

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.06.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.06.2001 10.10.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/301712 2001/328254**
(33) Země priority: **US US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 5/2004)

(21) Číslo dokumentu:

2002-2076

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 31/352
A 61 K 38/19
A 61 P 9/10

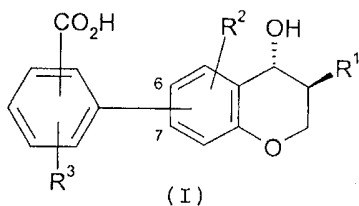
(71) Přihlašovatel:
PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US

(72) Původce:
Aiello Robert Joseph, Groton, CT, US
Bourassa Patricia-Ann, Groton, CT, US
Lindsey Saralyn, Groton, CT, US

(74) Zástupce:
Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Benzopyrany substituované benzoovou
kyselinou pro léčení aterosklerosy**

(57) Anotace:
Způsob léčení aterosklerosy u savců, včetně člověka, při němž se savci podává účinné množství sloučeniny obecného vzorce I, jejího enantiomeru nebo jejich farmaceuticky vhodné soli.



28.04.03

PV 2002-2076

{01-1275-02-Ma}

Benzopyrany substituované benzoovou kyselinou pro léčení atherosklerosy

Oblast techniky

Vynález se týká způsobů léčení atherosklerosy u savců, jako lidí, za použití antagonistů LTB_4 , přednostně substituovaných benzopyranů nebo jejich farmaceuticky vhodných solí, které jsou účinné při léčení atherosklerosy.

Dosavadní stav techniky

Substituované benzopyrany, které se připravují podle vynálezu, jsou uvedeny v US předběžné patentové přihlášce č. 60/301 712, podané 28. června 2001 s názvem "Benzopyrany substituované kyselinou benzoovou pro léčení atherosklerosy", US patentech č. 5 552 435 a 6 096 906 a PCT mezinárodních přihláškách zveřejněných jako WO 96/11925, WO 96/11920 a WO 93/15066. Všechny tyto dokumenty jsou citovány náhradou za přenesení celého jejich obsahu do tohoto textu.

K tvorbě atherosklerotických lézí může docházet v pěti vzájemně se překrývajících stádiích, jako je migrace, akumulace lipidů, vcestování zánětových buněk, proliferace buněk hladkého svalstva vaskulatury a ukládání extracelulární matrice. U modelu atherosklerosy u člověka i zvířete může dojít ke všem těmto procesům, ale jejich individuální relativní podíl na patologii a klinické významnosti léze je nejasný.

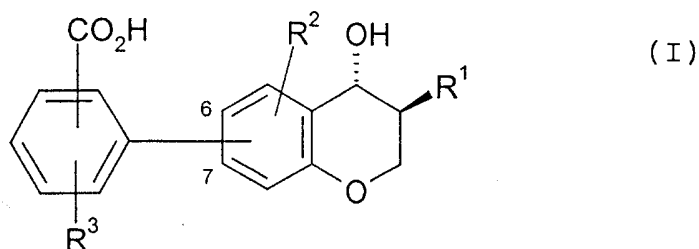
Vcestování a aktivace monocytů je jedním aspektem rozvoje atherosklerotické léze (viz Gerrity, R. G., Cellular Events In Early Atherogenesis In Swine, In Swine In Bio-

medical Research, M. E. Tumbleson, ed., 1985, Plenum Press: New York, str. 1497 až 1509). Vcestování monocytů je řízené chemoatraktanty s buněčnou specificitou, jako je metabolit kyseliny arachidonové, leukotrien B_4 (LTB_4). LTB_4 a isoleukotrieny B_4 svůj účinek navozují prostřednictvím vazby k vysoce afinitnímu receptoru LTB_4 (BLTR) (viz Yokomizo T. et al., Nature, 1997, 387: 620 až 624), který je exprimován na zánětových buňkách, jako neutrofilech, eosinofilech a makrofázích. Ukázalo se, že antagonisté BLTR u předklinických modelů chorob, jako experimentální autoimunitní encefalomyelitis, arthritida indukovaná kolagenem a transplantace alloštěpu, inhibují vcestování neutrofilů, eosinofilů a makrofágů (viz Weringer E. J. et al., Transplantation, 1999, 67(6): 808 až 815; Griffiths R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 517 až 521; a Showell, H. J. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1995, 273: 176 až 184). LTB_4 a jiné ligandy, které se vážou k receptoru LTB_4 mohou hrát proatherogenní roli.

Tento vynález ukazuje, že specifické antagonisty receptoru LTB_4 , například benzopyrany substituované kyselinou benzoovou, zpomalují progresi lézí u několika myších modelů atherosklerosy.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob léčení atherosklerosy u savců, přednostně lidí, jehož podstata spočívá v tom, že se savci podává sloučenina obecného vzorce I



kde

zbytek benzoové kyseliny substituovaný R^3 je ke zbytku molekuly připojen v poloze 6 nebo 7 benzopyranového kruhu;

R^1 představuje skupinu $-(CH_2)_qCHR^5R^6$, kde q představuje číslo 0 až 4;

R^2 a R^3 představuje každý nezávisle vodík, fluor, chlor, alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methylskupinu), alkoxy skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methoxy skupinu), fenylsulfinylskupinu, fenylsulfonylskupinu nebo skupinu $alkyl-S(O)_n-$ s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2, přičemž alkylové zbytky uvedené v definici R^2 a R^3 jsou bez ohledu na místo jejich výskytu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylové zbytky uvedené v definici R^2 a R^3 jsou bez ohledu na místo jejich výskytu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

R^5 představuje vodík nebo alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methylskupinu) nebo fenylskupinu, přičemž tato fenylskupina ve významu R^5 je popřípadě substituována jedním až třemi substituenty nezávisle zvolenými ze souboru sestávajícího z fluoru, chloru, alkylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methylskupiny), alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methoxy skupiny), fenylsulfinylskupiny, fenylsulfonylskupiny a skupiny $alkyl-S(O)_n-$ s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2, jako alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylsulfinylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku nebo alkylsulfo-

nylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na této fenylskupině nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylsulfinylové a fenylsulfonylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na tomto fenylovém substituentu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

R^6 představuje vodík, alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylskupinu se 3 až 8 atomy uhlíku, fenylskupinu nebo pěti- až desetičlennou heteroarylskupinu, přičemž fenylskupina uvedená v definici R^6 je popřípadě substituována jedním až třemi substituenty nezávisle zvolenými ze souboru sestávajícího z fluoru, chloru, alkylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methylskupiny), alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methoxy skupiny), fenylsulfinylskupiny, fenylsulfonylskupiny a skupiny alkyl-S(O) $_n$ - s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2, jako alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylsulfinylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a alkylsulfonylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylsulfinylové a fenylsulfonylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a přičemž uvedená pěti- až desetičlenná heteroarylskupina je popřípadě substituována jedním až dvěma substituenty nezávisle zvolenými ze souboru sestávajícího z fluoru, chloru, alkylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methylskupiny), alkoxy-

skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku (jako methoxyskupiny), fenylsulfinylskupiny, fenylsulfonylskupiny a skupiny alkyl-S(O)_n- s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2, jako alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylsulfinylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a alkylsulfonylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na substituentu této pěti- až destičlenné heteroarylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylsulfinylové a fenylsulfonylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na tomto pěti- až desetičlenném heteroarylovém substituentu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

její enantiomer, racemát nebo farmaceuticky vhodná sůl; v množství, které je účinné při léčení atherosklerosy.

Pod pojmem "halogen" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, fluor, chlor, brom nebo jod.

Pod pojmem "alkyl" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, nasycený jednovazný uhlovodíkový zbytek s řetězcem přímým, rozvětveným nebo kombinovaným.

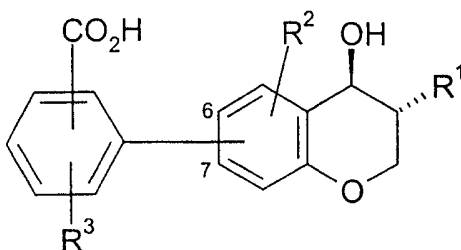
Pod pojmem "alkyloxy" se rozumí O-alkylskupina, kde "alkyl" má výše uvedený význam.

Pod pojmem "aryl" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, organický zbytek odvozený od aromatického uhlovodíku odstraněním jednoho atomu vodíku, jako je například fenylskupina nebo naftylskupina.

Pod pojmem "cykloalkyl" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, mono- nebo bicyklické karbocyklické kruhové systémy (například cyklopropyl-, cyklobutyl-, cyklopentyl-, cyklohexyl-, cykloheptyl-, cyklooktyl-, cyklononyl-, cyklopentenyl-, cyklohexenyl-, bicyklo[2,2,1]heptanyl-, bicyklo[3,2,1]oktanyl-, bicyklo[5,2,0]nonanylskupina apod.), které popřípadě obsahují jednu nebo dvě dvojně vazby a jsou popřípadě substituovány jedním až třemi vhodnými substituenty definovanými dále, jako je fluor, chlor, trifluormethylskupina, alkoxy skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, aryloxy skupina se 6 až 10 atomy uhlíku, trifluormethoxy skupina, difluormethoxy skupina nebo alkyl skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, výhodněji fluor, chlor, methyl skupina, ethyl skupina a methoxy skupina.

Pod pojmem "heteroaryl" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, organický zbytek odvozený od aromatické heterocyklické sloučeniny odstraněním jednoho atomu vodíku, jako je například pyridyl-, furyl-, thienyl-, isochinolyl-, pyrimidinyl- a pyrazinylskupina.

Pod pojmem "enantiomer" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, sloučenina odpovídající obecnému vzorci



Pod pojmem "racemát" se rozumí, pokud není uvedeno jinak, směs sloučeniny obecného vzorce I a jejího enantiomeru, přičemž pojem "enantiomer" má výše uvedený význam.

28.04.03

Sloučeniny obecného vzorce I, kterých se používá při způsobech podle vynálezu, obsahují centra chiralit, a tudíž se vyskytují v různých enantiomerních formách. Do rozsahu vynálezu spadají všechny optické isomery a stereo-isomery sloučenin obecného vzorce I a jejich směsi, jako jejich racemáty.

Pojmem "s prodlouženým uvolňováním" se označují dávkovací formy vytvořené tak, aby uvolňovaly sloučeninu obecného vzorce I po dobu v rozmezí od asi 3 do asi 21 dnů. Uvolňování po dobu delší, než je uvedené rozmezí se v souvislosti s dávkovacími formami podle vynálezu také považuje za "prodloužené uvolňování".

Pod pojmem "léčení" se rozumí revertování, zmírnění, zastavení progresu nebo prevence choroby nebo stavu, k němuž se pojem "léčení" vztahuje, nebo jednoho nebo více symptomů takové choroby nebo stavu.

Pod pojmem "antagonisty receptoru LTB_4 " se rozumějí sloučeniny obecného vzorce I definované výše.

Pod pojmem "aterosklerosa" se rozumí tvorba aterosklerotických lézí v pěti vzájemně se překrývajících stádiích, jako je migrace, akumulace lipidů, vcestování zánětových buněk, proliferace buněk hladkého svalstva vaskulatury a ukládání extracelulární matrice.

Pod pojmem " LTB_4 antagonistické činidlo" se rozumí jakákoliv chemická nebo farmaceutická molekula, která vykazuje uvedenou aktivitu vůči LTB_4 , měřeno pomocí standardních stanovení (jako je stanovení chemotaxe nebo přímé vazebné stanovení), jako DNA, RNA, pozitivní nebo negativní oligonukleotid, monoklonální nebo polyklonální protilátka nebo malá molekula.

Pod pojmem "malá molekula" se rozumí molekula, která není molekulou DNA, RNA, polypeptidu a monoklonální protilátky, s molekulovou hmotností nižší než 2000 g/mol, přednostně nižší než 500 g/mol. Malé molekuly přednostně obsahují aromatické kruhy (jako arylové nebo heteroarylové). Ve výhodnějším provedení malé molekuly obsahují fenylskupinu nebo benzopyranylskupinu. Nejvýhodnějšími malými molekulami jsou sloučeniny z třídy fenothiazin-3-onů, k nimž náleží L-621 392 (Merck); z třídy amidinových sloučenin, k nimž náleží CGS-25019 (Novartis); z třídy benzoxazolaminů, k nimž náleží ontazolast; z třídy benzenkarboximidamidů, k nimž náleží BIIL 284/260 (Boehringer); z třídy 2-(substituovaný)-N-hydroxy-N-alkylcinnamamidů, k nimž náleží LY-233 569 (Lilly); z třídy sloučenin, k nimž náleží ebselen; z třídy sloučenin, k nimž náleží linazolast; z třídy sloučenin, k nimž náleží Bay-x-1005 (Bayer); z třídy sloučenin, k nimž náleží ETH-615 (Leo Denmank); z třídy sloučenin, k nimž náleží MAFP (Merck); z třídy sloučenin, k nimž náleží TMK-688 (Terumo); z třídy sloučenin, k nimž náleží T-0757 (Tanabe); z třídy sloučenin, k nimž náleží LY-213024, LY-210073, LY-223982, LY-233469, LY-255283, LY-293111, LY-264086 a LY-292728 (Lilly); z třídy sloučenin, k nimž náleží ONO-LB457, ONO-4057 a ONO-LB448 (ONO); z třídy sloučenin, k nimž náleží S-2474 (Shionogi); z třídy sloučenin, k nimž náleží kalcitrol; z třídy sloučenin, k nimž náleží SC-53228, SC-41930, CS-50605 a SC-51146 (Searle); z třídy sloučenin, k nimž náleží BPC-15 (Warner Lambert); z třídy sloučenin, k nimž náleží SB-209247 (SmithKline Beecham); nebo z třídy sloučenin, k nimž náleží SKF-104493 (SK&F).

Pojem "léze" je popsán v publikaci Ross, R., The Pathogenesis of Atherosclerosis in Heart Disease, 1106 až 1124 (E. Braunwald ed., W. B. Saunders Company, 1992), která

je citována náhradou za přenesení jejího obsahu do tohoto textu.

Pojem "plát" nebo "stabilita plátu" je popsán v publikaci Ross, R., The Pathogenesis of Atherosclerosis in Heart Disease, 1106 až 1124 (E. Braunwald ed., W. B. Saunders Company, 1992), která je citována náhradou za přenesení jejího obsahu do tohoto textu.

Pojem "LTB₄ IC₅₀ méně než asi 20nM, přednostně méně než asi 10nM, měreno stanovením chemotaxe" je popsán v publikacích Doherty et al., The In Vitro and In Vivo Pharmacologic Activity of the Potent and Selective Leukotriene B₄ Receptor Antagonist CP-105,696, J. Pharm. and Exp. Ther., 273: 176 až 184 (1995) a Showell et al., Characterization of The Pharmacological Profile of The Potent LTB₄ Antagonists CP-105,696 on Murine LTB₄ Receptors In Vitro, Br. J. Pharmacol., 117: 1127 až 1132 (1996), které jsou citovány náhradou za přenesení jejich obsahu do tohoto textu.

Přívlastkem "farmaceutické vhodné" se označují nosiče, vehikula, ředidla, excipienty a/nebo soli, které musí být kompatibilní s ostatními složkami kompozice a nesmějí poškozovat recipienta.

V přednostním provedení sloučeniny obecného vzorce I inhibují progresi tukových lézí. Jak je ilustrováno dále, benzopyrany substituované kyselinou benzoovou inhibují progresi tukových lézí u savců.

V přednostním provedení vynálezu ve sloučeninách obecného vzorce I R¹ představuje benzylskupinu, 4-fluorbenzylskupinu, 4-fenylbenzylskupinu, 4-(4-fluorfenyl)benzylskupinu nebo fenylethylskupinu (fenethylskupinu).

28.04.03

V přednostním provedení vynálezu ve sloučeninách obecného vzorce I R^2 představuje atom vodíku nebo fluoru.

V přednostním provedení vynálezu ve sloučeninách obecného vzorce I zbytek benzoové kyseliny substituovaný R^3 je ke zbytku molekuly připojen v poloze 7 benzopyranového kruhu; a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R^3 je 2-karboxyfenyl-, 2-karboxy-5-chlorfenyl-, 2-karboxy-4-chlorfenyl-, 2-karboxy-3-fluorfenyl-, 2-karboxy-5-fluorfenyl-, 2-karboxy-5-trifluormethylfenyl-, 2-karboxy-4-fluorfenyl-, 2-karboxy-6-fluorfenyl- nebo 3-karboxyfenylskupina.

V přednostním provedení vynálezu ve sloučeninách obecného vzorce I R^1 představuje benzylskupinu, R^2 představuje vodík a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R^3 je 2-karboxy-5-fluorfenylskupina.

V přednostním provedení vynálezu ve sloučeninách obecného vzorce I R^1 představuje 4-fenylbenzylskupinu, R^2 představuje vodík a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R^3 je 2-karboxy-5-fluorfenylskupina nebo 2-karboxy-4-chlorfenylskupina.

Ve zvláště přednostním provedení vynálezu je sloučenina obecného vzorce I zvolena ze souboru sestávajícího z

(3S,4R)-7-(2-karboxyfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

(3S,4R)-7-(2-karboxy-5-chlorfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

(3S,4R)-7-(2-karboxy-4-chlorfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

20.04.03

(3S,4R)-7-(2-karboxy-3-fluorfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

(3S,4R)-7-(2-karboxy-4-fluorfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

(3S,4R)-7-(2-karboxy-5-fluorfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu;

(3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu a

(3S,4R)-7-(3-karboxyfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu.

Ve výhodnějším provedení vynálezu je sloučeninou obecného vzorce I (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran.

Podle jednoho provedení je množství sloučeniny obecného vzorce I 0,5 až 1000 mg/den.

Podle jednoho provedení se sloučenina obecného vzorce I podává perorálně.

Podle jiného provedení je sloučeninou obecného vzorce I napuštěn stent, jako intravaskulární stent, který může být z kovu, plastu nebo biodegradovatelného plastu. Implantovatelná zařízení a biologické materiály, z nichž stenty mohou být vytvořeny jsou obecně diskutovány v publikaci H. Kambic et al., Biomaterials in Artificial Organs, Chem. Eng. News, 30 (1986), která je citována náhradou za přenesení jejího obsahu do tohoto textu.

Podle dalšího provedení je sloučeninou obecného vzorce I, kterou je napuštěn stent, (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran.

Stenty užitečné při způsobech podle tohoto vynálezu mohou obsahovat biodegradovatelný povlak nebo porézní nebiodegradovatelný povlak, v němž je dávkovací forma s prodlouženým uvolňováním dispergována. V alternativním provedení může sloučeninou obecného vzorce být biodegradovatelný stent (tj. matrice stentu) také napuštěn. Vynález také předpokládá využití biodegradovatelného stentu, který je napuštěn sloučeninou obecného vzorce I a dále potažen biodegradovatelným povlakem nebo porézním nebiodegradovatelným povlakem, v němž je dispergována dávkovací forma s prodlouženým uvolňováním. Toto provedení vynálezu umožňuje dosáhnout různé rychlosti uvolňování sloučeniny obecného vzorce I, tj. rychlejšího uvolňování sloučeniny obecného vzorce I z povlaku a následně, po degradaci matrice stentu, odloženého uvolňování sloučeniny obecného vzorce I, kterou je matrice stentu napuštěna.

V dalším provedení je sloučeninou obecného vzorce I napuštěn stent, jako intravaskulární stent, který je dále potažen biodegradovatelným povlakem nebo porézním nebiodegradovatelným povlakem, v němž je dispergována dávkovací forma s prodlouženým uvolňováním sloučeniny obecného vzorce I.

Předmětem vynálezu je také způsob léčení atherosklerosy u savčího subjektu, který má atherosklerotickou lézi, jehož podstata spočívá v tom, že se takovému subjektu podává terapeuticky účinné množství LTB_4 antagonistického činidla, přednostně malé molekuly, výhodněji malé molekuly obsahující fenylskupinu nebo benzopyranylskupinu, které účinně snižuje progresi tvorby takové léze.

Podle jednoho provedení je předmětem vynálezu způsob léčení atherosklerosy u savčího subjektu, přednostně člověka, jehož podstata spočívá v tom, že se subjektu, který má atherosklerotickou lézi podává, terapeuticky účinné množství LTB_4 antagonistického činidla, přednostně malé molekuly, výhodněji malé molekuly obsahující fenylskupinu nebo benzopyranylskupinu, které efektivně zlepšuje stabilitu plátu.

Podle jiného provedení je předmětem vynálezu způsob léčení atherosklerosy u savčího subjektu, přednostně člověka, jehož podstata spočívá v tom, že se subjektu, který má atherosklerotickou lézi podává, terapeuticky účinné množství LTB_4 antagonistického činidla, přičemž toto činidlo je zvoleno ze souboru sestávajícího z protilátky pro LTB_4 a antisense pro gen LTB_4 .

Podle jiného provedení je předmětem vynálezu způsob léčení atherosklerosy u savčího subjektu, přednostně člověka, jehož podstata spočívá v tom, že se subjektu, který má atherosklerotickou lézi podává, terapeuticky účinné množství LTB_4 antagonistického činidla, přičemž LTB_4 antagonistické činidlo vykazuje LTB_4 IC_{50} méně než asi 20nM, přednostně méně než asi 10nM, měřeno stanovením chemotaxe.

Podle jiného provedení je předmětem vynálezu způsob léčení atherosklerosy u savčího subjektu, přednostně člověka, jehož podstata spočívá v tom, že se subjektu, který má atherosklerotickou lézi podává, terapeuticky účinné množství malé molekuly, přičemž malá molekula vykazuje LTB_4 IC_{50} méně než asi 20nM, přednostně méně než asi 10nM, měřeno stanovením chemotaxe.

Podle ještě dalšího provedení je předmětem vynálezu farmaceutická kompozice pro léčení atherosklerosy u savčího

subjektu, jako člověka, který má atherosklerotickou lézi, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje LTB_4 antagonistic-ké činidlo v množství, které efektivně snižuje progresi tvorby takové léze, a farmaceuticky vhodný nosič.

Podle dalšího provedení je sloučenina obecného vzorce I, přednostně (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethyl-fenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran, podávána v kombinaci s jednou nebo více látkami zvolenými ze souboru sestávajícího ze (a) inhibitorů biosyntézy leukotrienů: inhibitorů 5-lipoxygenasy (5-LO) a antagonistů proteinu aktivujícího 5-lipoxygenasu (FLAP) zvolených ze souboru sestávajícího ze zileutonu; ABT-761; fenleutonu; tepoxalinu; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-substituovaný)thiofen-2-alkylsulfonamidů; 2,6-diterc-butylfenolhydrazonů; třídy methoxytetrahydropyranů, jako je Zeneca ZD-2138; sloučeniny SB-210661 a třídy sloučenin, k nimž tato sloučenina náleží; třídy pyridinylsubstituovaných 2-kyanonaftalenových sloučenin, k nimž náleží L-739 010; třídy 2-kanochinolinových sloučenin, k nimž náleží L-746 530; tříd indolových a chinolinových sloučenin, k nimž náleží MK-591, MK886 a BAYx1005; (b) antagonistů receptorů leukotrienů LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 a LTE_4 zvolených ze souboru sestávajícího z třídy fenothiazin-3-onových sloučenin, k nimž náleží L-651 392; třídy amidinových sloučenin, k nimž náleží CGS-52019; třídy benzoxaolaminů, k nimž náleží ontazolast; třídy benzenkarboximidamidů, k nimž náleží BIIL 284/260; a tříd sloučenin, k nimž náleží zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) a BAYx7195; (c) inhibitorů PDE4, jako inhibitorů isoformy PDE4D; (d) inhibitorů 5-lipoxygenasy (5-LO); nebo antagonistů proteinu aktivujícího 5-lipoxygenasu (FLAP); (e) duálních inhibitorů 5-lipoxygenasy (5-LO) a antagonistů aktivačního faktoru destiček (PAF); (f) antagonistů leukotrienu (LTRA), jako antagonistů LTB_4 ,

LTC₄, LTD₄ a LTE₄; (g) antihistaminických antagonistů receptoru H₁, jako cetirizinu, loratadinu, desloratadinu, fexofenadinu, astemizolu, azelastinu a chlorfeniraminu; (h) gastroprotektivních antagonistů receptoru H₂; (i) vazokonstrikčních sympatomimetických agonistů α₁- a α₂-adrenoceptorů podávaných perorálně nebo topicky za účelem snížení překrvení, jako propylhexedrinu, fenylefrinu, fenylpropanolaminu, pseudoefedrinu, nafazolin hydrochloridu, oxametazolin hydrochloridu, tetrahydrozolin hydrochloridu, xylometazolin hydrochloridu a ethylnorepinefrin hydrochloridu; (j) agonistů α₁- a α₂-adrenoceptorů v kombinaci s inhibitory 5-lipoxygenasy (5-LO); (k) anticholinergických činidel, jako ipratropium bromidu; tiotropium bromidu; oxitropium bromidu; pirenzepinu; a telenzepinu; (l) agonistů β₁- a β₂-adrenoceptorů, jako metaproterenolu, isoproterenolu, isoprenalinu, albuterolu, salbutamolu, formoterolu, salmeterolu, terbutalinu, orciprenalinu, bitolterol mesylátu a pirbuterolu; (m) methylxanthaninů, jako theofylinu a aminofylinu; (n) kromoglykanu sodného; (o) antagonistů muskarinového receptoru (M1, M2 a M3); (p) inhibitorů COX-1 (NSAID); selektivních inhibitorů COX-2, jako rofecoxibu; oxid dusnatý NSAID; (q) mimetik inzulín-like růstového faktoru typu I (IGF-1); (r) ciclesonidu; (s) inhalačních glukokortikoidů se sníženými systemickými vedlejšími účinky, jako prednisonu, prednisolonu, flunisolidu, triamcinolon acetonidu, beklometazon dipropionátu, budesonidu, flutikason propionátu a mometason furoátu; (t) inhibitorů tryptasy; (u) antagonistů aktivačního faktoru destiček (PAF); monoklonálních protilátek účinných proti endogenním zánětovým entitám; (w) IPL 576; (x) činidel účinkující proti tumor nekrotizujícímu faktoru (TNF-α), jako etanerceptu, infliximabu a D2E7; (y) DMARD, jako leflunomidu; (z) TCR peptidů; inhibitorů enzymu konvertujícího interleukin (ICE); (bb) inhibitorů IMPDH; (cc) inhibitorů molekul adheze, jako antagonistů VLA-4; (dd) kathepsinu; (ee) inhibitorů MAP kinasy; (ff) inhibitorů

glukosa-6-fosfát dehydrogenasy; (gg) antagonistů receptorů kininu- B_1 a kininu- B_2 ; (hh) zlata ve formě aurothioskupiny spolu s různými hydrofilními skupinami; (ii) imunosupresivních činidel, například cyklosporinu, azathioprinu a methotrexatu; (jj) antiuratik, například kolchicinu; (kk) inhibitorů xanthin oxidasy, například allopurinolu; (ll) urikosurik, například probenecidu, sulfinpyrazonu a benzobromaronu; (mm) antineoplastických činidel, zejména antimetotických léčiv, jako alkaloidů *Vinca*, jako vinblastinu a vinkristinu; (nn) sekretagogů růstového hormonu; (oo) inhibitorů matričních metaloproteinás (MMP), tj. stromelysinů, kolagenas a želatinas a také agrekanasy; zejména kolagenasy-1 (MMP-1), kolagenasy-2 (MMP-8), kolagenasy-3 (MMP-13), stromelysinu-1 (MMP-3), stromelysinu-2 (MMP-10) a stromelysinu-3 (MMP-11); (pp) transformačního růstového faktoru ($TGF\beta$); (qq) růstového faktoru odvozeného od destiček (PDGF); (rr) fibroblastového růstového faktoru, například základního fibroblastového růstového faktoru (bFGF); (ss) faktoru stimulující granulocytové makrofágové kolonie (GM-CSF); (tt) kapsaicinového krému; (uu) antagonistů receptoru tachykininu NK_1 a NK_2 zvolených ze souboru sestávajícího z UT-77 a ZD-0892; (ww) inhibitorů HMG CoA reduktasy, jako lovastatinu; (xx) Lipitoru; fibrových kyselin, jako cisprofibrátu a klofibrátu; (zz) činidel, která vážou žlučovou kyselinu, jako cholestyraminu a kolestipolu; (aaa) nikotinové kyseliny; a (bbb) lipofilních antioxidantů, jako probukolu.

Podle dalšího provedení se sloučenina obecného vzorce I podává jako proléčivo sloučeniny obecného vzorce I. Sloučeniny obecného vzorce I, které obsahují volné amino-skupiny, hydroxyskupiny nebo skupiny karboxylové kyseliny, je možno převést na proléčiva. Jako proléčiva lze uvést sloučeniny, k jejichž volné aminokyselině, hydroxyskupině nebo skupině karboxylové kyseliny je prostřednictvím

28.04.03

peptidové vazby kovalentně připojen zbytek aminokyseliny nebo polypeptidový řetězec obsahující dva nebo větší počet aminokyselinových zbytků. Jako aminokyseliny je možno uvést 20 přirozených aminokyselin, které se označují třípísmennými symboly, a také 4-hydroxyprolin, hydroxylysin, demosin, isodemosin, 3-methylhistidin, norvalin, beta-alanin, gamma-aminomáselnou kyselinu, citrulin, homocystein, homoserin, ornithin a methioninsulfon. K proléčivům se také řadí sloučeniny, v nichž jsou k výše uvedeným substituentům obecného vzorce I prostřednictvím karbonylového uhlíku postranního řetězce proléčiva kovalentně vázány karbonátové, karbamátové, amidové a alkylesterové skupiny.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

Při způsobech léčení atherosklerosy podle vynálezu se antagonisté receptoru LTB_4 savcům, jako lidem, podávají různými obvyklými způsoby. Jako vhodné způsoby podávání lze uvést perorální (například intravenosní, intramuskulární, intraperitoneální nebo subkutánní podávání), bukální, rektální, intranasální a transdermální podávání. Sloučeniny podle vynálezu (dále také označované jako "účinné sloučeniny") je obvykle možno podávat v denních dávkách v rozmezí od asi 0,5 do 1000 mg.

Účinné sloučeniny se přednostně podávají perorálně. V závislosti na stavu léčeného subjektu však nezbytně bude docházet k odchýlkám v dávkování. Vhodnou dávku pro jednotlivý subjekt v každém případě stanoví osoba zodpovědná za podávání.

Účinné sloučeniny lze podávat v celé řadě různých dávkovacích forem. Sloučeniny podle vynálezu jsou v takových dávkovacích formách přítomny v účinném množství, v koncentraci v rozmezí od asi 5,0 do asi 70 % hmotnostních.

Sloučeniny, isomery, proléčiva a farmaceuticky vhodné soli podle vynálezu lze mísit s farmaceuticky vhodnými nosiči, vehikuly nebo ředidly za vzniku farmaceutických kompozic, které jsou užitečné při léčení atherosklerosy u savců, výhodněji lidí. Konkrétní nosiče, vehikula nebo ředidla, kterých se v těchto farmaceutických kompozicích používá, mohou mít, v závislosti na požadovaném typu podávání (například intravenosním, perorálním, topickém, rektálním nebo parenterálním), řadu forem. Sloučeniny, isomery, proléčiva a jejich soli podle vynálezu je možno podávat jednotlivě nebo společně v jakékoliv obvyklé dávkovací formě, jako formě pro perorální, parenterální, rektální nebo transdermální podávání.

Pro perorální podávání je možno použít tablet obsahujících různé excipienty, jako je mikrokrytalická celulóza, citrát sodný, uhličitan vápenatý, dikalciumfosfát a glycin spolu s různými rozvolňovacími látkami, jako je škrob (přednostně kukuřičný, bramborový nebo tapiokový škrob), kyselina alginová a určité komplexní křemičitany, a také granulačními pojivy, jako je polyvinylpyrrolidon, sacharosa, želatina a klovatina. Často jsou pro tabletování také velmi užitečná lubrikační činidla, jako je stearan hořečnatý, laurylsulfát sodný a mastek. Pevných kompozic podobného typu je také možno použít jako náplně pro želatinové tobolky; jako přednostní látky je v této souvislosti možno uvést také laktosu a vysokomolekulární polyethylenglykoly. Když se má pro perorální podávání použít vodných suspenzí a/nebo elixírů, mísí se účinná přísada s různými sladidly nebo ochucovacími látkami, pigmenty nebo barvivy a je-li to zapotřebí, emulgátory a/nebo suspenzními činidly, jakož i s takovými ředidly, jako je voda, ethanol, propylenglykol, glycerol a jejich různé směsi. V případě podávání zvířatům jsou tyto látky s výhodou zahrnuty do krmiv pro zvířata nebo picí vody v koncentraci 5 až 5000 ppm, přednostně 25 až 500 ppm.

28.04.03

Pro parenterální podávání, např. intravenosní, intramuskulární, intraperitoneální nebo subkutánní podávání, se obvykle používá sterilních injekčních roztoků účinných přísad. Při tom se může použít roztoků sloučeniny podle vynálezu buď v sezamovém nebo arašidovém oleji nebo také ve vodném propylenglykolu. Hodnota pH vodných roztoků by měla být, pokud je to zapotřebí, vhodným způsobem nastavena a pufrována, přednostně na hodnotu vyšší než 8 a kapalné ředidlo by mělo být nejprve isotonizováno. Takové vodné roztoky se hodí pro podávání ve formě intravenosních injekcí. Olejové roztoky se hodí pro intravenosní, intramuskulární a subkutánní injekční podávání. Všechny tyto roztoky se vyrábějí za sterilních podmínek v souladu se standardními farmaceutickými technologiemi, které jsou odborníkům v tomto oboru dobře známé. V případě podávání zvířatům, mohou být tyto sloučeniny podávány intramuskulárně nebo subkutánně, přičemž úroveň denní dávky leží v rozmezí od asi 0,1 do asi 50 mg/kg, výhodně od 0,2 do 10 mg/kg, a je možno ji podávat ve formě jediné nebo až tří dílčích dávek.

Kompozice pro bukalní podávání mohou mít formu tablet nebo pastilek, které se připravují obvyklým způsobem.

Účinné sloučeniny podle vynálezu je také možno zpracovávat do formy rektálních kompozic, jako čípků nebo retenčních střevních nálevů. Čípky obsahují obvyklé báze, jako je kakaové máslo nebo jiné glyceridy.

V případě intranasálního nebo inhalačního podávání se účinné sloučeniny podle vynálezu účelně dodávají ve formě roztoku nebo suspenze, která se uvolňuje z nádoby s rozprašovací pumpičkou ovládanou pacientem, nebo ve formě aerosolu, který se uvolňuje z tlakovky nebo rozmlžovače, za použití vhodných hnacích plynů, například dichlordifluormethanu, trichlorfluormethanu, dichlortetrafluorethanu,

28.04.03

oxidu uhličitého nebo jiného vhodného plynu. U tlakovaného aerosolu lze dávkovací jednotku stanovit předem za použití ventilu, který uvolňuje odměřené množství. Tlakovky nebo rozmlžovače mohou obsahovat roztok nebo suspenzi účinné sloučeniny. Také je možno připravovat tobolky nebo patrony (vyrobené například z želatiny) pro inhalátory a insuflátory, které obsahují práškovou směs sloučeniny podle vynálezu a vhodné práškové báze, jako je laktosa nebo škrob.

Pro transdermální podávání je v souladu s dobře známými způsoby pro dodávku léčiv možno připravovat transdermální náplasti, které lze aplikovat na kůži léčených savců, přednostně lidí nebo psů. Po aplikaci účinná látka v důsledku svých charakteristických vlastností, co se týče rozpustnosti, prochází přes epidermis do dermálních vrstev kůže, kde se dostává do celkového oběhu, čímž se nakonec dosáhne systemické distribuce aktivní přísady po požadovanou prodlouženou dobu. K transdermálním systémům se řadí také implantáty, které se umísťují pod epidermální vrstvu kůže, tj. mezi epidermis a dermis kůže léčeného pacienta. Takové implantáty se připravují dobře známými způsoby z látek, kterých se obvykle používá při tomto způsobu dodávky léčiv, přičemž je možno dosáhnout řízeného, prodlouženého a/nebo odloženého uvolňování účinné složky do systemického oběhu pacienta. Tyto subepidermální (subkutikulární) implantáty lze aplikovat stejně snadno jako transdermální náplasti, a dosáhne se i stejné efektivnosti dodávky léčiva, avšak bez omezení daných možností degradace, poškození nebo nechtěného odstranění v důsledku expozice na horní vrstvě pacientovy kůže.

Zkouška prováděná za účelem zjištění vlivu sloučeniny obecného vzorce I, přednostně (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu,

na atherosklerosu u savců, konkrétně myší, je podrobně popsána dále.

Do rozsahu vynálezu také spadají způsoby a dávkovací formy s prodlouženým uvolňováním antagonisty receptoru LTB_4 k cílovým buňkám. Cílovými buňkami jsou s výhodou buňky hladkého svalstva vaskulatury, rakovinné buňky, somatické buňky, které potřebují modulaci za účelem zmírnění chorobného stavu a buňky, které se podílejí na chorobách zprostředkovaných imunitním systémem a jsou dostupné pro lokální podávání dávkovací formy. Způsoby a dávkovací formy podle tohoto provedení vynálezu jsou tedy užitečné pro inhibici buněk hladkého svalstva vaskulatury u savčího hostitele za použití antagonisty receptoru LTB_4 , který inhibuje aktivitu buňky (například migraci, proliferaci, tvorbu lipidových proliferčních lézí, kontrakci apod.), aniž by buňku usmrtil, a popřípadě vazebný protein buněk hladkého svalstva vaskulatury. Při provádění tohoto způsobu podle vynálezu lze také používat dávkovacích forem s prodlouženým uvolňováním.

Formulace, které mají řízeně uvolňovat farmaceuticky účinné sloučeniny in vivo obsahují pevné částice účinné složky, které jsou potaženy nebo tabletovány za použití filmotvorných polymerů, vosků, tuků, siliky apod. Těchto látek se používá za účelem inhibice rozpouštění, dispergování nebo absorpce účinné složky in vivo. Jako příklad složky, při jejímž použití se může dosáhnout pomalého nebo řízeného uvolňování účinné složky, lze uvést hydroxypropylmethylcelulosu. Sloučeniny je také možno podávat prostřednictvím náplastí pro transdermální dodávku léčiva, subkutánních implantátů, infusních pump nebo uvolněním z implantovaných dávkovacích forem s prodlouženým uvolňováním.

28.04.03

Jiné provedení způsobů podle vynálezu představuje prodloužené uvolňování léčiva z povrchu intravaskulárního zařízení, jako stentu, při němž se využívá excipientní matrice, která může uvolňovat antagonistu receptoru LTB_4 podle vynálezu po dobu jednoho týdne až dvou let nebo déle. Vrchní povlaky a napuštěné formy takového článku mohou být vytvořeny z biodegradovatelných nebo nebiodegradovatelných polymerních nebo keramických materiálů, které mohou pomalu uvolňovat antagonistu receptoru LTB_4 podle vynálezu takovou rychlostí, že jsou schopny inhibovat proliferaci fibromuskulárních buněk a/nebo akumulaci lipidů, které by mohly poškozovat funkci zařízení. Akumulace fibromuskulárních buněk a s nimi spojená matrice spolu s pěnovými buňkami mohou zmenšovat plochu lumen stentu až v takovém rozsahu, že dojde ke kritické poruše průtoku krve a zařízení přestane fungovat. Inhibice této proliferace může prodlužovat klinicky funkční životnost stentu, a být klinickým přínosem pro pacienty.

Dávkovací formy s prodlouženým uvolňováním podle tohoto provedení vynálezu musí dodat dostatečnou antiproliferační, s výhodou cytostatickou, dávku exponovaným buňkám, které bezprostředně přiléhají k povrchu zařízení pro léčení atherosklerosy. Tak je možno inhibovat přichycení buněk, migraci a proliferaci fibromuskulárních buněk a pěnových buněk. Tuto dávku lze stanovit empiricky intravaskulární implantací konkrétního zařízení obsahujícího různá množství antagonisty receptoru LTB_4 podle vynálezu a modifikací polymerního excipientu, jelikož oba tyto faktory mohou ovlivnit rychlost a trvání uvolňování léčiva potřebné pro dosažení cytostatické dávky. Stent je považován za trvale implantované zařízení, ale není nezbytně nutné, aby uvolňoval účinnou látku nepřetržitě. Na základě počátečních pozorování se zdá, že pokud se nadměrné proliferaci zabrání až do doby, kdy je stent obklopen klidnou tkání a je potažen

28.04.03

intaktním endothelem, nepřetržité uvolňování antagonisty receptoru LTB_4 nemusí být nutné.

Formy s prodlouženým uvolňováním podle vynálezu jsou s výhodou buď nedegradovatelné mikročástice nebo nanočástice nebo biodegradovatelné mikročástice nebo nanočástice. V ještě výhodnějším provedení jsou mikročástice nebo nanočástice vytvořeny na bázi matrice obsahující polymer, která je biologicky degradována náhodným, neenzymatickým, hydrolytickým štěpením. Vhodná struktura se vytvoří za použití směsi termoplastických polymerů (například polylaktidu nebo polyglykolidu) nebo kopolymerů laktidových a glykolidových složek. Laktidová/glykolidová struktura má tu přídatnou výhodu, že její biodegradací vzniká kyselina mléčná a kyselina glykolová, což jsou u savců normální metabolické produkty.

Dávkovací formy s prodlouženým uvolňováním podle vynálezu jsou schopny dodávat agonistu receptoru LTB_4 k cílovým buňkám po prodlouženou dobu. Takové dávkovací formy podle vynálezu mohou mít jakékoliv složení, které je vhodné pro tento účel. Vhodné formy s prodlouženým uvolňováním mají jeden nebo více z následujících charakteristických rysů:

1. mikročásticová (například o průměru od asi 0,5 μm do asi 100 μm , s výhodou od asi 0,5 do asi 2 μm) nebo nanočásticová (například o průměru od asi 1,0 nm do asi 1000 nm, s výhodou od asi 50 do asi 250 nm) struktura volně tekutého prášku;

2. biodegradovatelná struktura vytvořená tak, aby byla biologicky degradována během asi 3 až asi 180 dní, s výhodou asi 10 až asi 21 dní, nebo nebiodegradovatelná struktura, která umožní, aby k difuzi antagonisty receptoru

LTB₄ docházelo po dobu asi 3 až asi 180 dní, s výhodou od asi 10 do asi 21 dní;

3. biokompatibilní s cílovou tkání a místním fyziologickým prostředím, do kterého se dávkovací forma podává, včetně biokompatibilních biodegradovatelných produktů;

4. usnadňující stabilní a reprodukovatelné dispergování antagonistů receptoru LTB₄, s výhodou za vzniku systému antagonisty receptoru LTB₄-polymerní matrice, z něhož se antagonist receptoru LTB₄ uvolňuje jedním nebo oběma následujícími způsoby: (1) difuze antagonisty receptoru LTB₄ dávkovací formou (v případě, že je antagonist receptoru LTB₄ rozpustný v polymeru nebo polymerní směsi tvořící dávkovací formu); nebo (2) uvolňování antagonisty receptoru LTB₄ při biodegradaci dávkovací formy; a schopnost vázat se k jednomu nebo více buněčným a/nebo intersticiálním matričním epitopům s výhodou od asi 1 do asi 10 000 vazeb vazebný protein/peptid-dávkovací forma, výhodněji s maximem asi 1 vazba vazebný peptid-dávkovací forma na 1,5 nm² plochy povrchu částice. Celkový počet vazeb závisí na velikosti použité částice. Vazebné proteiny nebo peptidy jsou schopny kopulace s částicovou dávkovací formou prostřednictvím kovalentního ligandového sandwiche nebo nekovalentních modalit, jak je uvedeno výše.

Například nanočástice obsahující sloučeninu obecného vzorce I je možno připravovat za použití biodegradovatelných polymerů, jako je poly(D,L-mléčná kyselina) PLA, poly(D,L-mléčná-ko-glykolová) PLGA, kopolymer methakrylové kyseliny, poly(epsílon-kaprolakton) za použití 1) postupů n-rozpouštědlové emulgace - odpaření nebo 2) postupů emulgace - vysrážení. Tyto způsoby zahrnují disperzi polymeru v organickém rozpouštědle (například acetonu nebo

28.04.03

benzylakoholu) popřípadě za přítomnosti korozpouštědla, typicky methylenchloridu. Sloučenina obecného vzorce I je obsažena v organickém rozpouštědle. V některých případech se rozpouštědla smísí a poté za mechanického míchání nebo sonikace přikapou k vodnému roztoku obsahujícímu stabilizující hydrokoloid (například poly(vinylalkohol) nebo želatinu) (tj. olej ve vodě). Po vzniku stabilní emulze se chlorované rozpouštědlo odstraní tak, že se emulze za míchání odpaří, čímž se získají nanočástice, které lze zbavit organických rozpouštědel tangenciální filtrací nebo opakovaným promytím (centrifugace/resuspendování). Výslednou vodnou suspenzi je poté možno zmrazit popřípadě za použití sacharidového nebo jiného kryoprotektivního činidla a lyofilizovat. Získají se nanočástice schopné resuspendování ve fyziologických solných roztocích za jednoduchého míchání nebo sonikace.

Alternativně je vodný roztok možno za míchání nebo sonikace přidat k organické fázi bez chlorovaného rozpouštědla (tj. emulze voda v oleji). Po přidavku vodného roztoku dojde k obrácení fáze, vysrážení nanočástic. Alternativně je vysrážení možno podpořit přidavkem vysolovacích činidel ve vodném rozpouštědle. Za použití postupu emulgace-odpaření je typicky možno 750 mg PLGA rozpustit ve 30 ml methylenchloridu. S výhodou se přidá 5 ml methylenchloridu obsahujících 75 mg sloučeniny obecného vzorce I. Tato organická fáze se za sonikace přikape ke 180 ml vodného roztoku 2,5% poly(vinylalkoholu) (PVP) (molekulová hmotnost 20 až 70 kD), přičemž se používá sonikátoru s výkonem 15 až 55 W po dobu asi 10 minut. Získá se rozpustná emulze. Sonikace se provádí v ledové lázni při teplotě, která nepřekračuje 15°C. Emulze se dále míchá 24 hodin při teplotě místnosti, aby se umožnilo odpaření chlorovaného rozpouštědla. Výsledné nanočástice se dále přečistí za použití filtračního zařízení vybaveného olefinovou filtrační patronou (velikost pórů 100 mm). Při postupu za použití techniky emulgace-vysrážení se

za mechanického míchání o frekvenci 1200 až 5000 min⁻¹ k 5 ml benzylalkoholu obsahujícím 10 až 15% hmot. polymeru PLA nebo PLGA a 10 až 15 % hmotn. sloučeniny obecného vzorce I přidá 10 µl vodného PMP (10 až 30% hmotn.). Během 5 minut vznikne emulze olej ve vodě, k níž se přidá voda (160 ml), aby došlo k obrácení fáze, což v následujících 10 minutách vede k difuzi organického rozpouštědla do vody za současného vysrážení polymeru ve formě pevných nanočástic.

Tvorba atherosklerotické léze probíhá v pěti stádiích:

1. Migrace: u zdravých cév jsou všechny buňky hladkého svalstva (SMC), nebo většina z nich, obsaženy v medii cévy. Výskyt SMC ve zvětšené intimě během tvorby léze tedy vyžaduje migraci SMC z médie do intimy cévy. Inhibice této migrace SMC může významně měnit povahu lézí a zmírňovat patologii spojenou s tvorbou lézí.

2. Akumulace lipidů: Mediální SMC ve stěnách zdravých cév lipidy významně neakumulují. Intimální SMC však mají zvýšenou schopnost přijímat a uchovávat lipidy. Při expozici zvýšeným hladinám cirkulujících lipidů (zejména nízkohustotnímu lipoproteinu, LDL) se SMC mohou nasýtit mastnými lipidy a zahynout. Akumulace lipidů je pro progresi léze na klinickou významnost nezbytná, jelikož tvoří thrombogenní nekrotické jádro léze. Inhibice akumulace lipidů v SMC by tedy měla zpomalovat nebo zabráňovat progresi léze, a tedy omezovat nebo zabráňovat atherosklerose a výslednému infarktu myokardu.

3. Vcestování zánětových buněk: Lidské léze obsahují řadu buněk odvozených od makrofágů. Proces vcestování, funkce těchto buněk a jejich podíl na patologii je nejasný. Zjednodušený mechanismus napovídá, že makrofágy jsou

28.04.03

přitahovány k akumulovaným lipidům v lézi, aby odstranily lipid z cévní stěny. Ačkoliv inhibice vcestování buněk odvozených od makrofágů může redukovat patologii léze, může také urychlit progresi až na stav naplnění lipidy náchylný k ruptuře.

4. Proliferace: Intimální akumulace SMC je v řadě případů doprovázena zeslabením média. Celkový počet SMC se tedy v místě léze nemůže výrazně zvýšit. Kromě toho je chronický charakter atherosklerosy příčinou obtíží při detekci stimulace proliferace v těchto lézích.

5. Ukládání extracelulární matrice: Atherosklerotické léze jsou také bohaté na extracelulární matici (ECM), zejména vlákna kolagenu. Zvýšená syntéza ECM může zvyšovat stabilitu plátu. Časná ruptura plátu vedoucí k infarktu myokardu může být spojena s nízkým ukládáním ECM a výsledným zeslabením fibrozního krytu, který překrývá nekrotické jádro léze bohaté na lipidy.

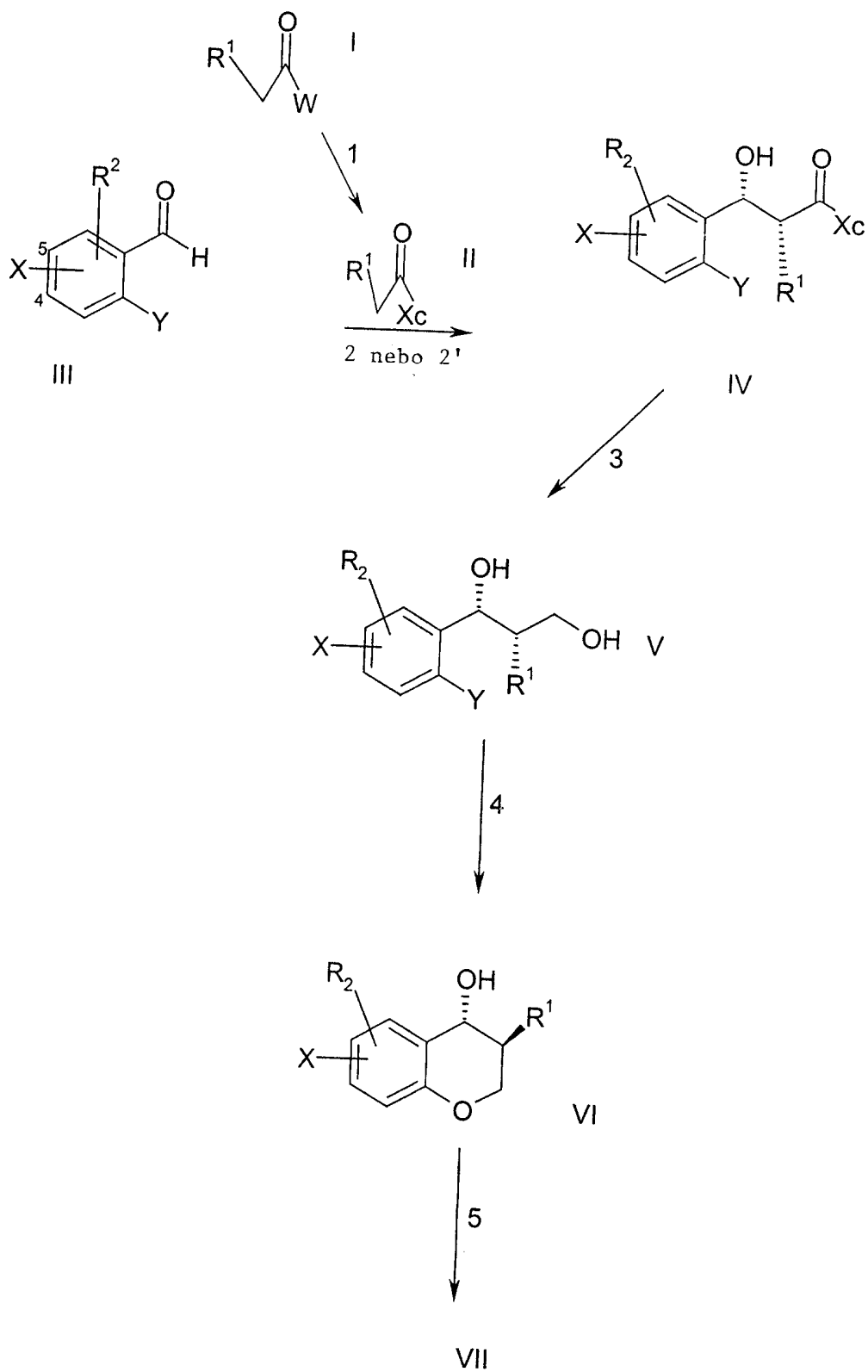
Atherosklerosa tedy představuje vzájemné působení různých procesů, z nichž některé mohou být ještě neidentifikované. Zaměření se na jediný způsob při snaze léčit atherosklerosu závisí na znalosti relativního podílu každého z procesů na manifestované patologii. Z těchto důvodů je vhodná koordinovaná strategie. Jako příklad lze uvést strategii, která zahrnuje inhibici migrace SMC, akumulace lipidů a proliferace a současně možné pozitivní účinky spočívající ve zvyšování ukládání ECM.

Sloučeniny obecného vzorce I, kterých se používá při způsobech léčení atherosklerosy podle vynálezu, je možno připravovat způsoby znázorněnými v následujících schemech. Obecné symboly R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 v těchto schemech a připojené diskusi mají výše uvedený význam. Schemata

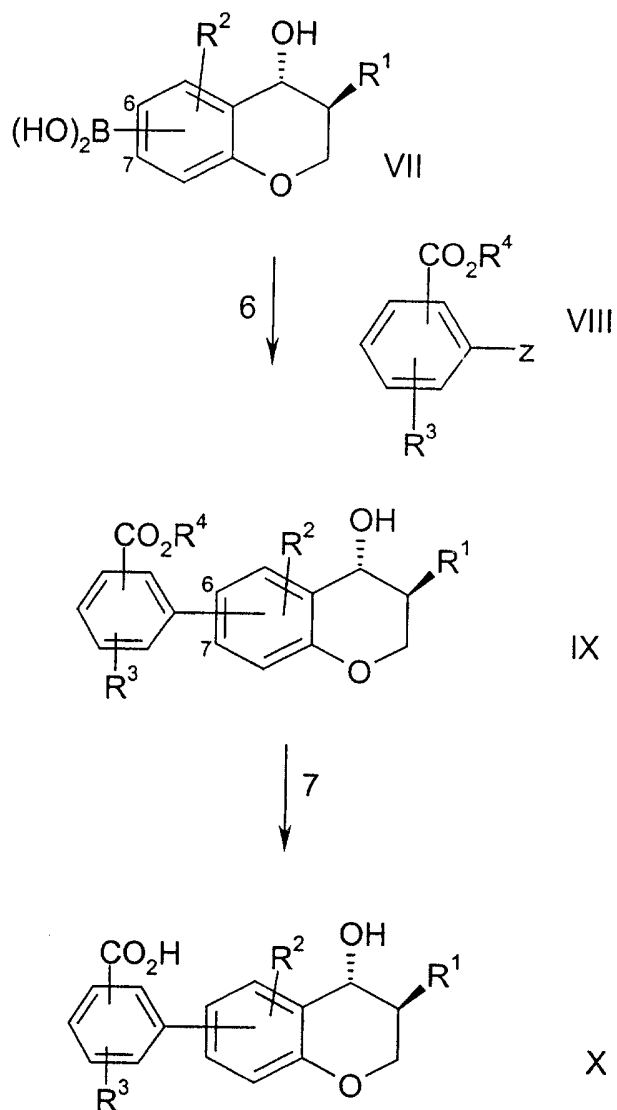
28.04.03

a diskuse popisují přípravu sloučenin obecných vzorců I až XIX a je možno je aplikovat rovněž na přípravu enantiomerů sloučenin obecných vzorců I až XIX, přičemž pojem "enantiomer" je definován výše.

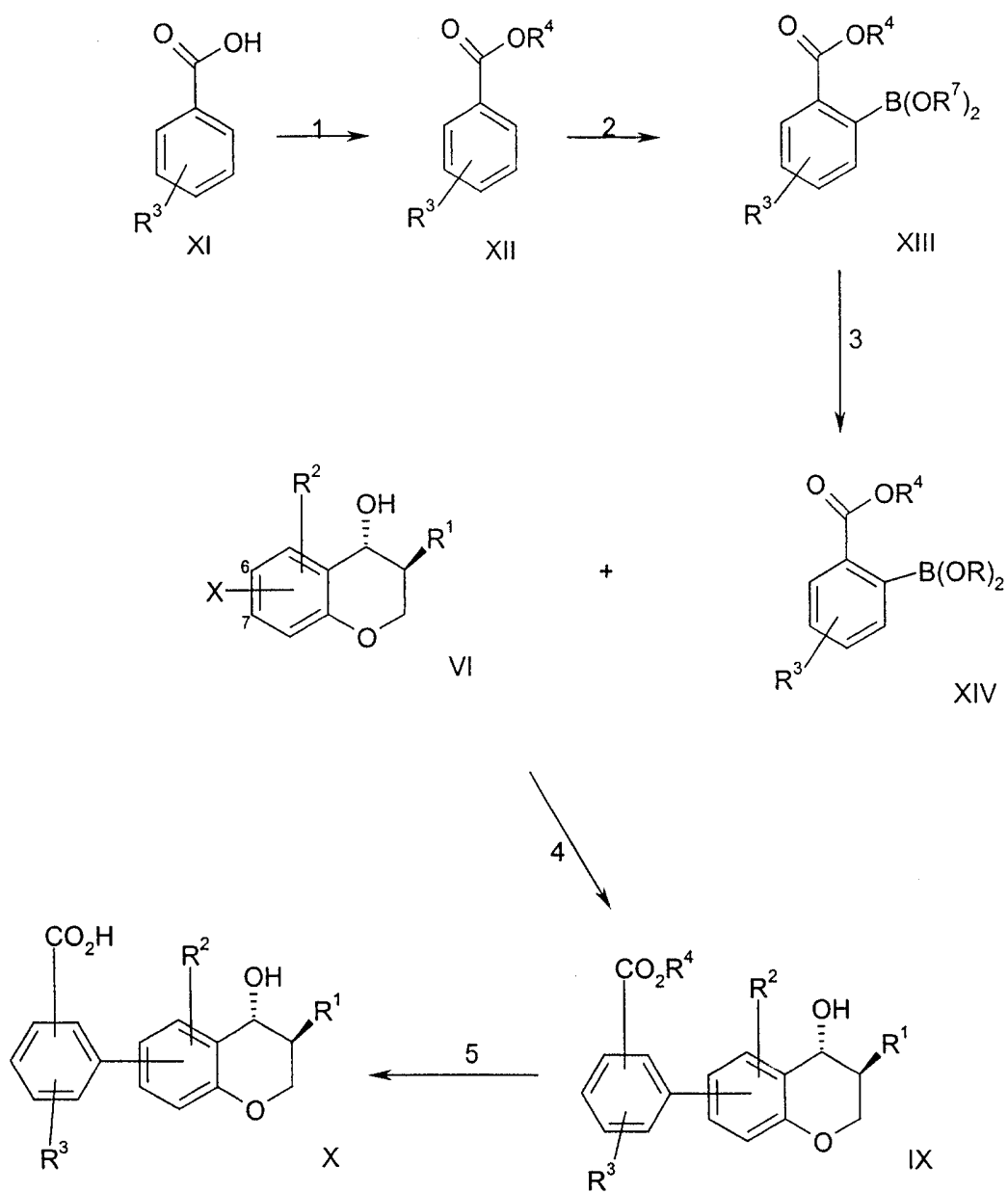
S c h e m a 1



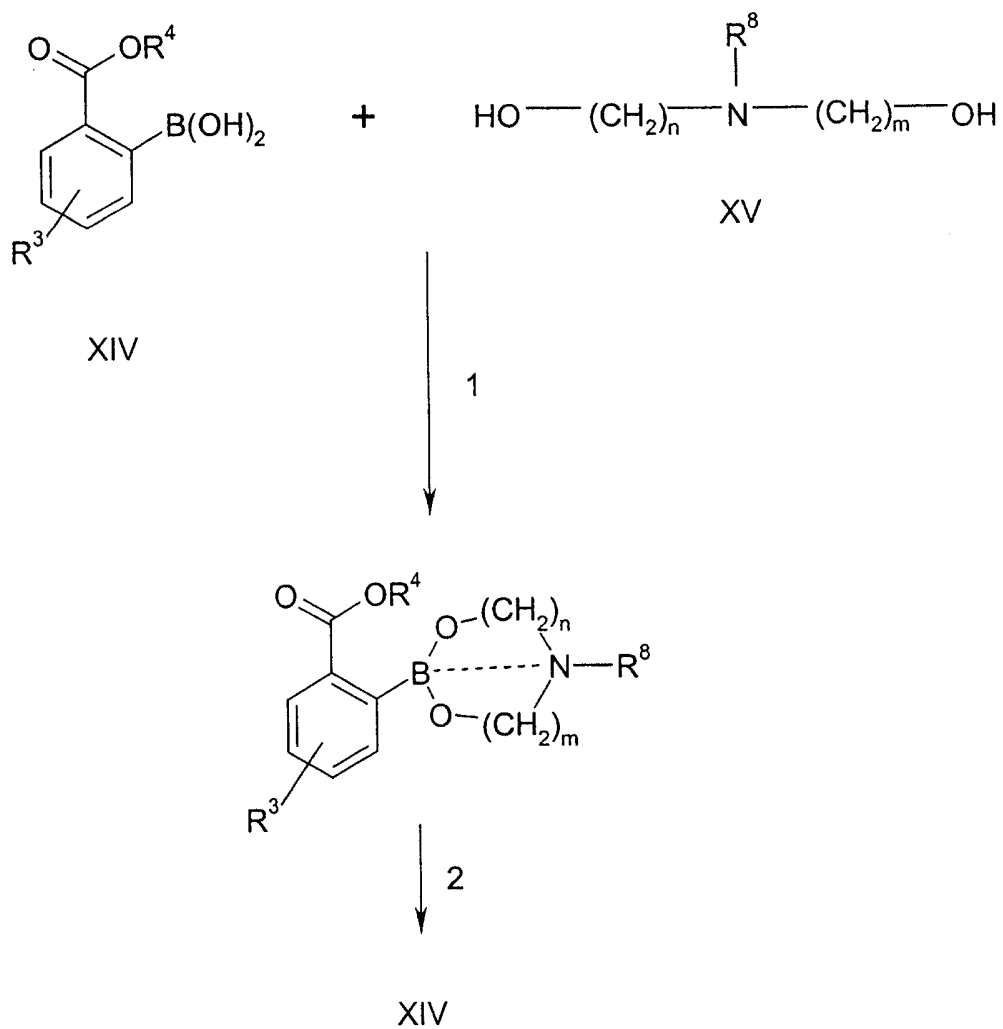
S c h e m a 1 - pokračování



S c h e m a 2

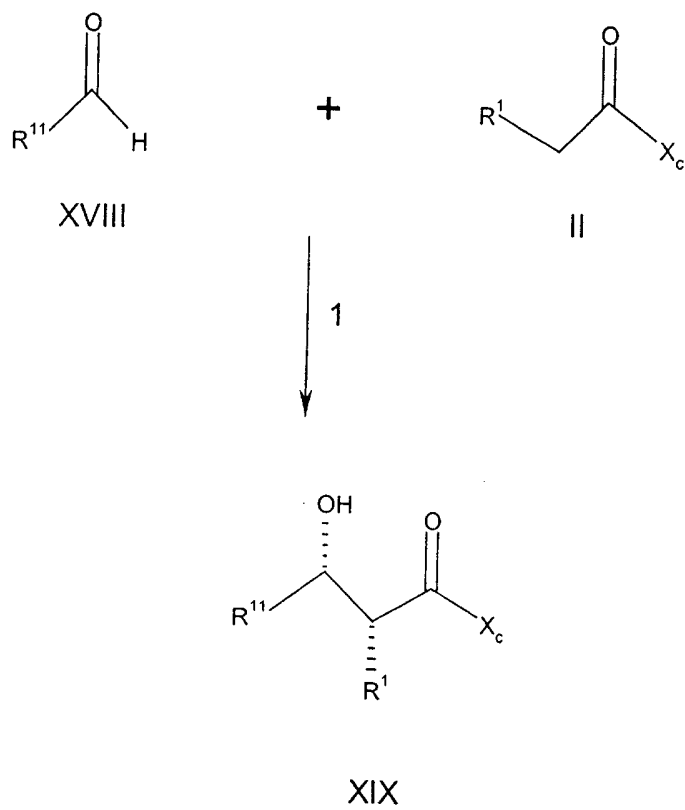


S c h e m a 3



28.04.03

S c h e m a 4



Syntetická sekvence znázorněná ve schematu 1 zahrnuje připojení chirální pomocné skupiny X_C ke sloučenině obecného vzorce I obsahující R^1 (stupeň 1), asymetrickou aldolovou kondenzaci s aldehydem obecného vzorce III (stupeň 2 nebo 2'), reduktivní odstranění chirální pomocné skupiny z aldolu obecného vzorce IV (stupeň 3), cyklizaci diolu obecného vzorce V za základních podmínek (stupeň 4), lithiaci a boraci halogenbenzopyranolu obecného vzorce VI (stupeň 5), kopulaci boronové kyseliny obecného vzorce VII s arylhalogenidem nebo sulfonátem obecného vzorce VIII (stupeň 6) a hydrolýzu esteru obecného vzorce IX (stupeň 7).

Ve stupni 1 postupu podle schematu 1 se chirální pomocná sloučenina obecného vzorce HX_C převede na odpovídající anion reakcí s vhodnou silnou bází, jako alkylolithiovou bází, přednostně butyllithiem, v aprotickém rozpouštědle, jako etherovém rozpouštědle, přednostně tetrahydrofuranu, při teplotě asi -80 až 0°C , přednostně při -78 až -55°C , během asi 20 minut až asi 1 hodiny. Substituent X_C je chirální pomocnou skupinou, která je schopna řídit relativní a absolutní stereochemii při asymetrických aldolových reakcích. Jako příklady sloučenin obecného vzorce HX_C je možno uvést (R)-4-benzyl-2-oxazolidinon, (S)-4-benzyl-2-oxazolidinon, (4R,5S)-4-methyl-5-fenyloxazolidin-2-on a (4S,5R)-4-methyl-5-fenyloxazolidin-2-on. Na výsledný anion se působí acylačním činidlem obecného vzorce I, kde W představuje halogen, přednostně chlor, a R^1 má výše uvedený význam, ve stejném rozpouštědle při teplotě asi -80 až asi 0°C , přednostně při asi -75°C , po dobu asi 1 hodiny. Reakční směs se poté zahřeje na asi -20 až asi 20°C , přednostně asi na 0°C a zpracuje vodou, přednostně vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, čímž se získá acylovaná chirální pomocná sloučenina obecného vzorce II.

Ve stupni 2 postupu podle schematu 1 se za podobných podmínek, jaké jsou popsány v Evans, D. A., Bartroli, J., Shih, T. L., J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 2127 a Gage, J. R., Evans, D. A., Org. Syn. 1989, 68, 83, provede "Evansova aldolová reakce". Uvedené publikace jsou zde citovány náhradou za přenesení celého jejich obsahu do tohoto textu. Konkrétně se ve stupni 2 postupu podle schematu 1 acylovaná chirální pomocná sloučenina obecného vzorce II nechá reagovat s Lewisovou kyselinou, bází a substituovaným benzaldehydem obecného vzorce III za vzniku alkoholu obecného vzorce IV s vysokým stupněm stereoselektivity. Benzaldehyd obecného vzorce III je substituován v poloze ortho skupinou Y, která během cyklizace ve stupni 4 slouží jako odstupující skupina, skupinou X (nebo X' ve schematu 2, konkrétně v kopulačním stupni 4 postupu podle schematu 2), která je v průběhu kopulačního stupně 6 substituována arylovým postraním řetězcem a skupinou R², přičemž R² má výše uvedený význam. Skupina X (nebo X' ve schematu 2) je ke zbytku benzaldehydu obecného vzorce III připojena v poloze 4 nebo 5 fenylového zbytku. Odstupující skupina Y představuje obvykle halogen nebo nitroskupinu a X představuje halogenidovou skupinu (ve schematu 2 X' představuje halogenidovou skupinu nebo perfluoralkylsulfonátovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku). Za účelem přípravy aldolového produktu obecného vzorce IV se acylovaná chirální pomocná sloučenina obecného vzorce II nechá reagovat halogenidem nebo sulfonátem boru, jako dialkylborsulfonátem, přednostně dibutylbortrifluormethansulfonátem, v aprotickém rozpouštědle, jako dichlormethanu, 1,2-dichlorethanu, toluenu nebo diethyletheru, přednostně dichlormethanu, při teplotě od asi -78 do asi 40°C, přednostně při -5°C, po dobu asi 20 minut. Poté následuje zpracování terciární aminovou bází, jako triethylaminem nebo diisopropylethylaminem, přednostně triethylaminem, při teplotě od asi -78 do asi 40°C, přednostně při -5 až 5°C, po dobu asi 1 hodiny. Na

reakční směs se působí substituovaným benzyldehydem obecného vzorce III při teplotě od asi -100 do asi 0°C , přednostně při asi -70°C , po dobu asi 30 minut. Reakční směs se během asi 1 hodiny nechá zahřát na teplotu asi -20 až asi 25°C , přednostně na asi -10°C a poté nechá reagovat s protickým oxidačním zhašecím činidlem. Přitom se přednostně postupuje tak, že se postupně přidá tlumivý roztok (pH 7), methanol a vodný peroxid vodíku, při teplotě méně než asi 15°C , za vzniku alkoholu obecného vzorce IV.

Stupeň 2' postupu podle schematu 1 je alternativním a přednostním způsobem přípravy alkoholu obecného vzorce IV za použití Lewisovy kyseliny obsahující titan. Ve stupni 2' postupu podle schematu 1 se acylovaná chirální pomocná sloučenina obecného vzorce II nechá reagovat s halogenidem titaničitým, přednostně chloridem titaničitým, v aprotickém rozpouštědle, jako dichlormethanu, 1,2-dichlorethanu nebo toluenu, přednostně dichlormethanu, při teplotě od asi -80 do asi 0°C , přednostně při asi -80 až asi -70°C , po dobu asi 30 minut. Reakční směs se poté asi 30 minut míchá a nechá reagovat s terciárním aminovou nebo terciární diaminovou bází, jako triethylaminem nebo N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem, přednostně N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem, při teplotě od asi -80 do asi 0°C , přednostně při asi -80 až asi -65°C , po dobu asi 30 minut. Dále je přednostně popřípadě možno provést reakci s donorním ligandem, jako 1-methyl-2-pyrrolidinonem, dimethylformamidem, 1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)pyrimidinonem, triethylfosfátem nebo 2,2'-dipyridylem, přednostně 1-methyl-2-pyrrolidinonem, při teplotě od asi -80 do asi 0°C , přednostně při asi -80 až asi -65°C , po níž následuje přibližně 30minutové míchání. Výsledná směs se nechá reagovat se substituovaným benzaldehydem obecného vzorce III při teplotě od asi -100 do asi 0°C , přednostně při asi -80 až asi -65°C , po dobu asi 30 minut. Reakční směs se během asi 1 až asi 24 hodin,

přednostně asi 4 hodin, zahřeje na teplotu asi -30 až asi 30°C , přednostně na 0 až 25°C , a nechá reagovat s protickým zhášecím činidlem, přednostně vodným chloridem amonným, při teplotě od -30 do 30°C , přednostně při 0 až 25°C , za vzniku alkoholu obecného vzorce IV. V případě, že se provádí reakce s donorním ligandu, získá se alkohol obecného vzorce IV ve formě krystalického solvátu s donorním ligandu. Míchání rozložené reakční směsi s pevný nosičem, jako je celit, po dobu asi 12 hodin při teplotě asi 20°C usnadní filtraci reakční směsi za účelem odstranění titanových vedlejších produktů.

Aldolizačním podmínkám za přítomnosti sloučeniny titanu ve stupni 2' postupu podle schematu 1 se dává přednost, protože jsou provozně jednodušší, než podmínky aldolizace za přítomnosti sloučeniny boru popsané ve stupni 2 postupu podle schematu 1, jelikož umožňují vyhnout se pyroforickému činidlu, tributylboranu, korozivnímu činidlu, trifluoromethansulfonové kyselině, a jejich exotermické reakci při přípravě Lewisovy kyseliny, kterou je dibutylbortrifluormethansulfonát.

Dále, na rozdíl od aldolizačních reakcí za přítomnosti sloučeniny titanu popsaných v literatuře, jako v Evans, D. A., Rieger, D. L., Bilodeau, M. T., Urpi, F., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 1047, poskytují aldolizační podmínky za přítomnosti sloučeniny titanu ve stupni 2' postupu podle schematu 1 vysokou selektivitu za použití méně než dvou ekvivalentů aldehydu obecného vzorce III. Přednostně se v tomto stupni používá přibližně 1 ekvivalentu aldehydu obecného vzorce III. Pod pojmem "přibližně jeden ekvivalent" se ve vztahu k aldehydu obecného vzorce III nebo sloučenině $\text{R}^{11}\text{C}(\text{O})\text{H}$ (jak je uvedena v nárocích) rozumí méně než 1,5 ekvivalentu této sloučeniny. Ve výše uvedeném článku Evans et al. se uvádí, že pro aldolizační reakci za přítomnosti

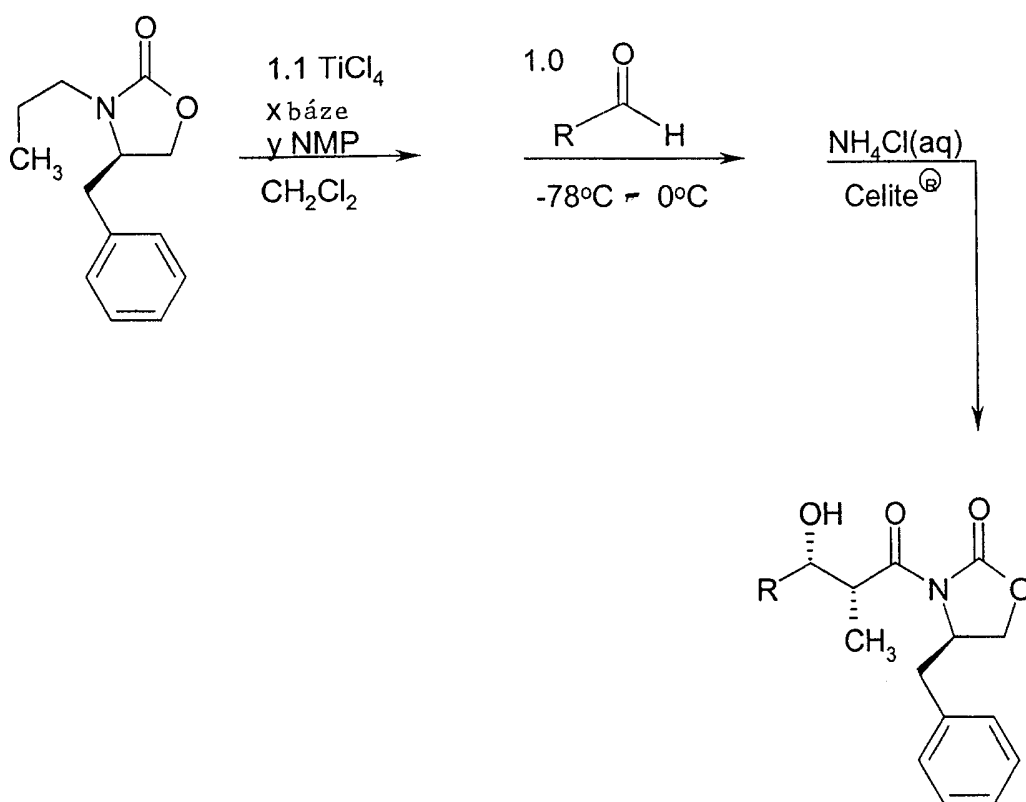
sloučeniny titanu, která je analogická se stupněm 2' postupu podle schematu 1, by bylo třeba dvou ekvivalentů aldehydu.

Kromě užitečnosti při přípravě sloučenin obecného vzorce X, jsou aldolizační podmínky za přítomnosti sloučeniny titanu stupně 2' postupu podle schematu 1 užitečné při výrobě sloučenin, které jsou inhibitory HIV proteasy, jež jsou popsány v GB patentové přihlášce 2 270 914 (zveřejněné 30. března 1994) a v B. D. Dorsey et al., Tetrahedron Letters, 1993, 34 (12), 1851. Ve schematu 4 je ilustrována aplikace aldolizace za přítomnosti sloučeniny titanu na aldehyd obecného vzorce XVIII, kde R^{11} představuje alkylskupinu s 1 až 9 atomy uhlíku, alkenylskupinu se 2 až 9 atomy uhlíku nebo fenylyskupinu substituovanou zbytkem Y ve poloze 2, zbytkem X v poloze 4 nebo 5 a zbytkem R^2 v jedné ze zbývajících poloh fenylového zbytku, kde Y, X a R^2 mají výše uvedený význam. Reakční podmínky jsou při postupu podle schematu 4 stejné, jako podmínky popsané pro stupeň 2' postupu podle schematu 1. Aldehyd obecného vzorce XVIII zahrnuje aldehyd obecného vzorce III ze schematu 1 a alkohol obecného vzorce XIX zahrnuje alkohol obecného vzorce IV ze schematu 1.

V následující tabulce 1 je ilustrováno, jak produkt postupu podle schematu 4 nebo stupně 2' postupu podle schematu 1 může různě záviset na použitých reakčních podmínkách, zejména, jak se vlivem zvýšení množství TMEDA od 1,2 do 3 ekvivalentů a přidavku 2 ekvivalentů NMP zvyšuje diastereoselektivita. V tabulce 1 bylo pro každou reakci použito 1,0 ekvivalentu aldehydu vzorce RCHO, x představuje počet ekvivalentů báze, y představuje počet ekvivalentů NMP, NMP znamená 1-methyl-2-pyrrolidinon, TMEDA znamená N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin, NETiPr₂ znamená diisopropylethylamin a poměr diastereomerů byl stanoven vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Isomery aldolů byly identifikovány

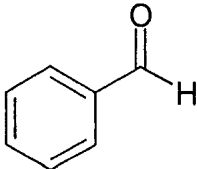
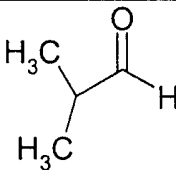
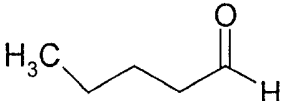
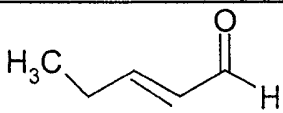
tak, že byly odděleny a hydrolýzou za použití hydroxidu lithného/peroxidu vodíku, podobným postupem, jaký je popsán v Van Draanen, N. A., Arseniyadis, S., Crimmins, M, T., Heathcock C. H., J. Org. Chem. 1991, 56, 2499 a Gage, J. R., Evans, D. A., Org. Syn. 1989, 68, 83, převedeny na známé isomery karboxylové kyseliny. Požadovaný isomer je uveden zvýrazněným písmem.

S c h e m a p r o t a b u l k u 1



28.04.03

T a b u l k a 1

RCHO	<u>x</u> báze	<u>y</u> NMP	Enolizační teplota	Poměr aldolo- vých diaste- reomerů
	1.2 NEt ₂ Pr ₂	0 NMP	0°C	33:--:2:65 (syn:anti:syn:anti)
"	1.2 TMEDA	0 NMP	0°C	22:--:55:23
"	1.2 NEt ₂ Pr ₂	0 NMP	-78°C	29:--:10:62
"	1.2 TMEDA	0 NMP	-78°C	16:--:57:28
	1.2 TMEDA	0 NMP	-78°C	--:--:11:89 (anti:anti:syn:syn)
"	3 TMEDA	2 NMP	-78°C	--:--:--:100
	1.2 TMEDA	0 NMP	-78°C	28:39:33:--
"	3 TMEDA	2 NMP	-78°C	4:92:3:2
	1.2 TMEDA	0 NMP	-78°C	18:40:42:--
"	3 TMEDA	2 NMP	-78°C	2:96:2:--

Ve stupni 3 postupu podle schematu 1 se chirální pomocná skupina X_C odštěpí (a popřípadě se regeneruje pro opětovné použití ve stupni 1). Oxidační stav sloučeniny obecného vzorce IV se z úrovně kyseliny způsobem podobným postupu popsanému v Penning, T. D., Djuric, S. W., Haack, R. A., Kalish, V. J., Miyashiro, J. M., Rowell, B. W., Yu, S. S., Syn Commun. 1990, 20, 307 sníží na oxidační stav alkoholu obecného vzorce V. Při tomto postupu se sloučenina obecného vzorce IV nechá reagovat s hydridovým redukčním činidlem, jako tetrahydroboritanem lithným, lithiumaluminiumhydridem, tetrahydroboritanem sodným nebo tetrahydroboritanem vápenatým, přednostně tetrahydroboritanem lithným, v etherovém rozpouštědle, jako tetrahydrofuranu, diisopropyletheru nebo methylterc.butyletheru, přednostně tetrahydrofuranu, které obvykle obsahuje protické rozpouštědlo, jako vodu, ethanol nebo isopropylalkohol, při teplotě od asi -78°C do teploty zpětného toku, přednostně při 0°C až teplotě okolí (20 až 25°C). Po 1 až 24, obvykle 12, hodinách se reakční směs rozloží vodou a případným následným přidavkem peroxidu vodíku. Chirální pomocnou sloučeninu obecného vzorce HX_C je možno regenerovat pro opětovné použití ve stupni 1 selektivním vysrážením nebo tak, že se sloučenina obecného vzorce HX_C extrahuje z roztoku diolu obecného vzorce V v organickém rozpouštědle, jako diisopropylethyl nebo směsi ethylacetátu a hexanu do vodné kyseliny, přednostně kyseliny chlorovodíkové, vodné kyselé extrakty se neutralizují báží a sloučenina obecného vzorce HX_C se extrahuje do organického rozpouštědla.

Ve stupni 4 postupu podle schematu 1 se provede intramolekulární aromatická substituce, při níž se v diolu obecného vzorce V vytěsňuje odstupující skupina Y v poloze ortho primární hydroxylovou skupinou za vzniku benzopyranolového kruhového systému sloučeniny obecného vzorce VI. Konkrétně se diol obecného vzorce V, kde odstupující skupina

Y představuje halogen nebo nitroskupinu, přednostně fluor, nechá reagovat s bází, jako terc.butoxidem draselným, bis(trimethylsilyl)amidem sodným, bis(trimethylsilyl)amidem draselným, uhličitanem cesným nebo hydridem sodným, přednostně terc.butoxidem draselným, v aprotickém rozpouštědle, jako tetrahydrofuranu, dimethylsulfoxidu nebo 1-methyl-2-pyrrolidinonu, přednostně tetrahydrofuranu, popřípadě za přítomnosti přidané soli mědi, při teplotě od teploty okolí do 130°C, přednostně při asi 70°C, po dobu 1 až 24, obvykle asi 4, hodin za vzniku benzopyranolu obecného vzorce VI. V benzopyranolu obecného vzorce VI je substituent X (nebo X' ve schematu 2) připojen v poloze 6 nebo 7 benzopyranového kruhu.

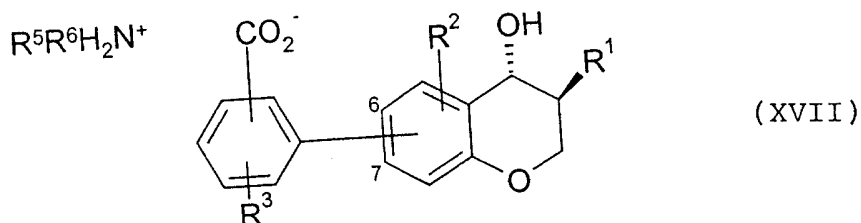
Ve stupni 5 postupu podle schematu 1 se substituent X v benzopyranolu obecného vzorce VI převede na lithium a poté na skupinu boronové kyseliny. Za účelem lithiace se chromanol obecného vzorce VI přednostně nechá reagovat nejprve s methyllithiem za vzniku alkoxidu lithného a poté s butyllithiem za vzniku aryllithia. Při tomto postupu se benzopyranol obecného vzorce VI, kde X představuje halogenidovou skupinu, přednostně bromidovou nebo jodidovou, nechá reagovat se dvěma ekvivalenty alkyllithia, přednostně nejprve s jedním ekvivalentem methyllithia a poté s jedním ekvivalentem butyllithia, v etherovém rozpouštědle, přednostně tetrahydrofuranu, při teplotě -78 až 0°C, přednostně -70 až -65°C, po dobu asi 1 hodiny, načež následuje reakce s boraním činidlem, jako boran-tetrahydrofuranovým komplexem, triisopropylborátem nebo trimethylborátem, přednostně boran-tetrahydrofuranovým komplexem, při teplotě od -78 do 0°C, přednostně při -70 až -65°C, po dobu asi 30 minut. Reakční směs se poté rozloží vodou nebo popřípadě vodnou kyselinou při teplotě od asi -65°C do teploty okolí, přednostně při asi 0°C, za vzniku boronové kyseliny obecného vzorce VII, kde je zbytek boronové kyseliny připojen v poloze 6 nebo 7 benzopyranového kruhu.

Ve stupni 6 postupu podle schematu 1 se provede Suzukiho kopulace mezi boronovou kyselinou obecného vzorce VII a sloučeninou obecného vzorce VIII za vzniku biarylové vazby sloučeniny obecného vzorce IX. Ve sloučenině obecného vzorce VIII Z představuje halogenidovou skupinu nebo sulfo-nátovou skupinu, přednostně bromidovou, jodidovou nebo trifluormethansulfonátovou skupinu, R^4 představuje alkyl-skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku a R^3 má výše uvedený význam. Tento postup je podobný postupu popsánému v Miyaura, N., Suzuki A., Chem. Rev., 1995, 95, 2457. Tento postup je výhodnější než kopulace sloučenin zinku nebo cínu, kvůli obtížnosti přípravy organických sloučenin zinku ve velkém měřítku a toxicitě organických sloučenin cínu. Při tomto postupu se směs boronové kyseliny obecného vzorce VII, arenu obecného vzorce VIII, palladiového katalyzátoru, jako tetrakis(trifenylfosfin)palladia(0), chloridu bis(trifenylfosfin)palladnatého, octanu palladnatého, dimerního allyl-palladiumchloridu, tris(dibenzylidenaceton)dipalladia(0) nebo 10% palladia na uhlíku, přednostně 10% palladia na uhlíku, a báze nebo fluoridové soli, jako uhličitanu sodného, triethylaminu, hydrogenuhličitanu sodného, uhličitanu cesného, terciárního fosforečnanu draselného, fluoridu draselného, fluoridu cesného nebo tetrabutylamoni-fluoridu, přednostně fluoridu draselného, v rozpouštěd-le, jako ethanolu, dimethoxyethanu nebo toluenu, které popřípadě obsahuje vodu, přednostně ethanolu, míchá při teplotě od teploty okolí do 130°C, přednostně při teplotě zpětného toku, po dobu asi 1 až asi 24 hodin, přednostně po dobu asi 3 hodin, za vzniku birarylu obecného vzorce IX, kde benzylesterový zbytek je připojen v poloze 6 nebo 7 chroma-nového kruhu.

Ve stupni 7 postupu podle schematu 1 se ester obec-ného vzorce IX nechá reagovat s vodnou hydroxidovou bází, jako vodným hydroxidem sodným, v alkoholickém rozpouštěd-le,

jako isopropylalkoholu, při teplotě od 40°C do teploty zpětného toku, přednostně při teplotě zpětného toku, po dobu asi 1 až asi 24 hodin, přednostně asi 6 hodin. Reakční směs se ochladí na teplotu okolí a rozdělí mezi vodnou bázi a organické rozpouštědlo, jako směs hexanu a isopropyl-etheru. Vodný roztok se okyselí a výsledná sloučenina obecného vzorce X se extrahuje do organického rozpouštědla, jako ethylacetátu. Tento způsob extrakce sloučeniny obecného vzorce X organickými rozpouštědly odstraňuje neutrální nečistoty, což je zvláště výhodné v posledním stupni této syntézy.

Za účelem usnadnění zpracování karboxylové kyseliny obecného vzorce X se tato sloučenina může nechat reagovat se sekundárním aminem obecného vzorce NHR^5R^6 , kde R^5 a R^6 mají výše uvedený význam, v rozpouštědle, jako toluenu, za vzniku amoniumkarboxylátu obecného vzorce XVII



kde R^1 , R^2 , R^3 , R^5 a R^6 mají výše uvedený význam. Amoniumkarboxylát obecného vzorce XVII je možno nechat reagovat s vodnou kyselinou, jako kyselinou chlorovodíkovou nebo kyselinou sírovou, přednostně kyselinou chlorovodíkovou, v rozpouštědle, jako ethylacetátu, toluenu nebo methylenchloridu, přednostně ethylacetátu, při teplotě od 0°C do teploty okolí po dobu 30 minut až 3 hodin, přednostně po dobu 1 hodiny, za vzniku karboxylové kyseliny obecného vzorce X.

28.04.03

Ve schematu 2 je ilustrován alterantivní způsob kopulační sekvence stupňů 5 a 6 postupu podle schematu 1. Způsobu podle schematu 2 se dává přednost. Ve stupni 1 postupu podle schematu 2 se esterifikací karboxylové kyseliny obecného vzorce XI alkoholem obecného vzorce R^4OH , kde R^3 a R^4 mají výše uvedený význam, získá ester obecného vzorce XII. Při tomto postupu se karboxylové kyselina obecného vzorce XI nechá reagovat s alkoholem obecného vzorce R^4OH , přednostně primárním nebo sekundárním alkoholem, jako 2,2-dimethylpropylalkoholem, a kyselinou, jako kyselinou sírovou, kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou methansulfonovou, kyselinou toluensulfonovou nebo kyselinou kafrsulfonovou, přednostně kyselinou sírovou, v rozpouštědle, jako toluenu, dichlormethanu nebo dichlorethanu, přednostně toluenu, při teplotě od $0^{\circ}C$ do teploty zpětného toku, přednostně při teplotě zpětného toku, po dobu 1 až 24, přednostně 4, hodin za vzniku esteru obecného vzorce XII.

Ve stupni 2 postupu podle schematu 2 se ester obecného vzorce XII nechá reagovat s báží a výsledná ortho metalovaná sloučenina se zachytí trialkylborátem za vzniku boronátového esteru obecného vzorce XIII. Ve stupni 3 postupu podle schematu 2 se boronátový ester obecného vzorce XIII za použití postupů známých odborníkům v tomto oboru hydrolyzuje na odpovídající boronovou kyselinu obecného vzorce XIV. Ve stupních 2 a 3 postupu podle schematu 2 se ester obecného vzorce XII nechá reagovat s kovovou amidovou báží, jako lithiumpiisopropylamidem, lithiumpiethylamidem, lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidinem nebo bis(2,2,6,6-tetramethylpiperidino)magnesiem, přednostně lithiumpiisopropylamidem, za přítomnosti tri(alkyl)borátu s 1 až 4 atomy uhlíku v každé z alkylových částí, jako triisopropylborátu, triethylborátu nebo trimethylborátu, přednostně triisopropylborátu, v etherovém rozpouštědle, jako tetrahydrofuranu, diisopropyletheru, dioxanu nebo methylterc.butyletheru,

přednostně tetrahydrofuranu, při teplotě v rozmezí od asi -78°C do teploty okolí (20 až 25°C), přednostně při asi 0°C . Po 10 minutách až 5 hodinách, obvykle po 1 hodině, se reakční směs rozloží vodnou kyselinou, čímž se získá boronová kyselina obecného vzorce XIV.

Za účelem usnadnění zpracování boronové kyseliny obecného vzorce XIV před provedením stupně 4 postupu podle schematu 2 je boronovou kyselinu obecného vzorce XIV možno nechat reagovat s aminodiolem způsobem znázorněným ve schematu 3. Při postupu podle schematu 3 se boronová kyselina obecného vzorce XIV nechá reagovat s aminodiolem obecného vzorce XV, kde R^8 , m a n mají výše uvedený význam, v rozpouštědle, jako isopropylalkoholu, ethanolu, methanolu, hexanech, toluenu nebo kombinaci těchto rozpouštědel, přednostně v isopropylalkoholu, při teplotě v rozmezí od 0°C do teploty zpětného toku, přednostně při teplotě okolí, po dobu 15 minut až 10 hodin, přednostně 10 hodin, za vzniku aminového komplexu obecného vzorce XVI. Za účelem provedení stupně 4 postupu podle schematu 2 se aminový komplex obecného vzorce XVI hydrolyzuje za použití postupů dobře známých odborníkům v tomto oboru na boronovou kyselinu obecného vzorce XIV. Při tomto postupu se například použije vodné kyseliny, jako kyseliny chlorovodíkové.

Ve stupni 4 postupu podle schematu 2 se provede Suzukiho kopulace mezi boronovou kyselinou obecného vzorce XIV a benzopyranolem obecného vzorce VI za vzniku biarylové vazby ve sloučenině obecného vzorce IX. Při tomto způsobu se připraví směs, která obsahuje kyselinu boronovou obecného vzorce XIV, benzopyranol obecného vzorce VI, palladiový katalyzátor, jako tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0), chlorid bis(trifenylfosfin)palladnatý, octan palladnatý, dimerní allylpalladiumchlorid, tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) nebo 10% palladium na uhlíku, přednostně tetrakis-

(trifenylfosfin)palladium(0), bázi nebo fluoridovou sůl, jako uhličitanu sodný, triethylamin, hydrogenuhličitan sodný, uhličitan cesný, terciární fosforečnan draselný, fluorid draselný, fluorid cesný, hydroxid sodný, hydroxid barnatý nebo tetrabutylamoniumfluorid, přednostně uhličitan sodný, a rozpouštědlo, jako toluen, ethanol, dimethoxyethan, popřípadě obsahující vodu, přednostně toluen obsahující vodu. V benzopyranolu obecného vzorce VI připraveném podle schematu 1 zbytek X' připojený v poloze 6 nebo 7 benzopyranového kruhu, představuje halogenidovou skupinu nebo perfluoralkylsulfonátovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, přednostně brom, jod nebo trifluormethansulfonátovou skupinu. Reakční směs se míchá při teplotě v rozmezí od teploty místnosti do teploty zpětného toku, přednostně při teplotě zpětného toku, po dobu asi 10 minut až asi 6 hodin, přednostně po dobu 1 hodiny, za vzniku biarylu obecného vzorce IX.

Ve stupni 5 postupu podle schematu 2 se ester obecného vzorce IX hydrolyzuje za vzniku karboxylové kyseliny obecného vzorce X, jak je to popsáno výše pro stupeň 7 postupu podle schematu 1.

Soli sloučenin obecného vzorce I je možno připravovat obvyklým způsobem, reakcí s bázi, jako hydroxidem alkalického kovu, například hydroxidem sodným, nebo hydroxidem kovu alkalických zemin, například hydroxidem hořečnatým.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Odvození myší linie

Geneticky modifikované myši s deficitem apolipo-proteinu E ($\text{ApoE}^{-/-}$), deficitem receptoru nízkohustotního lipoproteinu (LDL) ($\text{LDLr}^{-/-}$) a deficitem monocytního chemoatraktantního proteinu-1 ($\text{MCP}^{-/-}$), kterých se používá při této zkoušce, byly popsány a charakterizovány dříve (viz Rutledge, B. J. et al., J. Immunol., 1995; 155, 4838 až 4843; a Nakashima Y. et al., Arterioscler. Thromb., 1994; 14(1): 133 až 140]. Za účelem získání myších homozygotů pro apoE a MCP-1 (ScyA2) nulové alely se samci $\text{ApoE}^{-/-}$ myši na základě C57B/6 ($\text{C57E}^{-/-}$) spáří s heterozygotními samicemi $\text{MCP}^{-/+}$ myši na základě C57B/6. Výsledné $\text{ApoE}^{-/-}$ x $\text{MCP-1}^{-/+}$ progeny se identifikují analýzou Southern blot a inbredně množí, aby se získaly $\text{ApoE}^{-/-}$ x $\text{MCP-1}^{-/-}$ ($\text{C57E}^{-/-}$ x $\text{MCP-1}^{-/-}$) a kontrolní $\text{ApoE}^{-/-}$ x $\text{MCP-1}^{+/+}$ ($\text{C57E}^{-/-}$) myši. $\text{ApoE}^{-/-}$ myši na smíšeném genetickém základě 1290Ia x C57B/6 ($\text{129E}^{-/-}$) se množí v místě zkoušky a odvodí se ze sourozeneckých partnerů. Všechny myši se 21. den odstaví a chovají se za podmínek 12hodinového cyklu světlo/tma a jsou krmeny krmivem nebo stravou západního typu n (viz Bourassa, P. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 10022 až 10027).

Podávání sloučeniny

Sloučeniny obecného vzorce I, přednostně (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran) se hodnotí na účinky na vývoj lézí u myší rozdělených do skupin podle věku (věk 15 až 30 týdnů v době usmrcení) za použití protokolu 35denního léčení. Podskupiny myší se léčí (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-benzopyranem) po kratší dobu (7 až 14

dní) za účelem hodnocení akutních změn v tkáňové genové expresi, jak je poznamenáno v tabulce a legendě k obrázkům. Ve všech zkušebních skupinách se sloučenina podává perorální sondou jednou za den ve vehikulu obsahujícím 0,6% Tween 80 + 0,25% methylcelulosu v PBS. Myším se podává buď samotné vehikulum nebo sloučenina obecného vzorce I v denní dávce 30 mg/g nebo 100 mg/kg.

FACs Analýza CD11B

Po léčebném období se myši anestetizují směsí ketaminu, xylazinu a PBS (1 : 1 : 2) a do zkumavek Vacutainer obsahujících 7,5% EDTA se shromáždí vzorky celé krve z abdominální aorty. Stanovení exprese monocytů CD11B se provádí dříve popsáním způsobem (viz Showell, J. H. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1995; 273: 176 až 184). Buňky se peletizují mírnou centrifugací (1200 min^{-1} , 2 minuty) a inkubují s 50 $\mu\text{g/ml}$ potkanního antimyšího CD11b IgG konjugovaného s fluoresceinem (Pharmingen) 30 minut při teplotě místnosti. Jako kontrola nespecifické vazby se duplikáty vzorků inkubují s 50 $\mu\text{g/ml}$ potkanním IgG konjugovaným s fluoresceinem. Po 30minutové inkubaci se buňky promyjí 1 ml pufru HIFAZ, peletizují a červené krvinky se lysují lysačním pufrem (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) 10 minut při teplotě místnosti. Buňky se dvakrát promyjí, resuspendují v pufru HIFAZ a v průtokovém cytometru FACs se stanoví stupeň fluorescence. Data se shromáždí v podobě seznamu a přívod makrofágů je definován jako poměr rozptylu teček v malém úhlu a rozptylu teček do stran.

Plasmové lipoproteiny a lipidy

Plasmové lipoproteiny se oddělí za použití rychlé kapalinové chromatografie proteinů (FPLC, Pharmacia LKB,

Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ, USA) dříve popsaným způsobem (viz Bourassa, P. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 10022 až 10027). Celkový cholesterol a triglyceridy v plasmě se měří kolorimetrickými postupy za použití kitů Cholesterol/HP (Boehringer-Mannheim) a Triglycerides G (Wako Chemical), které jsou dostupné na trhu.

Analýza rozvětvené aorty

Při některých zkouškách se myši fixují perfusí 4% paraformaldehydem a vyjme se celá rozvětvená aorta, včetně brachiocefalické oblasti a karotidové, podklíčkové a femorální větve. Tkáň se zbaví adventicie a rozloží se na polystyren. Za použití CCD kamery připojené ke kopírovacímu stojanu se pořídí digitální snímky. Karotidová větev a podíčková větev se odstraní a brachiocefalická oblast se izoluje pro další zpracování. Procento povrchu aorty pokryté lézemi ve zbylé části rozvětvené aorty se stanoví za použití postupu En face (viz Bourassa, P. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 10022 až 10027). Každá aorta se hodnotí z hlediska lézí zachycením přímého obrazu a zobrazením na monitoru Trinitron. Plocha atherosklerotického plátu se stanoví na nebarvené tkáni za použití obrazové analýzy ImagePro 3.1 (Image Processing Solutions, Woburn, MA, USA). Plochy atherosklerotických plátů v aortách zbavených adventicie se jeví jako žlutobílé opakní plochy oproti průsvitným plochám nepostiženým lézí. Tato plocha se kvantifikuje tak, že se manuálně nastaví práhové hodnoty pro různé odstíny černé (pozadí), šedé (normální tkáň) a bílé (plocha léze).

Analýza léze

Za účelem stanovení plochy příčného řezu léze se srdce perfusí fixují ve 4% paraformaldehydu, infiltrují 30%

roztokem sacharosy s obsahem klovatiny po dobu 24 hodin při 4°C, uloží do OCT sloučeniny a při -18°C nařežou na 10µm řezy (viz Borgeat, P. et al., J. Biol. Chem. 1979, 254: 2643 až 2646). Řezy se barví červení Oil red O (Polyscientific, Bay Shore, NY, USA) a kontrastně barví hematoxylinem Gill III (Sigma, St. Louis, MO, USA). U každého řezu aortální chlopně se zkoumá plocha obarvená červení Oil red O tak, že se zachycují obrazy přímo z RGB kamery připojené ke světelnému mikroskopu Leitz Laborlux X (Leica) pro zobrazení na monitoru Trinitron RGB. Analýza obrazů se provádí za použití software ImagePro 3.1' (viz Bourassa, P. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 10022 až 10027). Výsledky se vyjádří jako průměrná velikost léze na řez nebo jako procento příčného řezu stěny cévy obarvené červení Oil red O. Pro každé zvíře se stanoví průměrná plocha léze z 12 až 16 řezů a data se vyjádří jako velikost léze nebo střední procento plochy léze ± standardní odchylka.

Imunohistochemické barvení makrofágů

Řezy aortálních chlopní sériově fixované v para-formaldehydu a uložené v OCT se podrobí imunobarvení za použití potkaních monoklonálních protilátek (IgG_{2b}) proti MOMA-2 (BioSource) a CD11b (Pharmlingen). Endogenní biotin a aktivita peroxidasy se blokují tak, že se každý řez inkubuje s roztokem avidinu/biotinu (Vector Laboratories) a 3% peroxidem vodíku v 1% hovězím séru. Potkání antimyší MOMA-2 se použije v koncentraci 25 µg/ml a potkání antimyší CD11b se použije v koncentraci 5 µg/ml. Po inkubaci s primárními protilátkami se provede inkubace s biotinylovanou oslí protipotkaní sekundární protilátkou IgG (1,4 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) a inkubace se streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou (1 : 500). Jako negativní kontroly se použije nespecifické potkaní IgG2b protilátky (Pharmlingen). Navázaná protilátka se vizualizuje

pomocí DAB (Vector Laboratories) a všechny řezy se kontrastně barví hematoxylinem Gill III. Výsledky se vyjádří jako procento celkové plochy příčného řezu cévní stěny (normální + chorobou postižená plocha/řez, s výjimkou lumen) obarvené DAB.

Stanovení peritoneální chemotaxe makrofágů

Po ukončení zkoušky se podskupině myší z každé skupiny intraperitoneální injekcí podá 1 ml sterilního 6% kaseinu. Po čtyřech dnech se promytím dutiny Hanksovým vyváženým solným roztokem HBSS (Life Technology) doplněným 1% fetálním hovězím sérem (FBS) sklídí buňky z peritoneálního exsudátu. Peritoneální buňky se promyjí třikrát v RPMI-1640 doplněném 0,1% hovězím sérovým albuminem BSA. Za účelem chemotaxe se buňky suspendují v koncentraci 2×10^6 buněk/ml v chemotaktickém pufru (RPMI-1640 doplněném 0,1% BSA a 20mM HEPES, pH 7,4). Suspenze buněk se umístí do horní komory 48jamkové komory pro mikrotaxi. Do dolní komory se umístí myší MCP-1 (10nM) nebo LTB₄ (10nM) a od horní komory se oddělí 5µm polykarbonátovou membránou. Peritoneální makrofágy přichycené ke spodnímu povrchu membrány se fixují a barví za použití soupravy Diff-Quick (Dade Behring Inc., Švýcarsko). Výsledky se vyjádří jako střední počet buněk, které migrovaly ve čtyřech polích o vysoké energii (20x) ze třech replikovaných vzorků.

Statistika

Statistická významnost se stanoví nepárovým Studentovým t-testem za použití statistického programu StatWiew (Abacus Concept, Inc., Berkeley, CA, USA). Výsledky se uvedou jako střední hodnota $\pm$ standardní odchylka.

Účinnost sloučeniny obecného vzorce I, konkrétně (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranu) proti aterosklerose se uvedena v následujících tabulkách 2 až 4.

T a b u l k a 2

Účinek LTB₄ antagonismu na léze u aterosklerotických myší

Kmen	N	Pohlaví	Věk (týdny)	Tělní hmot. (g)	Dávka (mg/kg)	TPC (mg/dl)	TG (mg/dl)	Sinus (% léze)	Chlopeč (% léze)
129E ^{-/-}	10	F	15	25±1	0	739±59	72±13	22,5±4	24,9±3
	10			26±2	30	584±58	83±40	19,6±2	21,6±2
	5			25±2	50	675±181	59±17	14,7±2*	16,3±2*
	10			25±1	100	858±166	36±13	7,9±1**	8,0±2**
	10	F	20	27±1	0	795±57	120±15	34,6±2	41,0±3
	10			29±1	30	780±51	138±21	24,4±3	25,9±3*
	5	F	24	30±1	0	513±42	59±12	43,5±3	49,5±3
	5			31±1	100	579±37	102±9	30,0±1	34,0±1
C57E ^{-/-}	8	M	16	29±1	0	807±83	189±73	22,9±4	24,7±4
	8			29±1	100	801±71	169±57	10,4±3*	7,8±2*
	12	F	22	30±	0	494±51	66±5	50,3±3	56,9±2
	9			30±	100	640±41	116±6	38,8±3	39±2
LDLR ^{-/-}	10	M	18	34±2	0	1342±315	778±210	14,8±2	15,9±3
	9			31±2	30	798±300	532±205	5,6±2*	6,5±3*

*p < 0,05 stanovena významná odchylka od skupiny ošetřené vehikulem

K tabulce 2: Myši s deficitem apolipoproteinu E na smíšeném základě 12910/B6 (129E^{-/-}) nebo C57Bl/6 (C57E^{-/-}), homozygotní myši s deficitem receptoru nízkohustotního lipoproteinu (LDLR^{-/-}) se 35 dní perorálně ošetřují (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranem) v uvedených dávkách. LDLR^{-/-} myši jsou krmeny západní stravou a všechny ostatní kmeny krmivem.

Po barvení červení Oil red O se vypočítá střední procento plochy léze v 10 μ m řezech aortálního sinu a chlopní. Hodnoty se vyjádří jako střední hodnota $\pm$ standardní odchylka. Pod zkratkou "ND" se rozumí "nestanoveno", pod zkratkou "TPC" "celkový plasmový cholesterol" a pod zkratkou "TG" triglyceridy. Pod pojmem "sinus" se rozumí oblast aortální chlopně, která vystupuje z báze srdce, která začíná u prvního výskytu cípu aortální chlopně rozdělujícího lumen na tři různé oblasti. V sinu je stěna aorty vydutá a nepravidelná. Pod pojmem "chlopeň" se rozumí oblast aortální chlopně, která začíná na místě, kde končí sinus, oblast chlopně začíná v místě, kde už cípy chlopně nerozdělují lumen a stěna aorty je oblejší a zřetelná. Oblast chlopně končí v místě, kde cípy chlopně už nejsou zjevné a stěna je oblá.

T a b u l k a 3

Účinek LTB₄ antagonismu na CD11b v atherosklerotických lézích

Kmen	Velikost léze (μ m)	% CD11b
129E ^{-/-}	188175 $\pm$ 19110	12,6 $\pm$ 1,1
léčené	10650 $\pm$ 12133	3,5 $\pm$ 1,0*
LDLr ^{-/-}	59009 $\pm$ 12734	25,1 $\pm$ 2,0
léčené	19955 $\pm$ 7278	3,5 $\pm$ 2,5*

*Významně odlišné (P<0,01) od kontroly

K tabulce 3: Samičky myši s deficitem apolipoproteinu-E (129E^{-/-}) krmené krmivem a samci myši s deficitem LDL receptoru (LDLr^{-/-}) krmení stravou západního typu se 35 dnů perorálně ošetřují (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluor-methylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranem) (30 mg/kg/den). Data se uvedou jako střední hodnota plochy léze

± standardní odchylka (n = 8/skupina) a střední procento léze pozitivně barvené na CD11b. "CD11b" se definován jako protein, který se nachází uvnitř v buňce, který při kopulaci s jiným buněčným proteinem, CD-18, tvoří MAC-1. MAC-1 je receptor na povrchu monocytů, který se účastní na adhezi.

T a b u l k a 4

Účinek LTB₄ antagonismu na atherosklerotické léze u myší s deficitem MCP-1

N	Pohlaví	Věk (týdny)	Tělní hmotn. (g)	Dávka (mg/kg)	TPC (mg/dl)	TG (mg/dl)	Sinus (% léze)	Chlopek (% léze)
8	M	15	29±1	0	390±20	85±11	7,6±2	5,8±1
7			29±1	30	345±15	82±12	13,3±2	12,8±2
7			29±1	100	354±20	79±15	9,8±1	9,7±1
14	M	30	32±1	0	505±20	45±1	44,1±4	49,6±5
8			31±1	30	565±22	ND	41,4±5	54,2±7
7			26±1	100	576±21	47±2	43,1±5	50,0±4

Nevýznamný rozdíl (p < 0,05) mezi skupinami ošetřovanými vehikulem a sloučeninou

K tabulce 4: myší homozygoti s nulovými allelami monocytařního chemoatraktantního proteinu-1 (MCP-1^{-/-}) a apolipoproteinu E (ApoE^{-/-}) (MCP-1^{-/-} x ApoE^{-/-}) na základě C57bl/ž (C57E^{-/-}) se 35 dní perorálně ošetřují (3S,4R)-7-
-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyranem) v uvedených dávkách 0, 30 nebo 100 mg/kg. Po barvení červení Oil red O se vypočítá střední procento plochy léze v 10µm řezech oblasti aortálního sinu a chlopní. Hodnoty se vyjádří jako střední hodnota ± standardní odchylka. Pod zkratkou "ND" se rozumí "nestanoveno", pod zkratkou "TPC" "celkový plasmový cholesterol" a pod zkratkou

"TG" triglyceridy. Pod pojmem "sinus" se rozumí oblast aortální chlopně, která vystupuje z báze srdce, která začíná u prvního výskytu cípy aortální chlopně rozdělující lumen na tři různé oblasti. V sinu je stěna aorty vydutá a nepravidelná. Pod pojmem "chlopeň" se rozumí oblast aortální chlopně, která začíná na místě, kde končí sinus, oblast chlopně začíná v místě, kde už cípy chlopně nerozdělují lumen a stěna aorty je oblejší a zřetelná. Oblast chlopně končí v místě, kde cípy chlopně už nejsou zjevné a stěna je oblá.

Sloučeniny obecného vzorce I, kterých se používá při způsobech podle vynálezu, je možno syntetizovat způsoby ilustrovanými v následujících preparativních postupech. Pod pojmem "teplota místnosti" se rozumí teplota v rozmezí od asi 20 do asi 25°C.

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 1

(3S,4R)-2-(3-Benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluor-methylbenzoová kyselina

Směs ethylesteru (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny (897 g, 1,93 mol) a 10% vodného hydroxidu sodného (980 ml, 2,72 mol) v isopropylalkoholu (9 litrů) se 6 hodin zahřívá ke zpětnému toku, ochladí na teplotu okolí, 12 hodin míchá a zředí vodou (13,5 litru), hexany (9 litrů) a isopropyletherem (4,5 litru). Vodná vrstva se oddělí a extrahuje hexany (9 litrů) a isopropyletherem (4,5 litru), 2M vodnou kyselinou chlorovodíkovou okyselí na pH 2 a extrahuje ethylacetátem (8 litrů a 4 litry). Spojené ethylacetátové extrakty se promyjí vodou (6 litrů), vysuší síranem hořečnatým a zkoncentrují za sníženého tlaku. Tmavě jantarový olej se zředí toluenem (2 litry) a toluenová směs se znovu zkoncentruje. Olejovitý

zbytek se při 60°C rozpustí v toluenu (4,2 litru) a ke vzniklému roztoku se přidají hexany (8,8 litru) takovou rychlostí, aby se teplota nezvýšila nad 50°C. Reakční směs se pomalu během několika hodin ochladí na teplotu místnosti, přičemž dojde k vyloučení pevné látky. Sraženina se odfiltruje, promyje směsí hexanu a toluenu v poměru 2 : 1 (2 litry) a rozpustí v toluenu (5 litrů) při 60°C. Výsledný roztok se smísí s Darco^(R) G-60. Vzniklá směs se přefiltruje, filtrát se promyje toluenem a zkoncentruje za sníženého tlaku na objem přibližně 4 litrů. Tato směs se zahřeje na 50 až 60°C a po kapkách smísí s hexany (8,6 litru). Hexanová směs se ochladí a nechá granulovat 1 až 2 hodiny při 5°C. Vyloučená pevná látka se odfiltruje, promyje směsí hexanů a toluenu v poměru 2 : 1. Vlhký koláč se 30 minut při teplotě zpětného toku míchá s hexany (4 litry), vzniklá směs se ochladí na teplotu okolí, 1 hodinu nechá granulovat a přefiltruje. Oddělená pevná látka se přes noc vysuší za sníženého tlaku. Získá se 450 g (55 %) (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny ve formě špinavě bílé pevné látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,99 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,66 (dd, J = 1,1, 8,1 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,15 - 7,32 (m, 6H), 6,89 (dd, J = 1,7, 7,9 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 6,1 (bs, 2H), 4,50 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 4,18 (dd, J = 2,7, 11,2 Hz, 1H), 3,94 (dd, J = 4,6, 11,0 Hz, 1H), 2,74 (dd, J = 6,1, 13,8 Hz, 1H), 2,51 (dd, J = 9,4, 13,9 Hz, 1H), 2,22 (m, 1H), IR 3454, 3218 (br), 1699, 1431, 1337, 1299, 1275, 1258, 1191, 1178, 1135, 1123, 700 cm⁻¹, teplota tání 142°C

Výchozí sloučenina v preparativním postupu 1, ethylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny, se připraví následujícím způsobem:

A. (R)-4-Benzyl-3-(3-fenylpropionyl)oxazolidin-2-on

K roztoku (R)-(+)-4-benzyl-2-oxazolidinonu (910 g, 5,14 mol) a 500 mg 2,2'-dipyridylu, jako indikátoru, v tetrahydrofuranu (9 litrů) se při -78°C během 30 minut přidá 2,5M roztok butyllithia v hexanech (2,03 litru, 5,14 mol). Během přidavku se teplota reakční směsi udržuje na méně než -55°C . Reakční směs se ochladí na -75°C a během 5 minut se k ní přidá 3-fenylpropanoylchlorid (950 g, 5,63 mol). Reakční směs se nechá zahřát na 0°C a za účelem posouzení úplnosti reakce se podrobí chromatografii na tenké vrstvě za použití směsi hexanů a ethylacetátu v poměru 2 : 1. Reakční směs se rozloží přidavkem 10% vodného hydrogenuhličitanu sodného (3,6 litru) a vody (3,6 litru). Vodná fáze se oddělí a extrahuje ethylacetátem (3 litry). Spojené organické vrstvy se promyjí 5% vodným uhličitánem sodným (3,6 litru) a nasyceným vodným chloridem sodným (2 litry), vysuší síranem hořečnatým a zkoncentrují za sníženého tlaku na přibližně 2 litry viskosní žluté suspenze. Tato suspenze se rozpustí v ethylacetátu (3 litry) a zkoncentruje. Pevný zbytek se rozpustí v ethylacetátu o teplotě 50°C . K ethylacetátovému roztoku se přidají hexany (10,7 litru). Výsledná směs se pomalu ochladí na 10°C . Vyloučená pevná látka se 30 minut míchá při 10°C , shromáždí filtrací, promyje hexany a vysuší na vzduchu při teplotě okolí. Získá se 1,4 kg (88 %) (R)-4-benzyl-3-(3-fenylpropionyl)oxazolidin-2-onu ve formě světle žlutých jehliček.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,14 - 7,33 (m, 10H), 4,66 (m, 1H), 4,17 (t, $J = 3,4$ Hz, 2H), 3,26 (m, 3H), 3,03 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2,75 (dd, $J = 9,5, 13,4$ Hz, 1H), IR 1787, 1761, 1699, 1390, 1375, 1308, 1208, 1203, 746, 699 cm^{-1} , teplota tání: 102 až 104°C

B. [4R-[3-(2R,3R)]]-4-Benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluor-fenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-on

28.04.03

K roztoku (R)-4-benzyl-3-(3-fenylpropionyl)oxazolidin-2-onu (1064 g, 3,44 mol) v dichlormethanu (5,6 litru) se při -5°C během 20 minut přidá dibutylbortrifluormethan-sulfonát (1133 g, 4,13 mol) a poté triethylamin (719 ml, 5,16 mol). Teplota se během přidavku udržuje pod 5°C . Výsledná směs se ochladí na -70°C a během 30 minut se k ní přidá roztok 4-brom-2-fluorbenzaldehydu (699 g, 3,44 mol) v dichlormethanu (2 litry). Reakční směs se nechá během 1 hodiny zahřát na -10°C a poté se na základě chromatografie na tenké vrstvě za použití směsi hexanů a ethylacetátu v poměru 2 : 1 konstatuje úplnost reakce. Reakční směs se rozloží tak, že se k ní během 30 minut přidá pufr obsahující primární fosforečnan draselný a hydroxid sodný (pH 7, 3,5 litru) a poté za míchání během 1,5 hodiny methanol (1,8 litru) a 35% vodný peroxid vodíku (1,8 litru), přičemž se teplota reakční směsi udržuje pod 15°C . Organická vrstva se oddělí, promyje nasyceným vodným hydrogenuhličitanem sodným (6,7 litru) a zředí bezvodým ethanolem (4 litry) a 25% vodným hydrogensířičitanem sodným. Organická vrstva se oddělí, promyje vodou (4 litry), vysuší síranem hořečnatým a zkoncentruje za sníženého tlaku. Získá se 1818 g (výtěžek 103 % surového produktu) [4R-[3-(2R,3R)]]-4-benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluorfenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-onu ve formě velmi viskosního jantarově zbarveného oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,46 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,16 - 7,32 (m, 10H), 6,94 - 6,96 (m, 2H), 5,35 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,92 - 5,29 (m, 1H), 4,45 - 4,51 (m, 1H), 3,92 (m, 2H), 3,01 - 3,14 (m, 3H), 2,83 (dd, $J = 3,1, 13,6$ Hz, 1H), 2,05 (dd, $J = 10,0, 13,5$ Hz, 1H), IR 3460 (br), 1780, 1696, 1483, 1388, 1350, 1209, 1106, 1068, 877, 760, 747, 701, 583, 512, 485 cm^{-1}

28.04.03

C. [4R-[3(2R,3R)]]-4-Benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluor-fenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-on, 1-methyl-2-pyrrolidonový solvát

K roztoku (R)-4-benzyl-3-(3-fenylpropionyl)oxazolidin-2-onu (12,0 kg, 38,8 mol) v dichlormethanu (180 litru) se při -70 až -80°C během 30 minut přidá chlorid titaničitý (8,8 kg, 46,6 mol). Vzniklá hustá suspenze se míchá dalších 30 minut při -70 až -80°C a během 30 minut se k ní přidá N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (17,6 litru, 116,4 mol). Ke vzniklé tekutější reakční směsi se přidá 1-methyl-2-pyrrolidinon (7,6 kg, 77,6 mol) a reakční směs se 30 minut míchá, přičemž reakční teplota se stále udržuje pod -65°C. K reakční směsi se během 30 minut přidá roztok 4-brom-2-fluorbenzaldehydu (7,9 kg, 38,8 mol) v dichlormethanu (38 litrů), přičemž se teplota reakční směsi udržuje na teplotě nižší nebo rovné -68°C. Reakční směs se během 8 hodin nechá zahřát na 20°C, poté ochladí na 10°C a rozloží roztokem 5,0 kg chloridu amonného v 11 litrech vody, což vyvolá vyloučení bílé sraženiny a zahřátí na 28°C vlivem exotermické reakce. K reakční směsi se přidá celit (12 kg) a výsledná směs se míchá 12 hodin při 20°C, poté přefiltruje a filtrát se za atmosférického tlaku zkoncentruje. Olejovitý zbytek se smísí s hexany (120 litrů), vzniklá směs se zkoncentruje na objem asi 50 litrů, pomalu ochladí na 0°C a 24 hodin nechá granulovat. Surový produkt (24,3 kg) se izoluje filtrací a spojí se surovými produkty ze dvou podobných reakcí ve 110 litrech dichlormethanu. Vzniklá směs se smísí se 320 litry hexanů, zkoncentruje za atmosférického tlaku na konečný objem asi 250 litrů (teplota destilátu 65°C), zaočkuje autentickým produktem a během 18 hodin pomalu ochladí na 20°C a nechá granulovat. Filtrací se izoluje 67,4 kg (93 %) [4R-[3(2R,3R)]]-4-benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluorfenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-onu solvatovaného 1-methyl-2-pyrrolidonem, jako světle zlatohnědá zrnitá pevná látka.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,46 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,15 - 7,29 (m, 10H), 6,94 (dd, $J = 1,9, 7,2$ Hz, 2H), 5,34 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 4,91 - 4,96 (m, 1H), 4,44 - 4,49 (m, 1H), 3,90 - 3,95 (m, 2H), 3,55 (bs, 1H), 3,37 (dd, $J = 7,2, 7,2$ Hz, 2H), 3,00 - 3,13 (m, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,82 (dd, $J = 3,3, 13,3$ Hz, 1H), 2,36 (dd, $J = 8,2, 8,2$ Hz, 2H), 1,97 - 2,06 (m, 3H), IR 3150 (br), 1776, 1695, 1652, 1600, 1221, 1050, 996, 953, 875 cm^{-1} , teplota tání 80 až 83°C

D. (1R,2S)-2-Benzyl-1-(4-brom-2-fluorfenyl)propan-1,3-diol

2M roztok tetrahydroboritanu lithného v tetrahydrofuranu (1,7 litru, 3,4 mol) se zředí tetrahydrofuranem (1,7 litru) a výsledná směs se během 15 minut opatrně smísí s vodou (61 ml, 3,4 mol). Vzniklá směs se míchá při teplotě okolí, dokud neustane vývoj vodíku (0,5 až 1 hodinu) a poté při 0°C během 30 minut přidá k roztoku [4R-[3-(2R,3R)]-4-benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluorfenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-onu (1,75 kg, 3,4 mol) v tetrahydrofuranu (8,75 litru). Výsledná mléčně bílá suspenze se během 12 hodin nechá zahřát na teplotu okolí a úplnost reakce se potvrdí na základě chromatografie na tenké vrstvě za použití směsi hexanů a ethylacetátu v poměru 2 : 1. Reakční směs se ochladí na 15°C a během 15 minut rozloží vodou (5,25 litru). Vodná směs se míchá dalších 10 minut a během 20 minut se k ní přidá 35% vodný peroxid vodíku (2,6 litru). Reakční směs se 15 minut míchá a poté zředí ethylacetátem (5,3 litru) a vodou (4 litry). Organická vrstva se oddělí a promyje vodou (5,3 litru), 5% vodným hydrogensířičitanem sodným (5,25 litru) a 50% nasyceným vodným chloridem sodným (7,5 litru). V organické vrstvě se zjistí přítomnost peroxidu vodíku, a proto se dále promyje 5% vodným hydrogensířičitanem sodným (5 litrů) a 50% nasyceným vodným chloridem sodným (6 litrů). Organická vrstva se zkoncentruje za sníženého tlaku. Olejovitý zbytek se zředí ethylacetátem (4 litry) a hexany

28.04.03

(13 litrů). Výsledná směs se promyje 1M vodnou kyselinou chlorovodíkovou (6 x 17 litrů), aby se odstranil (R)-(+)-4-benzyl-2-oxazolidinon. Organická vrstva se promyje nasyceným vodným hydrogensířičitanem sodným (5,3 litru), zředí toluenem (2 litry) a zkoncentruje za sníženého tlaku. Získá se 1138 g (98 %) (1R,2S)-2-benzyl-1-(4-brom-2-fluorfenyl)propan-1,3-diolu ve formě oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,47 - 7,51 (m, 1H), 7,33 (dd, J = 1,9, 8,3 Hz, 1H), 7,15 - 7,25 (m, 4H), 7,04 - 7,06 (m, 2H), 5,39 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 3,77 (dd, J = 3,0, 10,7 Hz, 1H), 3,64 (dd, J = 5,0, 10,8 Hz, 1H), 3,44 (bs, 1H), 2,68 (dd, J = 11,0, 13,8 Hz, 1H), 2,59 (dd, J = 4,1, 13,9 Hz, 1H), 2,15 - 2,20 (m, 1H), 2,01 (bs, 1H), IR 3370 (br), 3269 (br), 1485, 1406, 1213, 1033, 1021, 870, 700 cm^{-1}

El. (3S,4R)-3-Benzyl-7-brombenzopyran-4-ol

1M roztok bis(trimethylsilyl)amidu sodného v tetrahydrofuranu (6,55 litru, 6,55 mol) se během 20 minut při teplotě okolí přidá k roztoku (1R,2S)-2-benzyl-1-(4-brom-2-fluorfenyl)propan-1,3-diolu (1975 g, 5,82 mol) v dimethylsulfoxidu (9,88 litru). Výsledná směs se za sníženého tlaku (pod vývěvou) pomalu zahřeje na 60°C, aby se ní odstranil tetrahydrofuran. Reakční směs se poté 5 hodiny za sníženého tlaku (pod vývěvou) zahřívá na 60 až 65°C a poté se potvrdí úplnost reakce na základě chromatografie na tenké vrstvě za použití směsi hexanů a ethylacetátu v poměru 2 : 1, jako elučního činidla. Reakční směs se ochladí na teplotu okolí a rozloží přidavkem vody (10 litr) a poté 1M vodné kyseliny chlorovodíkové (10 litrů). Výsledná zlatohnědá suspenze se přefiltruje, promyje vodou (2 litry) a rozpustí v ethylacetátu (12 litrů). Ethylacetátový roztok se promyje vodou (2 x 12 litrů), zkoncentruje na malý objem a rozpustí v isopropyletheru (4 litry). Etherový roztok se za atmosférického tlaku při 50 až 60°C zkoncentruje na objem 1,0 litru, kdy se

začne srážet pevná látka. Vzniklá suspenze se ochladí na teplotu okolí, 12 hodin míchá, zkoncentruje na poloviční objem, ochladí na 0 až 5°C a přefiltruje. Získá se 916 g (49 %) (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu ve formě bílé pevné látky. Filtrát se zkoncentruje na tmavý olej (906 g) a rozpustí v refluxujícím isopropyletheru (1,5 litru). Výsledný roztok se ochladí na teplotu okolí, míchá a přefiltruje. Získá se dalších 82 g pevné látky. Filtrát se zkoncentruje a zbytek se chromatografuje na silikagelu (63 až 250 μm) za použití směsi hexanů a ethylacetátu v poměru 3 : 1, jako elučního činidla, čímž se získá dalších 82 g pevné látky. Celkový výtěžek (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu je 1080 g (58 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 - 7,33 (m, 2H), 7,21 - 7,25 (m, 1H), 7,15 - 7,19 (m, 3H), 7,06 - 7,09 (m, 2H), 4,44 (bs, 1H), 4,21 (dd, $J = 2,6, 11,3$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J = 4,5, 11,3$ Hz, 1H), 2,68 (dd, $J = 6,5, 13,8$ Hz, 1H), 2,51 (dd, $J = 9,1, 13,8$ Hz, 1H), 2,18 - 2,23 (m, 1H), 1,85 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), IR 3274 (br), 3181 (br), 1598, 1573, 1493, 1480, 1410, 1219, 1070, 1052, 1023, 859, 700 cm^{-1} , teplota tání 143,5 až 144,0°C

E2. (3S,4R)-3-Benzyl-7-brombenzopyran-4-ol

Alternativně je výše uvedenou sloučeninu možno připravit následujícím způsobem:

K roztoku (1R,2S)-2-benzyl-1-(4-brom-2-fluorfenyl)-propan-1,3-diolu (připraveného ze 33,5 kg (54,8 mmol) [4R-[3(2R,3R)]]-4-benzyl-3-[2-benzyl-3-(4-brom-2-fluorfenyl)-3-hydroxypropionyl]oxazolidin-2-onu solvatovaného 2-methyl-2-pyrrolidonem bez izolace) ve 185 litrech tetrahydrofuranu se přidá 12,9 kg (115 mol) terc.butoxidu draselného. Reakční směs se 4 hodiny zahřívá ke zpětnému toku a poté se chromatografii na tenké vrstvě za použití směsi hexanů a ethylace-

28.04.03

tátu v poměru 3 : 1, jako elučního činidla, zjistí, že reakce je dokončena. Reakční směs se ochladí na teplotu okolí a rozloží 170 litry vody. Vodná směs se zředí 83 litry ethylacetátu a 7,5 litry koncentrované kyseliny chlorovodíkové okyselí na pH 5,3 (vodná vrstva). Organická vrstva se zkoncentruje za sníženého tlaku na přibližně 38 litrů. Vzniklá suspenze se zředí 76 litry isopropyletheru, výsledná směs se zahřívá, aby se rozpustila pevná látka, poté pomalu ochladí na 0°C a nechá granulovat 12 hodin při 0°C. Filtrací se izoluje 5,1 (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu ve formě bílé pevné látky. Matečný louh se promyje 4 litry nasyceného vodného chloridu sodného, zkoncentruje na konečný objem 57 litrů a nechá granulovat 12 hodin při 0°C. Získá se druhá frakce (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu (4,3 kg).

Druhá stejná reakční směs se rozloží, zředí ethylacetátem a okyselí výše popsáním způsobem. Organická vrstva se vysuší 10 kg síranu sodného a zkoncentruje za atmosférického tlaku na přibližně 30 litrů. Výsledná suspenze se zředí 38 litry isopropyletheru, isopropyletherová směs se zkoncentruje na přibližně 57 litrů, pomalu ochladí a nechá 12 hodin granulovat při 0 až 10°C. Filtrací se izoluje (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-ol (8,7 kg). Matečný louh se spojí s matečným louhem druhé frakce z první reakce a zkoncentruje. Olejovitý zbytek se ochladí a ztuhlý produkt se v 6 litrech isopropyletheru nechá granulovat 12 hodin při 20°C a 2 hodiny při 0°C. Po filtraci a promytí chladným isopropyletherem se získá 6,3 kg (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-7-olu. Spojené frakce z obou reakcí se vysuší, čímž se získá 20,8 kg (59 %) (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu.

F. (3S,4R)-(3-Benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)boronová kyselina

K roztoku (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu (377 g, 1,18 mol) v tetrahydrofuranu (5,6 litru) se při -75°C během 45 minut přidá 1,48M roztok methyllithia v etheru (1,6 litru, 2,37 mol). Teplota se během přidavku udržuje pod -65°C. Ke vzniklé směsi se během 15 minut přidá 2,5M roztok butyllithia v hexanech (440 ml, 1,3 mol). Reakční směs se míchá při teplotě méně než -65°C po dobu 1 hodiny, načež se k ní během 30 minut přidá 1,0M roztok boran-tetrahydrofuranového komplexu v tetrahydrofuranu (5,9 litru, 5,9 mol). Reakční směs se zahřeje na 0°C a rozloží přidavkem vody (4,4 litru). Vodná směs se 1M vodnou kyselinou chlorovodíkovou (4 litry) okyselí na pH 2 a extrahuje isopropyletherem (4 litry). Vodná vrstva se extrahuje isopropyletherem (4 litry). Spojené organické vrstvy se promyjí 0,5M vodným hydroxidem sodným (7,2 litru). Vodná vrstva se 1M vodnou kyselinou chlorovodíkovou (5,5 litru) okyselí na pH 3 a extrahuje ethylacetátem (5,4 litru a 2,7 litru). Spojené ethylacetátové vrstvy se vysuší síranem hořečnatým a zkoncentrují za sníženého tlaku. Získá se 304,5 g (91 %) (3S,4R)-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)boronové kyseliny ve formě žluté pěny.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,35 - 7,00 (m, 8H), 4,42 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,19 (d, $J = 11$ Hz, 1H), 3,90 (m, 1H), 2,65 (dd, $J = 6,2, 13,8$ Hz, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), IR 3330 (br), 1413, 1348, 1320, 1211, 1025, 749, 730, 700 cm^{-1}

G. Ethylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny

Směs ethyl-2-jod-4-trifluormethylbenzoátu (723 g, 2,1 mol), (3S,4R)-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)boronové kyseliny (627 g, 2,2 mol), fluoridu draselného (366 g, 6,3 mol), 10% palladia na uhlíku (157 g, 50% vodné vlhkosti) a bezvodého ethanolu (6,27 litru) se 3 hodiny zahřívá ke

zpětnému toku. Poté chromatografie na tenké vrstvě za použití směsi toluenu a kyseliny octové v poměru 5 : 1, jako elučního činidla, ukáže, že reakce je úplná. Reakční směs se zředí isopropyletherem (8 litrů), přefiltruje přes celit a filtrát se promyje 10% vodným hydrogenuhlíčanem sodným (1,5 litru). Vodná vrstva se oddělí a extrahuje isopropyletherem (3 litry). Spojené organické vrstvy se promyjí vodou (6 litrů), vysuší síranem hořečnatým a při teplotě místnosti smísí s Darco^(R) G-60 (1,0 kg) a silikagelem (1 kg, 63 až 212 μ m). Výsledná směs se přefiltruje přes vrstvu silikagelu (63 až 212 μ m) a filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku na tmavý olejovitý zbytek (922 g). Tento olej se zředí ethylacetátem (1 litr) a ethylacetátový směs se nechá projít přes sloupec silikagelu (2 kg) za použití ethylacetátu, jako elučního činidla. Výsledný světle jantarový roztok se zkoncentruje, čímž se získá 897 g (92 %) ethylesteru (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny ve formě světle jantarového oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,89 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,63 - 7,67 (m, 2H), 7,18 - 7,38 (m, 6H), 6,91 (dd, J = 1,8, 7,8 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 4,55 (bs, 1H), 4,25 (dd, J = 2,7, 11,2 Hz, 1H), 4,17 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 4,00 (ddd, J = 1,0, 4,5, 11,2 Hz, 1H), 2,75 (dd, J = 6,4, 13,9 Hz, 1H), 2,56 (dd, J = 9,3, 13,8 Hz, 1H), 2,26 (m, 1H), 1,93 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 1,09 (t, J = 7,2 Hz, 3H), IR 3307 (br), 3216 (br), 1734, 1339, 1298, 1247, 1191, 1175, 118, 1097, 1050 cm⁻¹.

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 2

(3S,4R)-2-(3-Benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoová kyselina

2,2-Dimethylpropylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny

(2,34 g, 4,69 mmol) (2,34 g, 4,69 mmol) v isopropylalkoholu (23 ml) se smísí s 10% vodným hydroxidem sodným (2,3 ml, 6,4 mmol). Reakční směs se 3 hodiny zahřívá ke zpětnému toku, ochladí na teplotu okolí a nalije do vody (34 ml). Vodná směs se extrahuje hexany (23 ml) a isopropyletherem (13 ml). Vodná vrstva se oddělí a extrahuje hexany (23 ml) a isopropyletherem (13 ml), pH se 6M vodnou kyselinou chlorovodíkovou nastaví na 2 a extrahuje se ethylacetátem (2 x 40 ml). Spojené ethylacetátové extrakty se promyjí vodným roztokem chloridu sodného (40 ml), vysuší síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje na bílou pěnu, která se překrystaluje ze směsi toluenu a hexanů. Vzniklá pevná látka se odfiltruje a promyje hexany. Vlhký koláč se 1 hodinu míchá s hexany (20 ml), výsledná směs se přefiltruje a oddělená pevná látka se vysuší za vakua. Získá se 1,01 g (50% výtěžek) (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny ve formě bílé pevné látky.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,00 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,18 - 7,36 (m, 6H), 6,91 (dd, $J = 7,9, 1,7$ Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,53 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 4,24 (dd, $J = 11,2, 2,7$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J = 11,0, 4,0$ Hz, 1H), 2,76 (dd, $J = 13,9, 6,4$ Hz, 1H), 2,53 (dd, $J = 13,7, 9,3$ Hz, 1H), 2,24 - 2,26 (m, 1H)

2,2-Dimethylpropylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny, který je výchozí sloučeninou při preparativním postupu 2, se připraví následujícím způsobem.

A. 2,2-Dimethylpropylester 4-trifluormethylbenzoové kyseliny

K suspenzi 4-trifluormethylbenzoové kyseliny (75,0 g, 394 mmol) a 2,2-dimethylpropylalkoholu (70,5 g, 800 mmol) v toluenu (500 ml) se přidá koncentrovaná kyselina sírová

(3,0 ml). Výsledná směs se 4 hodiny míchá při teplotě zpětného toku, ochladí na teplotu místnosti a nalije do nasyceného vodného uhličitanu sodného (250 ml) a oddělí se vrstvy. Organická vrstva se promyje nasyceným vodným uhličitanem sodným (250 ml) a vodným chloridem sodným (100 ml) a zkoncentruje. Získá se 2,2-dimethylpropylester 4-trifluormethylbenzoové kyseliny (102 g, 99% výtěžek) ve formě žluté kapaliny.

R_f : 0,66 (ethylacetát/hexany), IR 2932, 1727, 1327, 1280, 1133, 1066, 862, 775, 704 cm^{-1} , ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 4,04 (s, 2H), 1,04 (s, 9; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 26,51, 31,61, 74,72, 134,63 (q, $J = 272,7$ Hz), 125,4, 129,9, 133,7, 134,35 (q, $J = 31,7$ Hz), 165,35

B. 2-(2,2-Dimethylpropoxykarbonyl)-5-trifluormethylbenzenboronová kyselina

K roztoku 2,2-dimethylpropylesteru 4-trifluormethylbenzoové kyseliny (4,225 g, 16,23 mmol) v tetrahydrofuranu (40 ml) se přidá triisopropylborát (9,00 ml, 39,0 mmol). Výsledný roztok se ochladí na -78°C a během 5 minut se k němu přikape diisopropylamid lithný (12,0 ml 2,0M roztoku v tetrahydrofuranu/heptanu, 24,0 mmol). Vzniklý červený roztok se 30 minut míchá, zahřeje na 0°C a rozloží pomalým přidávkem 1M kyseliny chlorovodíkové (50 ml). Reakční směs se nechá zahřát na teplotu místnosti, 30 minut míchá a přidá k hexanům (200 ml). Vrstvy se oddělí a organická vrstva se promyje postupně 2M kyselinou chlorovodíkovou (2 x 100 ml), vodou (100 ml) a vodným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organické extrakty se vysuší síranem hořečnatým, přefiltrují a zkoncentrují na olejovitý zbytek. Surový produkt se nechá vykrytalovat z heptanu (40 ml), čímž se získá 2-(2,2-dimethylpropoxykarbonyl)-5-trifluormethylbenzenboronová kyselina (3,037 g, 62% výtěžek) ve

28.04.03

formě bílé pevné látky.

Teplota tání 159 až 160°C, IR 3377 (br), 2963, 1703, 1371, 1308, 1171, 1131, 794, 709 cm^{-1} , ^1H NMR (400 MHz, DMSO/ D_2O): δ 8,05 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 3,94 (s, 2H), 0,95 (s, 9H), ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 26,69, 31,69, 74,91, 125,29, 125,75, 128,30, 129,62, 131,98 (q, J = 31,8 Hz), 136,28, 142,68, 166,90

C. 2,2-Dimethylpropylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxychroman-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny

Dvojfázový roztok 2-(2,2-dimethylpropoxykarbonyl)-5-trifluormethylbenzenboronové kyseliny (1,72 g, 5,66 mmol), (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-olu (1,80 g, 5,63 mmol), uhličitanu sodného (1,82 g, 17,2 mmol) a tetrakis-(trifenylfosfin)palladia(0) (12 mg, 0,19 mol%) v toluenu (15 ml) a vodě (9 ml) se 100 minut míchá při teplotě zpětného toku, ochladí na teplotu místnosti a nalije do vody (40 ml). Vodná směs se extrahuje diisopropyletherem (75 ml). Organické extrakty se promyjí vodným roztokem chloridu sodného (50 ml), smísí s Darco^(R) G-60, vysuší síranem hřečnatým, prefiltrují přes Celit^(R) a zkoncentrují. Surový produkt se přečistí chromatografií na silikagelu za použití směsi ethylacetátu a hexanů v poměru 20 : 80, jako elučního činidla. Získá se 2,2-dimethylpropylester (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoové kyseliny ve formě bílé pěny (2,35 g, 84% výtěžek).

R_f : 0,32 (ethylacetát/hexany, 25/75), IR 3407 (br), 2961, 1721, 1336, 1292, 1252, 1172, 1134, 1110, 1022, 848, 749 cm^{-1} , ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,90 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,19 - 7,37 (m, 6H), 6,88 - 6,93 (m, 2H), 4,53 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,22 (dd, J = 11,2, 2,5 Hz, 1H), 3,99 (dd, J = 11,2, 3,3 Hz, 1H), 3,78 (s, 2H), 2,73 (dd, J = 13,8, 6,3 Hz, 1H), 2,54 (dd, J = 13,6, 9,4 Hz, 1H), 2,20 - 2,80 (m, 1H), 1,81 (d,

$J = 5,2 \text{ Hz}$, 1H), $0,74 \text{ (s, 9H)}$, ^{13}C NMR (100 MHz , CDCl_3): δ 26,64, 30,96, 34,62, 41,53, 64,76, 67,42, 75,33, 116,77, 121,07, 122,97, 124,13, 126,44, 127,50, 127,54, 128,45, 128,60, 128,92, 129,11, 130,25, 130,31, 139,08, 141,69, 142,03, 154,44, 168,14

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 3

(3S,4R)-2-(3-Benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoová kyselina

Směs (3S,4R)-dicyklohexylamonium-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoátu (2,37 g, 3,89 mmol) v ethylacetátu (25 ml) a 2M kyselině chlorovodíkové (25 ml) se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Reakční směs se naliže do ethylacetátu (20 ml) a vodná vrstva se odstraní. Organická vrstva se promyje vodou (6 x 50 ml), vysuší sírnem hořečnatým, přefiltruje a filtrát se zkoncentruje. Získá se (3S,4R)-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoová kyselina (1,66 g, 100% výtěžek).

^1H NMR (400 MHz , CDCl_3): δ 8,00 (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), 7,67 (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,18 - 7,36 (m, 6H), 6,91 (dd, $J = 7,9, 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 6,86 (d, $J = 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 4,53 (d, $J = 4,2 \text{ Hz}$, 1H), 4,24 (dd, $J = 11,2, 2,7 \text{ Hz}$, 1H), 3,97 (dd, $J = 11,0, 4,0 \text{ Hz}$, 1H), 2,76 (dd, $J = 13,9, 6,4 \text{ Hz}$, 1H), 2,53 (dd, $J = 13,7, 9,3 \text{ Hz}$, 1H), 2,24 - 2,26 (m, 1H)

(3S,4R)-Dicyklohexylamonium-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoát, který je výchozí látkou v preparativním postupu 3, se připraví následujícím způsobem:

A. 2,2-Dimethylpropylester 2-[1,3,6,2]dioxazaborokan-2-yl-4-trifluormethylbenzoové kyseliny

K roztoku 2,2-dimethylpropylesteru 4-trifluor-methylbenzoové kyseliny (35,8 g, 138 mmol) v tetrahydrofuranu (250 ml) se přidá triisopropylborát (73,0 ml, 316 mmol). Vzniklý roztok se ochladí na 0°C a během 20 minut při 0°C se k němu přidá diisopropylamid lithný (73,0 ml 2,0M roztoku v tetrahydrofuranu/heptanu, 146,0 mmol). Výsledný červený roztok se míchá dalších 30 minut a přidají se k němu hexany (200 ml) a poté 1M kyselina chlorovodíková (200 ml). Reakční směs se míchá 10 minut a nalije do hexanů (200 ml). Organická vrstva se promyje 1M kyselinou chlorovodíkovou (2 x 150 ml) a vodným roztokem chloridu sodného (100 ml). Organické extrakty se vysuší síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje na objem asi 200 ml a přidá se k němu isopropylalkohol (100 ml) a diethanolamin (15,95 g, 151,7 mmol). Výsledná směs se míchá 10 hodin při teplotě místnosti. Pevná látka se odfiltruje a promyje směsí isopropylalkoholu (15 ml) a hexany (30 ml). Získá se 2,2-dimethylpropylester 2-[1,3,6,2]dioxazaborokan-2-yl-4-trifluor-methylbenzoové kyseliny (37,83 g, výtěžek 74 %) ve formě bílé pevné látky.

Teplota tání 233 až 234°C. IR 3077, 2963, 2862, 1722, 1480, 1467, 1371, 1331, 1298, 1290, 1274, 1254, 1161, 1117, 1108, 1087, 1074, 995, 952, 862 cm⁻¹, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,23 (s, 1H), 7,72 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,52 (dd, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,33 (brs, 1H), 4,08 - 4,14 (m, 2H), 3,98 (s, 2H), 3,93 - 3,98 (m, 2H), 3,42 - 3,50 (m, 2H), 2,88 - 2,94 (m, 2H), 1,02 (s, 9H), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 26,51, 31,69, 50,92, 63,33, 74,72, 123,94, 128,59, 132,06, 139,61, 171,56

P ř í k l a d 1 5

B. (3S,4R)-Dicyklohexylamonium-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoát

Směs 2,2-dimethylpropylesteru 2-[1,3,6,2]dioxaza-borokan-2-yl-4-trifluormethylbenzoové kyseliny (7,04 g, 18,9 mmol) v toluenu (45 ml) a 1,5M kyseliny chlorovodíkové (45 ml) se 45 minut míchá při teplotě místnosti. Vodná vrstva se odstraní a přidá se uhličitanem sodný (2,73 g, 25,8 mmol), (3S,4R)-3-benzyl-7-brombenzopyran-4-ol (5,47 g, 17,1 mmol), tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0) (24,0 mg, 20,8 μ mol) a voda (20 ml). Dvoufázový roztok se 100 minut míchá při teplotě zpětného toku, ochladí na teplotu místnosti a nalije do vody (50 ml). Vrstvy se oddělí a organická vrstva se smísí s Darco^(R) G-60, vzniklá směs se přefiltruje a filtrát se zkoncentruje. Surový ester se rozpustí v isopropylalkoholu (80 ml) a k výslednému roztoku se přidá 10% vodný hydroxid sodný (8,0 ml). Vzniklý roztok se 3 hodiny zahřívá ke zpětnému toku, ochladí na teplotu místnosti a nalije do vody (120 ml). Vodná směs se extrahuje hexany (80 ml) a isopropyletherem (40 ml). Vodná vrstva se promyje hexany (80 ml) a isopropyletherem (40 ml), 6M kyselinou chlorovodíkovou okyselí na pH 2 a extrahuje methylterc.butyletherem (2 x 75 ml). Organické extrakty se vysuší síranem hořečnatým, přefiltrují a filtrát se zkoncentruje. Surový produkt se rozpustí v methylterc.butyletheru (40 ml) a k etherovému roztoku se přidá dicyklohexylamin (4,10 ml, 20,6 mmol) a výsledná směs se přes noc míchá. Pevná látka se odfiltruje a promyje methylterc.butyletherem (20 ml). Získá se (3S,4R)-dicyklohexylamonium-2-(3-benzyl-4-hydroxybenzopyran-7-yl)-4-trifluormethylbenzoát (7,32 g, 70% výtěžek).

Teplota tání 209 až 210°C, IR 3307, 3025, 2939, 2858, 1626, 1564, 1429, 1398, 1388, 1333, 1168, 1119, 903, 875, 846, 838 cm^{-1} , ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,62 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,52 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,17 - 7,31 (m, 6H), 7,08 (dd, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 4,48 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,17 (dd, J = 11,0, 2,6 Hz, 1H), 3,90 (dd, J = 11,0, 5,0 Hz, 1H), 2,74 - 2,79 (m, 3H), 2,50 (dd, J = 13,8, 9,4 Hz, 1H), 1,80 - 1,82 (m, 4H), 2,20

(brs, 1H), 1,68 - 1,70 (m, 4H), 1,56 (d, $J = 12,2$ Hz, 2H), 1,00 - 1,26 (m, 10H), ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 24,70, 2473, 25,03, 28,94, 29,09, 34,75, 41,75, 52,64, 65,00, 67,57, 116,50, 121,42, 122,59, 123,77, 126,38, 126,73, 128,03, 128,55, 129,06, 129,45, 138,95, 139,16, 142,51, 144,20, 154,04, 173,85

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 4

3S,4R-7-(3-Karboxyfenyl)-4-hydroxy-3-fenylmethyl-2H-1-benzopyran

Zmýdelnění: K míchanému roztoku méně polárního 4R,3S-N- α -terc-butoxykarbonyl-L-tryptofan-7-[(3-methoxykarbonylphenyl)-3-methylphenyl]benzopyran-4-ylesteru (840 mg, 1,08 mmol) v 10 ml methanolu se přidá 10 ml 2M roztoku hydroxidu sodného. Výsledná směs se 8 hodin zahřívá ke zpětnému toku, ochladí a 1M kyselinou chlorovodíkovou okyselí na pH 4. Kalná emulze se extrahuje 3 x 20 ml ethylacetátu. Spojené organické frakce se promyjí vodným roztokem chloridu sodného, vysuší síranem hořečnatým a přefiltrují. Z filtrátu se za sníženého tlaku odstraní rozpouštědlo. Získá se žlutá pěna. Chromatografií na silikagelu za použití směsi ethylacetátu, hexanu a kyseliny octové v poměru 35 : 75 : 1 se získá 210 mg produktu. ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): 8,22 (1H, t, 1,7 Hz), 7,97 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,87 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,55 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,42 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,15 - 7,36 (6H, m), 7,10 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 4,44 (1H, d, $J = 4,9$ Hz), 4,19 (1H, dd, $J = 9,1, 2,5$ Hz), 3,97 (1H, dd, $J = 9,1, 5,4$ Hz), 2,72 (1H, dd, $J = 13,7, 6,2$ Hz), 2,51 (1H, dd, $J = 13,7, 9,1$ Hz), 2,04 - 2,20 (3H, m). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +11,1$ při $c = 1,00$ v methanolu. Teplota tání 210 až 212°C. Zmýdelněním polárnějšího 3R,4S-tryptofan-esteru (700 mg) za výše popsaných podmínek se získá 3R,4S enantiomer. ^1H NMR (300

MHz, CD_3CN): 8,22 (1H, t, $J = 1,7$ Hz), 7,97 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,87 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,55 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,42 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,15 - 7,16 (6H, m), 7,10 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 4,44 (1H, d, $J = 4,9$ Hz), 4,19 (1H, dd, $J = 9,1, 2,5$ Hz), 3,97 (1H, dd, $J = 9,1, 5,4$ Hz), 2,72 (1H, dd, $J = 13,7, 6,2$ Hz), 2,51 (1H, dd, $J = 13,7, 9,1$ Hz), 2,04 - 2,20 (3H, m). $[\alpha]_D^{25} = -11,0$ při $c = 1,01$ v methanolu. Teplota tání 209 až 211°C.

Trans-3-fenylmethyl-4-hydroxy-7-(3-karboxyfenyl)-2H-1-benzopyran

Zmýdlením výše uvedeného trans isomeru na kruhu za výše popsanych podmínek se získá odpovídající kyselina. ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): 8,22 (1H, t, 1,7 Hz), 7,97 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,87 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,55 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,42 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,15 - 7,36 (6H, m), 7,10 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 4,44 (1H, d, $J = 4,9$ Hz), 4,19 (1H, dd, $J = 9,1, 2,5$ Hz), 3,97 (1H, dd, $J = 9,1, 5,4$ Hz), 2,72 (1H, dd, $J = 13,7, 6,2$ Hz), 2,51 (1H, dd, $J = 13,7, 9,1$ Hz), 2,04 - 2,20 (3H, m). Teplota tání 210 až 212°C.

N- α -terc-Butoxykarbonyl-L-tryptofan-7-[(3-methoxykarbonylfenyl)-3-fenylmethyl]benzopyran-4-yl]ester, který je výchozí látkou v preparativním postupu 4, se připraví následujícím způsobem:

A. 2,4-Dihydroxy-3-chlorpropiofenon

K míchané směsi resorcinolu (200 g, 1,82 mmol) a 3-chlorpropionové kyseliny (200 g, 1,84 mmol) se najednou přidá trifluormethansulfonová kyselina (1 kg). Vzniklý roztok se pomalu během asi 45 minut zahřeje na asi 80°C, během asi 15 minut ochladí na teplotu místnosti a nalije do chloroformu (4,0 litru). Organická vrstva se pomalu nalije

do vody (4,0 litru) a oddělí se vrstvy. Vodná vrstva se extrahuje chloroformem (2 x 2,0 litru). Spojené organické vrstvy se promyjí vodným roztokem chloridu sodného, vysuší síranem sodným a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku. Získá se oranžová polopevná látka (244,1 g), které se použije v následujícím stupni v surovém stavu. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 12,56 (1H, s), 7,63 (1H, d, $J = 7,6$), 6,37 - 6,46 (2H, m), 3,92 (2H, t, $J = 6,3$), 3,41 (2H, t, $J = 6,3$)

B. 7-Hydroxybenzopyran-4-on

K chlazenému (asi 5°C) roztoku 2M hydroxidu sodného (10,0 litru) se v jedné dávce přidá sloučenina ze stupně A (244,1 g). Výsledný roztok se v lázni teplé vody během asi 2 hodin zahřeje na teplotu místnosti, znovu ochladí asi na 5°C a jeho pH se 6M kyselinou sírovou (1,2 litru) nastaví na 2. Okyselená směs se extrahuje 3 x 3,0 litru ethylacetátu, promyje vodným roztokem chloridu sodného (1 x 2,0 litru), vysuší síranem sodným a přefiltruje. Filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku. Zlatohnědý zbytek se trituruje s hexany a vzniklá suspenze se přefiltruje. Získá se 173,7 g (výtěžek 58 %) sloučeniny uvedené v nadpisu o teplotě tání 136 až 137°C.

C. 7-[(Trifluormethylsulfonyl)oxy]benzopyran-4-on

K míchanému roztoku 7-hydroxybenzopyran-4-onu (173,7 g, 1,05 mol) v methylenchloridu (3,0 litru) se při asi -78°C přidá triethylamin (320 g, 3,16 mol) a dimethylaminopyridin (2,5 g). Po úplném rozpuštění se ke vzniklému roztoku během asi 20 minut přikape anhydrid trifluormethansulfonové kyseliny (327 g, 1,16 mol). Vzniklá směs se míchá asi 30 minut při asi -78°C, během asi 2 hodiny zahřeje na teplotu místnosti a nalije do nasyceného roztoku chloridu amonného

(2,5 litru). Vrstvy se oddělí a vodná vrstva se extrahuje 2 x 2,0 litru methylenchloridu. Spojené organické frakce se promyjí vodou (1 x 1,0 litru), vysuší síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku. Červený olejovitý zbytek se chromatografuje na silikagelu (1 kg) za použití směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 8 : 1, jako elučního činidla. Po odpaření rozpouštědla se získá 211,1 g (výtěžek 69 %) sloučeniny uvedené v nadpisu o teplotě tání 43 až 44°C.

D. 7-[(Trifluormethylsulfonyl)oxy]-3-fenylmethylenbenzopyran-4-on

K míchanému roztoku 7-[(trifluormethylsulfonyl)oxy]-benzopyran-4-onu (27 g, 91,2 mmol) ve 183 ml methanolu se přidá benzaldehyd (11,1 ml, 109 mmol) a poté pyrrolidin (9,1 ml, 109 mmol). Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti, ochladí na asi 0°C a přefiltruje. Oddělená pevná látka se promyje jednou 50 ml ledově chladného methanolu a vysuší za vakua. Získá se 35,2 g (výtěžek 75 %) sloučeniny uvedené v nadpisu o teplotě tání 133 až 135°C.
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8,11 (1H, d, J = 8,7,), 7,91 (1H, brs), 7,40 - 7,51 (2H, m), 7,24 - 7,38 (3H, m), 6,97 (1H, dd, J = 8,7, 2,4), 6,91 (1H, d, J = 2,4), 5,40 (1H, brs)

E. 7-[(Trifluormethylsulfonyl)oxy]-3-fenylmethylbenzopyran-4-on

K roztoku 7-[(trifluormethylsulfonyl)oxy]-3-fenylmethylenbenzopyran-4-onu (26,6 g, 69,2 mmol) ve 250 ml ethylacetátu v 500ml Parrově třepané nádobě se přidá 10% palladium na uhlíku (1,3 g). Reakční směs se hydrogenuje za tlaku 274,8 kPa po dobu asi 3 hodin, až do skončení absorpce vodíku, přefiltruje přes celit, čímž se odstraní palladiový katalyzátor a chromatografuje na silikagelu za použití směsi

hexanu a etheru, jako elučního činidla. Získá se 25,1 g (vý-
těžek 94 %) sloučeniny uvedené v nadpisu o teplotě tání 56
až 58°C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,01 (1H, d, $J = 8,5$),
7,20 - 7,35 (5H, m), 6,81 - 6,96 (2H, m), 4,42 (1H, dd,
 $J = 11,6, 4,4$), 4,22 (1H, dd, $J = 11,6, 8,7$), 3,26 (1H, dd,
 $J = 14,0, 4,4$), 2,90 - 3,05 (1H, m), 2,70 (1H, dd, $J =$
14,0, 8,7)

F. 7-(Trimethylstannyl)-3-fenylmethylbenzopyran-4-on

K míchanému roztoku 7-[(trifluormethylsulfonyl)-
oxy]-3-fenylmethylbenzopyran-4-onu (9,20 g, 25,0 mmol) ve
200 ml dioxanu se přidá chlorid lithný (3,20, 75,0 mmol),
 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)$ (1,15 g, 1,0 mmol), butylovaný hydroxytoluen (3
krystaly) a hexamethyldicín (9,0 g, 27,5 mmol). Výsledná
směs se 1,5 hodiny zahřívá ke zpětnému toku, ochladí na
teplotu místnosti a nalije do 150 ml nasyceného vodného
roztoku chloridu amonného. Vzniklá směs se extrahuje 3 x 150
ml diethyletheru. Spojené organické frakce se promyjí vodným
roztokem chloridu sodného, vysuší síranem sodným,
přefiltrují a filtrát se odpaří za sníženého tlaku. Žlutý
polopevný zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití
směsi hexanu a etheru v poměru 5 : 1. Získá se 8,90 g
(výtěžek 89 %) sloučeniny uvedené v nadpisu o teplotě tání
84 až 86°C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,85 (1H, d, $J = 8,7$
Hz), 7,18 - 7,37 (5H, m), 7,14 (1H, d, $J = 8,7$ Hz), 7,11
(1H, s), 4,38 (1H, dd, $J = 11,6, 4,5$ Hz), 4,17 (1H, dd, $J =$
11,6 Hz, 8,4 Hz), 3,28 (1H, dd, $J = 14,0, 4,4$ Hz), 2,84 -
2,95 (1H, m), 2,71 (1H, dd, $J = 14$ Hz, $J = 11,0$ Hz), 0,31
(9H, s)

G. 7-(3-Methoxykarbonylfenyl)-3-fenylmethylbenzopyran-4-on

K míchanému roztoku 7-(trimethylstannyl)-3-fenyl-
methylbenzopyran-4-onu (7,0 g, 17,5 mmol) v dimethylformami-

du (35 ml) se přitá chlorid trifenyfosfinpalladnatý (490 mg, 0,7 mmol), BHT (3 krystaly) a methyl-3-jodbenzoát (5,0 g, 19,1 mmol). Výsledná směs se 1,5 hodiny míchá při teplotě zpětného toku, poté ochladí na teplotu místnosti a nalije do 150 ml nasyceného vodného roztoku chloridu amonného. Výsledná směs se extrahuje 3 x 150 ml diethyletheru. Spojené organické extrakty se promyjí 2 x 100 ml vody a poté vodným roztokem chloridu sodného. Vzniklý roztok se vysuší síranem sodným, přefiltruje a filtrát se odpaří za sníženého tlaku. Žlutý olejovitý zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití směsi hexanu a etheru v poměru 4 : 1 jako elučního činidla. Získá se 6,51 g sloučeniny uvedené v nadpisu ve formě viskosního oleje. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,29 (1H, t, $J = 1,6$ Hz), 8,06 (1H, dd, $J = 7,6, 1,6$ Hz), 8,00 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,79 (1H, dd, $J = 7,6$ Hz), 1,6 Hz), 7,53 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,22 - 7,36 (7H, m), 4,41 (1H, dd, $J = 11,6, 4,5$ Hz), 4,21 (1H, dd, $J = 11,6, 8,5$ Hz), 3,94 (3H, s), 3,31 (1H, dd, $J = 14,0, 4,4$ Hz), 2,91 - 2,99 (1H, m), 2,73 (1H, dd, $J = 14,0$ Hz, 11,1 Hz)

H. 7-(3-Methoxykarbonylfenyl)-4-hydroxy-3-fenylmethylbenzopyran

K míchanému roztoku 7-(3-methoxykarbonylfenyl)-3-fenylmethylbenzopyran-4-onu (6,50 g, 17,5 mmol) ve 35 ml methanolu se při teplotě místnosti v jedné dávce přidá tetrahydroboritan sodný (940 mg, 26,0 mmol). Tmavá směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti a poté nalije do nasyceného vodného roztoku chloridu amonného (75 ml). Výsledná směs se extrahuje 3 x 75 ml diethyletheru. Spojené extrakty se promyjí vodným roztokem chloridu sodného, vysuší síranem sodným, přefiltrují a filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku. Špinavě žlutý olejovitý zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití směsi hexanu a etheru v poměru 4 : 1 jako elučního činidla. Nejprve se získá 3,26 g cis isomeru

na kruhu titulní sloučeniny a poté 1,98 g trans isomeru na kruhu titulní sloučeniny ve formě viskosního oleje. Celkový výtěžek 81 %. Cis isomer na kruhu: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,26 (1H, t, $J = 1,7$ Hz), 8,02 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,76 (1H, dt, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,50 (H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,41 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,31 (1H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,14 - 7,25 (6H, m), 4,58 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 4,28 (1H, dd, $J = 9,1, 2,5$ Hz), 4,03 (1H, dd, $J = 9,1, 5,4$ Hz), 3,93 (3H, s), 2,78 (1H), 2,77 (1H, dd, $J = 13,7, 6,2$ Hz), 2,58 (1H, dd, $J = 13,7, 9,1$ Hz), 2,20 - 2,29 (1H, m), 1,83 (1H, d, $J = 7,2$ Hz). Trans isomer na kruhu ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,23 (1H, t, $J = 1,7$ Hz), 7,98 (1H, dt, $J = 7,8$ Hz), 7,7E (1H, t, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,7$ Hz), 7,48 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,20 - 7,36 (6H, m), 7,15 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz), 7,09 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 4,56 (1H, dt, $J = 4,7, 3,8$ Hz), 4,12 - 4,19 (2H, m), 3,92 (3H, s), 2,90 (1H, dd, $J = 13,6, 8,4$ Hz), 2,70 (1H, dd, $J = 13,6, 7,2$ Hz), 2,36 - 2,39 (1H, m), 1,75 (1H, d, $J = 4,7$ Hz)

I. N- α -terc-Butoxykarbonyl-L-tryptofan-7-[(3-methoxykarbonylphenyl)-3-fenylmethyl]benzopyran-4-yl]ester

K míchanému roztoku 7-(3-methoxykarbonylphenyl)-4-hydroxy-3-fenylmethylbenzopyranu (2,5 g, 6,7 mmol) v 70 ml methylenchloridu se přidá DMAP (897 mg, 7,34 mmol, 1,1 ekvivalentu), DCC (1,51 g, 7,39 mmol, 1,1 ekvivalentu) a N-t-Boc-L-tryptofan (2,4 g, 8,01 mmol, 1,2 ekvivalentu). Výsledná směs se 12 hodin míchá při teplotě místnosti, přefiltruje a promyje 1M kyselinou chlorovodíkovou a vodným chloridem sodným. Organická vrstva se vysuší síranem hořečnatým, přefiltruje a filtrát se zkoncentruje za sníženého tlaku. Zbytek se pdorobí chromatografií na silikagelu za použití směsi cyklohexanu a etheru v poměru 3 : 1 jako elučního činidla. Získá se 860 mg méně polárního diastereomeru ($R_f = 0,3$) a 700 mg polárnějšího diastereomeru ($R_f =$

0,2). Méně polární produkt (3S,4R): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,29 (1H, s), 8,03 (2H, d, $J = 7,8$ Hz), 7,77 - 7,83 (2H, m), 7,52 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,02 - 7,33 (5H, m), 6,64 (1H, s), 5,65 (1H, s), 5,06 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,58 - 4,62 (1H, m), 3,95 (3H, s), 3,73 - 3,85 (2H, m), 3,18 - 3,28 (2H, m), 2,45 - 2,61 (2H, m), 2,09 - 2,15 (1H, brd s), 1,39 (9H, s).

Polárnější produkt (3R,4S): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,25 (1H, s), 8,01 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 7,94 (1H, brd s), 7,74 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,54 (1H, d, $J = 11,9$ Hz), 7,48 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 7,09 - 7,38 (H, m), 6,95 (1H, s), 5,61 (1H, s), 5,08 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 4,55 - 4,60 (1H, m), 3,94 (3H, s), 3,73 - 3,76 (2H, m), 3,22 - 3,55 (2H, m), 2,42 - 2,60 (2H, m), 1,90 - 1,96 (1H, m), 1,39 (9H, s)

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 5

Sloučeniny uvedené v tabulce 5 se vyrobí zmýdelněním popsaným v příkladu 4.

T a b u l k a 5

R^1	R^3	Produkt
4-fenylbenzyl	5-Cl	^1H -NMR(300 MHz, DMSO-d_6): 7,61-7,67(4H, m), 7,29-7,46 (6H, m), 6,93(1H, brd d, $J=7,9\text{Hz}$), 6,80(1H, br.s.), 4,38(1H, d, $J=4,9\text{Hz}$), 4,16 (1H, brd.d, $J=11,0\text{Hz}$), 4,02 (1H, dd, $J=11,0, 5.6\text{Hz}$), 2,96 (1H, m), 2,56(1H, m), 2,26 (1H, m).
Benzyl	5- OCH_3	(cis) ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3): 7,96(1H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 7,24-7,38(5H, m), 7,16(1H, d, $J=8,0\text{Hz}$), 6,88(1H, dd, $J=8,7, 2,6\text{Hz}$), 6,75-6,83(3H, m), 4,51(1H, d, $J=2,9\text{Hz}$), 4,06-4,15(2H, m), 3,84(3H, s), 2,90(1H, dd, $J=13,6, 8,2\text{Hz}$), 2,70(1H, dd, $J=13,6, 7,2\text{Hz}$), 2,27-2,39(1H, m).
Benzyl	5- OCH_3	(trans) ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3): 7,97(1H, d, $J=8,7\text{Hz}$), 7,17-

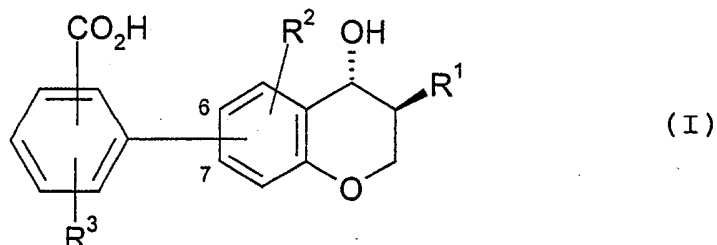
R ¹	R ³	Produkt
		7,31(6H, m), 6,85(2H, dt, J=14,3, 2,8Hz), 6,81-6,85 (2H, m), 4,50(1H, d, J=4,1Hz), 4,20(1H, dd, J=11,2, 2,6Hz), 3,94(1H, dd, J=11,2, 4,8Hz), 3,86(3H, s), 2,76(1H, dd, J=13,8, 6,2Hz), 2,52(1H, dd, J=13,2, 9,4Hz), 2,22-2,30(1H, m).
Benzyl	5-Cl	(cis) ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃): 7,83(1H, d, J=8,4Hz), 7,16-7,38(7H, m), 7,09(1H, d, J=89,1Hz), 6,72-6,84(2H, m), 4,47(1H, d, J=2,8Hz), 4,02-4,12(2H, m), 2,85(1H, dd, J=13,6, 8,1Hz), 2,62(1H, 13,6, 7,4Hz), 2,22-2,38(1H, m).
Benzyl	5-Cl	(trans) ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃): 7,86(1H, d, J=8,3Hz), 7,14-7,42(8H, m), 6,76-6,84 (2H, m), 4,48(1H, d, J=4,2Hz), 4,12(1H, dd, J=11,7, 2,6Hz), 3,92(1H, dd, J=11,7, 4,4Hz), 2,73(1H, dd, J=13,7, 6,1Hz), 2,50(1H, dd, J=13,7, 9,5Hz), 2,14-2,26(1H, m).
Benzyl	5-H	(cis) ¹ H- NMR(300MHz, CDCl ₃): 7,88(1H, dd, J=7,7, 1,2Hz), 7,49(1H, t, J=7,7Hz), 7,11-7,39(8H, m), 6,82-6,89 (2H, m), 4,49(1H, d, J=3,0Hz), 4,06-4,11(2H, m), 2,87(1H, dd, J=13,6, 8,0Hz), 2,63(1H, dd, J=13,6, 7,4Hz), 2,28-2,38(1H, m).
Benzyl	5-H	(trans) ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃): 7,88(1H, dd, J=7,7, 1,2Hz), 7,52(1H, t, J=7,7Hz), 7,10-7,41(8H, m), 6,83-6,90 (2H, m), 4,43(1H, d, J=4,2Hz), 4,12(1H, dd, J=11,2, 2,9Hz), 3,88(1H, dd, J=11,2, 4,5Hz), 2,75(1H, dd, J=13,7, 5,8Hz), 2,51(1H, dd, J=13,7, 9,5Hz), 2,14-2,25(1H, m), t.t. 82-84°C.
4-fenylbenzyl	5-F	¹ H-NMR(300MHz, DMSO _{d6}): 7,8(1H, dd), 7,01-7,67 (3H, m), 7,29-7,46(6H m), 6,93(HH, brd, d), 6,80(1H, d) 4,38(1H, d)4,16(1H, brd d), 4,01(1H, dd), 2,96(1H, m), 2,54(1H, m), 2,22(1H, m).

P r e p a r a t i v n í p o s t u p 6

Zmýdelněním odpovídajícího esteru za použití způsobu popsaného v preparativním postupu 4 se vyrobí 7-(4-hydroxy-3-karboxyfenyl)-4-hydroxy-3-fenylmethyl-2H-benzopyran o teplotě tání 158 až 160°C (cis) a 173 až 175°C (trans).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Benzopyran substituovaný kyselinou benzoovou
obecného vzorce I



kde

zbytek benzoové kyseliny substituovaný R^3 je ke zbytku molekuly připojen v poloze 6 nebo 7 benzopyranového kruhu;

R^1 představuje skupinu $-(CH_2)_qCHR^5R^6$, kde q představuje číslo 0 až 4;

R^2 a R^3 představuje každý nezávisle vodík, fluor, chlor, alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylsulfinylskupinu, fenylsulfonylskupinu nebo skupinu $alkyl-S(O)_n-$ s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2, přičemž alkylové zbytky uvedené v definici R^2 a R^3 jsou bez ohledu na místo jejich výskytu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylové zbytky uvedené v definici R^2 a R^3 jsou bez ohledu na místo jejich výskytu nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

R^5 představuje vodík, alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku nebo fenylskupinu, přičemž tato fenylskupina ve významu R^5 je popřípadě substituována fluorem,

chlorem, alkylskupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylsulfinylskupinou, fenylsulfonylskupinou nebo skupinou alkyl-S(O)_n- s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

R⁶ představuje vodík, alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylskupinu se 3 až 8 atomy uhlíku, fenylskupinu nebo pěti- až desetičlennou heteroarylskupinu, přičemž fenylskupina uvedená v definici R⁶ je popřípadě substituována fluorem, chlorem, alkylskupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylsulfinylskupinou, fenylsulfonylskupinou nebo skupinou alkyl-S(O)_n- s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této fenylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a přičemž uvedená pěti- až desetičlenná heteroarylskupina je popřípadě substituována jedním nebo dvěma substituenty nezávisle zvolenými ze souboru sestávajícího z fluoru, chloru, alkylskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylsulfinylskupiny,

fenylsulfonylskupiny a skupiny alkyl-S(O)_n- s 1 až 6 atomy uhlíku, kde n představuje číslo 0 až 2; přičemž alkylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této pěti- až destičlenné heteroarylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru; a fenylové zbytky jsou bez ohledu na místo jejich výskytu na případném substituentu této pěti- až desetičlenné heteroarylskupiny nezávisle popřípadě substituovány jednou až třemi skupinami fluoru;

jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

2. Benzopyran podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R¹ představuje benzylskupinu, 4-fluorbenzylskupinu, 4-fenylbenzylskupinu, 4-(4-fluorfenyl)benzylskupinu nebo fenylethylskupinu a ostatní symboly mají význam uvedený v nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

3. Benzopyran podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R² představuje vodík nebo fluor a ostatní symboly mají význam uvedený v nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

4. Benzopyran podle nároku 1 obecného vzorce I, kde zbytek benzoové kyseliny substituovaný R³ je ke zbytku molekuly připojen v poloze 7 benzopyranového kruhu; a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R³ je 2-karboxyfenyl-, 2-karboxy-5-chlorfenyl-, 2-karboxy-4-chlorfenyl-, 2-karboxy-3-fluorfenyl-, 2-karboxy-5-fluorfenyl-, 2-karboxy-5-trifluormethylfenyl-, 2-karboxy-4-fluorfenyl-, 2-karboxy-6-fluorfenyl- nebo 3-karboxyfenylskupina přičemž obecné

symboly mají jinak význam uvedený v nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

5. Benzopyran podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R^1 představuje benzylskupinu, R^2 představuje vodík a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R^3 je 2-karboxy-5-fluor-fenylskupina a ostatní symboly mají význam uvedený v nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

6. Benzopyran podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R^1 představuje 4-fenylbenzylskupinu, R^2 představuje vodík a zbytkem benzoové kyseliny substituovaným R^3 je 2-karboxy-5-fluorfenylskupina nebo 2-karboxy-4-chlorfenylskupina a ostatní symboly mají význam uvedený v nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

7. Benzopyran podle nároku 1, kterým je (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran), jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

8. Benzopyran podle nároku 1, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, kterým je v množství účinném při léčení atherosklerosy napuštěn stent, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

9. Benzopyran podle nároku 1, kterým je (3S,4R)-7-(2-karboxy-5-trifluormethylfenyl)-4-hydroxy-3-benzyl-2H-1-benzopyran), jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, přičemž touto látkou je v množství účinném při léčení atherosklerosy napuštěn stent, pro použití pro léčení atherosklerosy u savců.

10. Benzopyran definovaný v některém z nároků 1 až 7, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, pro použití jako léčivo.

11. Benzopyran, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl, kterým je v množství účinném při léčení atherosklerosy napuštěn stent, definovaný v některém z nároků 8 a 9, pro použití jako léčivo.

12. Použití benzopyranu definovaného v některém z nároků 1 až 7, jeho enantiomeru nebo jeho farmaceuticky vhodné soli, pro výrobu léčiva pro léčení atherosklerosy u savců.

13. LTB_4 antagonistické činidlo pro použití pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu.

14. LTB_4 antagonistické činidlo podle nároku 13 zvolené ze souboru sestávajícího z protilátky pro LTB_4 a antisense progenu LTB_4 pro použití pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu.

15. LTB_4 antagonistické činidlo podle nároku 13, které vykazuje LTB_4 IC_{50} méně než asi 20nM, měřeno stanovením chemotaxe pro použití pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu.

16. LTB_4 antagonistické činidlo uvedené v některém z nároků 13 až 15 pro použití jako léčivo.

17. Použití LTB_4 antagonistického činidla uvedeného v některém z nároků 13 až 15 pro výrobu léčiva pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu.

18. Malá molekula efektivně snižující progresi tvorby atherosklerotické léze pro použití pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu, který má atherosklerotickou lézi.

19. Malá molekula podle nároku 18 vykazující LTB_4 IC_{50} méně než asi 20nM, měřeno stanovením chemotaxe pro použití pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu, který má atherosklerotickou lézi.

20. Malá molekula uvedená v nároku 18 nebo 19 pro použití jako léčivo.

21. Použití malé molekuly uvedené v nároku 18 nebo 19 pro výrobu léčiva pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu, který má atherosklerotickou lézi.

22. Farmaceutická kompozice pro léčení atherosklerosy u savčího subjektu, včetně člověka, který má atherosklerotickou lézi, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje LTB_4 antagonistické činidlo v množství, které efektivně snižuje progresi tvorby léze, a farmaceuticky vhodný nosič.

{01-1275-02-Ma}