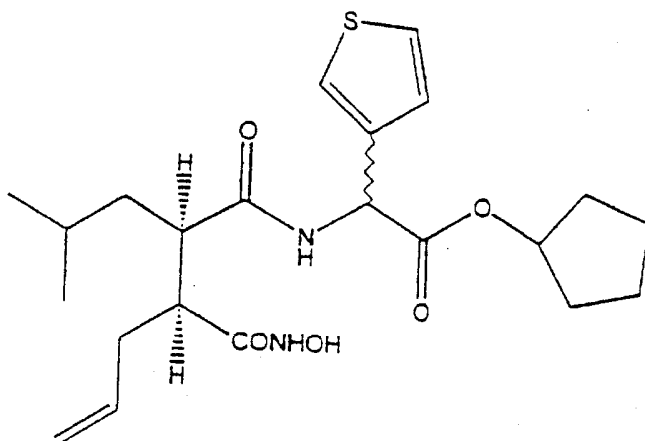
$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,41 (1H, dd, $J=5,1, 1,2\text{Hz}$), 7,12 (1H, d, $J=3,5\text{Hz}$), 7,01 (1H, dd, $J=5,1, 3,5\text{Hz}$), 5,72 (1H, s), 5,69-5,52 (1H, m), 5,26-5,18 (1H, m), 5,00-4,89 (2H, m), 2,70-2,59 (1H, m), 2,28-2,13 (2H, m), 2,09-1,50 (11H, m), 1,05 (1H, ddd, $J=13,8, 11,0, 2,9\text{Hz}$), 0,93 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$) a 0,87 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,5, 172,7, 171,1, 139,5, 136,4, 128,4, 128,3, 127,7, 117,9, 80,7, 54,1, 48,7, 47,7, 41,9, 36,5, 33,8, 33,7, 27,2, 25,1, 25,0, 24,9, a 22,1.

Diastereoisomer B

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,42 (1H, dd, $J=5,0, 0,7\text{Hz}$), 7,10 (1H, d, $J=3,6\text{Hz}$), 7,01 (1H, dd, $J=5,0, 3,6\text{Hz}$), 5,79-5,59 (2H, m), 5,28-5,19 (1H, m), 5,10-4,94 (2H, m), 2,71-2,59 (1H, m), 2,36-2,16 (3H, m), 1,97-1,34 (10H, m), 1,13-1,00 (1H, m), 0,86 (3H, d, $J=6,2\text{Hz}$) a 0,84 (3H, d, $J=6,3\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,7, 172,8, 171,2, 139,3, 136,7, 128,3, 128,2, 127,6, 117,9, 80,7, 54,2, 48,8, 47,8, 41,7, 36,4, 33,8, 27,5, 25,1, 25,0, 24,8 a 22,1.

Příklad 6

Cyklopentylester kyseliny 2-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-3-yl)ethanové



Tato sloučenina byla připravena podobným způsobem jak bylo popsáno v preparativním příkladu D s použitím cyklopentylesteru thien-3-ylglycinu.

Diastereoisomer A

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,48-7,42 (2H, m), 7,13 (1H, dd, $J=4,2$, 2,0Hz), 5,69-5,52 (2H, m), 5,21-5,16 (1H, m), 4,98-4,90 (2H, m), 2,71-2,59 (1H, m), 2,28-2,11 (2H, m), 2,00-1,50 (11H, m), 1,12-0,98 (1H, m), 0,94 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$) a 0,88 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$; δ (MeOD), 176,6, 172,8, 171,8, 137,8, 136,4, 128,3, 128,0, 125,2, 117,9, 80,3, 54,6, 41,9, 36,5, 33,8, 33,8, 27,1, 25,0, 24,9 a 22,1.

Diastereoisomer B

$^1\text{H-NMR}$; δ (MeOD), 7,45 (1H, dd, $J=4,9$, 3,0Hz), 7,43-7,40 (1H, m), 7,12 (1H, dd, $J=5,0$, 1,3Hz), 5,68 (1H, ddt, $J=17,0$, 10,1, 6,8Hz), 5,53 (1H, s), 5,23-5,17 (1H, m), 5,10-4,96 (2H, m), 2,70-2,60 (1H, m), 2,41-2,16 (3H, m), 1,94-1,49 (9H, m), 1,44-1,29 (1H, m), 1,05 (1H,

ddd, $J=12,9, 10,3, 3,3\text{Hz}$), $0,84$ (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$) a $0,83$ (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$).

Biologický příklad

Sloučeniny z příkladu 1 až 6 byly testovány následujícím testem buněčné proliferace pro stanovení jejich schopnosti inhibovat proliferace určitého typu buněk.

Lidská buněčná linie, histiocytický lymfom (U937) byla vyseta do jamek pro tkáňové kultury 30 mm^2 ve vhodném kultivačním médiu doplněném 10% fetálního telecího séra na hustotu 250 buněk/mm^2 . O šest hodin později byly k buňkám přidány testované sloučeniny ve stejném kultivačním médiu pro získání konečné koncentrace $6\text{ }\mu\text{M}$. Kontrolní jamky obsahovaly buňky doplněné stejným kultivačním médiem s obsahem ekvivalentního množství lékového vehikula, kterým byl v tomto případě DMSO s konečnou koncentrací $0,08\%$. Po ~~72 h~~ v kultuře byly buňky pulzně označeny po dobu ~~3 h~~ [methyl- ^3H]-thymidin] ($2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$, 74 kBq/ml) a potom sklizeny na filtrech a byla počítána radioaktivita spojená s DNA. Výsledky byly vyjádřeny jako procento inkorporace ^3H thymidinu kontroly ($n = 6 \pm 1\text{ st. odch.}$). Inhibice proliferace byla pozorována u všech testovaných sloučenin.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina zvolená ze skupiny:

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxyhydroxy-
-karbamoylmethyl)-4-methylpentanoylamin]-2-fenylethanové,

isopropylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-2R-
-isobutylhex-5-enoylamino)-2-fenylethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-[2R-(S-hydroxy-
-karbamoylmethoxymethyl)-4-methylpentanoylamino]-3-
-fenylethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-
-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(4-methoxyfenyl)ethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-
-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-2-yl)ethanové,

cyklopentylester kyseliny 2-(R nebo S)-(3S-hydroxykarbamoyl-
-2R-isobutylhex-5-enoylamino)-2-(thien-3-yl)ethanové,

a její farmaceuticky nebo veterinárně přijatelné estery.

2. Sloučenina podle nároku 1, která je ve formě 2-S-
diastereomeru.3. Farmaceutický prostředek pro humánní nebo veterinární
použití, vyznačující se tím, že obsahuje
sloučeninu podle nároku 1 nebo 2 spolu s farmaceuticky nebo
veterinárně přijatelnou pomocnou látkou nebo nosičem.

4. Způsob inhibice proliferace tumorových buněk u savců, který zahrnuje podávání množství sloučeniny podle nároku 1 nebo 2, dostatečné pro inhibici této proliferace savci.
5. Způsob podle nároku 4, kde léčenou proliferací buněk je proliferace buněk lymfomu, leukémie, myelomu, adenokarcinomu, karcinomu, mezotheliomu, teratokarcinomu, choriokarcinomu, karcinomu z malých buněk, karcinomu z velkých buněk, melanomu, retinoblastomu, fibrosarkomu, leiomyosarkomu, glioblastomu nebo endotheliomu.
6. Použití sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 při výrobě farmaceutického prostředku pro inhibici proliferace tumorových buněk u savců.

Zastupuje: