

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **227833**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **416659**

(22) Data zgłoszenia: **01.04.2016**

(51) Int.Cl.

C07K 5/10 (2006.01)

C07F 9/40 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(54) **Peptydowe pochodne S-enancjomerów diarylowych estrów kwasów
1-aminoalkilofosfonowych, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.02.2017 BUP 04/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARCIN SKOREŃSKI, Jelcz-Laskowice, PL

JÓZEF OLEKSYSZYN, Siechnice, PL

MARCIN SIEŃCZYK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 227833 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku peptydowe pochodne S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie jako inhibitorów proteazy NS3/4A ekspresjonowanej przez ludzki wirus zapalenia wątroby typu C (HCV).

Według najnowszych doniesień na świecie około 130–150 milionów ludzi zarażonych jest wirusem zapalenia wątroby typu C. Dodatkowo z powodu braku skutecznej szczepionki co roku rejestruje się około 4 milionów nowych zachorowań tym wirusem. Każdego roku notuje się ponad 350 tysięcy zgonów na skutek powikłań oraz chorób towarzyszących infekcjom wirusa zapalenia wątroby typu C. Do nie dawna jedyną terapią była terapia dwuskładnikowa (składająca się z interferonu i Ribavarinu), która często nie była dobrze tolerowana przez pacjentów oraz nie była skuteczna. Dodatkowo, pojawiające się nowe genotypy wirusa okazały się być całkowicie odporne na jej działanie. W maju 2011 roku, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zaakceptowała dwa nowe terapeutyki (Telaprevir, Boceprevir), które stosowane są w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C. Mechanizm ich działania oparty jest na odwracalnym hamowaniu aktywności proteolitycznej wirusowej proteazy NS3/4A. Inhibicja aktywności tego enzymu nie pozwala na powstanie nowych wirusów zdolnych do dalszej replikacji. Największym problemem związanym z wykorzystaniem inhibitorów proteazy NS3/4A są pojawiające się mutacje materiału genetycznego, dzięki którym wirus uzyskuje oporność na nowe terapeutyki. Innym problemem jest występowanie efektów niepożądanych podczas stosowania wyżej wymienionych leków (Chang MH, Gordon LA, Fung HB." *Clin Ther* 2012, 34, 2021–38; Neukam K et al. *PLoS One* 2015, 10, 4). Z tego też powodu niesłychanie ważnym jest nieustanne poszukiwanie nowych związków będących inhibitorami tej kluczowej dla cyklu życiowego wirusa proteazy (Alkhoury N, Zein NN., *Cleve Clin J Med.* 2012, 79, 213–22; Pawlowsky, JM., *Gastroenterology* 2014, 146, 1176–92).

Zastosowania aromatycznych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, jako specyficznych inhibitorów proteaz serynowych zostało już wykorzystane w wielu pracach naukowych. Obecny w strukturze inhibitora N-końcowy fragment peptydowy odpowiada za oddziaływanie z kieszeniami S2-Sn proteazy, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie wysokiej specyficzności ich działania, tzn. wyeliminowanie możliwości reakcji z innymi proteazami serynowymi, szczególnie inaktywacji ważnych proteaz gospodarza. Natomiast C-końcowy region inhibitora zawiera fosfonowy analog aminokwasu, którego struktura zapewnia nie tylko optymalne oddziaływanie cząsteczki z kieszenią wiążącą S1 proteazy, ale umożliwia aparatowi katalitycznemu enzymu rozpoczęcie nukleofilowego ataku na atom fosforu, co w konsekwencji prowadzi do samobójczej inaktywacji proteazy (Sienczyk, M., Oleksyszyn, J. *Curr Med Chem.* 2009, 16, 1673). Prezentowane związki to pochodne peptydów, jednak ich konfiguracja przy atomie węgla α w reaktywnej części inhibitora odpowiada konfiguracji niebiałkowych aminokwasów. W literaturze naukowej i patentowej opisano jedynie zastosowanie peptydowych pochodnych estrów arylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako związków hamujących aktywność ludzkich enzymów proteolitycznych takich jak m.in.: chymotrypsyna, trypsyna, elastaza neutrofilowa czy kathepsyna G (Sieńczyk M., Lesner A., Wysocka M., Legowska A., Pietrusewicz E., Rolka K., Oleksyszyn J., *Bioorg Med Chem.* 2008, 16, 8863; Winiarski Ł, Oleksyszyn J, Sieńczyk M., *J Med Chem.* 2012, 55, 6541–53; Pietrusewicz E, Sieńczyk M, Oleksyszyn J. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009, 24, 1229–36) lub inhibitorów proteaz bakteryjnych. Ponadto w literaturze patentowej i naukowej nie istnieją doniesienia o zastosowaniu peptydowych pochodnych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów proteazy NS3/4A ekspresjonowanej przez ludzki wirus zapalenia wątroby typu C (HCV). W poniższym wynalazku prezentujemy związki o odwrotnej konfiguracji asymetrycznego atomu węgla w fosfonowym analogu aminokwasu, odpowiadającej niebiałkowym aminokwasom, co zmniejsza podatność otrzymanych pochodnych na degradację przez enzymy proteolityczne, zarówno ludzkie, jak i wirusowe czy bakteryjne.

Istotą wynalazku są peptydowe pochodne S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych o wzorze ogólnym I w którym R_1 oznacza analog proliny: pierścień piperydyny, pierścień oktadehydroindolu, dimetylocyklopropylową pochodną proliny lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna.

Sposób wytwarzania peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych przedstawionych wzorami II–IX oraz o wzorze ogólnym I w którym R_1 oznacza analog proliny: pierścień piperydyny, pierścień oktadehydroindolu, dimetylocyklopropylową pochodną proliny lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu

pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna polega na tym, że fosforyn triarlowy, otrzymany z fenolu para-merkaptometylowego oraz chlorku fosforu (III) w acetonitrylu, poddaje się amidoalkilowaniu przy użyciu karbaminianu benzylu, fosforynu tri-(4-merkaptometylo)fenylowego oraz aldehydu n-butyłowego, w acetonitrylu jako rozpuszczalniku stosując jako katalizator kompleks eteratu kwasu tetrafluoroborowego, po czym prowadzi się syntezę bromowodoru, w której odblokowuje się ochronną grupę benzyloksykarbonylową (Cbz) przy użyciu 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym, w kolejnym etapie otrzymany bromowodorek estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego poddaje się reakcji z proliną z zablokowaną grupą α -aminową a reakcję sprzęgania prowadzi się w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforan benzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i acetonitrylem jako rozpuszczalnikiem. W następnym etapie z otrzymanego fosfonodipeptydu, usuwa się grupę blokującą tert-butyloksykarbonylową (t-Boc) przy użyciu 50% roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2), po czym odblokowany dipeptyd estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego poddaje się reakcji z tert-butyloglicyną z zablokowaną grupą α -aminową w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanem benzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i acetonitrylem jako rozpuszczalnikiem, ostatnim etapem jest usunięcie grupy tert-butyloksykarbonylowej (t-Boc) przy użyciu 50% roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2), a otrzymany produkt poddaje się reakcji sprzęgania z trzema różnymi grupami: kwasem pirazynokarboksylowym, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna, w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanem benzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i N,N-dimetyloformamidem jako rozpuszczalnikiem.

Korzystnie w przypadku syntezy pochodnej hydrochinonu prowadzi się finalną deprotekcję estru tert-butyłowego przy użyciu 50% roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2).

Sposób wytwarzania peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych przedstawionych wzorami X–XV oraz wzorem ogólnym I, w którym R_1 oznacza analog proliny: dimetylocyklopropylprolinę lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwasu pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna znamienny tym, że uprzednio przygotowany peptydowy fragment poddaje się reakcji sprzęgania z bromowodorkiem estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego przygotowanego zgodnie z opisem powyżej. Reakcję sprzęgania prowadzi się w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanem benzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i N,N-dimetyloformamidem jako rozpuszczalnikiem.

Korzystnie w przypadku syntezy pochodnej hydrochinonu prowadzi się deprotekcję estru tert-butyłowego dla związku o wzorze X przy użyciu 50% roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2) lub estru benzyłowego dla związku o wzorze XIII przy użyciu 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych o wzorze ogólnym I w którym R_1 oznacza analog proliny: pierścień piperidyny, pierścień oktahydroindolu, dimetylocyklopropylową pochodną proliny lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna jako nieodwracalnych inhibitorów proteazy NS3/4A o genotypach 1a oraz 1b.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach realizacji oraz na schematach reakcji na rysunku, na którym:

- fig. 1 przedstawia schemat syntezy związków przedstawionych wzorami II–IX,
- fig. 2 przedstawia schemat syntezy związków przedstawionych wzorami X–XII,
- fig. 3 przedstawia schemat syntezy związków przedstawionych wzorami XIII–XV.

P r z y k ł a d 1.

Sposób wytwarzania estru di-(4-metylosulfidofenylowego) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego przedstawionego wzorem 2

Etap 1. Otrzymywanie *fosforynu trój-(4-metylomerkapt)fenylowego*. W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszałkę magnetyczną dodaje się 4,1 g (29 mmol) 4-metylomerkaptofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C

przez 2 minuty. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (9,8 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez trzy godziny w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania, do reakcji syntezy przedstawionej w etapie 2.

Etap 2. Otrzymywanie *estru di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu 1-N-(benzyloksykarbonylo)-aminobutylofosfonowego*. W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-(4-merkaptometylo)fenylowy powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,1 ml (10,5 mmol) aldehydu n-butyloвого. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 15 ml acetonitrylu całość chłodzi się na łaźni lodowej. Następnie dodaje się 0,16 g (1 mmol) kwas tetrafluoroborowy w eterze dietylowym. Po 12 godzinach trwania reakcji w temperaturze pokojowej usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszcza w 50 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 3,16 g produktu (wydajność 59%). Wzór sumaryczny: $C_{26}H_{30}NO_5P$. Masa cząsteczkowa: 531,1303 g/mol.

Etap 3. Otrzymywanie *bromowodoru estru di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu-aminobutylofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,53 g estru di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu 1-N-(benzyloksykarbonylo)-aminobutylofosfonowego (1 mmol) i dodaje się 4 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 0,45 g (94%) produktu w postaci białego osadu. Wzór sumaryczny: $C_{18}H_{25}O_3NPS_2Br$. Masa cząsteczkowa: 478,40 g/mol.

Etap 4. Otrzymywanie *estru di-(4-metylosulfidofenyloвого) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,37 g (0,77 mmol) bromowodoru estru di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu-aminobutylofosfonowego i dodaje się 0,20 g Boc-Pip-OH (0,88 mmola). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml) a po upływie 2 minut dodaje się 0,32 g N,N-diizopropylloetyloaminy (2,5 mmola). Po 10 minutach dodaje się 0,43 g (0,82 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie odparowuje się lotne składniki mieszaniny reakcyjnej, a powstały olej rozpuszcza się w 40 ml octanu etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego, solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%) i solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,25 g (wydajność 53%) w postaci bezbarwnego oleju. Wzór sumaryczny: $C_{29}H_{41}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 608,75 g/mol.

Etap 5. Synteza *trifluorooctanu estru di-(4-metylosulfidofenyloвого) kwasu (N-L-homoprolilo)-aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,1 g (0,16 mmol) estru di-(4-metylosulfidofenyloвого) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego i rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwas trójfluorooctowy (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy jako substrat wyjściowy do otrzymania pochodnej w etapie 6.

Etap 6. Synteza *estru di-(4-metylosulfidofenyloвого) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie V produktu TFA*Pip-n Val^P(OC₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,1 g (0,16 mmola) dodaje się 0,04 g (0,17 mmola) Boc-Tleu-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,24 g (0,4 mmola) diizopropylloetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,09 g (0,17 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie odparowuje się lotne składniki mieszaniny reakcyjnej, a powstały olej rozpuszcza się w 25 ml octanu etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej

stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 24%). Wzór sumaryczny: $C_{35}H_{52}O_7N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 721,91 g/mol. $R_f = 0,18$ (eter naftowy: AcOEt, 2:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.23-7.00 (m, 8H), 5.59 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 2.48-2.38 (m, 6H), 2.12-1.83 (m, 3H), 1.57 (m, 7H), 1.44-1.34 (m, 9H), 0.96 (s, 9H), 0.92-0.85 (m, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.27 (s, 77%), 18.16 (s, 23%), (konformer). HRMS: otrzymano z $(C_{35}H_{52}N_3O_7PS_2)Na^+$, 744.2882; znaleziono: 744.2874

P r z y k ł a d 2. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 3.

Etap 1–6 identyczne jak w przykładzie 1.

Etap 7. Trifluorooctanu estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu (L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,03 g (0,04 mmol) estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu (L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego* i rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy jako substrat wyjściowy w etapie 8.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-(N-2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu TFA**Tleu-Pip-nVal*^P(OC₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,03 g (0,04 mmola) dodaje się 0,014 g (0,05 mmola) kwasu 2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowy. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) diizopropyleoaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,019 g (wydajność 53%). Wzór sumaryczny: $C_{44}H_{60}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 886,07 g/mol.

Etap 9. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Powstały w etapie VIII produkt (0,019 g; 0,02 mmol) rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,015 g (wydajność 90%). Wzór sumaryczny: $C_{40}H_{52}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 829,96 g/mol $R_f = 0,1$, (eter naftowy: AcOEt, 1:5, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38-6.70 (m, 12H), 4.95-4.81 (m, 1H), 4.77-4.60 (m, 1H), 4.57-4.48 (m, 4H), 4.00-3.88 (m, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.49-2.40 (m, 4H), 2.13-1.85 (m, 3H), 1.80-1.71 (m, 4H), 1.55-1.24 (m, 4H), 1.09-0.90 (m, 9H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 20.71 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{40}H_{52}N_3O_{10}PS_2)Na^+$, 852.2729; znaleziono 852.2737.

P r z y k ł a d 3.

Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 4.

Etap 1–7 identyczne jak w przykładzie 1.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu TFA**Tleu-Pip-nVal*^P(OC₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,03 g (0,04 mmola) dodaje się 0,01 g (0,08 mmola) kwasu piperazynowego.

Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) diizopropylloetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,020 g (wydajność 67%). Wzór sumaryczny: $C_{35}H_{46}O_6N_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 727,86 g/mol. $R_f = 0,21$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.36 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.25-6.94 (m, 8H), 5.10 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.89-4.87 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.39 (s, 6H), 2.30-2.05 (m, 8H), 1.84-1.36 (m, 6H), 1.10 (s, 9H), 1.03-0.85 (m, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.79 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{35}H_{46}N_5O_6PS_2)Na^+$, 750.2516; znaleziono 750.2518.

Przykład 4.

Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenylowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 5.

Etap 1–7 identyczne jak w przykładzie 1.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenylowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-homoprolilo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu TFA**Tleu*-Pip-*nVal*^P(OC₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,03 g (0,04 mmol) dodaje się 0,013 g (0,05 mmol) z (S)-2-cykloheksyl-2-(pyrazina-2-karboksyamido)octowy kwas. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) N,N-diizopropylloetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,018 g (wydajność 82%). Wzór sumaryczny: $C_{43}H_{59}O_7N_6PS_2$. Masa cząsteczkowa: 867,07 g/mol. $R_f = 0,07$ (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.42 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 8.40-8.25 (m, 1H), 7.70-7.05 (m, 8H), 6.65-6.50 (m, 1H), 4.99-4.90 (m, 1H), 4.50-4.35 (m, 1H), 2.77-2.68 (m, 2H), 2.55-2.50 (m, 6H), 2.21-1.90 (m, 3H), 1.84-1.65 (m, 6H), 1.63-1.34 (m, 6H), 1.20 (s, 9H), 0.99 (s, 9H), 0.88-0.79 (m, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 19.27 (s, 79%), 18.46 (s, 21%), (konformer) HRMS: otrzymano z $(C_{43}H_{59}N_6O_7PS_2)Na^+$, 889.3522; znaleziono: 889.3526.

Przykład 5.

Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenylowy) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 6.

Etapy 1–3 identyczne jak w przykładzie 1.

Etap 4. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenylowy) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,37 g (0,77 mmol) bromowodorku i dodaje się 0,23 g Boc-Oic-OH (0,88 mmola). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,32 g diizopropylloetyloaminy (2,5 mmola). Po 10 minutach dodaje się 0,43 g (0,82 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie odparowuje się lotne składniki mieszaniny reakcyjnej, a powstały olej rozpuszcza się w 40 ml octanu etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego, solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%) i solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,19 g (wydajność 38%) w postaci bezbarwnego oleju. Wzór sumaryczny: $C_{32}H_{45}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 648,81 g/mol.

Etap 5. Trójfluorooctanu estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,1 g (0,15 mmol) produktu otrzymanego w etapie 4 i rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy, jako substrat wyjściowy użyty w etapie 6.

Etap 6. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-(N-tert-butyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*.

Do powstałego w etapie V produktu TFA*Oic-nVal^P(O-C₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,1 g (0,15 mmol) dodaje się 0,04 g (0,17 mmola) Boc-Tleu-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,24 g (0,4 mmol) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,09 g (0,17 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie odparowuje się lotne składniki mieszaniny reakcyjnej, a powstały olej rozpuszcza się w 25 ml octanu etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 26%). Wzór sumaryczny: C₃₈H₅₆O₇N₃PS₂. Masa cząsteczkowa: 761,97 g/mol. R_f = 0,19 (eter naftowy: AcOEt, 2:1, v/v). ¹H NMR (601 MHz, MeOD) δ 7.32-7.10 (m, 8H), 4.83-4.71 (m, 1H), 4.48-4.39 (m, 1H), 4.31-4.21 (m, 1H), 2.48 (s, 6H), 2.35-2.21 (m, 1H), 2.04-1.92 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 4H), 1.77-1.66 (m, 6H), 1.57-1.49 (m, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.37-1.25 (m, 2H), 1.02 (s, 9H), 1.01-0.91 (m, 3H). ³¹P NMR (243 MHz, MeOD) δ 18.63. HRMS: otrzymano z (C₃₈H₅₆N₃O₇PS₂)Na⁺, 784.3195; znaleziono: 784.3189.

P r z y k ł a d 6.

Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego indolo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 7.

Etap 1–6 identyczne jak w przykładzie 5

Etap 7. Synteza trójfluorooctanu estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu (L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do kolby okrągłodennej odważa się 0,03 g (0,04 mmol) produktu otrzymanego w etapie 6 i rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały ilościowo produkt w postaci żółtego oleju służy, jako substrat wyjściowy w etapie 8.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-(N-2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu TFA*Tleu-Oic-nVal^P(OC₆H₄-4-SCH₃)₂ 0,03 g (0,04 mmola) dodaje się 0,014 g (0,05 mmola) kwasu 2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOB. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,021 g (wydajność 45%). Wzór sumaryczny: C₄₇H₆₄O₁₀N₃PS₂. Masa cząsteczkowa: 926,13 g/mol.

Etap 9. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)feno-ksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego indolo)aminobutanofosfonowego*. Powstały w etapie 7 produkt (0,021 g; 0,02 mmol) rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,017 g (wydajność 98%). Wzór sumaryczny: $C_{43}H_{56}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 829,96 g/mol. $R_f = 0,1$, (eter naftowy: AcOEt, 1:5, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.28-6.71 (m, 12H), 4.83-4.54 (m, 4H), 4.47 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.154.06 (m, 1H), 3.52 (s, 1H), 2.77 (s, 1H), 2.55-2.45 (m, 6H), 2.28-2.16 (m, 2H), 2.10-1.67 (m, 8H), 1.65-1.26 (m, 6H), 0.98 (s, 9H), 0.95-0.87 (m, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 19.44 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{43}H_{56}N_3O_{10}PS_2)Na^+$, 892.3043; znaleziono 892.3041.

Przykład 7.

Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 8.

Etapy 1–7 identyczne jak w przykładzie 5.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu $TFA^*Tleu-Oic-nVal^P(OC_6H_4-4-SCH_3)_2$ 0,03 g (0,04 mmola) dodaje się 0,01 g (0,08 mmola) kwasu piperazynowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,015 g (wydajność 48%). Wzór sumaryczny: $C_{38}H_{50}O_6N_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 767,94 g/mol. $R_f = 0,04$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.40 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.45-7.34 (m, 2H), 7.26-7.11 (m, 6H), 4.79-4.76 (m, 1H), 4.50-4.33 (m, 2H), 2.72 (s, 2H), 2.48 (s, 6H), 2.31-2.26 (m, 1H), 2.08-1.98 (m, 2H), 1.82-1.72 (m, 6H), 1.49-1.28 (m, 6H), 1.15 (s, 9H), 1.00-0.95 (m, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.07 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{38}H_{50}N_5O_6PS_2)Na^+$, 790.2838; znaleziono 790.2827.

Przykład 8. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 9.

Etapy 1–7 identyczne jak w przykładzie 5.

Etap 8. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-oktahydro-1H-indolo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie VII produktu $TFA^*Tleu-Oic-nVal^P(OC_6H_4-4-SCH_3)_2$ 0,03 g (0,04 mmola) dodaje się 0,013 g (0,05 mmol) z (S)-2-cykloheksyl-2-(pirazylo-2-karboksyamido)octowy kwas. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,013 g (0,1 mmola) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,026 g (0,05 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,013 g (wydajność 29%). Wzór sumaryczny: $C_{46}H_{63}O_7N_6PS_2$. Masa cząsteczkowa: 907,14 g/mol. 1H NMR (601 MHz,

CDCl_3) δ 9.45 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.30 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.24-7.10 (m, 8H), 4.85-4.77 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.60-4.40 (m, 2H), 4.29-4.23 (m, 1H), 2.5 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 2.08-1.86 (m, 6H), 1.81-1.61 (m, 12H), 1.49-1.38 (m, 3H), 1.20-1.07 (m, 7H), 0.98 (s, 9H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3) δ 18.48 (s). HRMS: otrzymano z $(\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_7\text{PS}_2)\text{Na}^+$, 929.3835; znaleziono 929.3832.

P r z y k ł a d 9. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 10.

Etap 1. Synteza estru *metylowego kwasu (1R,2S,5S)-3-((S)-2-((tert-butoksykarbonyl)amino)-3,3-dimetylobutano)-6,6-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksanowego*. W mieszaninie DCM/DMF (25 mL, 1:1, v/v) rozpuszczono 0,55 g Boc-Tleu-OH (2,36 mmol) następnie dodano 0,44 g (1R,5R)-3-(metoksykarbonyl)-6,6-dimetyl-2-azabicyklo[3.1.0]heksan-2-ium chlorku (2,16 mmol); 0,66 g NMM (6,5 mmol) oraz 1,12 g PyBOP (2,16 mmol). Reakcja prowadzona była przez 24 godziny na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 5% roztwór kwasu cytrynowego (20 mL). Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto DCM (3x20 mL). Połączone frakcje organiczne przemyto kolejno: 5% roztworem kwasu cytrynowego (20 mL), wodą (20 mL), 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono a następnie odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą techniki chromatografii kolumnowej. Otrzymano 0,49 g (wydajność 59%) produktu w postaci bezbarwnego oleju. Wzór sumaryczny: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{N}_2$. Masa cząsteczkowa: 382,50 g/mol.

Etap 2. Synteza kwasu *(1R,2S,5S)-3-((S)-2-((tert-butoksykarbonyl)amino)-3,3-dimetylobutano)-6,6-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksanowego*. W mieszaninie MeOH/THF/ H_2O (10 mL, 1:1:1, v/v/v) rozpuszczono 0,1 g (0,26 mmol) produktu otrzymanego w etapie 1. Następnie dodano 260 μL 1M roztworu LiOH w wodzie (0,26 mmol). Przebieg reakcji monitorowano przy użyciu techniki TLC. Po zakończeniu reakcji (2–3 godziny) do mieszaniny reakcyjnej dodano 5% roztwór kwasu cytrynowego i doprowadzono do pH=4. Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto DCM (3x20 mL). Połączone frakcje organiczne przemyto kolejno: 5% roztworem kwasu cytrynowego (20 mL), wodą (20 mL), 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono a następnie odparowano. Surowy produkt w postaci bezbarwnego oleju (0,09 g, wydajność: 94%) użyty został do syntezy w następnym etapie. $R_f = 0,06$ (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). HRMS: otrzymano z $(\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5)\text{Na}^+$, 391.2209; znaleziono: 391.2211.

Etap 3. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu (-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie II produktu 0,09 g (0,24 mmol) dodaje się 0,12 g (0,25 mmola) bromowodorku estru *di-(4-sulfidometylofenyloвого) kwasu-aminobutylofosfonowego*. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,081 g (0,63 mmol) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,15 g (0,28 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanu sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,11 g (wydajność 61%). Wzór sumaryczny: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_7\text{N}_3\text{PS}_2$. Masa cząsteczkowa: 747,95 g/mol. $R_f = 0,12$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v).

Etap 4. Synteza *trifluorooctanu estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu (-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*. Powstały w etapie III produkt (0,1 g; 0,13 mmol) rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfłuroooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy, jako substrat wyjściowy w następnym etapie.

Etap 5. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-(N-2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie IV produktu 0,08 g (0,1 mmol) dodaje się 0,028 g (0,1 mmola) kwasu 2-(4-(2-(tert-

butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczekuje się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropylotetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,04 g (wydajność 44%). Wzór sumaryczny: $C_{46}H_{62}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 912,11 g/mol.

Etap 6. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*.

Powstały w etapie V produkt (0,04 g; 0,04 mmol) rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 88%). Wzór sumaryczny: $C_{42}H_{54}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 856,00 g/mol $R_f = 0,03$, (eter naftowy: AcOEt, 1:3, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 7.67-6.67 (m, 12H), 5.62 (s, 1H), 5.41-5.27 (m, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.58 (s, 1H), 4.34-4.28 (m, 1H), 3.62-3.46 (m, 3H), 3.33-3.21 (m, 1H), 2.58 (s, 6H), 1.90-1.60 (m, 4H), 1.32-1.22 (m, 1H), 1.10-0.95 (m, 13H), 0.81 (s, 6H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 20.31 (s). HRMS: otrzymano z ($C_{42}H_{54}N_3O_9PS_2$)Na⁺ 862.2937; znaleziono 862.2940.

P r z y k ł a d 10. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 11.

Etap 1. Identyczny jak w przykładzie 9.

Etap 2. Powstały w etapie I produkt (0,1 g; 0,26 mmol) rozpuszcza się w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju o masie 0,09 g (wydajność 87%). Który używa się w następnym etapie. Wzór sumaryczny: $C_{17}H_{27}O_5N_2F_3$. Masa cząsteczkowa: 396,41 g/mol.

Etap 3. Synteza estru *metylowego (S)-2-(pirazyno-2-karboksyamido)-2-cykloheksyloglicyny*. Do powstałego w etapie II produktu 0,04 g (0,1 mmol) dodaje się 0,02 g (0,16 mmol) kwasu piperazynowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczekuje się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropylotetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 77%). Wzór sumaryczny: $C_{20}H_{28}O_4N_4$. Masa cząsteczkowa: 388,47 g/mol.

Etap 4. Synteza kwasu *(S)-2-(pirazyno-2-karboksyamido)-2-cykloheksyloglicyny*. W mieszaninie MeOH/THF/H₂O (10 mL, 1:1:1, v/v/v) rozpuszczono 0,03 g (0,08 mmol) produktu otrzymanego w etapie III. Następnie dodano 80 μ L 1M roztworu LiOH w wodzie (0,08 mmol). Przebieg reakcji monitorowano przy użyciu techniki TLC. Po zakończeniu reakcji (2–3 godziny) do mieszaniny reakcyjnej dodano 5% roztwór kwasu cytrynowego i doprowadzono do pH=4. Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto DCM (3x20 mL). Połączone frakcje organiczne przemyto kolejno: 5% roztworem kwasu cytrynowego (20 mL),

wodą (20 mL), 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono a następnie odparowano. Surowy produkt w postaci bezbarwnego oleju (0,03 g, wydajność: 100%) użyty został do syntezy w następnym etapie.

Etap 5. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie IV produktu 0,03 g (0,08 mmol) dodaje się 0,06 g (0,12 mmola) bromowodorku estru *di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu-aminobutylofosfonowego*. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,027 g (0,21 mmol) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,075 g (0,14 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 50%). Wzór sumaryczny: $C_{37}H_{48}O_6N_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 753,91 g/mol. $R_f = 0,06$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.38 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 7.26-7.11 (m, 8H), 6.82 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.79 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.05 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 2.47 (d, $J = 2.8$ Hz, 6H), 2.07-1.92 (m, 1H), 1.83-1.71 (m, 2H), 1.69-1.54 (m, 6H), 1.52-1.42 (m, 1H), 1.11 (s, 6H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.84 (s, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.52. HRMS: otrzymano z $(C_{37}H_{48}N_5O_6PS_2)Na^+$, 776.2681; znaleziono 776.2681.

P r z y k ł a d 11. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego* przedstawionego wzorem 12.

Etap 1–2. Identyczne jak w przykładzie 10.

Etap 3. Synteza estru *metylowego kwasu (1R,2S,5S)-3-((S)-2-((S)-2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)acetamido)-3,3-dimetylobutylo)-6,6-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksanowego*. Do powstałego w etapie II produktu 0,04 g (0,1 mmol) dodaje się 0,042 g (0,16 mmola) (S)-2-(pirazyno-2-karboksyamido)-2-cykloheksyloglicynę. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 57%). Wzór sumaryczny: $C_{28}H_{41}O_5N_5$. Masa cząsteczkowa: 527,67 g/mol.

Etap 4. Synteza kwasu *(1R,2S,5S)-3-((S)-2-((S)-2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)acetamido)-3,3-dimetylobutylo)-6,6-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksanowy*. W mieszaninie MeOH-/THF/H₂O (10 mL, 1:1:1, v/v/v) rozpuszczono 0,03 g produktu (0,06 mmol) otrzymanego w etapie III. Następnie dodano 60 μ L 1M roztworu LiOH w wodzie (0,06 mmol). Przebieg reakcji monitorowano przy użyciu techniki TLC. Po zakończeniu reakcji (2–3 godziny) do mieszaniny reakcyjnej dodano 5% roztwór kwasu cytrynowego i doprowadzono do pH=4. Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto DCM (3x20 mL). Połączone frakcje organiczne przemyto kolejno: 5% roztworem kwasu cytrynowego (20 mL), wodą (20 mL), 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono a następnie odparowano. Surowy produkt w postaci bezbarwnego oleju (0,03 g, wydajność: 100%) użyty został do syntezy w następnym etapie. Wzór sumaryczny: $C_{27}H_{39}O_5N_5$. Masa cząsteczkowa: 513,67 g/mol.

Etap 5. Synteza estru *di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-dimetylocyklopropyloproliło)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie IV produktu 0,03 g (0,06 mmol) dodaje się 0,06 g (0,12 mmola) bromowodorku estru

di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu-aminobutylofosfonowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,027 g (0,21 mmol) diizopropylaoetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,075 g (0,14 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 56%). Wzór sumaryczny: $C_{45}H_{61}O_7N_6PS_2$. Masa cząsteczkowa: 893,11 g/mol. $R_f = 0,10$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.42 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.26-7.06 (m, 8H), 6.88-6.78 (m, 1H), 4.90-4.77 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.48-4.42 (m, 1H), 3.97 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 3.87-3.77 (m, 1H), 2.50-2.45 (m, 6H), 2.10-1.96 (m, 3H), 1.92-1.55 (m, 9H), 1.54-1.43 (m, 2H), 1.30-1.04 (m, 8H), 1.02-0.95 (m, 5H), 0.95-0.86 (m, 10H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.44 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{45}H_{61}N_6O_7PS_2)Na^+$, 915.3679; znaleziono 915.3676.

P r z y k ł a d 12. Sposób wytwarzania 2-(4-(2-(((S)-1-((2S,3aS,6aS)-2-(((S)-1-(bis(4-(metylofeno)izopropyl)butyl)karbamoyl)heksahydrocyclopenta[b]pyrrol-1(2H)-yl)-3,3-dimetyl-1-oksobutan-2-yl)amino)-2-oksoetoksy)fenoksy) kwas octowy przedstawionego wzorem 13.

Etap 1. Synteza estru *tert*-butylowego kwasu (1S,3aS,6aR)-2-((S)-2-(((benzyloksy)karbonylo)-amino)-3,3-dimetylobutano)oktahydrocyclopenta[c]pirolowego. Do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się ester *t*-butylowy szczawianu dicykloproliny (0,4 g), który zawieszają w 20 ml octanu etylu. Następnie do mieszaniny dodaje się 15 ml H_2O oraz 4 g K_2CO_3 . Mieszaninę pozostawia się na mieszadle przez 0,5 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, mieszaninę przenosi się do rozdzielacza i oddziela fazę organiczną którą przemywa się 5 ml 25% K_2CO_3 oraz 5 ml solanki oraz suszy bezwodnym $MgSO_4$.

Do osobnej kolby wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważono Cbz-*t*BuGly-OH·DCHA (0,6 g), zawieszono w eterze *tert*-butylometylowym i dodano 20 ml 0,86 M roztworu H_2SO_4 . Mieszaninę pozostawia się na mieszadle przez 0,5 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i oddzielono fazę organiczną, którą przemyto 5 ml H_2O oraz 5 ml solanki oraz wysuszono bezwodnym $MgSO_4$. Następnie do fazy organicznej dodano 6 ml NMM oraz odparowano eter na wyparce rotacyjnej.

W osobnej kolbie umieszczono 20 ml NMM w której rozpuszczono EDC·HCl (260 mg) oraz HOBt (204 mg). Kolbę umieszczono na łaźni lodowej i dodano Cbz-*t*BuGly-OH w NMM. Następnie po godzinie dodano ester *t*-butylowy dicykloproliny rozpuszczony w octanie etylu. Reakcję prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 30 ml octanu etylu oraz 20 ml 1M HCl i pozostawia na mieszadle magnetycznym przez 0,5 godziny. Oddzieloną fazę organiczną przemywa się 10 ml 25% K_2CO_3 oraz 10 ml solanki i suszy bezwodnym $MgSO_4$.

Po przesączeniu odparowuje się dichlorometan a powstały żółty olej oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy: octan etylu; 1:1, v/v. Frakcje zawierające produkt odparowano otrzymując 0,1 g (65%) bezbarwnego oleju. Wzór sumaryczny: $C_{26}H_{38}O_5N_2$. Masa cząsteczkowa: 458,60 g/mol.

Etap 2. Synteza estru *tert*-butylowy kwasu (1S,3aS,6aR)-2-((S)-2-amino)-3,3-dimetylobutano)oktahydrocyclopenta[c]pirolowego. 0,1 g produktu z etapu 1 rozpuszczono w 20 mL metanolu. Dodano 0,1 g 10% palladu na węglu. Reakcję prowadzono przez dwie godziny przepuszczając gazowy wodór. Postęp reakcji monitorowano używając chromatografii cienkowarstwowej-TLC. Po zakończeniu reakcji, na lejku z silica żelem oraz celitem odsączono katalizator. Przesącz odparowano. Otrzymano produkt w postaci bezbarwnego oleju o masie 0,07 g (wydajność 100%).

Etap 3. Synteza estru *tert*-butylowy kwasu (1S,3aS,6aR)-2-((S)-2-(2-(4-(2-(benzyloksy)-2-oksyetoksy)fenoksy)acetamido)-3,3-dimetylobutyl)oktahydrocyclopenta[c]pirolowego. Do powstałego w etapie II produktu 0,03 g (0,1 mmol) dodaje się 0,05 g (0,16 mmola) kwas 2-(4-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowy. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropylaoetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml),

dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,03 g (wydajność 57%). Wzór sumaryczny: $C_{35}H_{46}O_8N_2$. Masa cząsteczkowa: 622,76 g/mol.

Etap 4. Synteza kwasu (1*S*,3*aS*,6*aR*)-2-((*S*)-2-(2-(4-(2-(benzyloksy)-2-oksyetoksy)fenoksy)acetamido)-3,3-dimetylobutylo)oktahydrocyklopenta[*c*]pirolowy. W kolbie umieszcza się 0,03 g (0,05 mmol) produktu otrzymanego w etapie 3 i rozpuszcza w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy, jako substrat wyjściowy w następnym etapie syntezy.

Etap 5. Synteza estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-*N*-*D*-(*N*-2-(4-(2-(benzyloksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)acetylo-*L*-tert-butyloglicylo-*L*-dicykloproliło)aminobutanofosfonowego. Do powstałego w etapie IV produktu 0,03 g (0,05 mmol) dodaje się 0,03 g (0,06 mmol) bromowodoru estru di-(4-sulfidometylofenyloвого) kwasu-aminobutylofosfonowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,014 g (0,1 mmol) diizopropyluetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,038 g (0,07 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,025 g (wydajność 53%). Wzór sumaryczny: $C_{49}H_{60}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 946,12 g/mol.

Etap 6. Synteza estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-*N*-*D*-(*N*-2-(4-(karboksymetoksy)fenoksy)acetylo-*L*-tert-butyloglicylo-*L*-dicykloproliło)aminobutanofosfonowego. Otrzymany w etapie V produkt (0,025 g; 0,026 mmol) rozpuszcza się w 33% procentowym roztworze kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Po dwóch godzinach odparowuje się lotne składniki mieszaniny reakcyjnej a powstały olej zalewa się eterem dietylowym. Powstałą mieszaninę przenosi się na próbówki typu falcon i woruje przez 5 min. Czynność powtarza się trzykrotnie. Otrzymany osad rozpuszcza się w mieszaninie acetonitryl/woda i liofilizuje. Otrzymuje się produkt w postaci białego osadu o masie 0,01 g (wydajność: 45%). Wzór sumaryczny: $C_{42}H_{54}O_{10}N_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 856,00 g/mol. $R_f = 0,09$, (eter naftowy: AcOEt, 1:3, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42-7.33 (m, 5H), 7.26-7.08 (m, 8H), 6.88 (s, 4H), 5.26 (s, 2H), 4.84-4.74 (m, 1H), 4.70 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.54-4.44 (m, 3H), 3.80-3.74 (m, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.84-2.76 (m, 1H), 2.47 (s, 6H), 2.10-1.37 (m, 12H), 1.06-0.90 (m, 10H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.67 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{49}H_{60}N_3O_{10}PS_2)Na^+$, 968.3356; znaleziono 968.3360.

P r z y k ł a d 13. Sposób wytwarzania estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-*N*-*D*-(*N*-pirazyloksykarbonylo-*L*-tert-butyloglicylo-*L*-dicykloproliło)aminobutanofosfonowego przedstawionego wzorem 14.

Etap 1–2. Identyczne jak w przykładzie 12.

Etap 3. Synteza estru tert-butyłowy kwasu (1*S*,3*aS*,6*aR*)-2-((*S*)-3,3-dimetylo-2-(pirazyno-2-karboksamid)butano)oktahydrocyklopenta[*c*]pirolowego. Do powstałego w etapie II produktu 0,03 g (0,1 mmol) dodaje się 0,02 g (0,16 mmol) kwasu piperazynowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropyluetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe

suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju o masie 0,02 g (wydajność 46%). Wzór sumaryczny: $C_{23}H_{34}O_4N_4$. Masa cząsteczkowa: 430,55 g/mol. $R_f = 0,31$ (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). HRMS: otrzymano z $(C_{23}H_{34}N_4O_4)Na^+$, 453.2478; znaleziono: 453.2484.

Etap 4. Synteza kwasu (1*S*,3*aS*,6*aR*)-2-((*S*)-2-(((benzyloksy)karbonylo)amino)-3,3-dimetylobutano)oktahydrocyklopenta[*c*]pirolowy. W kolbie umieszcza się 0,02 g (0,05 mmol) produktu otrzymanego w etapie 3 i rozpuszcza w dichlorometanie (5 ml), a następnie dodaje się powoli kwasu trójfuoorooctowego (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy, jako substrat wyjściowy w następnym etapie syntezy.

Etap 5. Synteza estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-*N*-*D*-(*N*-pirazyloksykarbonylo-*L*-tert-butyloglicylo-*L*-dicykloproliło)aminobutanofosfonowego. Do powstałego w etapie 4 produktu 0,02 g (0,05 mmol) dodaje się 0,03 g (0,06 mmola) bromowodorku estru di-(4-sulfidometylofenylowego) kwasu aminobutylofosfonowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczekuje się 2 minuty i dodaje się 0,014 g (0,1 mmol) diizopropylaoetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,038 g (0,07 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,019 g (wydajność 50%). Wzór sumaryczny: $C_{37}H_{48}O_6N_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 753,91 g/mol. $R_f = 0,02$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.40 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.26-7.11 (m, 8H), 7.09-6.98 (m, 1H), 4.86 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.84-4.75 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.85 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.97-2.90 (m, 1H), 2.86-2.79 (m, 1H), 2.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 6H), 2.07-1.89 (m, 3H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.68-1.50 (m, 4H), 1.49-1.41 (m, 1H), 1.06 (s, 9H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.83 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{37}H_{48}N_5O_6PS_2)Na^+$, 776.2681; znaleziono 776.2678.

P r z y k ł a d 14. Sposób wytwarzania estru di-(4-metylosulfidofenyłowy) kwasu 1-*N*-*D*-(*N*-pirazyloksykarbonylo-*L*-cykloheksyloglicylo-*L*-tert-butyloglicylo-*L*-dicykloproliło)aminobutanofosfonowego przedstawionego wzorem 15.

Etap 1–2. Identyczne jak w przykładzie 12.

Etap 3. Synteza estru tert-butyłowego kwasu (1*S*,3*aS*,6*aR*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)acetamido)-3,3-dimetylobutano)oktahydrocyklopenta[*c*]pirolowego. Do powstałego w etapie II produktu 0,03 g (0,1 mmol) dodaje się 0,04 g (0,16 mmola) (*S*)-2-(pirazyno-2-karboksyamido)-2-cykloheksyloglicynę. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczekuje się 2 minuty i dodaje się 0,026 g (0,2 mmol) diizopropylaoetyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,052 g (0,1 mmol) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanem sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju o masie 0,02 g (wydajność 35%). Wzór sumaryczny: $C_{31}H_{47}O_5N_5$. Masa cząsteczkowa: 569,75 g/mol. $R_f = 0,28$ (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). HRMS: otrzymano z $(C_{31}H_{47}N_5O_5)H^+$, 570.3655; znaleziono: 570.3663.

Etap 4. Synteza kwasu (1*S*,3*aS*,6*aR*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)acetamido)-3,3-dimetylobutano)oktahydrocyklopenta[*c*]pirolowego. W kolbie umieszcza się 0,02 g (0,03 mmol) produktu otrzymanego w etapie 3 i rozpuszcza w dichlorometanie (2,5 ml), następnie

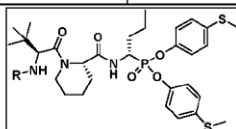
dodaje się powoli kwasu trójfluorooctowego (2,5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały olej służy jako substrat wyjściowy w następnym etapie syntezy.

Etap 5. Sposób wytwarzania estru *di-(4-metylosulfidofenyloxy) kwasu 1-N-D-(N-pirazyloksykarbonylo-L-cykloheksyloglicylo-L-tert-butyloglicylo-L-dicyklopropilo)aminobutanofosfonowego*. Do powstałego w etapie IV produktu 0,02 g (0,03 mmol) dodaje się 0,03 g (0,06 mmola) bromowodorku estru di-(4-sulfidometylofenyloxy) kwasu-aminobutylofosfonowego. Całość rozpuszcza się w DMF (~5 ml). Odczeka się 2 minuty i dodaje się 0,014 g (0,1 mmol) diizopropyletyloaminy. Po 5 minutach dodaje się 0,038 g (0,07 mmola) PyBOP. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się octanem etylu (30 ml). Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodą (50 ml), dwukrotnie 5% roztworem kwasu cytrynowego (10 ml), solanką (10 ml), dwukrotnie 5% roztworem wodorowęglanu sodu (10 ml) i solanką (10 ml). Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowuje się lotne rozpuszczalniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent eter naftowy/octan etylu w stosunku objętościowym 1:1. Po zebraniu frakcji zawierających oczekiwany produkt, lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po liofilizacji przyjmuje formę białego osadu o masie 0,015 g (wydajność 56%). Wzór sumaryczny: $C_{45}H_{61}O_7N_6PS_2$. Masa cząsteczkowa: 893,11 g/mol. $R_f = 0,06$, (eter naftowy: AcOEt, 1:1, v/v). 1H NMR (601 MHz, $CDCl_3$) δ 9.41 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.26-7.07 (m, 8H), 6.75 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.83-4.75 (m, 1H), 4.72 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.79-3.75 (m, 1H), 3.69 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.02-2.95 (m, 1H), 2.82-2.76 (m, 1H), 2.48 (d, $J = 12.9$ Hz, 6H), 2.08-1.88 (m, 4H), 1.82-1.63 (m, 8H), 1.54-1.41 (m, 3H), 1.33-1.22 (m, 4H), 1.17-1.06 (m, 3H), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.94 (s, 9H). ^{31}P NMR (243 MHz, $CDCl_3$) δ 18.52 (s). HRMS: otrzymano z $(C_{45}H_{61}N_6O_7PS_2)Na^+$, 915.3679; znaleziono 915.3679.

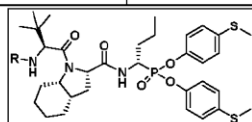
Przykład 15

Aktywność biologiczną peptydowych pochodnych estru di(4-merkaptometylo)fenyloxy kwasu 1-aminobutanofosfonowego o wzorach od II do XV (stosując ich czyste formy diastereoizomeryczne) przebadano pod kątem ich zdolności do hamowania proteolitycznej aktywności proteazy NS3/4A ekspresjonowanej przez ludzki wirus zapalenia wątroby typu C. Wszystkie badania przeprowadzono stosując fluorescencyjny substrat Ac-Asp-Glu-Asp(EDANS)-Glu-Glu-Abu- ψ -[COO]-Ala-Ser-Lys(DABCYL)-NH₂ (wzbudzenie 350 nm, emisja 460 nm). Pomiar przeprowadzono w temperaturze 37°C przy użyciu spektrofлуorymetru płytkowego.

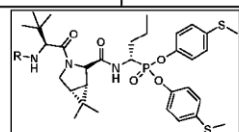
No.	R:	Diastereoizomer	Proteaza NS3/4A	
			Genotyp 1a	Genotyp 1b
			% inhibicji przy $C_i = 100 \mu M$	% inhibicji przy $C_i = 100 \mu M$



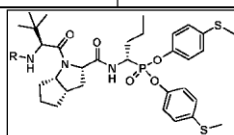
II		S	3	6
III		S	7	8
IV		S	11	13
V		S	11	8



VI		S	4	3
VII		S	5	8
VIII		S	11	13
IX		S	14	12



X		S	4	8
XI		S	19	22
XII		S	28	31



XIII		S	8	4
XIV		S	18	19
XV		S	30	25

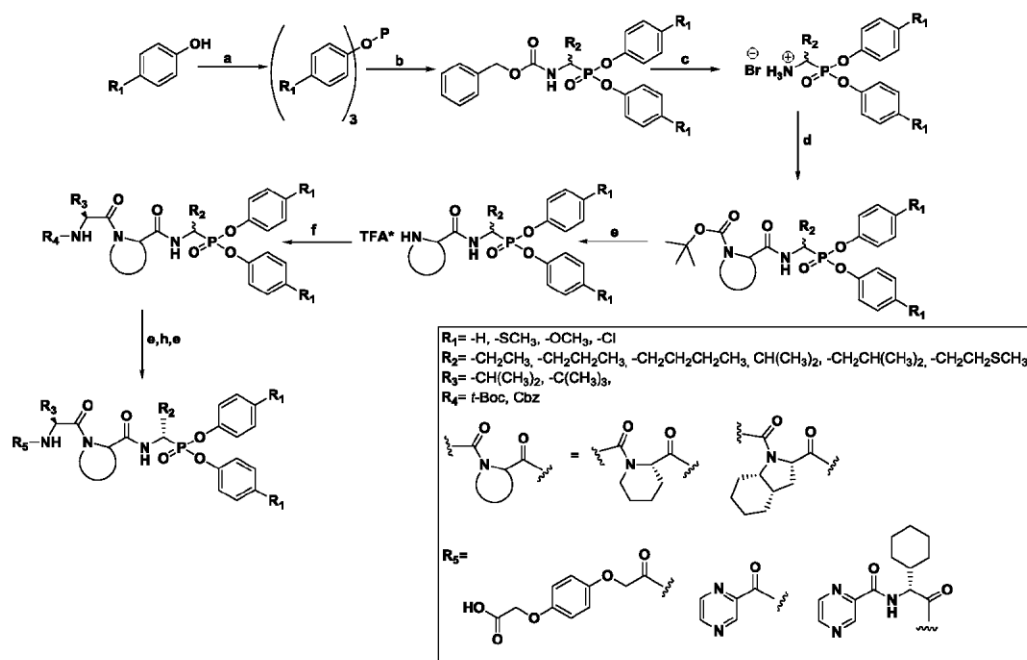
T a b e l a 1. Aktywność biologiczna związków oznaczonych wzorem II–XV względem proteazy NS3/4A genotyp 1a oraz NS3/4A genotyp 1b

Zastrzeżenia patentowe

1. Peptydowe pochodne S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym w którym R_1 oznacza analog proliny: pierścień piperydyny, pierścień oktadehydroindolu, dimetylocyklopropylową pochodną proliny lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna.
2. Sposób wytwarzania peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych przedstawionych wzorami II–IX oraz wzorem ogólnym I, w którym R_1 oznacza analog proliny: pierścień piperydyny, pierścień oktadehydroindolu, R_2 oznacza resztę tert-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna, **znamienny tym**, że fosforyn triarylowy, otrzymany z fenolu para-merkaptometyloвого oraz chlorku fosforu (III) w acetonitrylu, poddaje się amidoalkilowaniu przy użyciu karbaminianu benzylu, fosforynu tri-(4-merkaptometylo)fenylowego oraz aldehydu n-butylowego, w acetonitrylu jako rozpuszczalniku stosując jako katalizator kompleks eteratu kwasu tetrafluoroborowego, po czym prowadzi się syntezę bromowodoru, w której odblokowuje się ochronną grupę benzyloksykarbonylową (Cbz) przy użyciu 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym, w kolejnym etapie otrzymany bromowodorek estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego poddaje się reakcji z proliną z zablokowaną grupą α -aminową a reakcję sprzęgania prowadzi się w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanembenzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i acetonitrylem jako rozpuszczalnikiem, w następnym etapie z otrzymanego fosfonodipeptydu, usuwa się grupę blokującą tert-butyloksykarbonylową (*t*-Boc) przy użyciu 50% roztworu kwasu trójfluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2), po czym odblokowany dipeptyd estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego poddaje się reakcji z tert-butyloglicyną z zablokowaną grupą α -aminową w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanembenzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i acetonitrylem jako rozpuszczalnikiem, ostatnim etapem jest usunięcie grupy tert-butyloksykarbonylowej (*t*-Boc) przy użyciu 50% roztworu kwasu trójfluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2), a otrzymany produkt poddaje się reakcji sprzęgania z trzema różnymi grupami: kwasem pirazynokarboksylowym, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna, w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanembenzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i N,N-dimetyloformamidem jako rozpuszczalnikiem.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w przypadku syntezy pochodnej hydrochinonu prowadzi się finalną deprotekcję estru *tert*-butylowego przy użyciu 50% roztworu kwasu trójfluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2).
4. Sposób wytwarzania peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych przedstawionych wzorami X–XV oraz wzorem ogólnym I, w którym R_1 oznacza analog proliny: dimetylocyklopropyloprolinę lub bicykliczną pochodną proliny, R_2 oznacza resztę *tert*-butyloksykarbonylową, kwasu pirazynokarboksylowego, pochodną hydrochinonu lub dipeptydową pochodną: kwas pirazynokarboksylowy-cykloheksyloglicyna, **znamienny tym**, że uprzednio przygotowany peptydowy fragment poddaje się reakcji sprzęgania z bromowodorkiem estru di(4-merkaptometylo)fenylowego kwasu 1-aminobutanofosfonowego w obecności N,N-diizopropylometyloaminy (DIPEA) oraz heksafluorofosforanembenzotriazol-1-yl-oksytripirolidynofosfonianu (PyBOP) jako odczynnikami sprzęgającym i N,N-dimetyloformamidem jako rozpuszczalnikiem.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w przypadku syntezy pochodnej hydrochinonu prowadzi się deprotekcję estru *tert*-butylowego dla związku o wzorze X przy użyciu 50% roztworu kwasu trójfluorooctowego (TFA) w dichlorometanie (CH_2Cl_2) lub estru benzyloвого dla związku o wzorze XIII przy użyciu 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym.

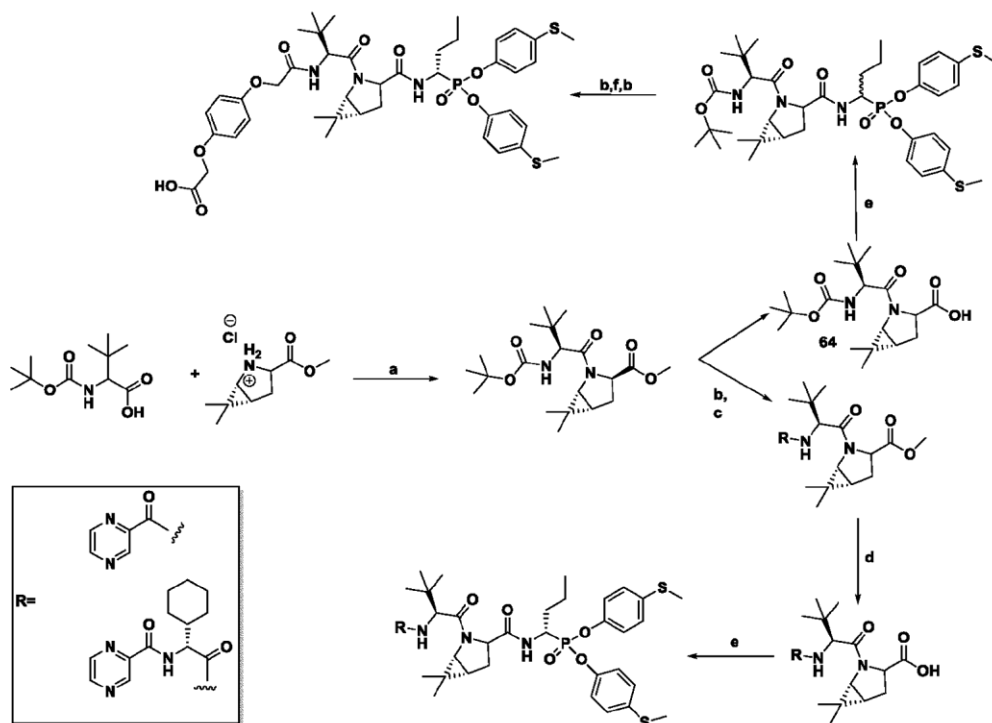
6. Zastosowanie peptydowych pochodnych S-enancjomerów estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I określonych w zastrzeżeniu 1 jako nieodwracalnych inhibitorów proteazy NS3/4A o genotypach 1a oraz 1b.

Rysunki



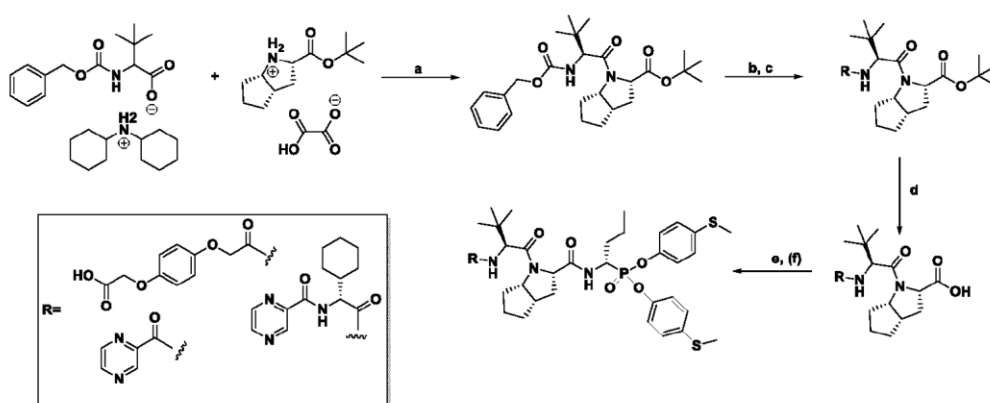
Warunki reakcji: (a) PCl_3 , MeCN, reflux, 4h; (b) karbaminian benzylu, R_2CHO , $HBF_4 \cdot Et_2O$, MeCN, $4^\circ C \rightarrow 22^\circ C$, 6h; (c) 33% $HBr/AcOH$, $22^\circ C$, 2h; (d) N-Boc-L-Pro-OH or Boc-L-Pip-OH or Boc-L-Oic-OH, PyBOP, DIPEA, MeCN, 12h, $22^\circ C$; (e) 50% TFA/DCM (v/v) $22^\circ C$, 2h; (f) R_4 -L-Val-OH or R_4 -L-tert-Leu-OH, PyBOP, DIPEA, MeCN, 12h, $22^\circ C$; (g) kwas 2-(4-(2-(tert-butoxy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowy lub kwas pirazyńowy lub kwas 2-cykloheksylo-2-(pirazyńo-2-karboksyamido)octowy, PyBOP, DIPEA, MeCN, 12h, $22^\circ C$

Fig. 1



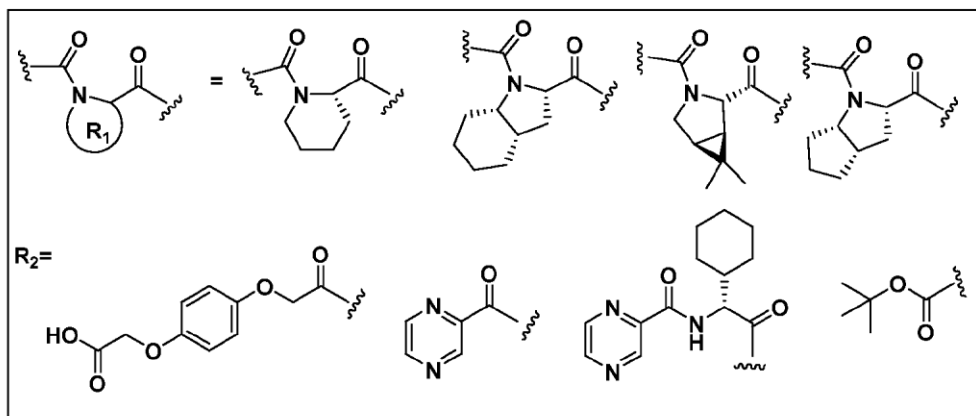
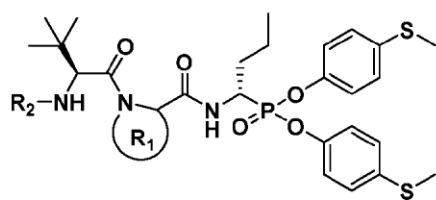
Warunki reakcji: (a) PyBOP, NMM, DCM/DMF 1:1 (v/v), 22°C, 24h; (b) 50% TFA/DCM (v/v) 22°C, 2h; (c) kwas 2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)octowy lub kwas pirazynowy, PyBOP, DIPEA, DMF, 12h, 22°C; (d) LiOH, MeOH/THF/H₂O, 1/1/1, (v/v/v); 22°C, 3h; (e) HBr·H₂N-nVal^P(O-C₆H₄-p-SCH₃)₂, PyBOP, DIPEA, DMF, 12h, 22°C; (f) kwas 2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowy, PyBOP, DIPEA, DMF, 12h, 22°C

Fig. 2

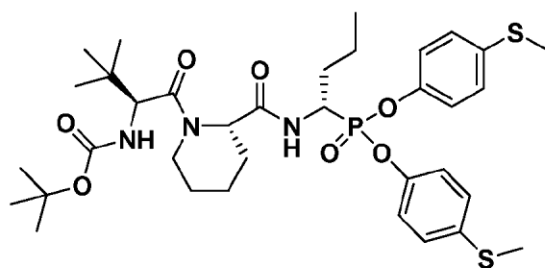


Warunki reakcji: (a) EDC·HCl, HOBT·H₂O, NMM, AcOEt, 24h; (b) Pd/C, H₂, AcOEt, 22 °C; (c) kwas 2-(4-(2-(tert-butoksy)-2-oksoetoksy)fenoksy)octowy lub kwas pirazynowy lub kwas 2-cykloheksylo-2-(pirazyno-2-karboksyamido)octowy, PyBOP, DIPEA, DMF, 12h, 22°C; (d) 50% TFA/DCM (v/v) 22°C, 1h; (e) HBr·H₂N-nVal^P(O-C₆H₄-p-SCH₃)₂, PyBOP, DIPEA, DMF, 12h, 22°C; (f) 33% HBr/AcOH, 22°C, 1h.

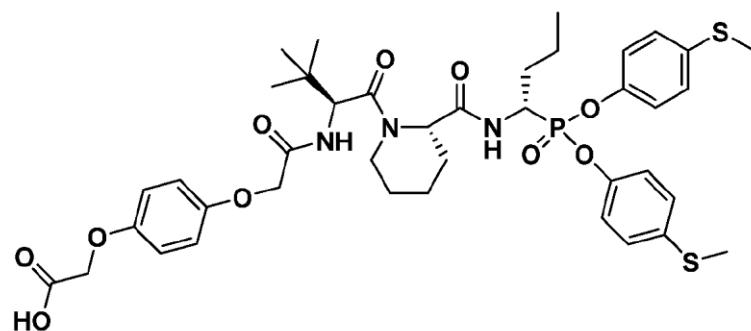
Fig. 3



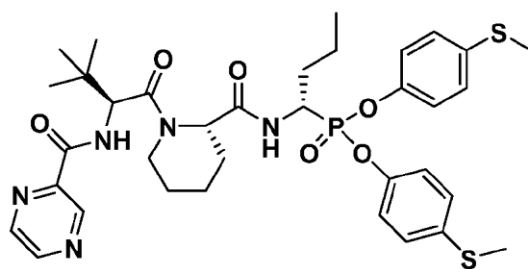
Wzór I



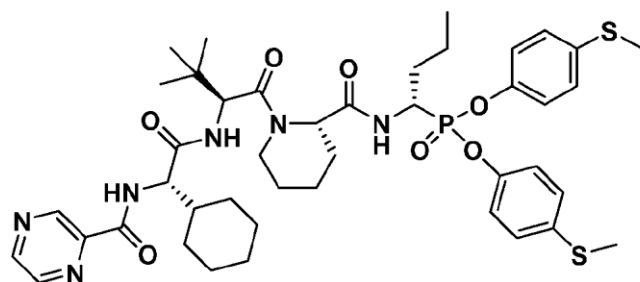
WZÓR II



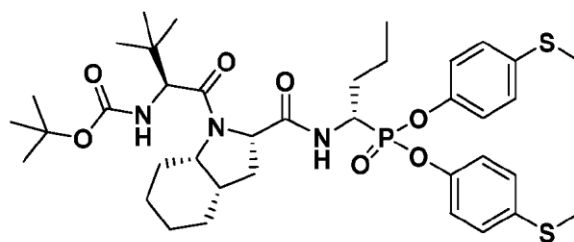
WZÓR III



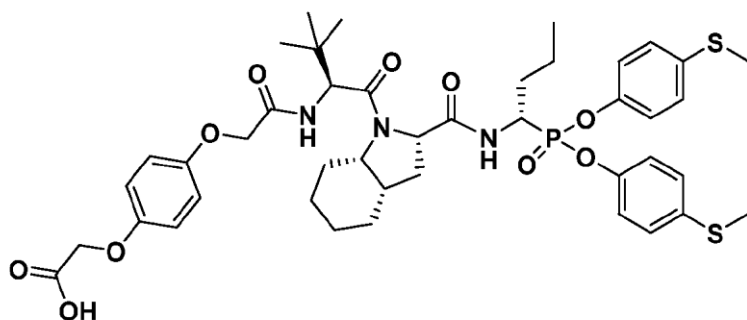
WZÓR IV



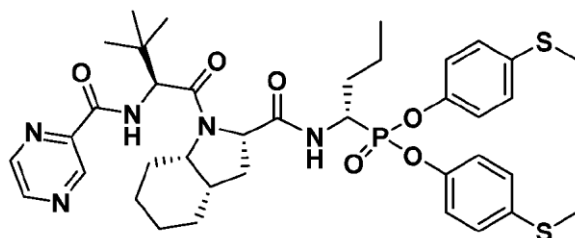
WZÓR V



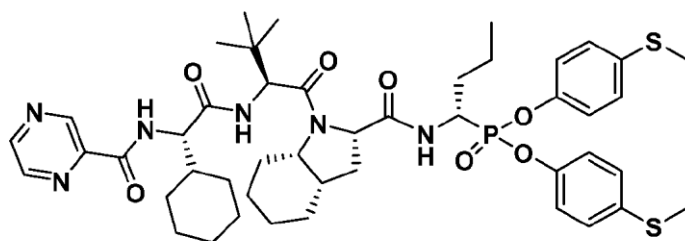
WZÓR VI



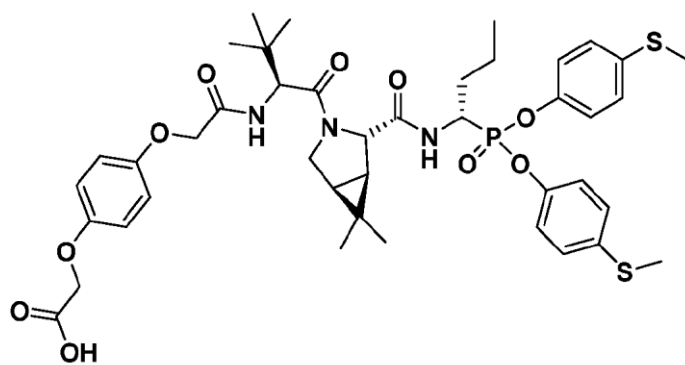
WZÓR VII



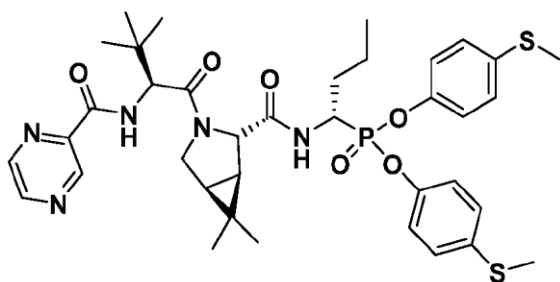
WZÓR VIII



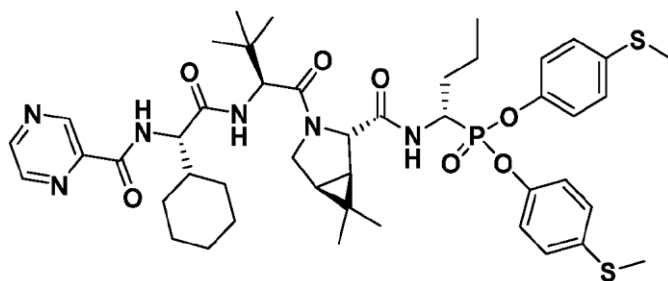
WZÓR IX



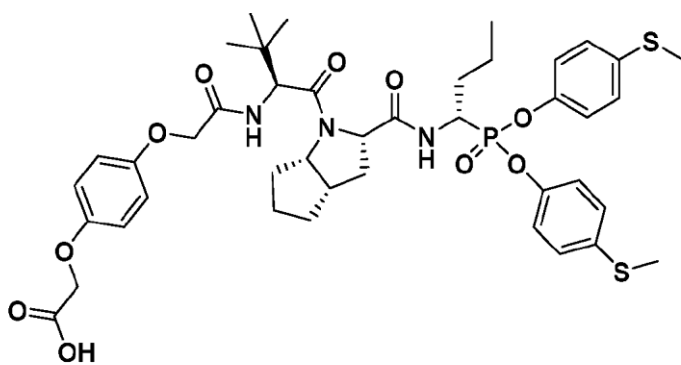
WZÓR X



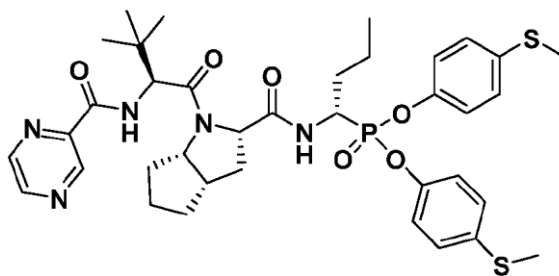
WZÓR XI



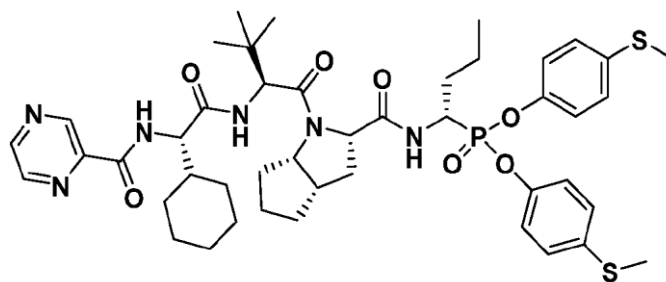
WZÓR XII



WZÓR XIII



WZÓR XIV



WZÓR XV