

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520365

(P2004-520365A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.Cl.⁷

C07D 307/935

A61K 31/343

A61K 31/381

A61K 31/5377

A61P 33/00

F I

C07D 307/935

A61K 31/343

A61K 31/381

A61K 31/5377

A61P 33/00

テーマコード (参考)

4C037

4C063

4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 210 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-557927 (P2002-557927)

(86) (22) 出願日 平成14年1月17日 (2002.1.17)

(85) 翻訳文提出日 平成15年7月8日 (2003.7.8)

(86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000194

(87) 国際公開番号 W02002/057246

(87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)

(31) 優先権主張番号 0101204.6

(32) 優先日 平成13年1月17日 (2001.1.17)

(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(31) 優先権主張番号 60/275,506

(32) 優先日 平成13年3月13日 (2001.3.13)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503245683

アミューラ テラビューティクス リミテッ
ドイギリス, ケンブリッジ シービー 3 7
エージェンシー, パートン ロード, ホリゾン
パーク, インセンタ ハウス

(74) 代理人 100072349

弁理士 八田 幹雄

(74) 代理人 100102912

弁理士 野上 敦

(74) 代理人 100110995

弁理士 奈良 泰男

(74) 代理人 100111464

弁理士 齋藤 悦子

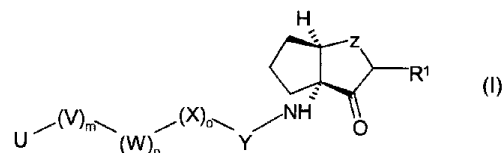
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クルジパインおよび他のシステインプロテアーゼの阻害剤

(57) 【要約】

R^1 、Y、 $(X)_o$ 、 $(W)_n$ 、 $(V)_m$ 、Z及びUは、本明細書に記載されるのと同様の定義である、一般式

(I) の化合物は、クルジパインの阻害剤及び他のシステインプロテアーゼの阻害剤であり、例えば、シャーガス病の、治療剤として、または治療のための標的化合物の確認に有用である。

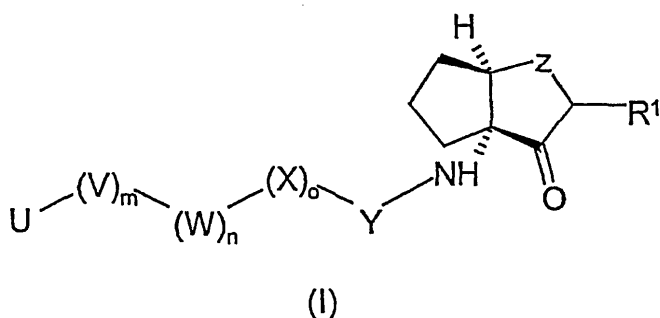


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) の化合物：

【化 1】



10

ただし、 R^1 は、 $C_0 - 7$ - アルキル ($C = 0$ である時は、 R^1 は、単に水素である)、 $C_3 - 6$ - シクロアルキルまたは $Ar - C_0 - 7$ - アルキル ($C = 0$ である時は、 R^1 は、単に芳香族部分 Ar である) であり；

Z は、 O 、 S 、 CR^2R^3 または NR^4 であり、この際、 R^4 は、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキルまたは $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ；

20

R^2 及び R^3 のそれぞれは、独立して、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $O - C_0 - 7$ - アルキル、 $O - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $O - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $S - C_0 - 7$ - アルキル、 $S - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $S - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $NH - C_0 - 7$ - アルキル、 $NH - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $NH - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $N(C_0 - 7 - アルキル)_2$ 、 $N(C_3 - 6 - シクロアルキル)_2$ または $N(Ar - C_0 - 7 - アルキル)_2$ から選ばれ；
 Y は、 $CR^5R^6 - CO$ であり、この際、 R^5 、 R^6 は、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキルまたは $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ；

$(X)_o$ は、 CR^7R^8 であり、この際、 R^7 及び R^8 は、独立して、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル及び $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ、及び、 o は、
 $0 \sim 3$ の数であり；

30

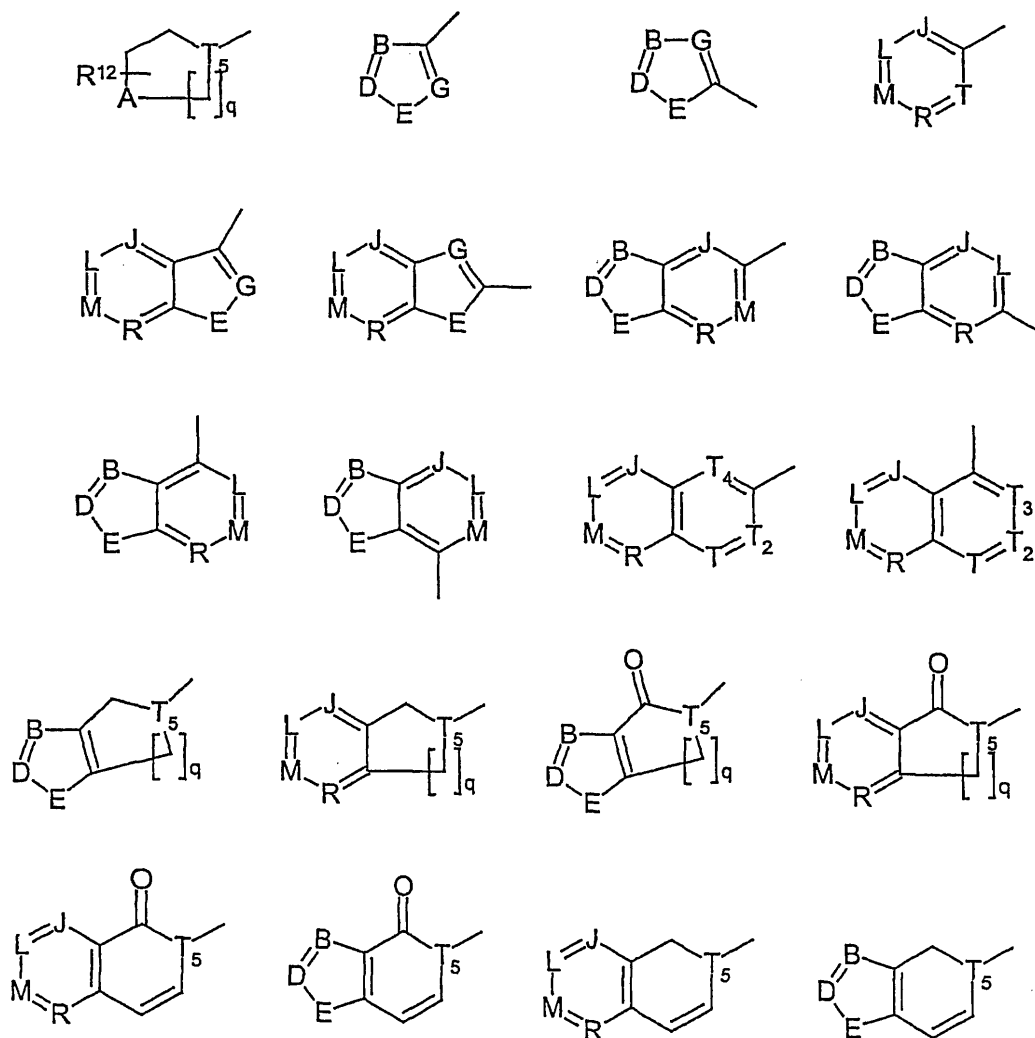
$(W)_n$ は、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $S(O)$ または $S(O)_2$ または NR^9 であり、この際、 R^9 は、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル及び $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ、及び、 n は、 0 または 1 であり；

$(V)_m$ は、 $C(O)$ 、 $C(S)$ 、 $S(O)$ 、 $S(O)_2$ 、 $S(O)_2NH$ 、 $OC(O)$ 、 $NHC(O)$ 、 $NHS(O)$ 、 $NHS(O)_2$ 、 $OC(O)NH$ 、 $C(O)NH$ または $CR^{10}R^{11}$ であり、この際、 R^{10} 及び R^{11} は、独立して、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ、及び、 m は、 $0 \sim 3$ の数であり、 m が 1 より大きい場合には、 $(V)_m$ は、最大 1 個のカルボニルまたはスルホニル基を含み；

40

U は、(下記に詳述されるように) 飽和または不飽和のいずれかであり、 $0 \sim 4$ 個のヘテロ原子を含む、安定した $5 \sim 7$ - 員の一環または安定した $8 \sim 11$ - 員の 2 環であり；

【化 2】



10

20

30

40

ただし、 R^{12} は、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $O - C_0 - 7$ - アルキル、 $O - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $O - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $S - C_0 - 7$ - アルキル、 $S - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $S - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $NH - C_0 - 7$ - アルキル、 $NH - C_3 - 6$ - シクロアルキル、 $NH - Ar - C_0 - 7$ - アルキル、 $N(C_0 - 7 - アルキル)_2$ 、 $N(C_3 - 6 - シクロアルキル)_2$ または $N(Ar - C_0 - 7 - アルキル)_2$ から選ばれる、または基 CHR^{12} 若しくは CR^{12} の一部である際には、 R^{12} は、ハロゲンであってもよい；

A は、 CH_2 、 CHR^{12} 、O、S 及び NR^{13} から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義であり、及び R^{13} は、 $C_0 - 7$ - アルキル、 $C_3 - 6$ - シクロアルキル及び $Ar - C_0 - 7$ - アルキルから選ばれ；

B、D 及び G は、独立して、 CR^{12} から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義である、または N であり；

E は、 CH_2 、 CHR^{12} 、O、S 及び NR^{13} から選ばれ、この際、 R^{12} 及び R^{13} は、上記と同様の定義であり；

J、L、M、R、T、 T_2 、 T_3 及び T_4 は、独立して、 CR^{12} 及び N から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義であり；

T_5 は、CH または N から選ばれ；

q は、1 ~ 3 の数であり、これにより 5 -、6 - または 7 - 員環を規定する。

【請求項 2】

Z は、O、S、NH または CH_2 である、請求項 1 に記載の化合物。

50

【請求項 3】

Z は、 NR^4 であり、この際、 R^4 は、 $\text{Ar}-\text{C}_{1-4}$ -アルキルまたは置換カルボニル若しくはスルホニル基である、請求項 1 に記載の化合物。

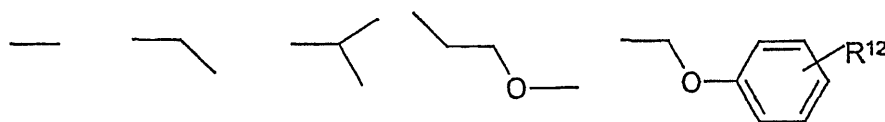
【請求項 4】

R^1 は、 C_{0-7} -アルキルまたは $\text{Ar}-\text{C}_{0-7}$ -アルキルを有する、請求項 1、2 または 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

R^1 は、水素または下記部分：

【化 3】



10

の一から選ばれる、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

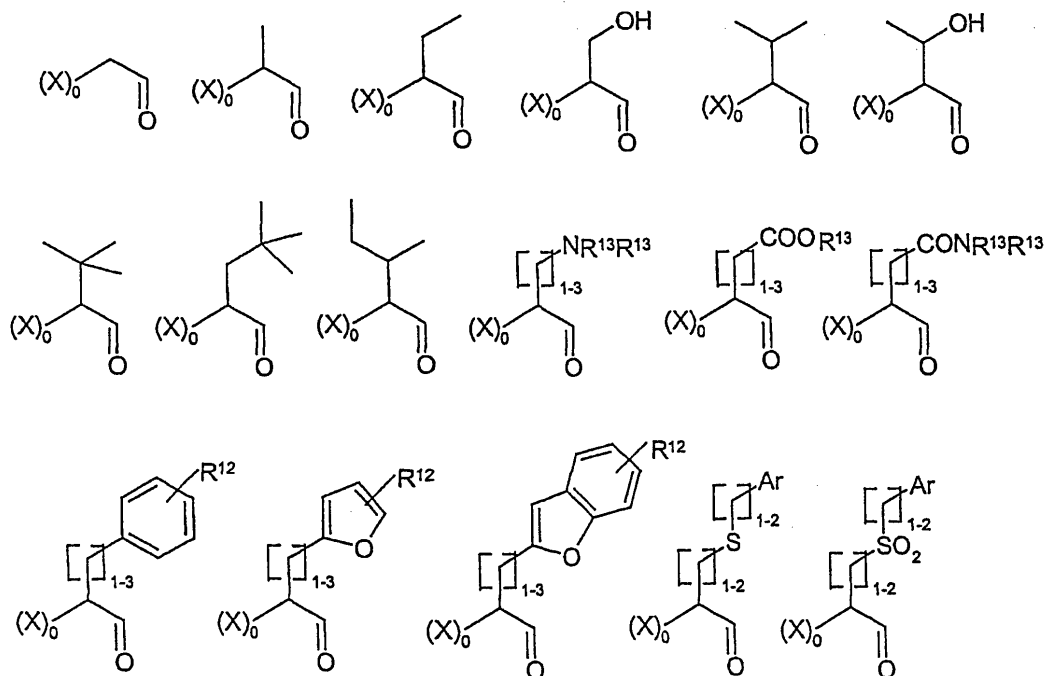
Y は、 $\text{CR}^5\text{R}^6\text{CO}$ であり、この際、 R^5 、 R^6 は、 C_{0-7} -アルキル、 C_{3-6} -シクロアルキルまたは $\text{Ar}-\text{C}_{0-7}$ -アルキルから選ばれる、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 7】

Y は、下記部分：

【化 4】



30

40

ただし、 R^{12} 、 R^{13} 及び Ar は、上記と同様の定義である、の一から選ばれる、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

Y は、 CHR^6CO であり、この際、 R^6 は、 $\text{Ar}-\text{CH}_2$ -であり、この際、芳香族環は、必要であれば置換されてもよいフェニルまたは 1 環式ヘテロ環である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 9】

Y は、 CHR^6CO であり、この際、 R^6 は、単純分岐鎖のアルキル基または直鎖ヘテロアルキル鎖である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

50

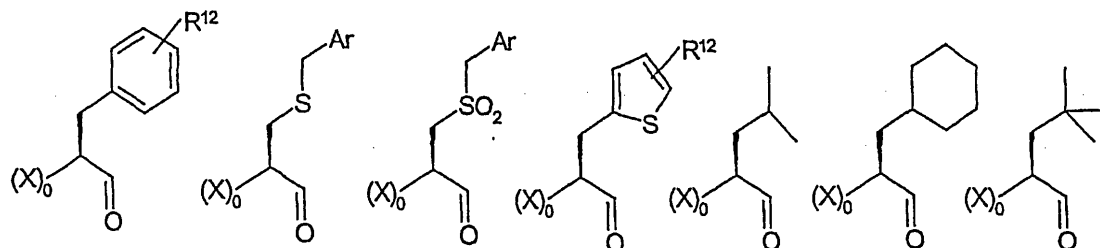
【請求項 10】

Yは、CHR⁶COであり、この際、R⁶は、シクロヘキシルメチルを有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 11】

Y は、以下：

【化 5】



10

ただし、 $R^{1\ 2}$ 及び A_r は、上記と同様の定義である、
から選ばれる、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

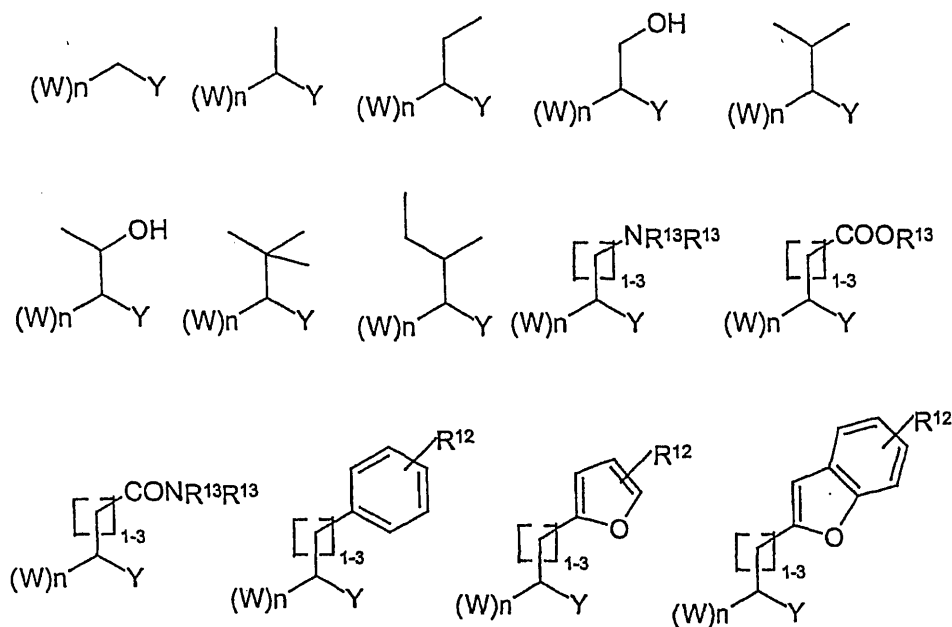
【請求項 12】

基 (X) において、X は、 $\text{C R}^7 \text{ R}^8$ であり、ならびに R^7 及び R^8 は、それぞれ、 C_{0-7} -アルキルまたは $\text{Ar}-\text{C}_{0-7}$ -アルキルから選ばれる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 13】

(X) 。は、下記部分：

【化 6】



30

40

ただし、 $R^{1\ 2}$ 及び $R^{1\ 3}$ は、上記と同様の定義である、
 の一である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 14】

(X)。_oは、単純アルキル基であり、この際、_oは、0または1である、請求項1～11のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 15】

基 $(W)_n$ において:

Wは、O、S、SO₂、SO、C(O)またはNR⁹であり、この際、R⁹は、C₀₋₄ 50

ーアルキルであり；ならびに n は、0 または 1 である、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 16】

基 $(W)_n$ において：

W は、O、S、 SO_2 、 $C(O)$ または NH であり、および n は、0 または 1 である、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 17】

基 $(W)_n$ において：

NH であり、この際、 n は、1 である、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 18】

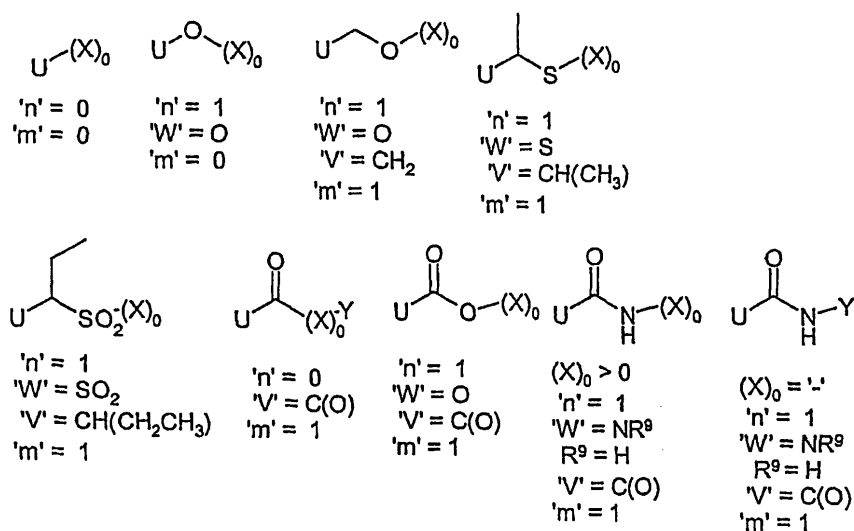
基 $(V)_m$ において：

V は、 $C(O)$ 、 $C(O)NH$ または CHR^{11} であり、この際、 R^{11} は、 C_{0-4} - アルキルであり；および m は、0 または 1 である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 19】

$(V)_m$ 及び $(W)_m$ の組み合わせは、下記：

【化 7】



の一である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 20】

$(V)_m$ 及び $(W)_m$ の組み合わせは、請求項 19 で示される初めの 8 個の構造の一である、請求項 19 に記載の化合物。

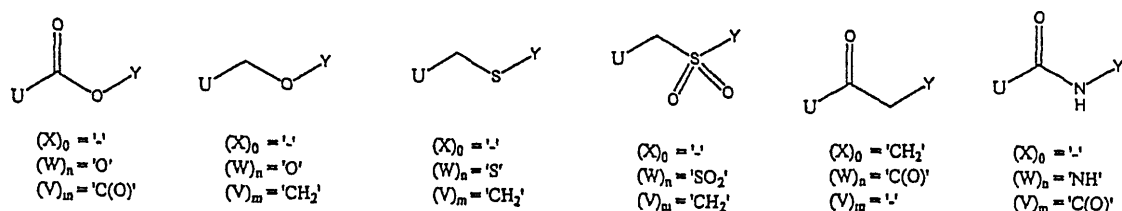
【請求項 21】

$(V)_m$ 及び $(W)_m$ の組み合わせは、請求項 19 で示される 9 番目の構造である、請求項 19 に記載の化合物。

【請求項 22】

$(X)_0$ 、 $(V)_m$ 及び $(W)_m$ の組み合わせは、下記：

【化 8】



10

20

30

40

50

の一である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物。

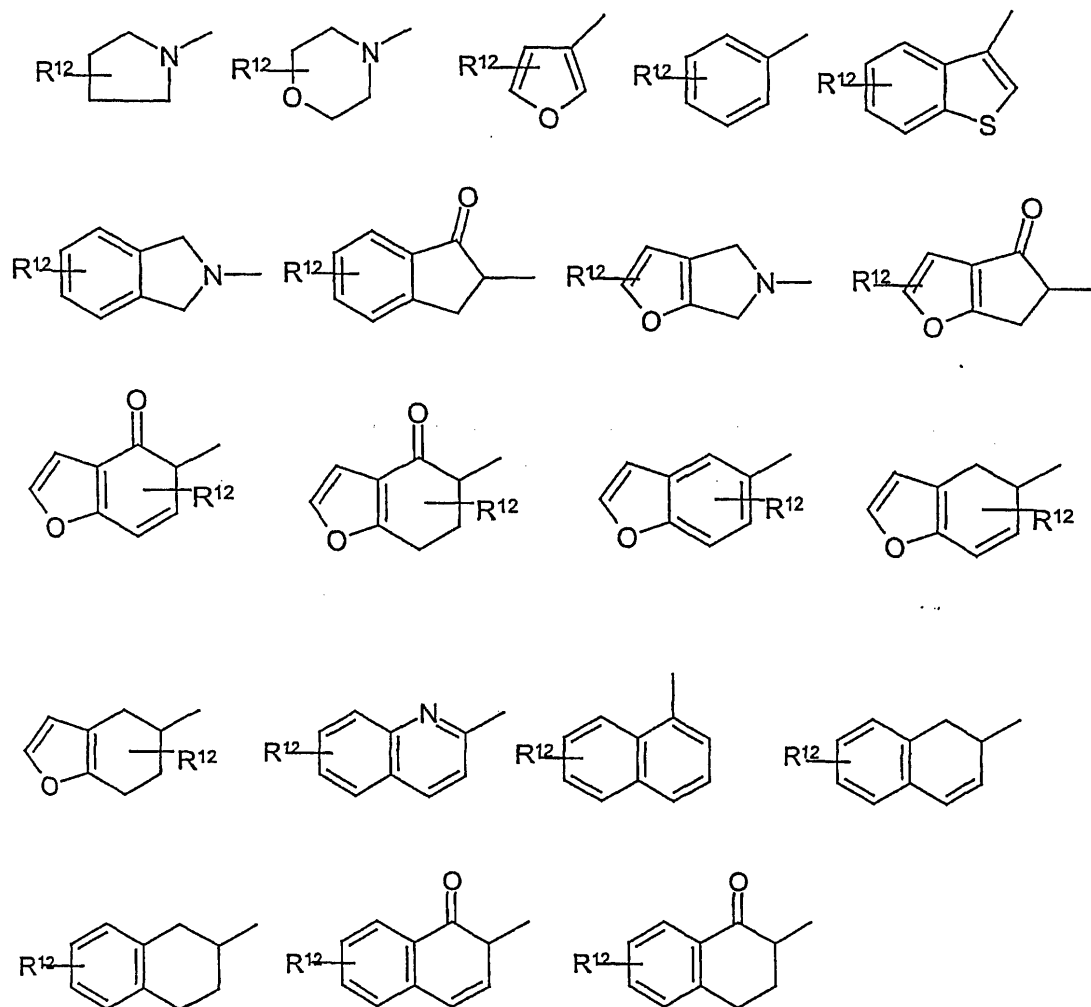
【請求項 23】

U は、必要であれば置換されてもよい 5-若しくは 6-員の飽和若しくは不飽和ヘテロ環または必要であれば置換されてもよい飽和若しくは不飽和の 9-若しくは 10-員のヘテロ環を有する、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 24】

U は、下記：

【化 9】



10

20

30

ただし、R¹² は、上記と同様の定義である、
の一を有する、請求項 23 に記載の化合物。

【請求項 25】

U は、アリール Ar のパラ位に嵩高いアルキルまたはアリール基を有する、請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の化合物。 40

【請求項 26】

U は、メタまたはパラ-2 アリール Ar-Ar を有し、この際、Ar は、上記と同様の定義である、請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

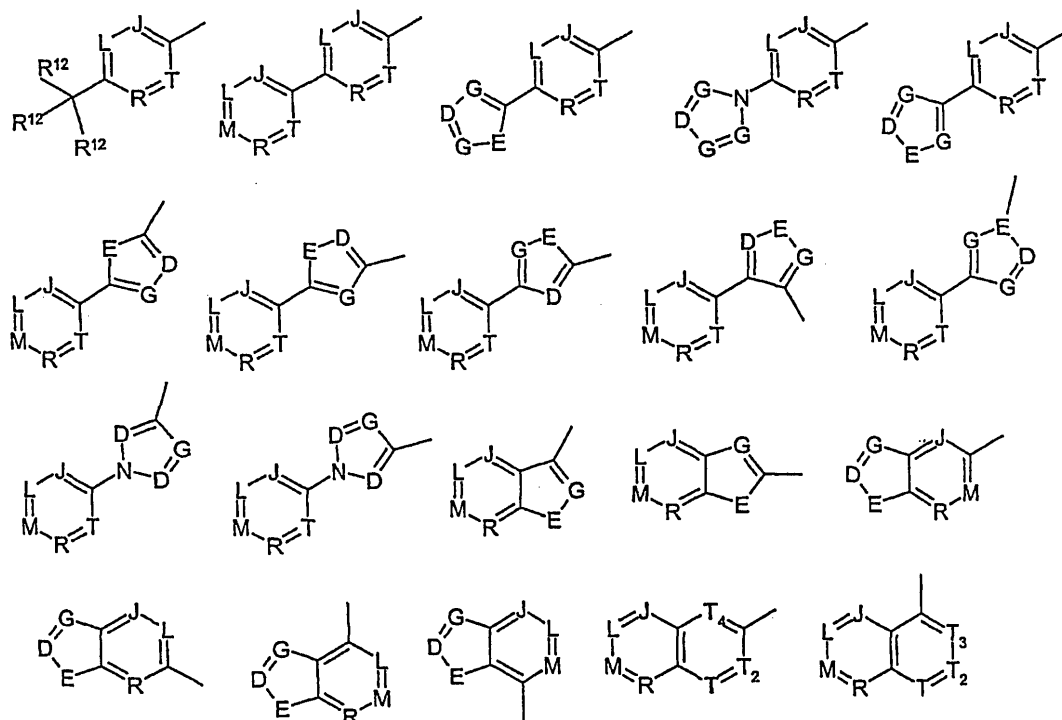
【請求項 27】

U は、6, 6 または 6, 5 または 5, 6-融合芳香環を有する、請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 28】

U は、下記基：

【化 10】



10

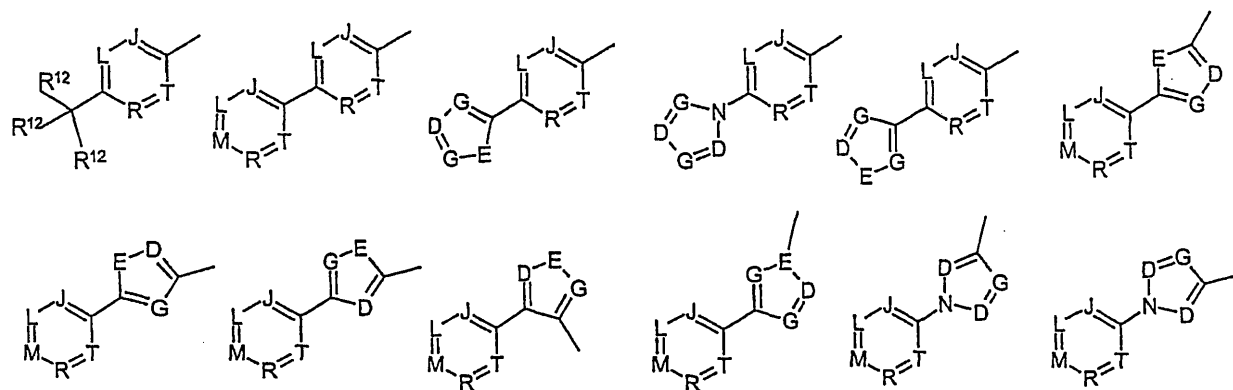
20

ただし、 R^{12} 、D、E、G、J、L、M、R、T、 T_2 、 T_3 及び T_4 は、上記と同様の定義である、
を表す、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 29】

U は、下記基：

【化 11】



30

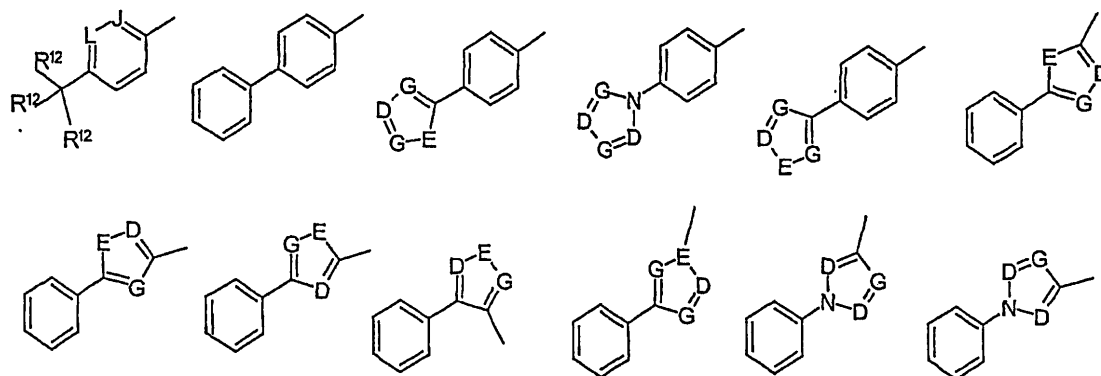
40

ただし、 R^{12} 、D、E、G、J、L、M、R 及び T は、上記と同様の定義である、
を表す、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 30】

U は、下記基：

【化 1 2】



10

ただし、R^{1 2}、D、E、G、J及びLは、上記と同様の定義である、
を表わす、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 3 1】

(a) 単離された既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼへの請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物のインビトロでの結合を評価して、「潜在性」の基準を提供し；さらに必要であれば下記段階：

(b) 標的の及び一般的なハウスキーピングプロテアーゼ（例えば、トリプシン）の密接に関連する相同性プロテアーゼへの請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の結合を評価して、「選択性」の基準を提供する；

(c) 請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の存在下での、特定のシステインプロテアーゼ活性の細胞に基づく機能性マーカーをモニターする；および

(d) 請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の存在下での、特定のシステインプロテアーゼ活性の動物モデルに基づく機能性マーカーをモニターする、
の一以上を有する、治療のための標的としての既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼ阻害剤の確認方法。

20

【請求項 3 2】

治療のための標的としての既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼ阻害剤の確認における請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

30

【請求項 3 3】

特に、病気の状態がシステインプロテアーゼを阻害することによって修飾される病気を予防または処置することを目的として、医薬に使用される請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 3 4】

病気の状態がシステインプロテアーゼを阻害することによって修飾される病気を予防または処置するための医薬の調製における請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 3 5】

シャーガス病の予防または処置に使用される請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物。

40

【請求項 3 6】

シャーガス病の予防または処置に使用される請求項 25～30 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 3 7】

シャーガス病を予防または処置するための医薬の調製における請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 3 8】

シャーガス病を予防または処置するための医薬の調製における請求項 25～30 のいずれ

50

か 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 39】

請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の一以上の化合物及び製薬上または獣医学上許容できる担体を含む薬剤または獣医薬組成物。

【請求項 40】

例えば、混合によって、活性化合物を担体と組み合わせて取り入れることを有する、請求項 39 に記載の薬剤または獣医薬組成物の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロテアーゼクルジパイン(protease cruzipain)、トリパノソーマ クルージ寄生虫(Trypanosoma cruzi parasite)の遺伝子産物の阻害剤である化合物に関するものである。特に、本発明は、トリパノソーマ クルージ(Trypanosomacruzi)感染の治療のための処置に有用である化合物、これらの化合物の使用、およびこれらを含む薬剤組成物を提供するものである。さらに、本発明は、広範なシステインプロテアーゼの阻害剤である化合物、これらの化合物の使用、およびこれらを含む薬剤組成物に関するものである。このような化合物は、システインプロテアーゼが関与する病気の治療のための処置に有用である。

【背景技術】

【0002】

トリパノソーマ科の寄生虫は、ヒト及び動物の健康管理にかなりの世界的な衝撃がある(McKerrow, J. H., et al, Ann. Rev. Microbiol. 47, 821-853, 1993)。この科の寄生虫の一つである、トリパノソーマ クルージ(Trypanosomacruzi)は、ラテン及び南アメリカで毎年 2000 万人を超える人々に罹患し、これらの地域で心臓病の主要な原因であり、毎年、45,000 人を超える人を死亡させる、シャーガス病の原因物質である(疾患制御センター(Centers for Disease Control)及び予防ウェブサイト(prevention website))。加えて、田舎から都会への感染集団の移動ならびに南及び中央アメリカから北アメリカへの移動の増加に伴って、感染が輸血を介して、及び誕生時に広がっている。トリパノソーマ クルージ(Trypanosomacruzi)感染で選択される現在の処置剤である、ニフルティモックス(nifurtimox)及びベンズニダゾール(benznidazole) (NADH フマル酸レダクターゼ阻害剤, Turrens, JF, et al, Mol Biochem Parasitol., 82(1), 125-9, 1996) が最も中等度にうまくいっており、感染急性期に約 60% の治癒を達成している(一般的な討論に関して、Docampo, R. Curr. Pharm. Design, 7, 1157-1164, 2001 を参照) が、心筋障害が関連する心不全がしばしば起こる慢性期には全く処方されていない(Kirchhoff, L. V. New Engl. J. Med., 329, 639-644, 1993)。加えて、これらの 2 種の薬は、重篤な悪い毒性効果があり、処置中細かい医学的な監視を必要とし、シャーガス病の乳児に染色体の損傷を誘導することが示された(Gorla, N. B. et al, Mutat. Res. 206, 217-220, 1988)。したがって、トリパノソーマ クルージ(Trypanosomacruzi)感染症の化学療法処置に有効な新規な薬剤に対する強い医療面での必要性がある。

【0003】

従来、感染疾患の定着または伝播に重要であることが知られている酵素の同定は、アンチウィルス(例えば、HIV アスパルチルプロテアーゼ阻害剤)及び抗菌(例えば、 β -ラクタム系抗生物質)等の良好な薬剤の開発を助けてきた。寄生虫感染における同様の弱点に関する調査により、多くの酵素が試験された(例えば、寄生虫のジヒドロ葉酸レダクターゼ、Chowdhury, S. F. et al, J. Med. Chem., 42(21), 4300-4312, 1999 を参照; トリパノチオンレダクターゼ(trypanothionereductase)、Li, Z. et al, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11(2), 251-254, 2001 を参照; 寄生虫のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、Aranov, A. M. et al, J. Med. Chem., 41(24), 4790-4799, 1998 を参照)。特に顕著な研究領域としては、寄生虫の寿命中に重要な役割を果たす、寄生虫によってコードされる、システインプロテアーゼの役割の同定がある(McKerrow, J. H., et al, Bioorg. Me

10

20

30

40

50

d. Chem., 7, 639-644, 1999)。現在まですべての遺伝子産物の約2%を構成する生物分子のかなりの群由来のプロテアーゼが、幾つかのゲノム配列決定プログラムの分析後に同定された（例えば、Southan, C. J. Pept. Sci, 6, 453-458, 2000を参照）。プロテアーゼは、天然で見出される無数のタンパク質内のペプチドアミド結合の切断によってこれらの効果を仲介する、広範な生物学的プロセスに参与するように展開してきた。この加水分解作用は、正確にプロテアーゼ触媒部位内にある切断に関する結合を並べる、タンパク質によって発揮される特定の3次元の電子表面を、まず認識した後、これに結合することによって行なわれる。次に、触媒による加水分解は、プロテアーゼ自身のアミノ酸側鎖を介して、またはプロテアーゼに結合し、これによって活性化される水分子の作用のいずれかにより切断されるアミド結合の求核性アタックにより開始する。アタックする求核試薬が Cys 残基のチオール側鎖であるプロテアーゼは、システインプロテアーゼとして知られている。「システインプロテアーゼ」の一般的な分類は、ウィルス、細菌、原生動物、植物及び真菌から哺乳動物までの広範な生物にわたって見出される多くのものを含む。

【0004】

トリパノソーマ クルージ感染の生物学的な調査によって、寄生虫のライフサイクルの継続に重要である数多くの特定の酵素が明らかになった。このような酵素の一つである、クルジパイン(cruzipain)、カテプシンL様システインプロテアーゼは、シャーガス病の処置を目的とする明らかな治療標的である((a)Cazzulo, J. J. et al, Curr. Pharm. Des. 7, 1143-1156, 2001; (b) Caffrey, C. R. et al, Curr. Drug Targets, 1, 155-162, 2000)。寄生虫のライフサイクルにおけるクルジパインの正確な生物学的な役割は不明なままであるが、エピマスチゴート発達段階におけるクルジパインmRNAの上昇はリソソーム様ベシクルにおける宿主分子の栄養分解での役割を示す(Engel, J. C. et al, J. Cell. Sci, 111, 597-606, 1998)。実行可能な治療標的としてのクルジパインの確認は、複雑さのレベルが増して達成された。一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤である、Z-Phe-Ala-FMKをトリパノソーマ クルージが感染した哺乳動物細胞培養物に添加すると、寄生虫の複製及び分化が遮断され、これにより寄生虫のライフサイクルが停止する(Harth, G., et al, Mol. Biochem. Parasitol. 58, 17-24, 1993)。トリパノソーマ クルージが感染したマウス動物モデルにおけるビニルスルホン系阻害剤の投与は、マウスを致命的な感染から救うのみでなく、完全に回復させた(Engel, J. C. et al, J. Exp. Med, 188(4), 725-734, 1998)。多くの他のインビボでの研究によって、メジャーリーシュマニア(Leishmaniamajor)(Selzer, P. M. et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., 96, 11015-11022, 1999)、マンソン住血吸虫(Schistosoma mansoni)及び熱帯熱マラリア原虫(Plasmodiumfalciparum)(Olson, J. E. et al, Bioorg. Med. Chem., 7, 633-638, 1999)等の別の寄生虫による感染がシステインプロテアーゼ阻害剤による処置によって停止または治癒されることが確認された。

【0005】

様々な合成方法が、クルジパイン阻害剤の設計について記載されてきた。しかしながら、トリパノソーマ クルージ感染症の処置を目的として生物学的な「プルーフオブプリンシプル(proof-of-principle)」を提供するものの、現在の阻害剤は、それらの臨床での開発を妨げる多くの生化学的及び物理的な性質を示す（例えば、(a)Brinen, L. S. et al, Structure, 8, 831-840, 2000, peptidomimetic vinylsulphones, possible adverse mammalian cell toxicity (McKerrow, J. H. and Engel, J. unpublished results cited in Scheidt, K. A. et al, Bioorg. Med. Chem, 6, 2477-2494, 1998を参照) ; (b) Du, X. et al, Chem. Biol., 7, 733-742, 2000, aryl ureas, generally with low μ M activity, and high ClogP values, thus poor aqueous solubility and probably low oral bioavailability; (c) Roush, W. R. et al, Tetrahedron, 56, 9747-9762, 2000, peptidyl epoxysuccinates, irreversible inhibitors, with potent activity versus house-keeping mammalian proteases such as cathepsin B; (d) Li, R. et al, Bioorg. Med. Chem. 4(9), 1421-1427, 1996, bisarylacylhydrazides and chalcones, polyhydroxylated aromatics; (e) US6143931, WO 9846559, non-peptide α -ketoamidesを参照)。今日までの多く

の異なる酵素阻害方法のうち、クルジパインプロテアーゼ阻害剤のみがトリパノソーマクルージ感染の病気関連動物モデルを治癒するのに有効であることが分かっている。したがって、潜在性、選択性、低毒性及び最適化された薬物動態パラメーターの望ましい組み合わせを有するより有効なクルジパイン阻害剤の発見による、ヒトへの使用に適する、臨床上的候補へのこれらの「ブルーフーオブプリンシプル(proof-of-principle)」知得を続けることが明らかに医療上必要である。

【0006】

クルジパイン及び多くの他の重要な寄生虫プロテアーゼは、パパイン様C A C 1 科に属し、密接な構造上の哺乳動物の相同性を有する。システインプロテアーゼは、3次元構造での類似性またはプロテアーゼ1次配列内の触媒残基の保存配列に基づいて「クラン」に分類される。加えて、「クラン」はさらに、各プロテアーゼがプロテアーゼ活性に応答できる部分を構成するアミノ酸配列の部分を比較すると他のものとの統計学的に有意な関係を共有する「科」に分類される(徹底的な討論については、Barrett, A. J. et al, in 'Handbook of Proteolytic Enzymes', Eds. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., 及び Woessner, J. F. Publ. Academic Press, 1998を参照)。今日まで、システインプロテアーゼは5種のクラン、C A、C B、C C、C D及びC Eに分類される(Barrett, A. J. et al, 1998)。トロピカルパパイアフルーツである「パパイン」のプロテアーゼは、クランC Aの基礎を形成し、これは、現在、より多くのものが現在のゲノム配列決定の努力により予想されて、様々な配列データベースで80種を超える別の完全な登録を有する。クランC A / 科C 1のプロテアーゼ、例えば、カテプシンK (骨粗鬆症)、カテプシンS (自己免疫疾患)、カテプシンL (転移)等のヒトのプロテアーゼまたはファルシパイン(falcipain) (マラリア原虫 熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum))、クルジパイン (トリパノソーマ クルージ感染)等の寄生虫のプロテアーゼは、多数の病気のプロセスにかかわりがある。最近、細菌のプロテアーゼ、スタフィロパイン(staphylopain) (S. aureus感染)がまた、試験的にクランC Aに分類された。X線結晶構造が、ある範囲の阻害剤、例えば、パパイン (PDB登録、1 pad、1 pe 6、1 pip、1 pop、4 pad、5 pad、6 pad、1 ppp、1 the、1 csb、1 huc)、カテプシンK (1 au 0、1 au 2、1 au 3、1 au 4、1 atk、1 mem、1 bgo、1 ayw、1 ayu)、カテプシンL (1 cs 8)、カテプシンS (現在、待機中であるが、McGrath, M. E. et al, Protein Science, 7, 1294-1302, 1998で公表された)、クルザイン(cruzain) (クルジパインの組換え形態、Eakin, A. E. et al, 268(9), 6115-6118, 1993を参照) (1 ewp、1 aim、2 aim、1 F 2 9、1 F 2 A、1 F 2 B、1 F 2 C)、スタフィロパイン(staphylopain) (1 cv 8)と複合したある範囲の上記プロテアーゼで利用できる。各構造は、これらの「クラン」及び「科」の分類によって予想されるように、同様の全体の活性部位のトポロジーを示し、このような構造の類似性は、ヒトへの使用に適するクルジパインの選択的な阻害剤を発見するのに伴われる困難性の一概念を具体化する。しかしながら、各C A C 1プロテアーゼの活性部位溝の深さ及び複雑な形状の点での微妙な相違が明らかであり、これは選択的な阻害剤設計で開発されてもよい。加えて、C A C 1科プロテアーゼの多くの現在の基質による阻害剤複合体は、阻害剤の潜在性に有意に寄与する、阻害剤及びプロテアーゼバックボーン間の一連の保存された水素結合を示す。主に2座水素結合がプロテアーゼG l y 6 6 (C=O) / 阻害剤N-H及びプロテアーゼG l y 6 6 (NH) / 阻害剤(C=O)の間で観察され、この際、阻害剤(C=O)及び(NH)は阻害剤内のS 2サブサイト結合要素を構成するアミノ酸残基N H C H R C Oによって提供される(プロテアーゼ結合部位の命名の記載に関しては、Berger, A. and Schechter, I. Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.], 257, 249-264, 1970を参照)。アスパルギンまたはアスパルギン酸のプロテアーゼ主鎖(C=O) (1 5 8 ~ 1 6 3、残基の番号はプロテアーゼによって異なる)及び阻害剤(N-H)間のさらなる水素結合が多くの場合観察され、この際、阻害剤(N-H)は、阻害剤内のS 1サブサイト結合要素によって提供される。ゆえに、モチーフX - N H C H R C O - N H - Yが、C A C 1プロテアーゼの従来の基質に基づく阻害剤の中で広範に観察される。

【0007】

従来技術では、ヒトに使用されるシステインプロテアーゼ阻害剤の開発が、近年、活発に行なわれる領域であった。CA C1科のものを考慮すると、ペプチド及びペプチド様(peptidomimetic)のニトリル(例えば、WO-A-0109910、WO-A-0051998、WO-A-0119816、WO-A-9924460、WO-A-0049008、WO-A-0048992、WO-A-0049007、WO-A-0130772、WO-A-0055125、WO-A-0055126、WO-A-0119808、WO-A-0149288、WO-A-0147886を参照)、直鎖及び環状ペプチド及びペプチド様ケトン(例えば、Veber, D. F. andThompson, S. K., Curr. Opin. Drug Discovery Dev., 3(4), 362-369, 2000、WO-A-0170232、WO-A-0178734、WO-A-0009653、WO-A-0069855、WO-A-0029408、WO-A-0134153からWO-A-0134160、WO-A-0029408、WO-A-9964399、WO-A-9805336、WO-A-9850533を参照)、ケトヘテロ環(例えば、WO-A-0055144、WO-A-0055124を参照)およびモノバクタム(例えば、WO-A-0059881、WO-A-9948911、WO-A-0109169を参照)の使用により、ヒトのカテプシン、主にカテプシンK(骨粗鬆症)、カテプシンS(自己免疫疾患)及びカテプシンL(転移)の阻害剤の開発が特に強調されてきた。従来技術では、潜在的なインビトロでの阻害剤が記載されるが、ヒトの治療剤を開発する上での多くの困難も明らかにされた。例えば、WO-A-9850533及びWO-A-0029408には、環状ケトンに言及し、パパイ

ン科のプロテアーゼ、及び最も好ましい実施態様としては、カテプシンKを特に参照してシステインプロテアーゼの阻害剤である化合物が記載される。WO-A-9850533には、良好な経口生物学的利用能を有するカテプシンKの潜在的な阻害剤として文献後に詳述される化合物が記載される(Witherington, J., 'Tetrahydrofurans as Selective cathepsin KInhibitors', RSC meeting, Burlington House, London, 1999)。WO-A-9850533の化合物は、テトラヒドロフランカルボニル及び活性部位触媒性システイン残基間の可逆的な共有結合の形成によりカテプシンKに結合することが報告された(Witherington, J., 1999)。加えて、同様の環状ケトン化合物が、特にファルシパインの阻害によるマラリアの処置について、寄生虫病に関連するシステインプロテアーゼの阻害剤の広範な説明の一部として、WO-A-9953039に記載される。しかしながら、後の文献では、WO-A-9850533の環状ケトン化合物は、阻害剤の生理化学的な性質、 α -アミノケトンキラル中心のキラル安定性が劣っていることにより、さらなる開発または十分な薬物動態評価には不適切であることが記載される(Marquis, R. W. et al, J. Med. Chem., 44(5), 725-736, 2001)。WO-A-0069855には、特にカテプシンSの阻害に関する環状ケトンについても言及される化合物が記載される。WO-A-0069855の化合物は、環状ケトン環系の α -炭素に向上したキラル安定性を提供する環状ケトン環系の β -置換基の存在により、WO-A-9850533の化合物より進歩していると考えられる。低いキラル保全性の問題を解決しようとして、後の文献では、WO-A-9850533に記載されるのに密接に関連する環状ケトン群が提供され、ここでは、阻害剤の潜在性の約300倍の損失が不安定な α -プロトンの代わりにアルキル基を導入すると観察された(Marquis, R. W. et al, J. Med. Chem., 44, 1380-1395, 2001)。加えて、後の文献では、WO-A-9850533に記載される環状ケトン群では、 α (S)-異性体は、 α (R)-異性体に比べて10~80倍より潜在的であることが示された(Fenwick, A. E. et al, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 199-202, 2001)。

【発明の開示】

【0008】

ここで、一般式(I)で規定される、特定の化合物がトリパノソーマ クルージ感染症の処置に有用である潜在的かつ選択的なクルジパインプロテアーゼ阻害剤であることを発見した。一般式(I)で規定される他の化合物は、広範なCA C1システインプロテアーゼのプロテアーゼ阻害剤であり、システインプロテアーゼによって引き起こされる病気の

処置に有用な化合物である。一般式 (I) で記載される化合物は、R-立体配置（または Z = 'S' の場合には、S-立体配置）の、 α -アルキル基を含むが、驚くべきことに、一般式 (I) で規定される化合物は良好な潜在性を保持する。本発明は、一般式 (I) で規定される置換された (3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) アルキルアミド、(3aS, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] チオフェン-3a-イル) アルキルアミド、(3aR, 6aS) N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3a-イル) アルキルアミドまたは (3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] ピロール-3a-イル) アルキルアミド化合物を提供するものである。

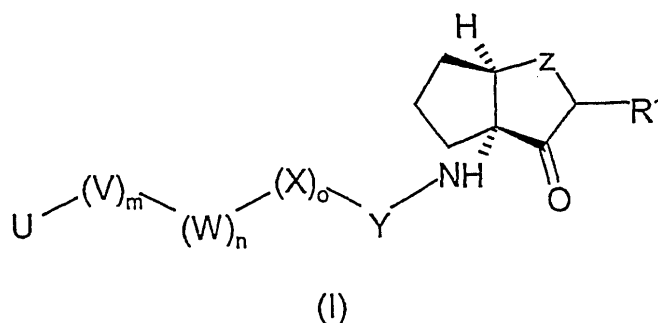
【0009】

10

したがって、本発明の第一の態様は、一般式 (I) の化合物を提供するものである。

【0010】

【化1】



20

ただし、 R^1 は、 C_0-7 -アルキル ($C=0$ である時は、 R^1 は、単に水素である)、 C_3-6 -シクロアルキルまたは $Ar-C_0-7$ -アルキル ($C=0$ である時は、 R^1 は、単に芳香族部分 Ar である) であり；

Z は、O、S、 CR^2R^3 または NR^4 であり、この際、 R^4 は、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキルまたは $Ar-C_0-7$ -アルキルから選ばれ；

R^2 及び R^3 のそれぞれは、独立して、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキル、 $Ar-C_0-7$ -アルキル、 $O-C_0-7$ -アルキル、 $O-C_3-6$ -シクロアルキル、 $O-Ar-C_0-7$ -アルキル、 $S-C_0-7$ -アルキル、 $S-C_3-6$ -シクロアルキル、 $S-Ar-C_0-7$ -アルキル、 $NH-C_0-7$ -アルキル、 $NH-C_3-6$ -シクロアルキル、 $NH-Ar-C_0-7$ -アルキル、 $N(C_0-7-アルキル)_2$ 、 $N(C_3-6-シクロアルキル)_2$ または $N(Ar-C_0-7-アルキル)_2$ から選ばれ；

30

Y は、 CR^5R^6-CO であり、この際、 R^5 、 R^6 は、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキルまたは $Ar-C_0-7$ -アルキルから選ばれ；

(X)_o は、 CR^7R^8 であり、この際、 R^7 及び R^8 は、独立して、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキル及び $Ar-C_0-7$ -アルキルから選ばれ、及び、o は、0~3 の数であり；

(W)_n は、O、S、C(O)、S(O) または S(O)₂ または NR^9 であり、この際、 R^9 は、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキル及び $Ar-C_0-7$ -アルキルから選ばれ、及び、n は、0 または 1 であり；

40

(V)_m は、C(O)、C(S)、S(O)、S(O)₂、S(O)₂NH、OC(O)、NHC(O)、NHS(O)、NHS(O)₂、OC(O)NH、C(O)NH または $CR^{10}R^{11}$ であり、この際、 R^{10} 及び R^{11} は、独立して、 C_0-7 -アルキル、 C_3-6 -シクロアルキル、 $Ar-C_0-7$ -アルキルから選ばれ、及び、m は、0~3 の数であり、m が 1 より大きい場合には、(V)_m は、最大 1 個のカルボニルまたはスルホニル基を含み；

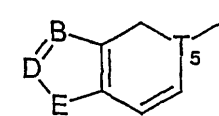
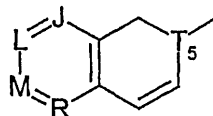
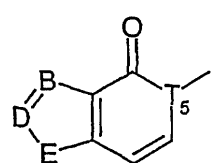
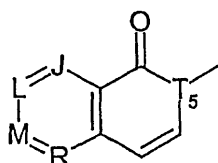
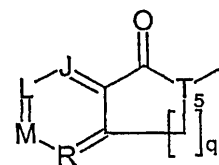
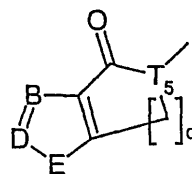
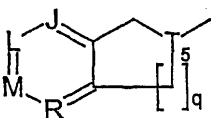
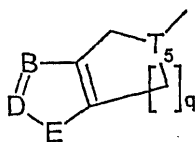
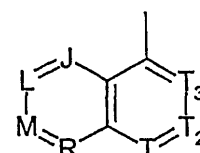
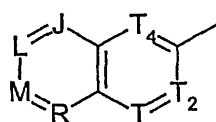
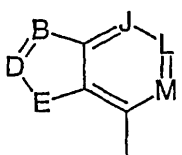
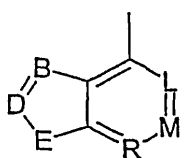
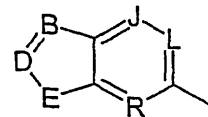
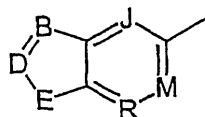
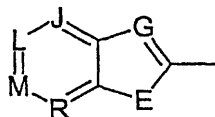
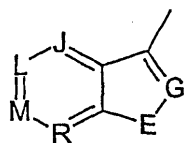
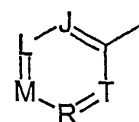
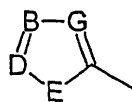
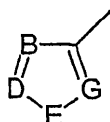
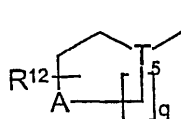
U は、(下記に詳述されるように) 飽和または不飽和のいずれかであり、0~4 個のヘテロ原子を含む、安定した 5~7 員の一環または安定した 8~11 員の 2 環であり

50

;

【 0 0 1 1 】

【 化 2 】



ただし、 R^{12} は、 $C_0 - 7$ -アルキル、 $C_3 - 6$ -シクロアルキル、 $Ar - C_0 - 7$ -アルキル、 $O - C_0 - 7$ -アルキル、 $O - C_3 - 6$ -シクロアルキル、 $O - Ar - C_0 - 7$ -アルキル、 $S - C_0 - 7$ -アルキル、 $S - C_3 - 6$ -シクロアルキル、 $S - Ar - C_0 - 7$ -アルキル、 $NH - C_0 - 7$ -アルキル、 $NH - C_3 - 6$ -シクロアルキル、 $NH - Ar - C_0 - 7$ -アルキル、 $N(C_0 - 7 -アルキル)_2$ 、 $N(C_3 - 6 -シクロアルキル)_2$ または $N(Ar - C_0 - 7 -アルキル)_2$ から選ばれる、または基 CHR^{12} 若しくは CR^{12} の一部である際には、 R^{12} は、ハロゲンであってもよい；

A は、 CH_2 、 CHR^{12} 、O、S 及び NR^{13} から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義であり、及び R^{13} は、 $C_0 - 7$ -アルキル、 $C_3 - 6$ -シクロアルキル及び $Ar - C_0 - 7$ -アルキルから選ばれ；

B、D 及び G は、独立して、 CR^{12} から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義である、または N であり；

E は、 CH_2 、 CHR^{12} 、O、S 及び NR^{13} から選ばれ、この際、 R^{12} 及び R^{13} は、上記と同様の定義であり；

J、L、M、R、T、 T_2 、 T_3 及び T_4 は、独立して、 CR^{12} 及び N から選ばれ、この際、 R^{12} は、上記と同様の定義であり；

T_5 は、CH または N から選ばれ；

10

20

30

40

50

q は、1～3 の数であり、これにより 5-、6-または 7-員環を規定する。

【0012】

B、D、G、J、L、M、R、T、 T_2 、 T_3 及び T_4 は、さらに、N-オキシド (N→O) を表わしてもよい。

【0013】

本発明は、本発明の化合物のすべての塩、水和物、溶媒和化合物、複合体及びプロドラッグを包含する。「化合物」ということばは、特記しない限り、このようなすべての塩、水和物、溶媒和化合物、複合体及びプロドラッグを包含するものとする。

【0014】

一般式 (I) の化合物の適当な製薬上または獣医学上許容できる塩としては、有機酸、特に、以下に制限されないが、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、乳酸塩、グルコン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、パントテン酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、酪酸塩、ジグルコン酸塩、シクロペントネート、グルコヘプタネート、グリセロリン酸塩、シュウ酸塩、ヘプタノエート、ヘキサン酸塩、フマル酸塩、ニコチネート、パルモエート、ペクチネート、3-フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、ラクツビオネート (lactobionate)、ピボレート (pivolate)、樟脳酸塩、ウンデカン酸塩及びコハク酸塩などの、カルボン酸、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、樟脳スルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-クロロベンゼンスルホン酸塩、及び p-トルエンスルホン酸塩等の、有機スルホン酸；ならびに塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、ヘミスルフェート、チオシアン酸塩、過硫酸塩、リン酸塩及びスルホン酸塩等の、無機酸の塩が挙げられる。

【0015】

プロドラッグは、インビボで一般式 (I) の活性のある親薬剤を放出する共有結合化合物である。プロドラッグは、例えば、(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) アルキルアミド、(3aS, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] チオフェン-3a-イル) アルキルアミド、(3aR, 6aS) N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3a-イル) アルキルアミドまたは (3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] ピロロール-3a-イル) アルキルアミド足場に存在する環外ケトン官能性を有するアセタールまたはヘミアセタール誘導体を構成してもよい。キラル中心または他の形態の異性体中心が本発明の化合物に存在する際には、鏡像異性体及びジアステレオ異性体等の、すべての形態のこのような一つの異性体または複数の異性体は、本発明に包含される。キラル中心を含む本発明の化合物はラセミ混合物、鏡像異性体が多く含まれる混合物として使用されてもよい、またはラセミ混合物を既知の技術を用いて分離して、個々の鏡像異性体を単独で使用してもよい。

【0016】

本明細書で適用する際の「ハロゲン」は、F、Cl、Br、I を含むことを意味する。

【0017】

本明細書で適用する際の「ヘテロ原子」は、O、S 及び N を含むことを意味する。

【0018】

本明細書で適用する際の「 C_{0-7} -アルキル」は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、ヘプチル及びこれらの単純異性体等の 0 (即ち、単純に水素) ～7 炭素原子を有する安定した直鎖及び分岐鎖の脂肪族炭素鎖を含むことを意味する。加えて、 C_{0-7} -アルキルは、必要であれば、1、2 または 3 個のハロゲン原子 (上記定義と同様) でいずれかの位置で置換されて、例えば、トリフルオロメチル置換基を形成してもよい。さらに、 C_{0-7} -アルキルは、一以上のヘテロ原子 (上記定義と同様) を有して、例えば、エーテル、チオエーテル、スルホン、スルホンアミド、置換アミン、アミジン、グアニジン、カルボン酸、カルボキサミドを形成してもよい。ヘテロ原子が鎖の末端に位置する際には、1

または2個の水素原子で適当に置換される。ヘテロ原子またはハロゲンは、 $C_0 - 7$ -アルキルが最小限1個の炭素原子を含む際にのみ存在する。

【0019】

本明細書で適用する際の「 $C_1 - 7$ -アルキル」は、最小限1個の炭素を有する置換基を記載する以外は（上記と同様の定義の） $C_0 - 7$ -アルキルの定義を包含することを意味する。

【0020】

本明細書で適用する際の「 $C_3 - 6$ -シクロアルキル」は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の環状炭素をさらに含む「 $C_0 - 7$ -アルキル」のいずれかのバリエーションを含むことを意味する。環状炭素は、必要であれば、一以上のハロゲン（上記定義と同様）またはヘテロ原子（上記定義と同様）で置換されて、例えば、テトラヒドロフラン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジンまたはモルホリン置換基を形成してもよい。

10

【0021】

本明細書で適用する際の「 $Ar - C_0 - 7$ -アルキル」は、さらに芳香環部分「 Ar 」を含む $C_0 - 7$ -アルキルのいずれかのバリエーションを含むことを意味する。芳香環部分 Ar は、一般式（I）におけるUで前記したのと同様、不飽和である安定した5-若しくは6-員の一環または安定した9若しくは10員の2環であってもよい。芳香環部分 Ar は、（一般式（I）におけるUで前記したのと同様） R^{1-4} で置換されてもよい。置換基 $Ar - C_0 - 7$ -アルキルで $C=O$ である場合には、置換基は単に芳香環部分 Ar である。

20

【0022】

アルキル及びシクロアルキル等のことばを含む他の表現は、上記定義に従って解されるものとする。例えば、「 $C_1 - 4$ -アルキル」は、1～4個の炭素原子を含む以外は $C_0 - 7$ -アルキルと同様である。

【0023】

異なる構造の異性体が存在する、および／または一以上のキラル中心が存在する際には、すべての異性体の形態を包含するものと解する。鏡像異性体は、これらのキラル中心の絶対配置によって特徴が明らかであり、Cahn, Ingold and PrelogのR-及びS-配列規則によって記載される。このような規則は当該分野においてよく知られている（例えば、‘Advanced Organic Chemistry’, 3rd edition, ed. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985を参照）。

30

【0024】

一般式（I）の好ましい化合物としては、以下に制限されないが、下記を単独であるいは組み合わせてなるものがある：

Zは、O、S、NHまたは CH_2 である。

【0025】

加えて、一般式（I）の好ましい化合物としては、以下に制限されないが、下記を単独であるいは組み合わせてなるものがある：

Zは、 NR^4 であり、この際、 R^4 は、 $Ar - C_1 - 4$ -アルキルまたは置換カルボニル若しくはスルホニル基である。

40

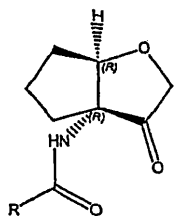
【0026】

ゆえに、好ましい化合物の例としては、以下に示されるように、（3aR, 6aR）N-（3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イル）アルキルアミド、（3aS, 6aR）N-（3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]チオフェン-3a-イル）アルキルアミド、（3aR, 6aS）N-（3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3a-イル）アルキルアミドまたは（3aR, 6aR）N-（3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-3a-イル）アルキルアミド2環部分を含むものがある。

【0027】

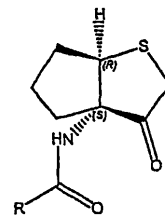
50

【化 3】



(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ

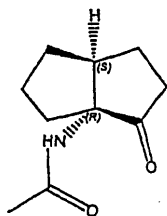
[b] フラン-3a-イル) アルキルアミド



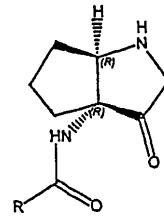
(3aS, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ

[b] チオフェン-3a-イル) アルキルアミド

10



(3aR, 6aS) N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3a-イル) アルキルアミド



(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ

[b] ピロール-3a-イル) アルキルアミド

20

一般式 (I) の化合物において、 R^1 が $C_0 - 7$ -アルキルまたは $Ar - C_0 - 7$ -アルキルを有することが好ましい。ゆえに、例えば、好ましい R^1 部分としては、水素または直鎖若しくは分岐鎖アルキル鎖、または直鎖若しくは分岐鎖ヘテロアルキル鎖、または必要であれば置換されてもよいアリールアルキル鎖、または必要であれば置換されてもよいアリールヘテロアルキル鎖がある。

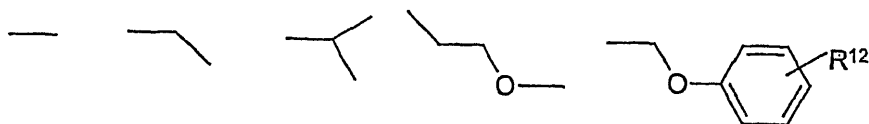
【0028】

R^1 が水素または $C_1 - 4$ -アルキルまたは $Ar - C_1 - 4$ -アルキルであることが特に好ましく、このような R^1 置換基の例としては、以下に制限されないが、下記がある。

【0029】

30

【化 4】



ただし、 R^{12} は、上記と同様の定義である。

【0030】

40

一般式 (I) の好ましい化合物において、Y は、 $CH R^6 CO$ であり、この際、 R^6 は、 $C_0 - 7$ -アルキルまたは $Ar - C_0 - 7$ -アルキルから選ばれ、例えば、水素、直鎖若しくは分岐鎖アルキル鎖、直鎖若しくは分岐鎖ヘテロアルキル鎖、必要であれば置換されてもよいアリールアルキル鎖または必要であれば置換されてもよいアリールヘテロアルキル鎖がある。加えて、一般式 (I) の好ましい化合物においては、 R^6 は、 $C_3 - 6$ -シクロアルキルから選ばれ、例えば、シクロヘキシルメチルがある。

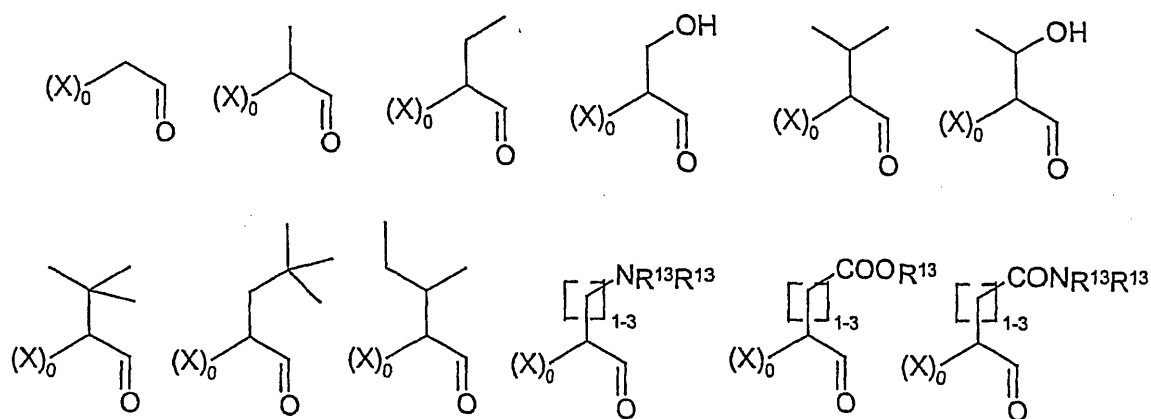
【0031】

好ましい Y 置換基の例としては、下記が挙げられる。

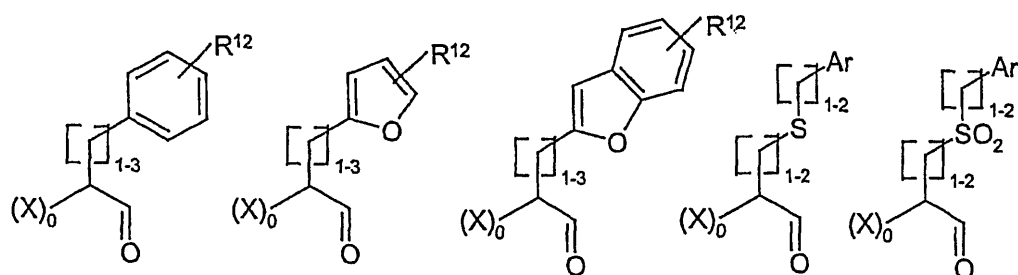
【0032】

【化 5】

50



10



20

ただし、 R^{12} 、 R^{13} 及び Ar は、上記と同様の定義である。

【0033】

より好ましい R^6 基としては、 OH 、 $NR^{12}R^{13}$ 、 $COOR^{13}$ 、若しくは $CONR^{13}$ で置換されてもよい、 C_{1-4} -アルキルまたはアリール基が R^{12} で置換されてもよい、シクロアルキルメチル若しくは $Ar-C_{1-4}$ -アルキルがある；この際、 R^{12} 及び R^{13} は、それぞれ独立して、上記と同様の定義である。

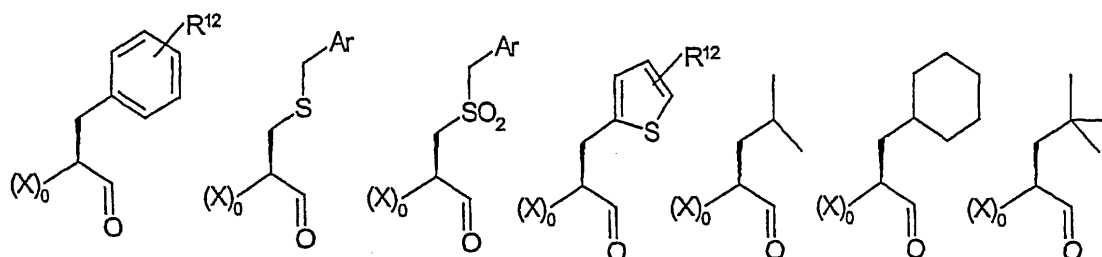
【0034】

さらにより好ましい R^6 基は、 $Ar-CH_2-$ を有し、この際、芳香環は、必要であれば置換されてもよいフェニルまたは1環式ヘテロ環である。加えて、さらにより好ましい R^6 基は、イソブチル等の単純分岐鎖アルキル基またはベンジルスルファニルメチルまたはベンジルスルホニルメチル等の直鎖のヘテロアルキル鎖を有する。さらに、より好ましい R^6 基は、シクロヘキシルメチルを有する。より好ましい Y 置換基の例としては、下記がある。

30

【0035】

【化6】



40

ただし、 R^{12} 及び Ar は、上記と同様の定義である。

【0036】

基 $(X)_0$ において、 R^7 及び R^8 は、それぞれ、 C_{0-7} -アルキルまたは $Ar-C_{0-7}$ -アルキル、例えば、水素、直鎖若しくは分岐鎖アルキル鎖、直鎖若しくは分岐鎖ヘ

50

テロアルキル鎖、必要であれば置換されてもよいアリールアルキル鎖または必要であれば置換されてもよいアリールヘテロアルキル鎖から選ばれることが好ましい。

【0037】

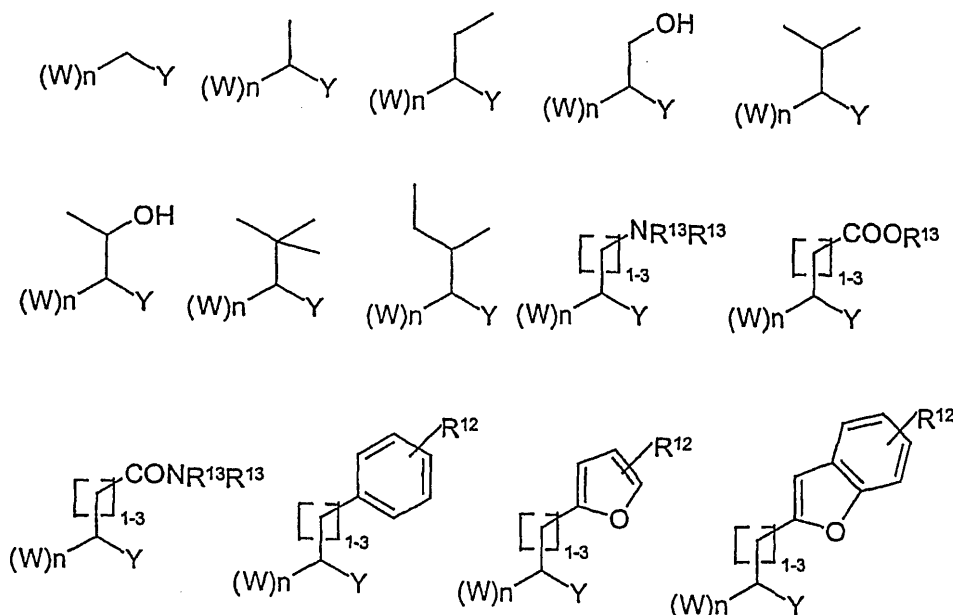
より好ましい(X)。基は、水素から選ばれる R^7 を有する； R^8 は、OH、 $NR^{13}R^{13}$ 、 $COOR^{13}$ 、若しくは $CONR^{13}$ で置換されてもよい、 C_{1-4} -アルキル；またはアリール基は R^{12} で置換されてもよい、 $Ar-C_{1-4}$ -アルキルであり、この際、 R^{12} 及び R^{13} は、それぞれ独立して、上記と同様の定義である。

【0038】

好ましい(X)。基の例としては、下記がある：

【0039】

【化7】



ただし、 R^{12} 及び R^{13} は、上記と同様の定義である。

【0040】

一般式(I)のさらにより好ましい化合物は、メチレン等の単純アルキル基である(X)。基を有し、この際、 α は、0または1である。

【0041】

基 $(W)_n$ において、Wは、好ましくは、O、S、 SO_2 、 $S(O)$ 、 $C(O)$ または NR^9 であり、この際、 R^9 は、 C_{0-4} -アルキルであり；及びnは、0または1である。

【0042】

一般式(I)のより好ましい化合物は、nは0または1であるO、S、 SO_2 、 $C(O)$ 及びNHとして規定される $(W)_n$ 基を有する。

【0043】

一般式(I)のさらにより好ましい化合物は、nは1であるNHとして規定される $(W)_n$ 基を有する。

【0044】

基 $(V)_m$ において：

Vは、好ましくは $C(O)$ 、 $C(O)NH$ または CHR^{11} であり、この際、 R^{11} は、 C_{0-4} -アルキルであり；およびmは0または1である。

【0045】

一般式(I)に包含される好ましいV及びW置換基の組み合わせとしては、以下に制限されないが、以下が挙げられる。

【0046】

10

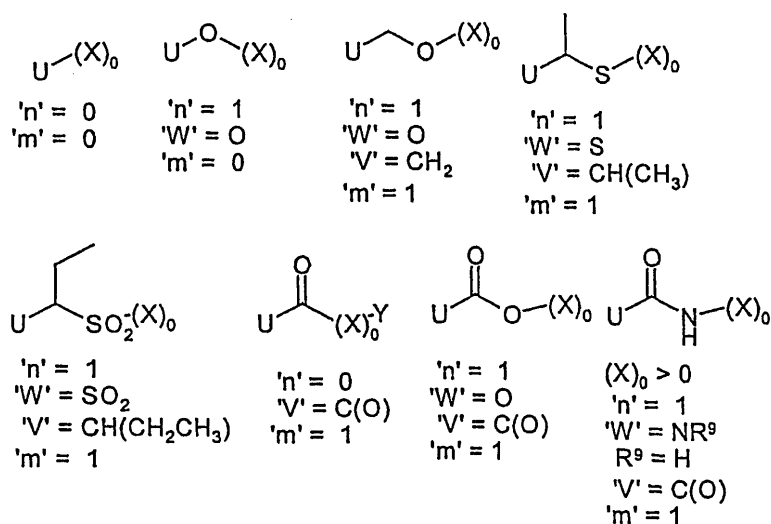
20

30

40

50

【化 8】



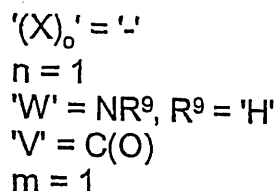
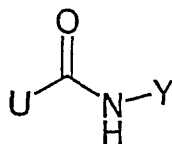
10

加えて、一般式（I）に包含される好ましいV及びW置換基の組み合わせとしては、以下に制限されないが、以下が挙げられる。

【0047】

【化 9】

20

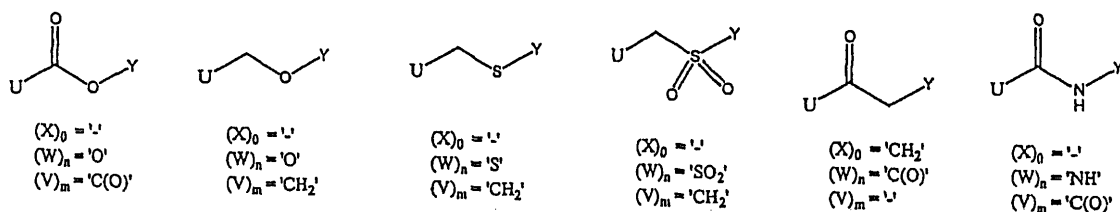


30

一般式（I）に包含されるより好ましいV、W及びX置換基の組み合わせとしては、以下に制限されないが、以下が挙げられる。

【0048】

【化 10】



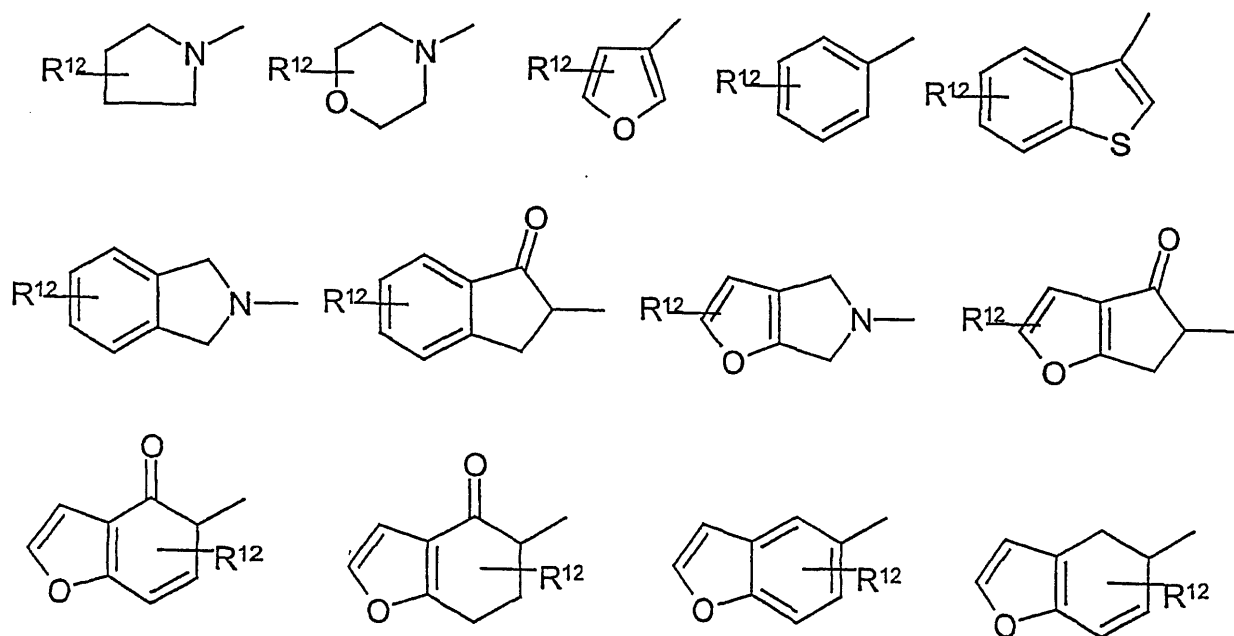
40

一般式（I）の好ましい化合物において、Uは、必要であれば置換されてもよい5-若しくは6-員の飽和若しくは不飽和のヘテロ環若しくはAr基または必要であれば置換されてもよい飽和若しくは不飽和の9-若しくは10-員のヘテロ環若しくはAr基を有する。このような好ましいU環の例としては、下記：

【0049】

【化 11】

50



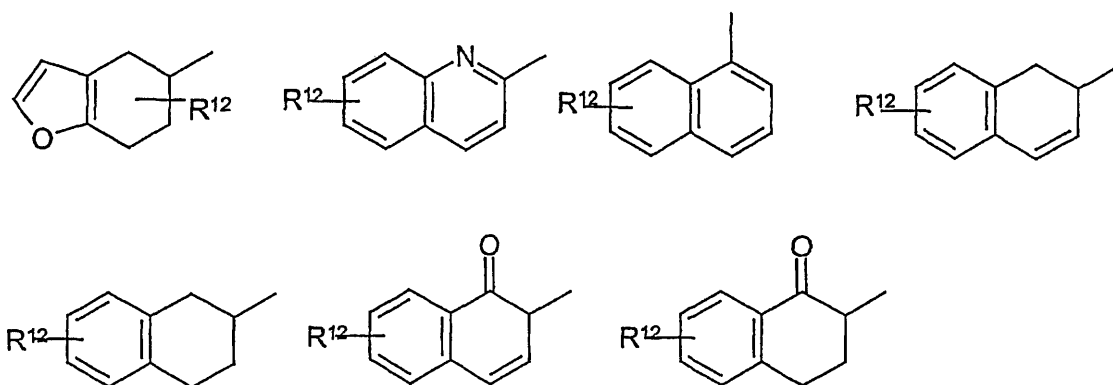
10

および下記：

20

【0050】

【化12】



30

ただし、 R^{12} は、上記と同様の定義である、
がある。

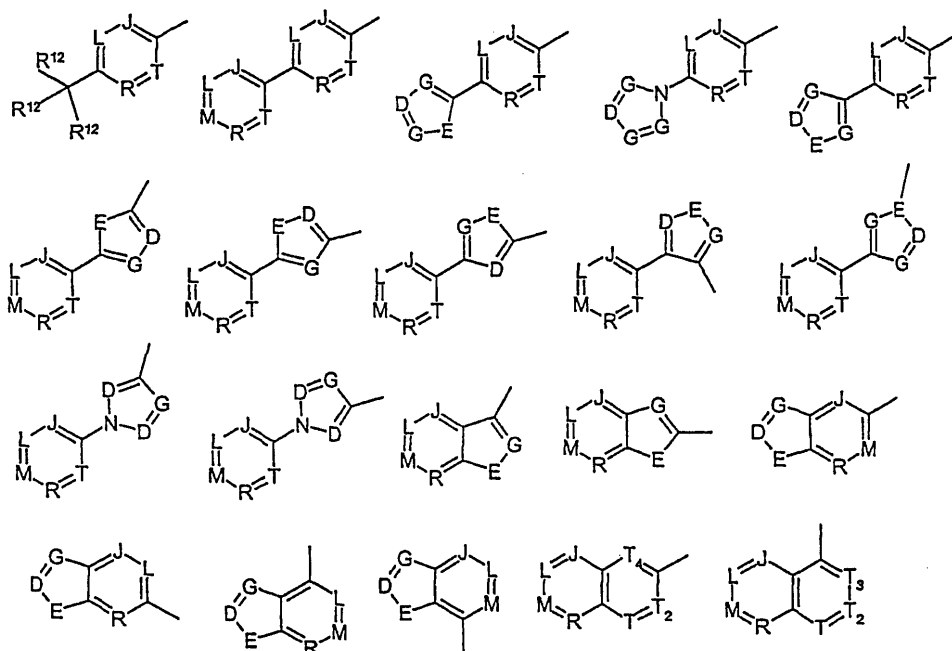
【0051】

一般式 (I) のより好ましい化合物は、アリール Ar のパラ位に嵩高いアルキルまたはアリール基を有する U を含む。また、より好ましい化合物は、メタまたはパラ-2 アリール Ar-Ar を有し、この際、Ar は、上記と同様の定義である。加えて、より好ましい化合物は、6, 6 または 6, 5 または 5, 6-融合芳香環を有する。より好ましい U 基の例としては、下記がある。

40

【0052】

【化13】



10

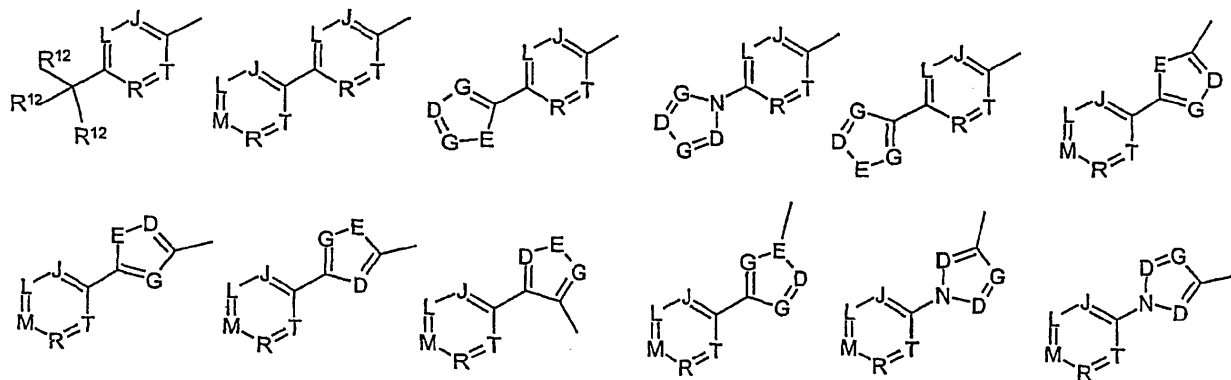
ただし、 R^{12} 、D、E、G、J、L、M、R、T、 T_2 、 T_3 及び T_4 は、上記と同様の定義である。 20

【0053】

特にクルジパインの阻害を目的とする、一般式 (I) のさらにより好ましい化合物は、パラ位に嵩高いアルキルまたはアリール基を含む6員のAr環を有するU基を含み、この際、Arは、上記と同様の定義である。

【0054】

【化14】



30

ただし、 R^{12} 、D、E、G、J、L、M、R 及び T は、上記と同様の定義である。

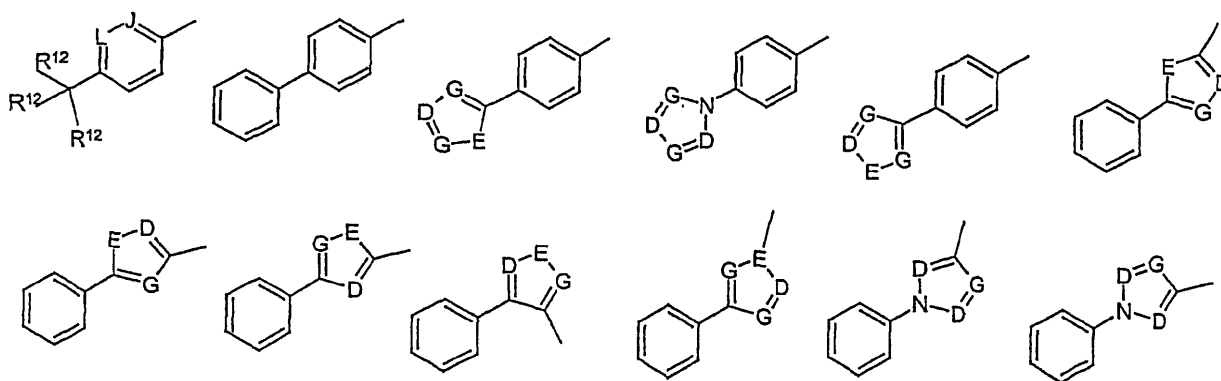
【0055】

一般式 (I) のさらにより好ましい化合物は、以下に制限されないが、以下を含むU基を有する。

【0056】

【化15】

40



10

R^{12} 、D、E、G、J及びLは、上記と同様の定義である。

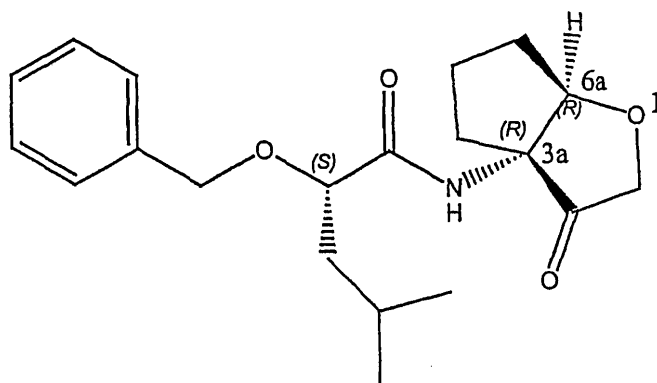
【0057】

ペプチド及び化学の分野で一般的に使用される略称及び記号は、Eur. J. Biochem., 158, 9-, 1984に記載されるのと同様にしてIUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclatureによって表わされる一般的なガイドラインに従って、本発明の化合物を説明するのに本明細書において使用される。一般式(I)の化合物ならびにこれらの調製に使用される中間体及び出発材料は、特定の基が主な基として列挙するために優先度を低くした命名法のIUPAC規則に従って、名付けられる。一般式(I)の化合物の一例である、 R^{12} はHであり、Zは酸素であり、Yは4-メチルペンチルであり、 $(X)_0$ は0であり、 $(W)_n$ は酸素であり、 $(V)_m$ はメチレンであり、およびUはフェニルである化合物(1)は、以下のような名称である。

20

【0058】

【化16】



(1)

30

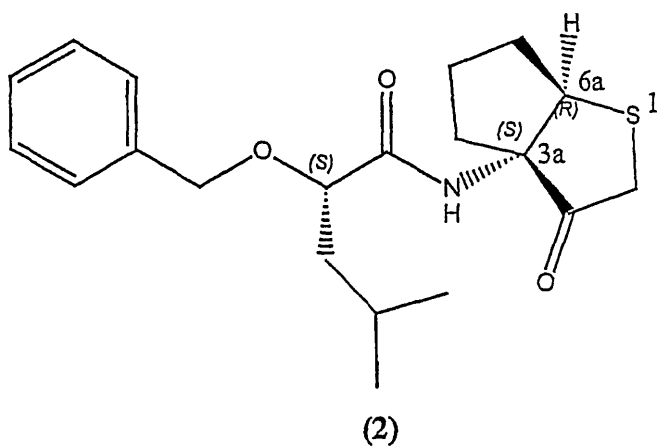
(3aR, 6aR) 2-ベンジルオキシ-4-メチル-ペンタン酸(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ[b]フラン-3a-イル)-アミド

一般式(I)の化合物の第2の例である、 R^{12} はHであり、Zは硫黄であり、Yは4-メチルペンチルであり、 $(X)_0$ は0であり、 $(W)_n$ は酸素であり、 $(V)_m$ はメチレンであり、およびUはフェニルである化合物(2)は、以下のような名称である。

40

【0059】

【化17】



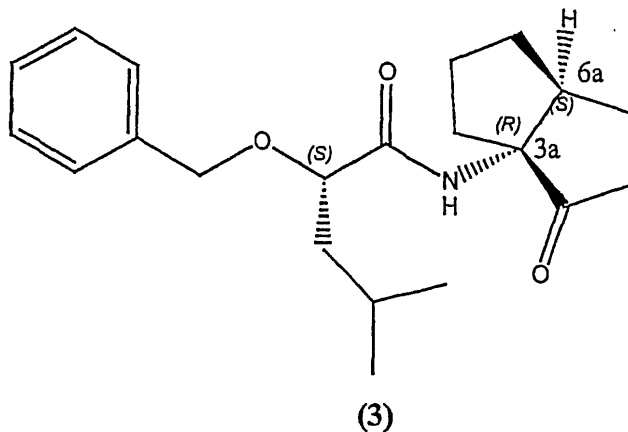
10

(3a S, 6a R) 2-ベンジルオキシ-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] チオフェン-3a-イル) -アミド
 一般式 (I) の化合物の第3の例である、 R^1 はHであり、Zはメチレンであり、Yは4-メチルペンチルであり、 $(X)_0$ は0であり、 $(W)_n$ は酸素であり、 $(V)_m$ はメチレンであり、およびUはフェニルである化合物 (3) は、以下のような名称である。

【0060】

【化18】

20

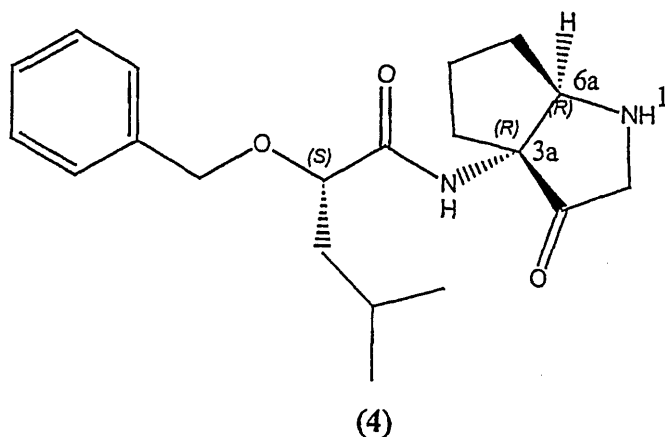


30

(3a R, 6a S) 2-ベンジルオキシ-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-ペンタレン-3a-イル) -アミド
 一般式 (I) の化合物の第4の例である、 R^1 はHであり、ZはNHであり、Yは4-メチルペンチルであり、 $(X)_0$ は0であり、 $(W)_n$ は酸素であり、 $(V)_m$ はメチレンであり、およびUはフェニルである化合物 (4) は、以下のような名称である。

【0061】

【化19】



10

(3a R, 6a R) 2-ベンジルオキシ-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] ピロール-3a-イル) -アミド

本発明の化合物は、以下に制限されないが、Zが 'O' であり R¹ が 'H' である一般式 (I) の (3a R, 6a R) 異性体である下記例を包含し、また、Z 及び R¹ の全定義に含まれる等価の類似体を包含する。

【0062】

4-tert-ブチル-N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

20

N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメトキシ-ベンズアミド

4-ジメチルアミノ-N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル) エチル]-4-イソプロピル-ベンズアミド

30

4-ジフルオロメトキシ-N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメチル-ベンズアミド

ナフタレン-2-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

ナフタレン-1-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

40

キノリン-6-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

ベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-

50

アミド

ビフェニル-4-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド
N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-イミダゾール-1-イルベンズアミド

N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-チオフエン-2-イルベンズアミド

N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-5-チオフエン-2-イルニコチンアミド 10

2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

4-フェニルチオフエン-2-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 20

2-チオフエン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [2-(4-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

4-tert-ブチル-N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-ベンズアミド

N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-4-トリフルオロメトキシベンズアミド 30

4-ジメチルアミノ-N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-ベンズアミド

4-イソプロピル-N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-ベンズアミド

4-ジフルオロメトキシ-N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-ベンズアミド

N-[3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-4-トリフルオロメチルベンズアミド

ナフタレン-2-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド 40

ナフタレン-1-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド

キノリン-6-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド

ベンゾ [b] チオフエン-2-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド

ベンゾ [b] チオフエン-3-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド

ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソヘキサヒドロシ 50

- クロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド
- ビフェニル-4-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド
- N-[3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-4-イミダゾール-1-イルベンズアミド
- N-[3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-4-チオフエン-2-イルベンズアミド
- N-[3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-5-チオフエン-2-イルニコチンアミド
- 2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド 10
- 2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド
- 4-フェニルチオフエン-2-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド
- 2-チオフエン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド
- 3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-ブチル]-アミド 20
- 4-tert-ブチル-N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド
- N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメトキシ-ベンズアミド
- 4-ジメチルアミノ-N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド 30
- N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-4-イソプロピル-ベンズアミド
- 4-ジフルオロメトキシ-N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド
- N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメチル-ベンズアミド
- ナフタレン-2-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 40
- ナフタレン-1-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド
- キノリン-6-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド
- ベンゾ [b] チオフエン-2-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド
- ベンゾ [b] チオフエン-3-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 50

ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

【0063】

ビフェニル-4-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド
N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-イミダゾール-1-イルベンズアミド

N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-チオフェン-2-イルベンズアミド 10

N-[2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-5-チオフェン-2-イルニコチンアミド

2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 20

4-フェニルチオフェン-2-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

2-チオフェン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [2-(3-ヒドロキシフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 30

4-tert-ブチル-N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメトキシベンズアミド

4-ジメチルアミノ-N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-イソプロピルベンズアミド 40

4-ジフルオロメトキシ-N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-ベンズアミド

N-[2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-4-トリフルオロメチルベンズアミド

【0064】

ナフタレン-2-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

ナフタレン-1-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド 50

- サヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド
 キノリン-6-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサ
 ヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド
 ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-
 オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル
] -アミド
 ベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-
 オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル
] -アミド
 ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソ
 -ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ア
 ミド 10
 ビフェニル-4-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサ
 ヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド
 N- [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b]
] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-イミダゾール-1-イル-ベン
 ズアミド
 N- [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b]
] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-チオフェン-2-イルベンズア
 ミド 20
 N- [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b]
] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -5-チオフェン-2-イルニコチン
 アミド
 2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-
 オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル
] -アミド
 2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-
 1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル
) -エチル] -アミド
 4-フェニルチオフェン-2-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-
 オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル
] -アミド 30
【0065】
 2-チオフェン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)
 -1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイ
 ル) -エチル] -アミド
 3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [2-(4-フルオロフェニル)-1-(3-オ
 キソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル]
 -アミド
 4-tert-ブチル-N- [2-(4-クロロフェニル)-1-(3-オキソヘキサ
 ヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミド 40
 N- [2-(4-クロロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b]
] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-トリフルオロメトキシーベンズア
 ミド
 4-ジメチルアミノ-N- [2-(4-クロロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒ
 ドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミド
 N- [2-(4-クロロフェニル)-1-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b]
] フラン-3 a-イルカルバモイル) エチル] -4-イソプロピル-ベンズアミド
 4-ジフルオロメトキシー-N- [2-(4-クロロフェニル)-1-(3-オキソヘキサ
 ヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミ 50

ド

N- [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-トリフルオロメチル-ベンズアミド

ナフタレン-2-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ナフタレン-1-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

キノリン-6-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ビフェニル-4-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

N- [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-イミダゾール-1-イル-ベンズアミド

【0066】

N- [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-チオフェン-2-イル-ベンズアミド

N- [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -5-チオフェン-2-イルニコチンアミド

2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

4-フェニルチオフェン-2-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

2-チオフェン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [2- (4-クロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

4-tert-ブチル-N- [2- (3, 4-ジクロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミド

N- [2- (3, 4-ジクロロフェニル) -1- (3-オキソヘキサヒドロシクロペン

10

20

30

40

50

タ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-トリフルオロメトキシ-ベンズアミド

4-ジメチルアミノ-N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミド

N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) エチル] -4-イソプロピル-ベンズアミド

4-ジフルオロメトキシ-N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -ベンズアミド

10

N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-トリフルオロメチル-ベンズアミド

ナフタレン-2-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ナフタレン-1-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

キノリン-6-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド
【0067】

20

ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

ベンゾチアゾール-5-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

30

ピフェニル-4-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-イミダゾール-1-イル-ベンズアミド

N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -4-チオフェン-2-イル-ベンズアミド

40

N-[2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -5-チオフェン-2-イル-ニコチンアミド

2-フェニルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

2-ピリジン-3-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -エチル] -アミド

4-フェニルチオフェン-2-カルボン酸 [2-(3, 4-ジクロロフェニル)-1-(

50

3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

2-チオフェン-2-イルチアゾール-4-カルボン酸 [2-(3,4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

3-フェニルピロール-1-カルボン酸 [2-(3,4-ジクロロフェニル)-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-エチル]-アミド

2-(4-tert-ブチル-ベンジルスルファニル)-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

10

2-(4-tert-ブチル-ベンジルスルファニル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-プロピオンアミド

2-(4-tert-ブチル-ベンジルスルファニル)-3-(3-ヒドロキシフェニル)-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-プロピオンアミド

【0068】

2-(4-tert-ブチル-ベンジルスルファニル)-3-(4-フルオロフェニル)-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-プロピオンアミド

20

2-(4-ヒドロキシベンジル)-4-オキソ-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-4-(3-フェニル-ピロール-1-イル)-ブチルアミド

2-(4-ヒドロキシベンジル)-4-オキソ-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-4-(3-フェニル-ピロリジン-1-イル)-ブチルアミド

4-メチル-2-[2-オキソ-2-(3-フェニル-ピロール-1-イル)-エチル]-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

4-メチル-2-[2-オキソ-2-(3-フェニル-ピロリジン-1-イル)-エチル]-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

30

2-[2-(1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル)-2-オキソ-エチル]-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

4-(1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル)-2-(4-ヒドロキシベンジル)-4-オキソ-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-ブチルアミド

4-(3,4-ジヒドロ-1H-イソキノリン-2-イル)-2-(4-ヒドロキシベンジル)-4-オキソ-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-ブチルアミド

40

2-[2-(3,4-ジヒドロ-1H-イソキノリン-2-イル)-2-オキソ-エチル]-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

【0069】

本発明のさらなる化合物は、以下に制限されないが、Zが‘O’でありR¹が‘H’である一般式(I)の(3aR, 6aR)異性体である下記例を包含し、また、Z及びR¹の全定義に含まれる等価の類似体を包含する。

【0070】

フラン-2-カルボン酸 [3-メチル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [

50

40

フラン-2-カルボン酸 [1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-2-フェニルメタンスルホニル-エチル]-アミド
フラン-3-カルボン酸 [1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-2-フェニルメタンスルホニル-エチル]-アミド
チオフェン-2-カルボン酸 [1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-2-フェニルメタンスルホニル-エチル]-アミド
チオフェン-3-カルボン酸 [1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル)-2-フェニルメタンスルホニル-エチル]-アミド
ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [1-(3-オキソ-ヘキサヒドロ-シクロペ 50

ンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル) -2-フェニルメタンスルホニル-エチル
]-アミド

2-ベンジルオキシ-3-シクロヘキシル-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペン
タ [b] フラン-3 a-イル)-プロピオンアミド

モルホリン-4-カルボン酸 2-シクロヘキシル-1-(3-オキソ-ヘキサヒドロシク
ロペンタ [b] フラン-3 a-イルカルバモイル)-エチルエステル

2-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-N-(3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-ブチルアミド

2-ビフェニル-3-イル-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ-ヘキサヒドロシクロ
ペンタ [b] フラン-3 a-イル)-アミド

10

3-シクロヘキシル-2-(フラン-2-イルメタンスルファニル)-N-(3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-プロピオンアミド

3-シクロヘキシル-2-(フラン-3-イルメタンスルファニル)-N-(3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-プロピオンアミド

3-シクロヘキシル-2-(フラン-2-イルメタンスルホニル)-N-(3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-プロピオンアミド

3-シクロヘキシル-2-(フラン-3-イルメタンスルホニル)-N-(3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-プロピオンアミド

2-(4-tert-ブチル-フェニルメタンスルホニル)-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ
-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-アミド

20

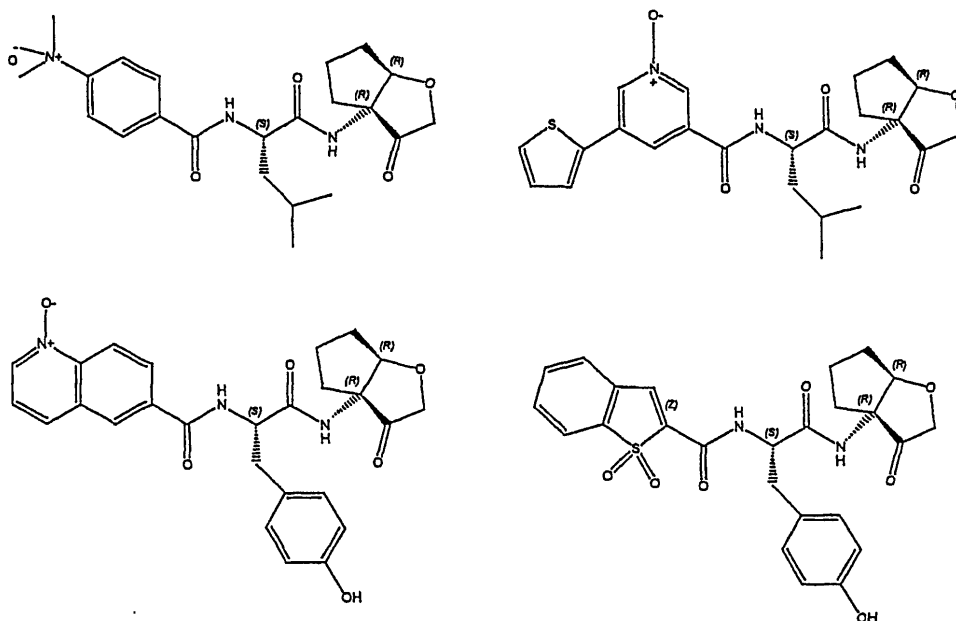
2-(4-tert-ブチル-ベンジルオキシ)-4-メチル-ペンタン酸 (3-オキソ
-ヘキサヒドロ-シクロペンタ [b] フラン-3 a-イル)-アミド

【0072】

上記すべての例を考慮すると、N-オキシドを形成するために容易に酸化される窒素またはスルホンを形成するために容易に酸化する硫黄を含むキャッピング基の酸化類似体をも包含するものである。下記構造は、詳細な例である。

【0073】

【化20】



30

40

有機化学を実施する当業者にとって、一般式 (I) の化合物は、溶液中であるいは固相でのいずれかで行なわれる、数多くの化学ストラテジーによって容易に合成される (固相合成原則の一般的なレビューに関しては、Atherton, E. and Sheppard, R. C. In 'Solid

50

Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach', Oxford University Press, Oxford, U.K. 1989を参照)。固相ストラテジーは、確立された平行合成方法により、一般的に 5 ~ 1 0 0 m g のスケールで、何千という類似体を得ることができるという点で魅力的である（例えば、(a) Bastos, M.; Maeji, N. J.; Abeles, R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6738-6742, 1995を参照）。

【0074】

したがって、一般式 (I) の化合物の合成の一つのストラテジーとしては、下記を有する。

【0075】

(a) 溶液における適当に官能化され (functionalised) 及び保護されたシクロペンタン 2 環式のケトン構成単位の調製。 10

【0076】

(b) 合成条件に安定であるが、合成終了時に容易に切断されやすいリンカーを介した固相への構成単位 (a) の結合 (固相合成に適用される「リンカー」機能について、例えば、James, I. W., Tetrahedron, 55(Report N^o 489), 4855-4946, 1999を参照)。

【0077】

(c) 残りの分子を構築するための、固相有機化学 (Brown, R. D. J. Chem. Soc., Perkin Trans.1, 19, 3293-3320, 1998を参照)。

【0078】

(d) 固相から溶液への化合物の切断。 20

【0079】

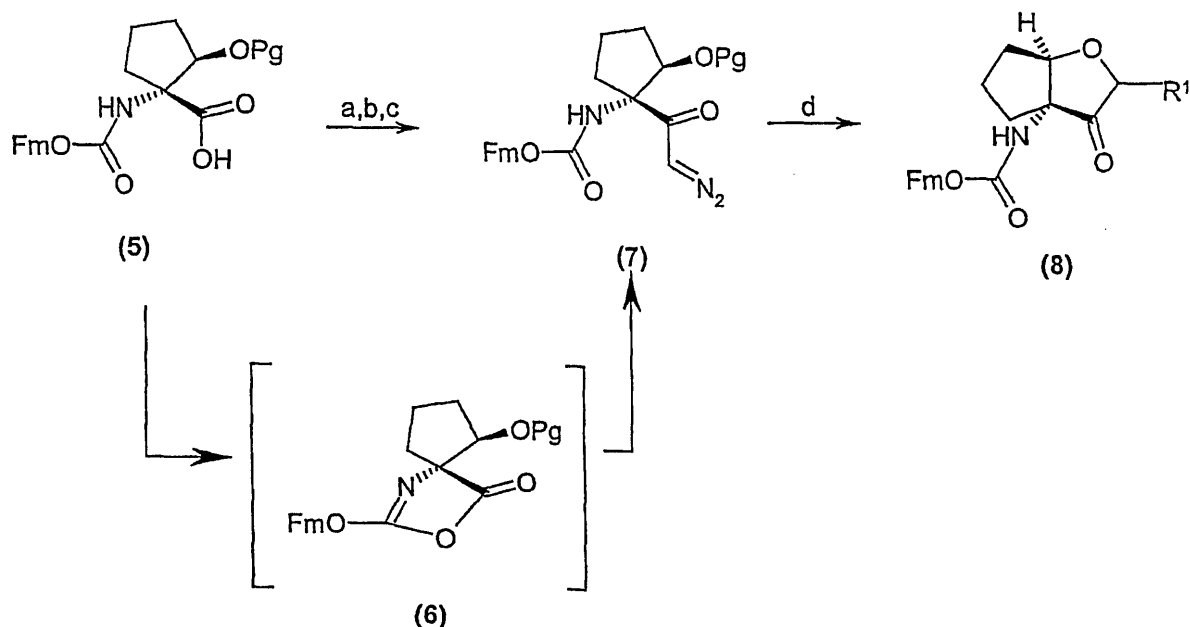
(e) 切断ワークアップ (work-up) 及び化合物の分析。

【0080】

一般式 (I) の化合物の合成の第一段階は、官能化され及び保護された構成単位の溶液での調製である。(3 a R, 6 a R) N - (3 - オキソーヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン - 3 a - イル) アルキルアミド (8) への具体的なスキームをスキーム 1 に詳述する。

【0081】

【化 2 1】



スキーム1 (a) $i\text{BuOCOC}\text{Cl}$ 、NMM、DCM、 -15°C 、10分、アルゴン下。

(b) ジエチルエーテルにおけるジアゾメタン、 -15°C から室温で1時間。

(c) 酢酸。(d) 80%酢酸水溶液における LiCl (10当量)、 5°C から室温で1時間。

FmOC(O)は、既知のアミン保護基9-フルオレンメトキシカルボニルを示し (Fmoc, Atherton, E. and Sheppard, R. C., 1989を参照)、「Pg」は、遊離ヒドロキシルまたはtert-ブチルエーテル等のヒドロキシル保護基のいずれかを示す。詳細には、ジアゾメタンによる縮合によって、 $\text{R}^1 = \text{H}$ が形成される。

【0082】

段階(a)を考えると、合成は、適当に保護された1-アミノ-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸(5)から開始する。コアのアミノ酸は、非対称ストレッカーまたはブッヘラー-バークス(Bucherer-Bergs)合成等の様々な文献の方法、例えば、(a) Ohfuné, Y., Nanba, K., Takada, I., Kan, T., Horikawa, N., Nakajima, T. Chirality, 9, 459-462, 1997. (b) Ohfuné, Y., Horikawa, N., J. Synth. Org. Chem. Jpn., 55, 982-993, 1997. (c) Volk, F.-J., Frahm, A. W. Liebigs Ann. Chem. 1893-1903, 1996. (d) Fonderkar, K. P., Volk, F.-J., Frahm, A. W. Tetrahedron: Asymmetry, 10, 727-735, 1999により利用できる。イソブチルクロロホルメート(isobutyl chloroformate)混合無水物を介して適当に保護された1-アミノ-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸(5)を活性化した後、ジアゾメタンで縮合することによって、ジアゾメチルケトン中間体(7)が得られる。スキーム1で詳述された反応条件によると、ジアゾケトンの形成が明らかに観察される。しかしながら、ジアゾケトン(7)の単離された収率の全体の向上は、活性の低い(5R, 6R) 6-アルコキシ-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)-3-オキサ-1-アザピロ[4,4]ノン-1-エン-4-オン(6)を形成しにくい、(5)のアシルフルオライド(acyl fluoride)を予め形成することによっておよびエーテル性ジアゾメタン(ethereal diazomethane)との反応を24時間続けることによっても得られる。ジアゾメチルケトン中間体(7)を酢酸水溶液中で塩化リチウムで処理すると、保護された(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イル)アルキルアミド(8)が形成する。単純 R^1 置換基の導入は、活性化された(5)をジアゾエタン($\text{R}^1 = \text{CH}_3$)、または1-フェニルオキシジアゾエタン($\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{OPh}$)等をジアゾメタンの代わりに使用して縮合することによって達成されてもよい。

【0083】

スキーム 1 で詳述された保護構成単位 ((3 a R, 6 a R) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル) アルキルアミド (8) で例示された合成) は、阻害剤分子の固相合成で使用されてもよい (段階 (b) ~ (e))。段階 (b)、アルデヒドまたはケトンの固相結合は、様々な方法によって従来記載されてきた (例えば、(a) James, I. W., 1999, (b) Lee, A., Huang, L., Ellman, J. A., J. Am. Chem. Soc., 121(43), 9907-9914, 1999, (c) Murphy, A. M., et al, J. Am. Chem. Soc., 114, 3156-3157, 1992 を参照)。 (8) 等のアルキルケトン官能性の可逆的な結合が可能な適当な方法は、従来記載されてきた化学の組み合わせによる。セミカルバジド (semicarbazide)、4-[[(ヒドラジノカルボニル) アミノ] メチルシクロヘキサンカルボン酸トリフルオロアセテート (9) (Murphy, A. M., et al, J. Am. Chem. Soc., 114, 3156-3157, 1992) を、(3 a R, 6 a R) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル) アルキルアミド (8) の結合で例示した、スキーム 2 に詳述されるように用いてもよい。

10

20

30

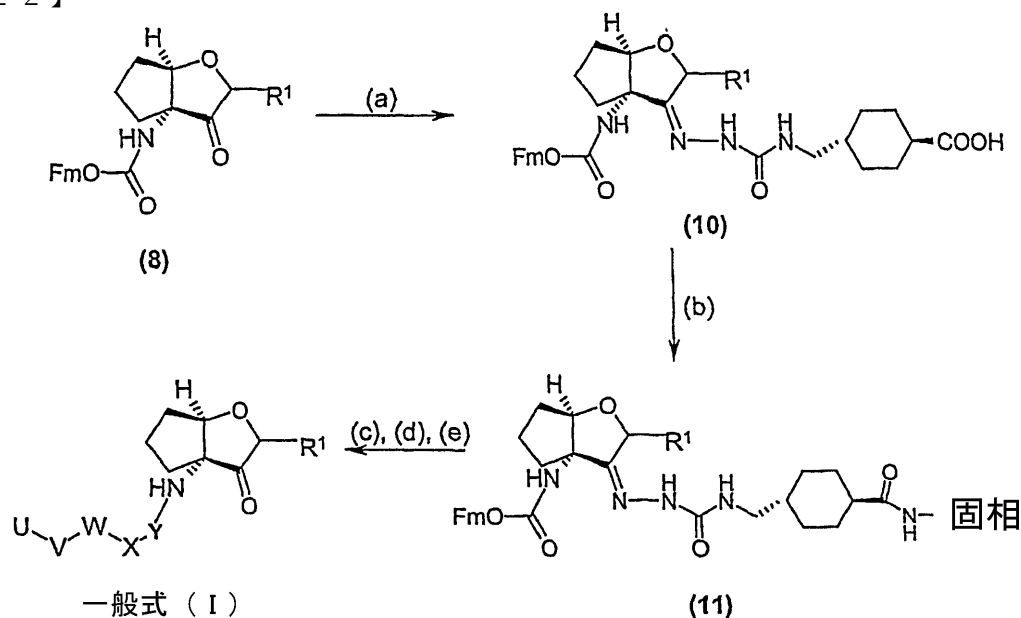
40

【0084】

構築物 (10) を、エタノール/酢酸ナトリウムの水溶液中での還流によってリンカー分子 (9) 及び (3 a R, 6 a R) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル) アルキルアミド (8) の反応により調製する。構築物 (10) の形成は 2 時間の反応で観察されるが、構築物 (10) の最適な形成は 24 時間の反応で起こる。標準的な固相技術 (例えば、Atherton, E. and Sheppard, R. C., 1989 を参照) を用いて、(10) の遊離カルボン酸官能性を介してアミノ官能化固相 (amino-functionalised solid phase) に構築物を固定し、ローディングされた (loaded) 構築物 (11) を形成する。十分構築された化合物の酸による切断は、24 時間の反応時に最適である。

【0085】

【化 2 2】



スキーム 2 (a) 90% EtOH/H₂O/1.5 当量 NaOAc/4-[[(ヒドラジノカルボニル) アミノ] メチル] -シクロヘキサンカルボン酸トリフルオロアセテート (9) における (8)、24 時間、還流。(b) 3 当量構築物 (10)/3 当量 HBTU/3 当量 HOBt/6 当量 NMM、NH₂-固相、DMF、室温、一晚。(c) 20% ピペリジン/DMF、30 分。(d) U-V-W-X-Y を導入するための範囲の化学物質。(e) TFA/H₂O (95:5、v/v)、室温、24 時間。

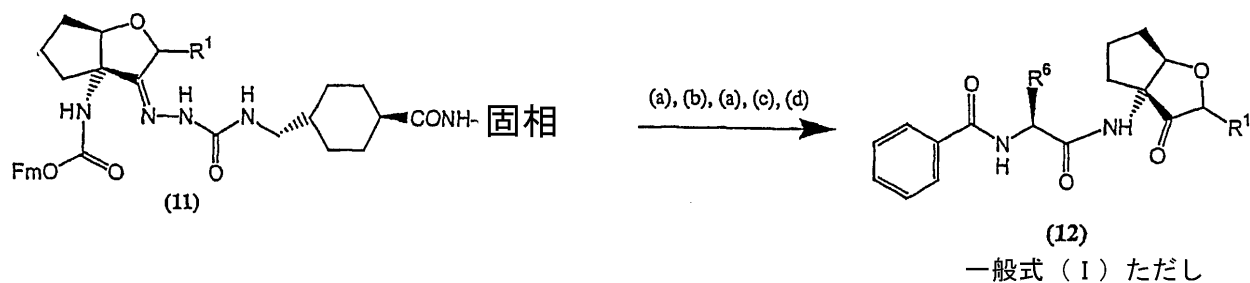
ローディングされた構築物 (11) を、市販または文献の広範なカルボン酸と反応させて、一般式 (I) の左側の部分「U-V-W-X-Y」を導入してもよい。最も簡単な例で

50

は、一般式 (I) の阻害剤の左側部分全体は、キャップドアミノ酸(capped amino acid)を有し(スキーム3)、例えば、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_0 = '-'$ 、 $(W)_n = 'NH'$ 、 $R^9 = 'H'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = 'CO'$ 、 $m = 1$ 及び $U =$ アリール の一般式 (I) の類似体を形成する。

【0086】

【化23】



$R^5 = 'H'$
 $(X)_0 = '-'$
 $(W)_n = 'NH', n = 1$
 $(V)_m = 'CO', m = 1$
 $U =$ フェニル
 $Z = 'O'$

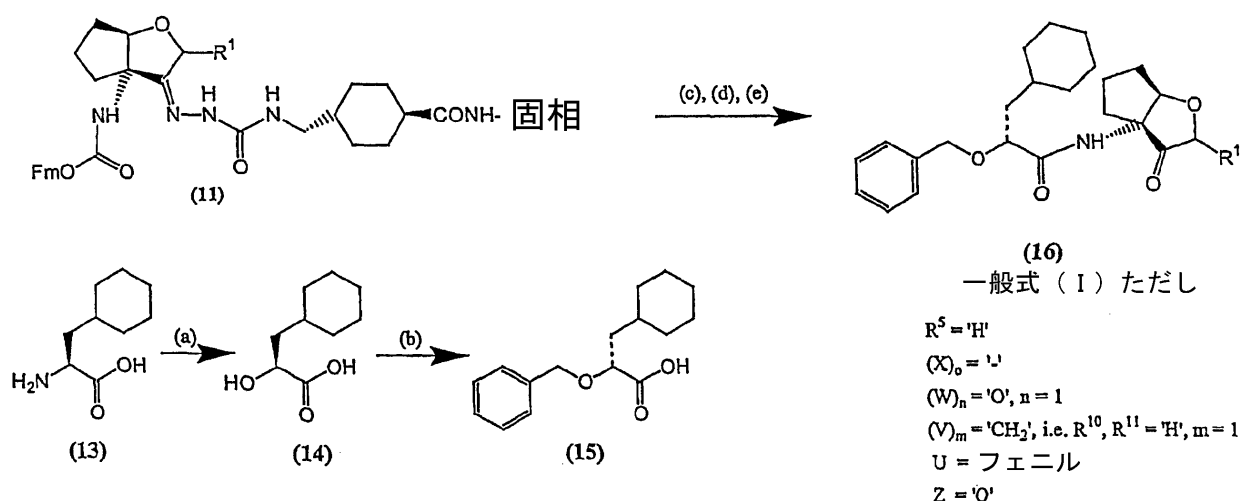
スキーム3 (a) 20%ピペリジン/DMF、30分。

(b) 20当量Fmoc-アミノ酸/20当量HBTU/20当量HOBt/40当量NMM、DMF、一晚。(c) 5当量カルボン酸/5当量HBTU/5当量HOBt/10当量NMM、DMF、室温、一晚。(d) TFA/H₂O (95:5、v/v)、室温、24時間。

または、カルボン酸を、典型的な有機化学方法によって溶液中で調製し、固相上で構築物(11)にカップリングしてもよい(スキーム4~8)。例えば(スキーム4)、亜硝酸ナトリウム/H₂SO₄による、(13)で例示される、アミノ酸の溶液における処理によって、(14)で例示される、 α -ヒドロキシ酸が形成する(Degerbeck, F. et al, J. Chem. Soc, PerkinTrans. 1, 11-14, 1993)。 α -ヒドロキシ酸、(14)を、ジメチルホルムアミド/ジクロロメタン混合物において水素化ナトリウムで処理した後、臭化ベンジルを添加することによって、2RS-ベンジルオキシ-3-シクロヘキシルプロピオン酸(15)が形成する。(15)を固相構築物(11)にカップリングした後、切断することによって、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_0 = '-'$ 、 $(W)_n = 'O'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = 'CH_2'$ 、即ち、 R^{10} 、 $R^{11} = 'H'$ 、 $m = 1$ 及び $U =$ フェニル の一般式 (I) の一例、(16)が形成する。有機化学を実施する当業者にとって、(13)等の広範なアミノ酸が、詳述した一般的な条件により(14)等の相当する α -ヒドロキシ酸に変換される。加えて、臭化ベンジルの代わりに、適当なAr-CR¹⁰R¹¹-ハロゲン化物を使用して、詳述した一般的な条件によりカルボン酸(15)の多くのバリエーションを形成してもよい。場合によっては、アルキルハロゲン化物との反応前にメチルエステルとしてカルボン酸を一時的に保護することが好ましい(例えば、化合物(21)、スキーム6)。次に、このエステル中間体を、簡単に酸(15)に加水分解する。一般式(I)において広範な(V)_m及びUを調べる、(16)の類似体が、スキーム4で詳述される一般的な条件で調製される。最終合成段階は固相に結合した化合物のトリフルオロ酢酸(TFA)が介する切断を含むため、置換エーテルがTFAに不安定である場合には類似体を別の経路によって溶液中で調製してもよい(スキーム11を参照)。

【0087】

【化24】



10

スキーム4 (a) $NaNO_2 / H_2SO_4$ 、 $0^\circ C \rightarrow$ 室温、2時間。

(b) 2.3当量 NaH 、1:1 DMF/DCM、1.4当量臭化ベンジル、一晚。

(c) 20%ピペリジン/DMF、30分。(d) 10当量 (15) / 10当量 HBTU /

10当量 HOBt / 20当量 NMM、DMF、室温、一晚。(e) TFA / H_2O (95:5、v/v)、室温、24時間。

20

または、構築物 (11) (Fmocの除去後) の α -ヒドロキシ酸 (14) とのカップリングによって、多くの試薬と反応する一般式 (I) の様々な固相結合中間体「Y」置換基が形成する。例えば、 α -ヒドロキシ酸を、ミツノブ条件(Mitsunobu conditions)下で反応させて(Hughes, D. L. Org. React.(N.Y), 42,335-656, 1992)、エーテル (即ち、一般式 (I) において、 $X = ' - '$ 、 $W = 'O'$) を得てもよい (固相上でのミツノブ反応(Mitsunobu reaction)の一例について、Grabowska, U. et al, J. Comb. Chem., 2(5),475-490, 2000を参照)。または、 α -ヒドロキシ酸を、カルバミルクロライドと反応させて、カルバメート (即ち、一般式 (I) において、 $X = ' - '$ 、 $W = 'O'$ 、 $V = 'NHC(O)'$) を得てもよい。

【0088】

30

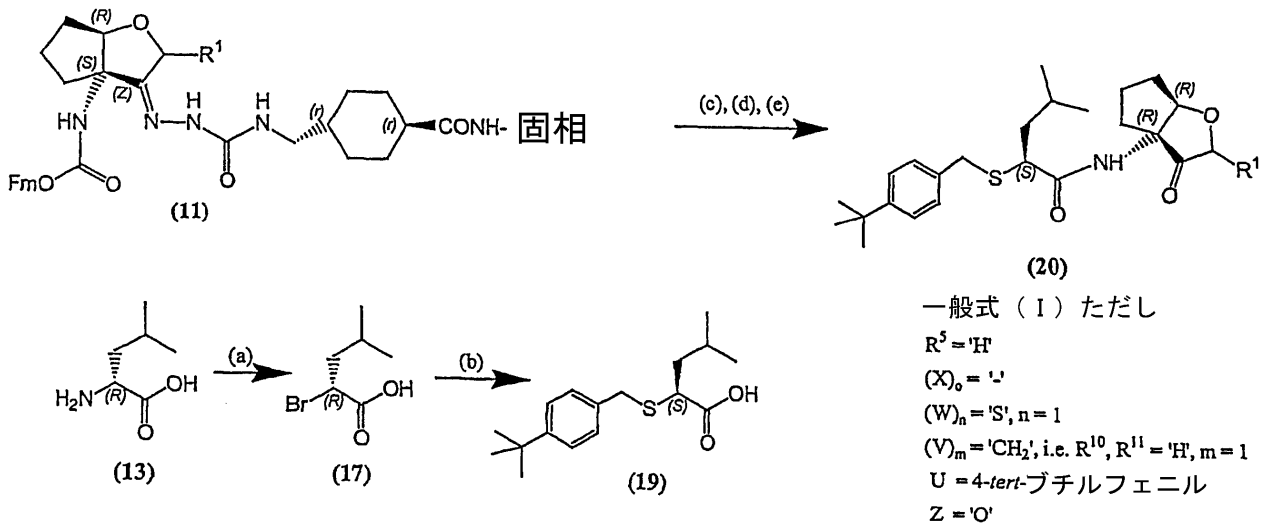
または、(スキーム5)、亜硝酸ナトリウム / H_2SO_4 / 臭化カリウムによる (13) で例示される、アミノ酸の溶液における処理によって、立体を保持した (17) (Souers, A. J. et al, Synthesis, 4, 583-585, 1999) で例示される、 α -ブロモ酸を得てもよい。ジメチルホルムアミド / トリエチルアミンにおける 4-tert-ブチルフェニルメタンチオール (18) で例示されるアルキルチオールによる α -ブロモ酸 (17) の処理によって、逆の構造を有する、2S-(4-tert-ブチルベンジルスルファニル)-4-メチルプロピオン酸 (19) が得られる。(19) を固相構築物 (11) にカップリングした後、切断することによって、(20)、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_0 = ' - '$ 、 $(W)_n = 'S'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = 'CH_2'$ 、即ち、 R^{10} 、 $R^{11} = 'H'$ 、 $m = 1$ 及び $U = 4\text{-tert-ブチルフェニル}$ の一般式 (I) の一例が得られる。有機化学を実施する当業者にとって、(13) 等の広範なアミノ酸が、詳述された一般的な条件で (17) 等の相当する α -ブロモ酸に変換される。加えて、(13) の S-異性体で出発することによって、(17) の S-ブロモ酸類似体及び (19) の R-チオエーテル類似体を得られる。加えて、(4-tert-ブチルフェニル)メタンチオール (18) の代わりに、適当な $Ar-CR^{10}R^{11}-SH$ を使用して、詳述した一般的な条件によりカルボン酸 (19) の多くのバリエーションを形成してもよい。ゆえに、一般式 (I) において広範な $(V)_m$ 及び U を調べる、(20) の類似体が、スキーム5で詳述される一般的な条件で調製される。

40

【0089】

【化25】

50



10

スキーム5 (a) $NaNO_2/H_2SO_4, KBr, 0^\circ C \rightarrow$ 室温、2時間。

(b) アルキルチオール (18) / DMF / NEt_3 、一晩。(c) 20%ピペリジン / DMF、30分。

(d) 10当量 (19) / 10当量 HBTU / 10当量 HOBt / 20当量 NMM、DMF、室温、一晩。

(e) TFA / H_2O (95 : 5、v / v)、室温、24時間。

20

または、構築物 (11) (Fmocの除去後) の α -ブロモ酸、例えば (17) とのカップリングによって、多くの試薬と反応する一般式 (I) の様々な固相結合中間体「Y」置換基が形成する。例えば、 α -ブロミドを、求核試薬、例えば、アルコール、チオール、カルバニオン等で置換して、エーテル (即ち、一般式 (I) において、 $X = '-'$ 、 $W = 'O'$)、チオエーテル (即ち、一般式 (I) において、 $X = '-'$ 、 $W = 'S'$) を得てもよい。チオエーテルは、必要であれば、スルホンに酸化してもよい (スキーム9参照; 即ち、一般式 (I) において、 $X = '-'$ 、 $W = 'SO_2'$) (固相でのブロミドの置換及びチオエーテルの酸化の一例に関して、Grabowska, U. et al, J. Comb. Chem., 2(5), 475-490, 2000を参照)。

30

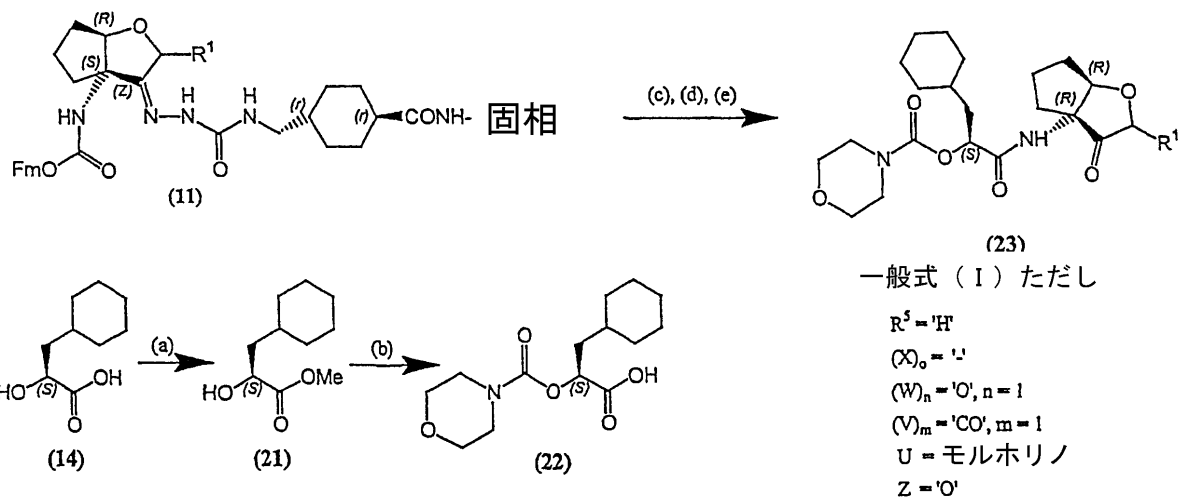
【0090】

または、(スキーム6)、(14)で例示される、 α -ヒドロキシ酸を、トリメチルシリルクロライド及びメタノールで処理することによって、メチルエステル (21) が得られる。ジクロロメタンでのホスゲンによる遊離ヒドロキシルからクロロホルメートへの活性化後にモルホリンを添加し、さらに加水分解することによって、モルホリン-4-カルボン酸-1S-カルボキシ-2-シクロヘキシルエチルエステル (22) が形成する。(22)を固相構築物 (11) にカップリングした後切断することによって、(23)、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_0 = '-'$ 、 $(W)_n = 'O'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = 'CO'$ 及び $U =$ モルホリンの一般式 (I) の一例が得られる。有機化学を実施する当業者にとって、(21)等の広範な α -ヒドロキシ酸エステルが、詳述された一般的な条件で活性化クロロホルメートに変換されうる。加えて、モルホリンの代わりに、適当なアミンを使用して、詳述した一般的な条件により、カルボン酸 (22) の多くのバリエーションを形成してもよい。ゆえに、一般式 (I) において広範な $(V)_m$ 及び U を調べる、(23)の類似体が、スキーム6で詳述される一般的な条件で調製される。

40

【0091】

【化26】



10

スキーム6 (a) Me_3SiCl 、 $MeOH$ 、室温、一晩。

(b) i. $COCl_2/DCM$ ／一晩、ii. モルホリン／ DCM 、 $0^\circ C$ 、2時間、

iii. H_2O における $LiOH$ ／ジオキサン、 $0^\circ C$ 。(c) 20%ピペリジン／ DMF 、30分。

(d) 10当量(22)／10当量HBTU／10当量HOBt／20当量NMM、 DMF 、室温、一晩。

20

(e) TFA/H_2O (95 : 5、v/v)、室温、24時間。

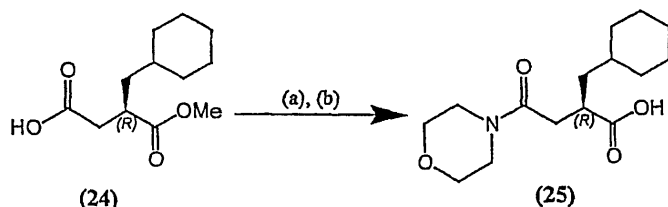
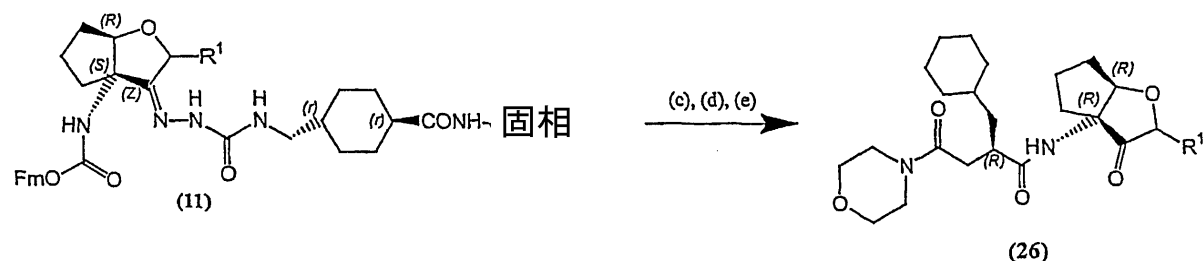
または、(スキーム7)、2R-シクロヘキシルメチルコハク酸1-メチルエステル(24)で例示される広範なアルキルコハク酸エステルは、市販されているまたは既知の方法によって容易に調製される((a) Azam et al, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 621-, 1996; (b) Evans et al, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 103, 2127, 1981; (c) Oikawa et al, Tet.Lett, 37, 6169, 1996を参照)。アルキルコハク酸エステル(24)のカルボキシル活性後にジメチルホルムアミドにおけるモルホリンを添加し、さらにエステルの加水分解を行なうことによって、2R-シクロヘキシルメチルー4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸(25)が得られる。(25)を固相構築物(11)にカップリングした後切断することによって、(26)、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_o = 'CH_2'$ 、即ち、 R^7 、 $R^8 = 'H'$ 、 $o = 1$ 、 $(W)_n = 'CO'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = '-'$ 及びU = モルホリノの一般式(I)の一例が得られる。有機化学を実施する当業者にとって、(24)等の広範なアルキルコハク酸エステルが、詳述された一般的な条件で調製され、(25)等の相当する置換アルキルコハク酸に変換されてもよい。加えて、モルホリンの代わりに、適当なアミンを使用して、詳述した一般的な条件によりカルボン酸(25)の多くのバリエーションを形成してもよい。ゆえに、一般式(I)において広範な $(X)_o$ 、 $(V)_m$ 及びUを調べる、(26)の類似体が、スキーム7で詳述される一般的な条件で調製される。

30

【0092】

40

【化27】



一般式 (I) ただし

$R^5 = 'H'$
 $(X)_0 = 'CH_2'$ i.e. $R^7, R^8 = 'H'$, $o = 1$
 $(W)_n = 'CO'$, $n = 1$
 $(V)_m = 'I'$
 $U = \text{モルホリノ}$
 $Z = 'O'$

10

スキーム7 (a) i. EDC/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール/DMF、0°C、30分。

ii. モルホリン、室温、一晩。(b) H_2O におけるLiOH/ジオキサン、0°C。

(c) 20%ピペリジン/DMF、30分。(d) 10当量(25)/10当量HBTU/

10当量HOBt/20当量NMM、DMF、室温、一晩。(e) TFA/ H_2O (95:5、v/v)、
 室温、24時間。

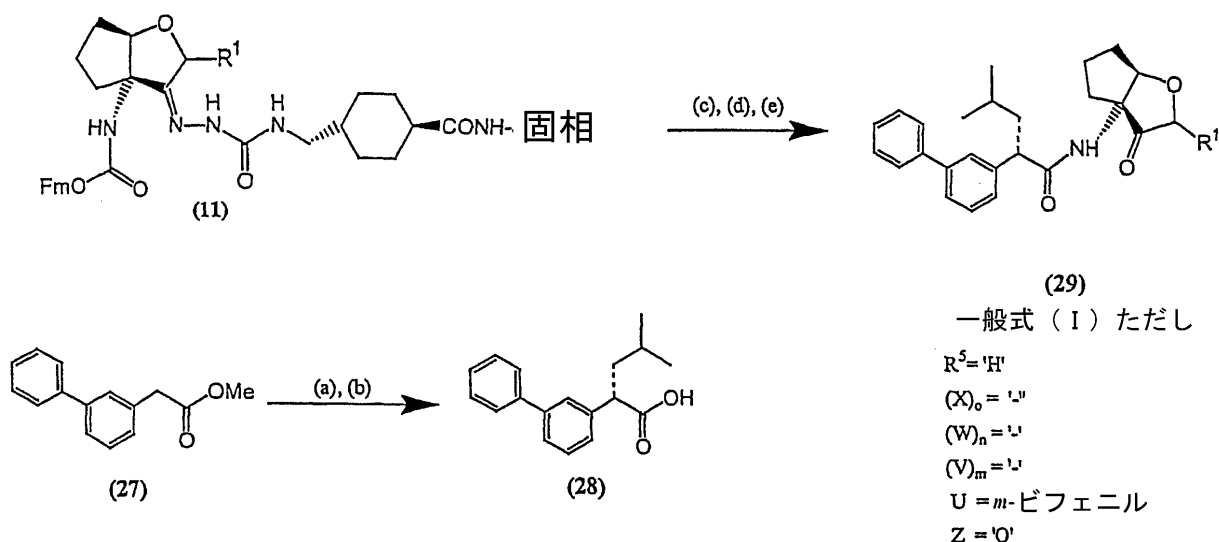
20

または、(スキーム8)、2RS-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンタン酸(28)で例示される、広範なビアリールアルキル酢酸は、既知の方法によって容易に利用できる((a) DesJarlais, R. L. et al, J. Am. Chem. Soc, 120, 9114-9115, 1998; (b) Obal la, R. M. et al, WO 0149288を参照)。ビアリールアルキル酢酸(28)を固相構築物に(11)にカップリングした後切断することによって、(29)、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_0 = '-'$ 、 $(W)_n = '-'$ 、 $(V)_m = '-'$ 及び $U = m$ -ビフェニルの一般式(I)の一例が得られる。有機化学を実施する当業者にとって、(28)等の広範なビアリールアルキル酢酸が、(27)の遊離酸類似体の α -アニオンのアルキル化によって調製されてもよく、これはさらにフェニルボロン酸(phenylboronic acid)及び3-ブロモフェニル酢酸メチルエステルのスズキカップリング(Suzuki coupling)によって調製される。フェニルボロン酸の代わりに、スズキカップリングにおいて広範なアリールボロン酸(arylboronic acid)を使用して、詳述した一般的な条件によりカルボン酸(28)の多くのバリエーションを形成してもよい。ゆえに、一般式(I)において広範な基「U」を調べる(29)の類似体が、スキーム8で詳述される一般的な条件で調製される。

30

【0093】

【化28】



10

スキーム8 (a) H₂OにおけるLiOH/ジオキサン、0°C。

(b) i. LDA、THF、2-メチルプロペニルブロミド。ii. Pd/C、EtOH、H₂。

(c) 20%ピペリジン/DMF、30分。(d) 10当量(28)/10当量HBTU/

10当量HOBt/20当量NMM、DMF、室温、一晚。

20

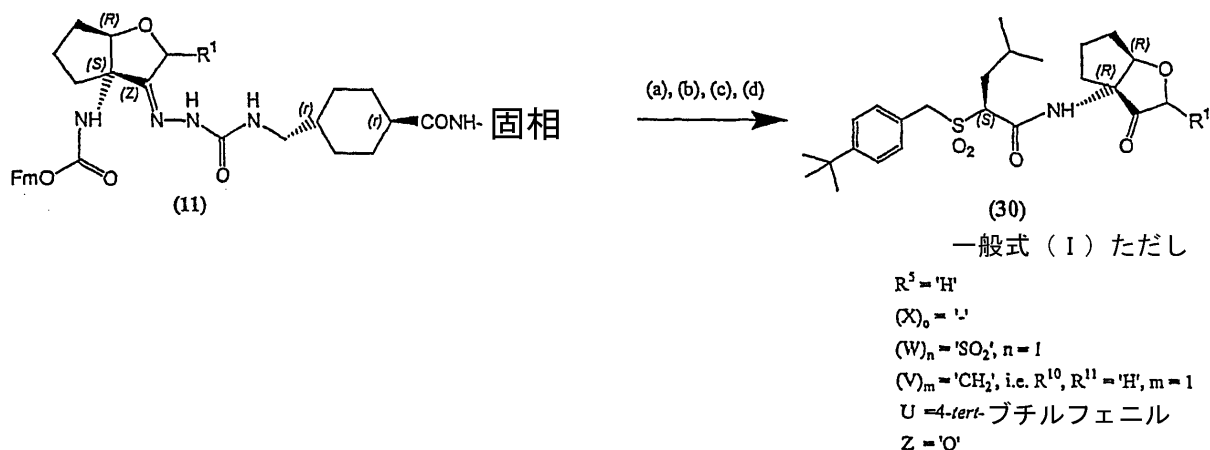
(e) TFA/H₂O (95:5、v/v)、室温、24時間。

固相有機化学の多くの他の可能性（例えば、最近のSPOC公表のレビューに関して、Brown, R. D. J. Chem. Soc., Perkin Trans.1, 19, 3293-3320, 1998を参照）を用いて、一般式(I)の化合物に構築物(11)を誘導してもよい。例えば、一般式(I)における左側の部分の'U-V-W-X-Y'を、一部溶液中で構築して、構築物(11)にカップリングし、さらに固相上で修飾してもよい。例えば(スキーム9)、スキーム5の簡単な拡張を、切断前にジクロロメタンで*m*-クロロ過安息香酸を用いて、中間固相結合種の酸化により行ない、スルホン類似体(30)、R⁵ = 'H'、(X)₀ = '-'、(W)_n = 'SO₂'、n = 1、(V)_m = 'CH₂'、即ち、R¹⁰, R¹¹ = 'H'、m = 1及びU = 4-tert-ブチルフェニルの一般式(I)の一例を得る。スキーム5に記載されるのと同様、カルボン酸(19)の多くのバリエーションが、詳述された一般的な条件により、調製される。ゆえに、一般式(I)において広範な(V)_m及びUを調べる(30)の類似体が、スキーム5及び9で詳述される一般的な条件で調製される。

30

【0094】

【化29】



10

スキーム 9 (a) 20%ピペリジン/DMF、30分。

(b) 10当量(19)/10当量HBTU/10当量HOBT/20当量NMM、DMF、室温、一晚。

(c) 5当量m-クロロ過安息香酸/DCM、室温、5時間。(d) TFA/H₂O (95:5、v/v)、室温、24時間。

一般式 (I) の化合物は、最終的に、トリフルオロ酢酸/水で処理することによって固相から放出され、その後に、蒸発、凍結乾燥及び標準的な分析による特性化を行なう。

20

【0095】

一般式 (I) の化合物の第2の合成戦略は、下記を有する。

【0096】

(f) 溶液における適当に官能化及び保護された(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3-イル)アルキルアミド、(3aS, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]チオフェン-3-イル)アルキルアミド、(3aR, 6aS) N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3-イル)アルキルアミドまたは(3aR, 6aR) N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-3-イル)アルキルアミド構成単位の調製。液相化学の好ましい保護基は、N-tert-ブトキシカルボニル基及びN-ベンジルオキシカルボニル基である。

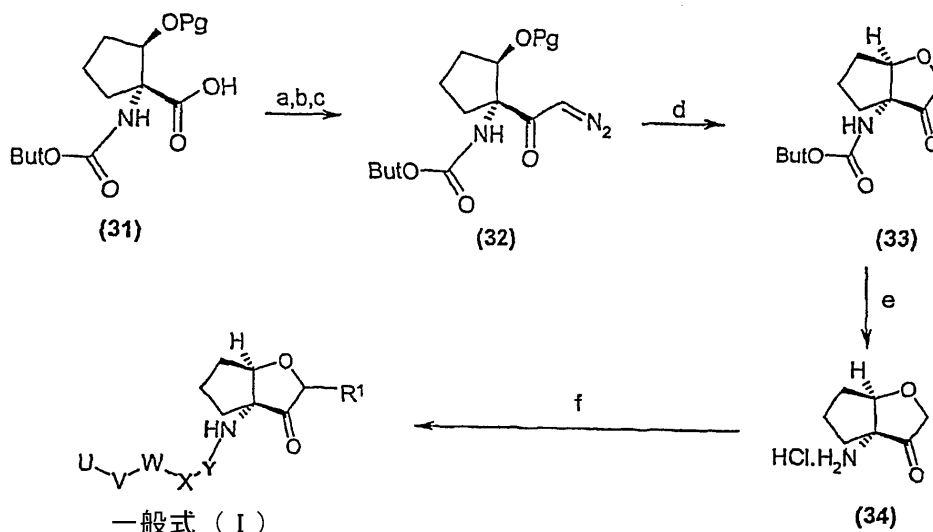
30

【0097】

(g) 構成単位(f)の一般式(I)の化合物への変換に関する標準的な有機化学方法(スキーム10)。

【0098】

【化30】



10

スキーム 10 (a) 予め形成されたアシルフルオライド。

(b) ジエチルエーテルにおけるジアゾメタン、 -15°C ～室温で 24 時間。(c) 酢酸。

(d) 80% 酢酸水溶液における LiCl (10 当量)、 5°C ～室温で 1 時間。

(e) ジオキサンにおける 4M HCl、 0°C 、2 時間。(f) 予め調製された

20

U-V-W-X-Y-COOH/活性化、例えば、HATU/HOAt/NMM、DMF、RT、一晚。

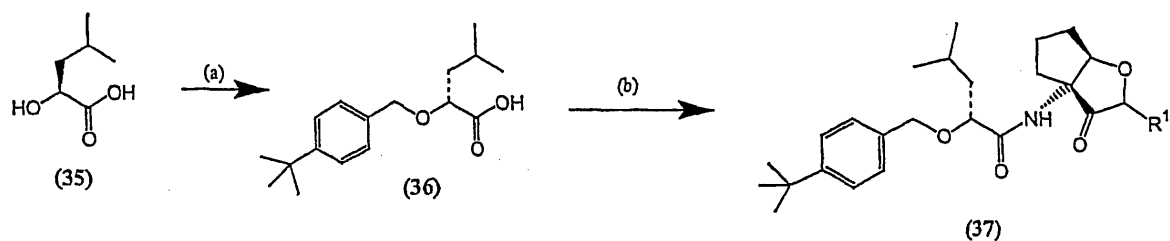
(31) の混合無水物による活性化の魅力的な代替法としては、予め形成されたアシルフルオライドを使用することによるものがある (スキーム 1 で詳述されたのと同様)。スキーム 10 で詳述された一般的な戦略は、一般式 (I) の化合物がトリフルオロ酢酸で分解されやすい置換基を含む際に特に有用であり、これは固相スキーム 4～9 のそれぞれで使用された最終試薬である。例えば (スキーム 11)、ジメチルホルムアミド/ジクロロメタン混合物における水素化ナトリウムによる α -ヒドロキシ酸 (35) の溶液における処理後に、4-tert-ブチルベンジルブロミド (4-tert-butylbenzyl bromide) を添加することによって、2RS-(4-tert-ブチルベンジロキシ)-4-メチルペンタン酸 (2RS-(4-tert-butylbenzyloxy)-4-methylpentanoic acid) (36) が形成する。(36) を塩酸塩 (34) にカップリングすると、(37)、 $R^5 = 'H'$ 、 $(X)_o = '-'$ 、 $(W)_n = 'O'$ 、 $n = 1$ 、 $(V)_m = 'CH_2'$ 、即ち、 R^{10} 、 $R^{11} = 'H'$ 、 $m = 1$ 及び $U = 4$ -tert-ブチルフェニルである、一般式 (I) の化合物の一例を得る。有機化学を実施する当業者にとって、4-tert-ブチルベンジルブロミドの代わりに、適当な $Ar-CR^{10}R^{11}$ -ハロゲン化物を用いて、示された条件下で、カルボン酸 (36) の多くのバリエーションを形成してもよい。ゆえに、一般式 (I) において広範な $(V)_m$ 及び U を調べる (37) の類似体が、スキーム 11 で詳述される条件で調製される。

30

【0099】

40

【化 31】



一般式 (I) ただし

$R^5 = 'H'$
 $(X)_0 = ' '$
 $(W)_n = 'O', n = 1$
 $(V)_m = 'CH_2', i.e. R^{10}, R^{11} = 'H', m = 1$
 $U = 4\text{-}tert\text{-ブチルフェニル}$
 $Z = 'O'$

10

スキーム11 (a) 2. 2当量NaH、1:1DMF/DCM、

1. 2.5当量4-tert-ベンジルブロミド、2時間。(b) 1当量(36)、1当量 $iBuOCOCI$ 、
 2当量NMM、DCM、 $-15^\circ C$ 、1時間、窒素下、次に1当量、(34)、室温、一晚。

U-V-W-X-Yの保護された(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3-イル)アルキルアミド、(3aS, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]チオフェン-3-イル)アルキルアミド、(3aR, 6aS)N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3-イル)アルキルアミドまたは(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-3-イル)アルキルアミド構成単位への添加が多段階有機反応を伴う一般式(I)の化合物の第3の合成戦略は、下記を有する。

20

【0100】

(h) 溶液における適当に官能化及び保護された(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3-イル)アルキルアミド、(3aS, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]チオフェン-3-イル)アルキルアミド、(3aR, 6aS)N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3-イル)アルキルアミドまたは(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-3-イル)アルキルアミド構成単位の調製。液相化学で好ましい保護基は、N-tert-ブトキシカルボニル基及びN-ベンジルオキシカルボニル基である。

30

【0101】

(i) 例えば、ジメチルアセタールとしての、(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3-イル)アルキルアミド、(3aS, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]チオフェン-3-イル)アルキルアミド、(3aR, 6aS)N-(3-オキソヘキサヒドロペンタレン-3-イル)アルキルアミドまたは(3aR, 6aR)N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-3-イル)アルキルアミド構成単位のケトン官能性の保護。または、ケトン、アキラル性の第2級アルコールに還元して、最終合成段階として再度酸化してもよい。

40

【0102】

(j) 構成単位(i)の一般式(I)の化合物への変換に関する標準的な有機化学方法。

【0103】

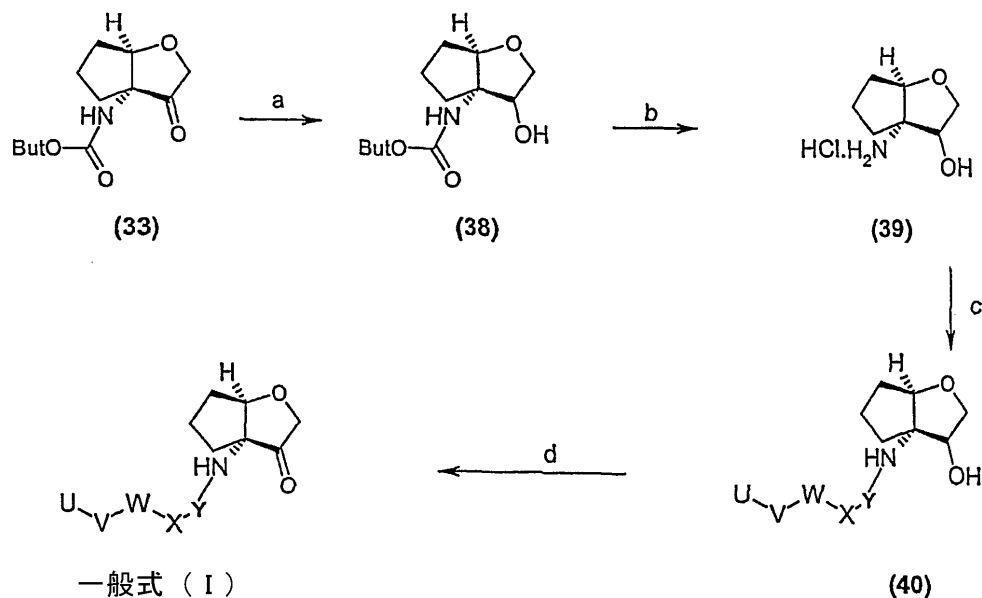
中間体を溶液中で調製した後、構成単位(i)にカップリングし、さらに一般式(I)の化合物に誘導してもよい((3-ヒドロキシヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3-イル)カルバミン酸tert-ブチルエステル(38)の調製及び使用が例示される

50

スキーム 12 を参照)。

【0104】

【化32】



10

20

スキーム 12 (a) 還元、例えば、 NaBH_4 。(b) ジオキサンにおける 4 M HCl 、 0°C 、2 時間。

(c) Y、次に、X、次に W 等の中間体を用いた段階反応により、化合物 (40) を段階的に構築。

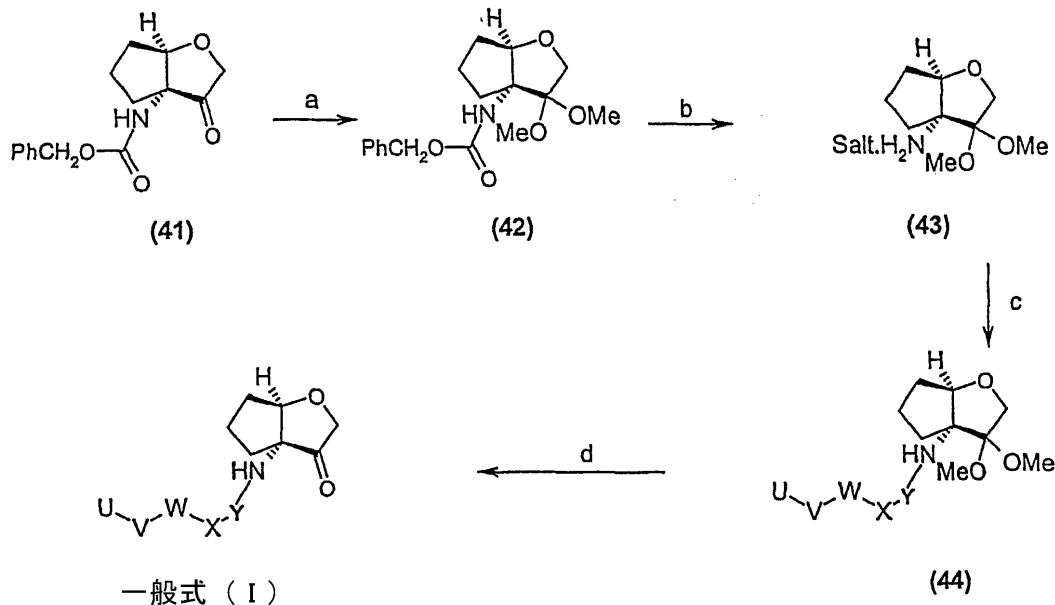
(d) 酸化、例えば、デスマーチンペリオダン (Dess-Martin periodane)、 CH_2Cl_2 。

または、一般式 (I) の化合物の左側の $\text{U}-\text{V}-\text{W}-\text{X}-\text{Y}$ を構築するのに使用される化学のタイプによっては、ケトン、例えば、ジメチルアセタールとしての、保護を必要としてもよい。このような方法は、(3, 3-ジメトキシヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3-イル) カルバミン酸ベンジルエステル (42) の調製及び使用によってス

30

【0105】

【化33】



スキーム 13 (a) トリエチルオルソホルメート／p T S A／Me O H。

(b) H₂、P d - C。(c) Y、次にX、次にW等の中間体を用いた段階反応により、化合物 (44) を段階的に構築。(d) トリフルオロ酢酸／CH₂ C l₂／H₂ O。

本発明は、上記したような新規な中間体、およびこれらの中間前駆体からの一般式 (I) の化合物の調製方法にまで拡張するものである。さらに、これらの中間前駆体からの中間体の調製方法もまた本発明の一部を形成する。

【0106】

一般式 (I) の化合物は、実験道具として及び治療剤として有用である。実験室においては、本発明の化合物によっては、既知のまたは新たに発見されたシステインプロテアーゼが、「標的確認(target validation)」と一般的に称されるプロセスである、病気の状態の定着(establishment)または進行中の重要なまたは少なくとも有意な生化学的機能をもたらすかどうかを確立するのに有用である。

【0107】

本発明の第二の態様によると、(a) 単離された既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼへの上記したような化合物のインビトロでの結合を評価して、潜在性(potency)の基準(measure)を提供し；さらに必要であれば下記段階：

(b) 標的の及び一般的なハウスキーピングプロテアーゼ(house-keeping protease) (例えば、トリプシン) の密接に関連する相同性プロテアーゼへの化合物の結合を評価して、選択性の基準を提供する；

(c) 化合物の存在下での、特定のシステインプロテアーゼ活性の細胞に基づく機能性マーカーをモニターする；および

(d) 化合物の存在下での、特定のシステインプロテアーゼ活性の動物モデルに基づく機能性マーカーをモニターする、
の以上を有する、治療のための標的としての既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼ阻害剤の確認方法が提供される。

【0108】

したがって、本発明は、治療標的としての既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼ阻害剤の確認方法を提供する。様々なアプローチ及び複雑さのレベルが特定の標的の効果的な阻害及び「確認」に適當である。第一の場合では、本方法は、単離された既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼへの一般式 (I) の化合物のインビトロでの結合を評価して、「潜在性」の基準を提供する。標的の及び一般的なハウスキーピングプロテアーゼ (例えば、トリプシン) の密接に関連する相同性プロテアーゼへの一般式 (I) の化合

10

20

30

40

50

物の結合のさらなる評価は、「選択性」の基準を提供する。複雑さの第二のレベルは、一般式 (I) の化合物の存在下で、特定のシステインプロテアーゼ活性の細胞に基づく機能性マーカーをモニターすることによって評価されてもよい。例えば、「ヒト破骨細胞性吸収アッセイ」が、カテプシンKの活性及びプロテアーゼ阻害剤の生物学的な効果をモニターするための細胞に基づく第二のインビトロの試験系として使用された(例えば、WO-A-9850533を参照)。「MHC-I I プロセッシング-T細胞活性化アッセイ」は、カテプシンSの活性及びプロテアーゼ阻害剤の生物学的な効果をモニターするための細胞に基づく第二のインビトロの試験系として使用された(Shi, G-P., et al, Immunity, 10, 197-206, 1999)。ウィルスまたは細菌感染を調べる際には、このようなマーカーは、単に、ウィルスの(例えば、mRNAコピーのカウント)または細菌のローディングの機能的な評価及びプロテアーゼ阻害剤の生物学的な効果の評価であってもよい。複雑さの第三のレベルは、一般式 (I) の化合物の存在下で、特定のシステインプロテアーゼ活性の動物モデルに基づく機能性マーカーをモニターすることによって評価されてもよい。例えば、リーシュマニア(Leishmania)感染、ピー. ビンクケイ(P. vinckei)感染、マラリア(ファルシパイン(falcipain)の阻害)及びトリパノソーマ クルージ感染(クルジパイン(cruzipain))のマウスモデルは、病原の伝播に鍵となる役割を果たすシステインプロテアーゼの阻害が、病気の症状を阻止し、当該標的を「確認する」のに有効であることを示す。

10

【0109】

したがって、本発明は、治療のための標的としての既知のまたは推定上のシステインプロテアーゼ阻害剤の確認における一般式 (I) の化合物の使用を提供する。

20

【0110】

一般式 (I) の化合物は、システインプロテアーゼが関与する病気のインビボでの処置または予防に有用である。

【0111】

本発明の第三の態様によると、特に、病気の状態(disease pathology)がシステインプロテアーゼを阻害することによって修飾される病気を予防または処置するための、医薬に使用される一般式 (I) の化合物が提供される。

【0112】

本発明の第四の態様によると、病気の状態がシステインプロテアーゼを阻害することによって修飾される病気を予防または処置するための医薬の調製における一般式 (I) の化合物の使用が提供される。

30

【0113】

システインプロテアーゼによっては、ヒトを含む、動物でのタンパク質の分解の正常な生理学的なプロセスで、例えば、結合組織の破壊で機能する。しかしながら、体内でのこれらの酵素のレベルが上昇すると、病気を引き起こす病的な状態が生じうる。ゆえに、システインプロテアーゼは、以下に制限されないが、ニューモシスティス カリニ(Pneumocystis carinii)、トリパノソーマ クルージ(Trypanosoma cruzi)、トリパノソーマ ブルーセイ ブルーセイ(Trypanomabrucei brucei)及びクリチジア フシキュラタ(Crithidia fusciculata)による感染、さらには、骨粗鬆症、自己免疫性、住血吸虫症、マラリア、腫瘍の転移、変染色性白質ジストロフィー、筋ジストロフィー、脊髄萎縮などの、様々な病気の病態にかかわりがある。WO-A-9404172及びEP-A-0603873ならびに双方に列挙される参考文献を参照。加えて、スタフィロパイン(staphylopain)と称される黄色ブドウ球菌(S.Aureus)から分泌される細菌性のシステインプロテアーゼは細菌力因子として関連がある(Potempa, J., et al. J. Biol. Chem, 262(6), 2664-2667, 1998)。

40

【0114】

本発明は、上記したまたは上記に包含される病気の状態の予防および／または処置に有用である。本発明はまた、本発明の化合物を、必要のある動物、特に哺乳動物、最も好ましくはヒトに投与することを有する、システインプロテアーゼ、特にパパイン超科のシステ

50

インプロテアーゼの異常なレベルによって引き起こされる病気の処置または予防方法に有用である。本発明は、特に、ニューモシスティス カリニ (*Pneumocystis carinii*)、トリパノソーマ クルージ (*Trypanosoma cruzi*)、トリパノソーマ ブルーセイ (*Trypanosoma brucei*)、メキシコリーシュマニア (*Leishmania mexicana*)、クロストリジウム ヒストリチカム (*Clostridium histolyticum*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、口蹄疫ウィルス及びクリチジア フシキュラタ (*Crithidia fasciculata*) による感染；ならびに骨粗鬆症、自己免疫性、住血吸虫症、マラリア、腫瘍の転移、変染色性白質ジストロフィー、筋ジストロフィー、脊髄萎縮などの、システインプロテアーゼが関連する病気の処置方法を提供するものである。

【0115】

10

クルジパインの阻害剤、特にクルジパインに特異的な化合物は、シャーガス病の処置に有用である。

【0116】

本発明によると、有効量の一般式 (I) の化合物が投与されて、特定の症状または病気に関連のあるプロテアーゼを阻害してもよい。いうまでもなく、この投与量はさらに、化合物の投与タイプによって修飾されるであろう。例えば、急性治療に関する「有効量」を達成するためには、一般式 (I) の化合物の非経口投与が好ましい。筋肉内大量注射もまた使用できるが、水または正常生理食塩水における 5 % デキストロースにおける化合物、または適当な賦形剤を含む同様の配合物の静脈内注入が最も有効である。具体的には、非経口投与量は、システインプロテアーゼを阻害するのに有効な濃度で血漿中で薬剤の濃度を維持するように、約 0.01 ~ 約 100 mg / kg ; 好ましくは 0.1 ~ 20 mg / kg であろう。化合物は、約 0.4 ~ 約 400 mg / kg / 日の 1 日当たりの全投与量を達成するようなレベルで毎日 1 ~ 4 回投与されてもよい。治療上有効である本発明の化合物の正確な量、およびこのような化合物が最良に投与される経路は、薬剤の血中レベルを治療効果を有するのに必要な濃度と比較することによって当業者によって容易に決定される。本発明の化合物のプロドラッグを適当な方法によって調製してもよい。プロドラッグ部分がケトン官能性であるこれらの化合物、特にケタールおよび／またはヘミアセタールでは、公知の方法に従って変換を行なってもよい。

20

【0117】

本発明の化合物はまた、薬剤の濃度が骨の再吸収を阻害するのにまたは本明細書に開示されるような他の治療指示を達成するのに十分であるように、患者に経口投与されてもよい。具体的には、化合物を含む薬剤組成物は、患者の状態に適合するように約 0.1 ~ 約 50 mg / kg の経口投与量で投与される。好ましくは、経口投与量は、約 0.5 ~ 約 20 mg / kg である。

30

【0118】

本発明の化合物を本発明に従って投与される際に、許容できない毒性効果は予想されない。良好な生物学的利用能を有する、本発明の化合物は、所定の薬理効果を有するのに必要である化合物の濃度を決定するために幾つかの生物学的アッセイの一で試験されてもよい。

【0119】

40

本発明の第五の態様によると、一以上の一般式 (I) の化合物及び製薬上または獣医学上許容できる担体を含む薬剤または獣医薬組成物が提供される。処置されるまたは予防される病気または症状に相当であるまたは勧められると考えられる場合には、他の活性材料が存在していてもよい。

【0120】

担体、または一以上が存在する場合には、各担体は、配合物の他の成分と適合し、レシピエントに有害でない点で許容できなければならない。

【0121】

配合物は、直腸内、経鼻、局所（口腔内及び舌下を含む）、経膈または非経口（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む）投与に適するものを含むが、好ましくは、配合物は経口投

50

与される配合物である。配合物は、簡便に、単位投与形態(unit dosage form)、例えば、錠剤及び持続放出性カプセルで提示されてもよく、薬学の分野において既知である方法によって調製されてもよい。

【0122】

このような方法は、上記で規定される活性剤を担体と組み合わせて取り入れる(bringing into association with)ことを含む。通常、配合物は、活性剤を液状担体若しくは微粉碎された固体担体または双方と組み合わせて均一かつ均質に取り入れて、さらに必要であれば生成物を成形することによって調製される。本発明は、製薬上または獣医学上許容できる担体またはベヒクルと一緒に(inconjunction with)または組み合わせて(in association with)一般式(I)の化合物を取り入れてなる薬剤組成物の調製方法にまで拡張する。

10

【0123】

本発明における経口投与用の配合物は、各々所定量の活性剤を含むカプセル、カシェ剤若しくは錠剤等の離散単位(discrete unit)として；粉末若しくは顆粒として；水性液体若しくは非水性液体における活性剤の溶液若しくは懸濁液として；または水中油液状エマルジョン若しくは油中水液状エマルジョンとして；またはボーラスとしてなどとして提示されてもよい。

【0124】

経口投与用の組成物(例えば、錠剤及びカプセル)では、「許容できる担体」ということばは、一般的な賦形剤、例えば、結合剤、例えば、糖ミツ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、ポリビニルピロリドン(ポビドン)、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース及びデンプン；充填剤及び担体、例えば、コーンスターチ、ゼラチン、ラクトース、スクロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸2カルシウム、塩化ナトリウム及びアルギン酸；ならびにステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム及び他の金属ステアリン酸(metallic stearate)、グリセロールステアレート、ステアリン酸、シリコーン油、タルクワックス、油及びコロイドシリカ等の潤滑剤などのベヒクルを包含する。ペパーミント、ウインターグリーン油、チェリー着香剤(cherryflavouring)などの着香剤もまた使用できる。容易に同定できる投与形態にできるように着色剤を添加することが望ましい。錠剤は、当該分野において既知の方法によって被覆されてもよい。

20

30

【0125】

錠剤は、必要であれば一以上の補助成分と共に、圧縮または成形によって作製されてもよい。圧縮錠剤は、必要であれば、結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、表面活性剤または分散剤と混合して、粉末または顆粒などの自由に流れる形態(free flowing form)で活性剤を適当な機械で圧縮することによって調製されてもよい。成形錠剤は、不活性な液状希釈剤で湿潤化された粉末の化合物の混合物を適当な機械で成形することによって作製されてもよい。錠剤は、必要であれば被覆されてもまたは刻み目を入れられてもよく、また、活性剤が緩やかにまたは制御されて放出されるように配合されてもよい。

【0126】

経口投与に適する他の配合剤としては、フレーバーベース、一般的には、スクロース及びアカシアまたはトラガカント内に活性剤を含むロゼンジ；ゼラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアカシア等の不活性基剤内に活性剤を含む香錠；および適当な液状担体内に活性剤を含むマウスウォッシュがある。

40

【0127】

非経口配合物は通常滅菌されているであろう。

【0128】

本発明の第六の態様によると、例えば、混合によって、活性成分を担体と組み合わせて取り入れることを有する、上記した薬剤または獣医薬組成物の調製方法が提供される。

【0129】

本発明の各態様の好ましい特徴は、必要であれば変更を加えて、各態様と同様である。

50

【0130】

ここで、本発明を下記実施例により詳細に説明する。

【0131】

液相化学—一般的な方法

すべての溶剤は、特記しない限り、S p SまたはH i - D r yグレードでROMIL Ltd(Waterbeach, Cambridge, UK)から購入した。一般的なペプチド合成試薬は、Chem-ImpexIntl. Inc.(Wood Dale IL 60191, USA)から得た。薄層クロマトグラフィー(TLC)は、予め被覆されたプレート(メルクアルミニウムシートシリカ60 F254(Merckaluminium sheets silica 60 F254), part no. 5554)上で行なった。化合物の可視化は、紫外線(254 nm)下でまたは適当な染色試薬を用いて達成された。フラッシュカラム精製は、シリカゲル60(Merck9385)で行なった。すべての分析用HPLCは、215および/または254 nmのUVで検出する自動化Agilentシステム(automated Agilent system)で溶剤A=0.1%トリフルオロ酢酸水溶液(TFA)及び溶剤B=90%アセトニトリル/10%溶剤Aの混合液を用いて、Phenomenex Jupiter C₄、5 μ、300 Å、250×4.6 mmで得られた。特記しない限り、1.5 mL/分の25分にわたる10~90% AにおけるBの勾配を、全分析用HPLC分析で行なった。HPLC-MS分析は、0.4 mL/分のPhenomenex Columbus C₈、5 μ、300 Å、50×2.0 mmで10分にわたり10~90% AにおけるBの勾配で、自動化Agilent HPLCシステム(automated Agilent HPLC system)を用いて、Agilent 1100シリーズLC/MSD(Agilent 1100 series LC/MSD)で行なった。核磁気共鳴(NMR)は、示された溶媒及び温度でBruker DPX 400(400 MHz ¹H 周波数; QX1プローブ)で得られた。化学シフトは、部/ミリオン(δ)で表わし、溶剤の残留シグナル(residual signal)を参考にする。カップリング定数(J)は、Hzで表わす。

【0132】

固相化学—一般的な方法

例示阻害剤(1~12)は、溶液及び固相Fmocによる化学を組み合わせることにより調製した(一般的な説明に関しては、'Solid Phase Peptide Synthesis', Atherton, E. and Sheppard, R. C., IRL Press Ltd, Oxford, UK, 1989を参照)。適当に保護され官能化された構成単位は、溶液中で調製した(例えば、一般的な化合物(8)、スキーム1)後、適当なリンカーを介して固相に可逆的に結合した。次に、カップリング/脱保護/化学的修飾、例えば、酸化のラウンドを、全長の所望の分子が完了するまで行なった(スキーム2)。さらに、例示の阻害剤(1~12)は、固相から放出され(切断され)、分析され、精製されて、ある範囲のプロテアーゼに対する阻害についてアッセイした。

【0133】

通常、適当な固相表面が選択されうるものの、マルチピン(multipin)(ポリアミド1.2→10マイクロモルのローディング、www.mimotopes.comを参照)を、固相合成に使用した。通常、1.2マイクロモルのギヤを用いて、予備スクリーニング用に小スケールの未精製例示物を得、また、10マイクロモルのクラウンを好ましい実施例のスケールアップ合成及び精製で使用した。標準的なカップリング及びFmoc脱保護方法を使用した(固相マルチピン方法(solidphase multipin methodology)の徹底的な説明に関しては、Grabowska, U. et al, J. Comb. Chem. 2(5), 475-490, 2000を参照)。

【0134】

初期アセンブリの調製

構成単位—リンカー構築物(例えば、(10))を、5分間、ジメチルホルムアミド(DMF、具体的には、1~10 mL)中で2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU、1モル当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(HOBT、1モル当量)、及びN-メチルモルホリン(NMM、2モル当量)でカルボキシル活性化を行なった。アミノ官能化DA/MDAクラウンまたはHEMAギア(1クラウン当たり10マイクロモル/1

ギア当たり 1.2 マイクロモル、活性化構築物に比して 0.33 モル当量の全表面アミノ官能化)を添加した後、DMF を添加して、固相表面を被覆した。ローディング反応を一晩行なった。一晩ローディングした後、クラウン／ギアについて、洗浄、Fmoc 脱保護及びローディングの定量の標準的なサイクルを行ない (Grabowska, U. et al を参照)、ローディングされた構成単位ーリンカー構築物 (例えば、(11)) を得た。分析から、すべての実施例においてほとんど定量的なローディングが示された。

【0135】

カップリングサイクル

標準的な Fmoc-アミノ酸および新規なカルボン酸 (10 または 20 モル当量) のカップリングを、5 分間予め活性化して、ジメチルホルムアミド中で 2- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-тетраметилулоуиум хексафлуорофосфат (HBTU、10 または 20 モル当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt、10 または 20 モル当量) 及び N-メチルモルホリン (NMM、20 または 40 モル当量) で活性化されたカルボキシルを介して行なった。活性化された物質を、合成に必要なパターンでポリプロピレン製 96 ウェルプレート (Beckman, 1 mL ウェル、クラウンでは 1 ウェル当たり 500 μ L 溶液またはギアでは 1 ウェル当たり 250 μ L 溶液) の適当なウェルに分取した。ローディングされた遊離アミノ構成単位ーリンカー構築物 (例えば、(11)) を添加して、カップリング反応を一晩行なった。一晩カップリングした後、クラウン／ギアについて、洗浄、Fmoc 脱保護の標準的なサイクルを行なった (Grabowska, U. et al を参照)。同様の活性化及びカップリング条件をある範囲のカルボン酸 (R-COOH) のカップリングに使用した。または、クロロホルメート、例えば、モルホリン-4-カルボニルクロライド (10 モル当量) を、NMM (10 モル当量) を添加しながら DMF 中でカップリングした。

10

20

30

【0136】

酸分解切断サイクル (Acidolytic Cleavage Cycle)

95% TFA / 5% 水の混合液を、合成のパターンに相当するパターンでポリスチレンの 96 ウェルプレート (Beckman, 1 mL ウェル、クラウンでは 1 ウェル当たり 600 μ L 溶液またはギアでは 1 ウェル当たり 300 μ L 溶液) に予め分取した。完了したマルチピンアセンブリを第一のプレート (マザープレート) に添加し、単位を錫箔中にカバーして、2 時間切断した。次に、切断されたマルチピンアセンブリを、第一のプレートから除去して、15 分間、第二のプレート (洗浄プレート) に添加した。さらに、消費されたマルチピンアセンブリを捨て、マザー／洗浄プレートを HT-4 GeneVac プレートエバポレーター (HT-4GeneVac plate evaporator) で蒸発させた。

【0137】

切断された例示物の分析及び精製

(a) 1.2 マイクロモルのギアの例。100 μ L のジメチルスルホキシド (DMSO) を各切断後の乾燥した洗浄プレートのウェルに添加し、よく混合して、相当する切断後の乾燥したマザープレートのウェルに移し、再度よく混合した。10 μ L のこの DMSO 溶液を、90% アセトニトリル / 10% 0.1% TFA 水溶液の混合液で 100 μ L に希釈した。20 μ L のアリコート、HPLC-MS 及び全分析用 HPLC (full analytical HPLC) で分析した。それぞれの場合、未精製の例示分子は、予想された $[M+H]^+$ イオン及び 80% 超 (215 nm UV 分析による) の HPLC ピークを示した。これにより、予備的なプロテアーゼ阻害スクリーニング用に良質な未精製例示物を含む約 10 mM DMSO ストック溶液が得られた。

40

【0138】

(b) 10 マイクロモルのクラウンの例。500 μ L の 90% アセトニトリル / 10% 0.1% TFA 水溶液の混合液を、各洗浄プレートのウェルに添加し、よく混合して、相当するマザープレートのウェルに移し、再度よく混合した。5 μ L のこの溶液を、90% アセトニトリル / 10% 0.1% TFA 水溶液の混合液で 100 μ L に希釈した。20 μ L のアリコート、HPLC-MS 及び全分析用 HPLC で分析した。それぞれの場合

50

、未精製の例示分子は、予想された $[M+H]^+$ イオン及び 80% 超 (215 nm UV 分析による) の HPLC ピークを示した。次に、未精製例示物を含むポリスチレン単位を凍結乾燥した。

【0139】

(c) 個々の例示物 (例 (b)) を、0.1% TFA 水溶液 / アセトニトリルの 1:1 の混合液 (1 mL) 中に再溶解して、半予備的 HPLC (Phenomenex Jupiter C₄、5 μ 、300 Å、250 × 10 mm、25 分にわたる 25 ~ 90% の A における B の勾配、4.0 mL / 分、215 nm UV 検出) によって精製した。画分を、予めタールが塗布された (pre-tarred) グラスサンプルバイアル瓶中で凍結乾燥して、精製された例示物 (具体的には、2 ~ 4 mg、40 ~ 80% 収率) を得た。

10

【0140】

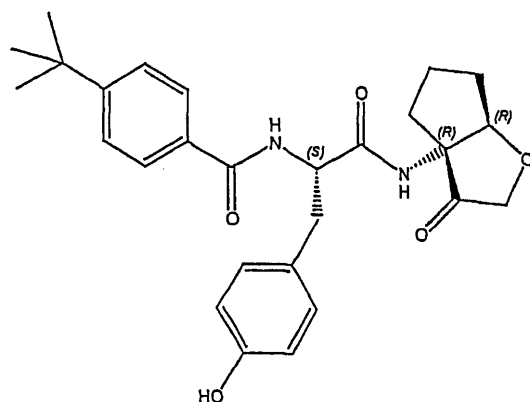
(d) 精製された例示物を、適当な容積の DMSO に溶かして、正確なプロテアーゼ阻害スクリーニング用の、10 mM のストック溶液を得た。

【0141】

実施例 1 (3aR, 6aR) 4-tert-ブチル-N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル) エチル] ベンズアミド

【0142】

【化 34】



20

スキーム 1 の一般的な詳細に従って、必要な 2 環式の構成単位、(3aR, 6aR) (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (8) を下記のように調製した。

【0143】

(1) (2S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオン酸 2-オキソシクロペンチルエステルの調製

a) メタノール (250 mL) におけるシクロペンタノン (11.6 mL、130 mmol) の溶液を、メタノール (75 mL) における水酸化カリウム (85% tech.、22.1 g、335 mmol) の攪拌溶液に、0 °C で 20 分かけて滴下した。この混合物を、0 °C で 30 分間攪拌した後、2-ヨードシル安息香酸 (36.45 g、138 mmol) を 1 時間にわたって一部ずつ添加した。この混合物を 4 時間で周囲温度に加温した後、周囲温度で 20 時間攪拌した。大部分の溶剤を真空中で除去した後、生成物をジクロロメタン (400 mL) で抽出した後、抽出物を水で洗浄し (2 × 250 mL)、乾燥し (Na₂SO₄)、さらに溶剤を真空中で除去したところ、2,2-ジメトキシシクロペンタノールが無色の油として残り (11.98 g)、これをさらに精製せずに使用した。

40

【0144】

b) 4-(ジメチルアミノ)ピリジン (1.0 g、8.2 mmol) を、ジクロロメタン (500 mL) における 2,2-ジメトキシシクロペンタノール (11.98 g、82 mmol)、(S)-2-tert-ブチルオキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピ

50

オン酸 (23.9 g、90.3 mmol) 及び 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (23.6 g、123.1 mmol) の攪拌懸濁液に 0℃で添加した。この混合物を 0℃で 4 時間攪拌した後、水 (2×300 ml) 及び飽和塩化ナトリウム水溶液 (200 ml) で洗浄し、乾燥し (Na₂SO₄)、さらに溶剤を真空中で除去したところ、(2S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオン酸 2,2-ジメトキシシクロペンチルエステルが黄色の油として残り (36.0 g)、これをさらに精製せずに使用した。

【0145】

c) 4-トルエンスルホン酸一水和物 (1.7 g、9.2 mmol) を、周囲温度でアセトン (450 ml) における (2S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオン酸 2,2-ジメトキシシクロペンチルエステル (36 g、91.6 mmol) の攪拌溶液に添加した。この溶液を 3 日間攪拌した後、水 (600 ml) 及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 ml) を添加し、さらに生成物を酢酸エチル (600 ml) で抽出した。水相を酢酸エチル (2×400 ml) で抽出した後、合わせた酢酸エチル溶液を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し (2×150 ml)、乾燥し (Na₂SO₄)、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣 (18.05 g) を、ヘプタン：酢酸エチル 3:1→2:1 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(2S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオン酸 2-オキソシクロペンチルエステルが無色の油として残った (18.05 g、シクロペンタノンから 40%)。TLC (単一の UV スポット、R_f = 0.25、ヘプタン：酢酸エチル 7:3)、R_t = 17.9~19.2 分のメインなブロードなピークを有する分析用 HPLC、HPLC-MS (R_t = 9.04~9.24 分、248.1 [M-Boc+2H]⁺、370.2 [M+Na]⁺、717.3 [2M+Na]⁺ のメインなブロード UV ピーク)。

【0146】

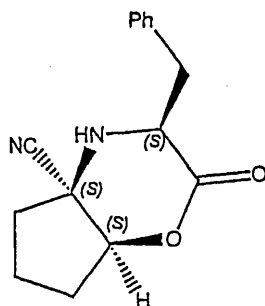
【化35】

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.42 (9H, 3 x CH₃, s), 1.79-2.48 (6H, 3 x cyclopentyl CH₂, m), 3.06-3.28 (2H, CH₂Ph, m), 4.60-5.20 (3H, COCHO + CHN + NH, m), 7.17-7.36 (5H, aromatic).

(2) (4aS, 7aS) 3S-ベンジル-2-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [1,4] オキサジン-4aS-カルボニトリルの調製

【0147】

【化36】



トリフルオロ酢酸 (75 ml) を、ジクロロメタン (250 ml) における (2S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオン酸 2-オキソシクロペンチルエステル (17.05 g、49.1 mmol) の攪拌溶液に 0℃で 60 分かけて滴下した。この混合物を 0℃で 75 分間攪拌した後、大部分の溶剤を真空中で除去した。トルエン (75 ml) を残渣に添加した後、溶剤を真空中で除去して、油を得、これをアセ

トニトリル (700 ml) に溶解した。硫酸マグネシウム (29.5 g)、次に、酢酸ナトリウム (20.1 g) を、攪拌溶液に加えた。得られた懸濁液を90分間攪拌した後、固体を濾過によって除去し、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣をプロパン-2-オール (650 ml) に溶解した後、窒素下で攪拌した。トリメチルシリルシナニド (trimethylsilyl cyanide) (13.1 ml、98.4 mmol) を15分かけて滴下した後、塩化亜鉛 (49 ml、ジエチルエーテルにおける1 M 溶液) を40分かけて添加した。この混合物を18時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (750 ml) に注意深く添加した。この混合物を水 (750 ml) で希釈した後、生成物をジエチルエーテルで抽出した (3 × 500 ml)。合わせたエーテル性溶液を飽和塩化ナトリウム水溶液 (350 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、さらに溶剤を真空中で除去して、茶色の油 (10.05 g) を得、これを、ヘプタン：酢酸エチル 4：1 → 3：2 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(3 S, 4 a R, 7 a S) 3-ベンジル-2-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [1, 4] オキサジン-4 a-カルボニトリルを白色固体として得た (4.54 g、36%)。TLC (単一のUVスポット、R_f = 0.45、ヘプタン：酢酸エチル 3：1)、分析用HPLC R_t = 14.521分、HPLC-MS (R_t = 7.645分、257.2 [M+H]⁺、279 [M+Na]⁺ の単一のメインのUVピーク)。

10

【0148】

【化37】

20

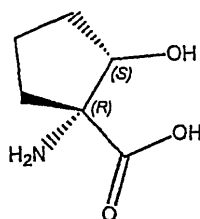
¹H (CDCl₃ at 298K); 1.70-2.29 (7H, 3 x CH₂ + NH, m), 2.84 (1H, CH₂CHN, dd, J = 14.3, 8.8Hz), 3.52 (1H, CH₂CHN, dd, J = 14.3, 3.6Hz), 3.90 (1H, CH₂CHN, dd, J = 9.8, 3.6Hz), 4.74 (1H, CHO, dd, J = 6.8, 5Hz), 7.15-7.32 (5H aromatic).

(3) 1 R-アミノ-2 S-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸の調製

【0149】

30

【化38】



tert-ブチルハイポクロライト (tert-butylhypochlorite) (4.0 ml、35.4 mmol) を、ジエチルエーテル (350 ml) における (3 S, 4 a R, 7 a S) 3-ベンジル-2-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [1, 4] オキサジン-4 a-カルボニトリル (4.53 g、17.7 mmol) の攪拌溶液に、0℃で2分にわたって窒素下で滴下した。この混合物を0℃で140分間攪拌した後、トリエチルアミン (7.4 ml、53 mmol) を30分かけて滴下した。得られた懸濁液を0℃で3時間、次に周囲温度で23時間、攪拌した。不溶性材料を濾過によって除去した後、濾液を真空中で濃縮した。残渣を、ヘプタン：酢酸エチル (7：3) で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、白色固体 (3.3 g、TLC [単一のUVスポット、R_f = 0.3、ヘプタン：酢酸エチル 2：1]、分析用HPLC R_t = 16.071分) が残り、これを0℃に冷却した

40

50

後、0℃で濃塩酸を1回添加した。この懸濁液を2時間で周囲温度まで加温した後、20時間攪拌した。反応混合物を、6個の加圧容器に等しく分配し、これを密閉した後、100℃で26時間加熱し、さらに周囲温度まで冷却した。反応混合物を再度合わせた後、生成物を水(400ml)で抽出し、さらにジエチルエーテル(2×200ml)で洗浄し、溶剤を真空中で除去したところ、残渣が残り、これを、0.01M 塩酸、水及び次に1.0M 水酸化アンモニウム水溶液で連続して溶出してDowex 50WX4-200イオン交換樹脂で精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、固体が残り、これを水：アセトニトリル(1：1)の混合液から3回凍結乾燥して、(1R, 2S) 1-アミノ-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸を明るい茶色の固体として得た(1.73g、67%)。HPLC-MS(UVで活性化しない、 $R_t = 0.54$ 10 1分、146.1[M+H]⁺)。

【0150】

【化39】

^1H (D_2O at 298K); 1.50-1.90 (4H, 2 x CH_2 , m), 2.16-2.25 (2H, CH_2 , m), 4.36 (1H, CHOH , dd, $J = 8.3, 7.7\text{Hz}$).

^{13}C (D_2O at 298K); 21.56 (d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.46 and 35.00 (both d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 69.74 (CNH_2), 77.54 (u, CHOH), 178.33 (CO_2H).

20

(4) 1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2S-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸の調製

(0.67g、4.6mmol)を、水：1,4-ジオキサン(2：1、45ml)における炭酸ナトリウム(1.0g、9.7mmol)の攪拌溶液に0℃で添加した。1,4-ジオキサン(15ml)における9-フルオレニルメチルクロロホルメート(1.25g、4.85mmol)の溶液を、30分かけて滴下した。得られた懸濁液を、0℃で75分間、次に周囲温度で45分間、攪拌した。水(200ml)を添加した後、濁った溶液をクロロホルムで洗浄した(2×140ml)。クロロホルム(100ml)を添加して、混合物を1M 塩酸で酸性にした(pH~2)。クロロホルム層を分離した後、水層をクロロホルムで再抽出した(2×100ml)。酸性化した水層から予め分離されたクロロホルム抽出物を合わせた後、乾燥し(Na_2SO_4)、さらに溶剤を真空中で除去したところ、無色の油が残り、これにヘプタン(100ml)を、-80℃で16時間貯蔵する前に加えた。溶剤を、油状の残渣から迅速にデカンテーションし、これをヘプタン(5ml)で洗浄した後、残った溶剤を真空中で除去して、(1R, 2S) 1-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸を油として得た(1.27g、75%)。TLC(メインなUVスポット、 $R_f = 0.20$ 、マイナーなUVスポット、 $R_f = 0.15$ 、 CHCl_3 における20%MeOH)、分析用HPLC $R_t = 17.172$ 分(メジャー)、 $R_t = 16.800$ 分(マイナー)及びHPLC-MS($R_t = 7.840$ 分、368.1[M+H]⁺、390.1[M+Na]⁺のメインUVピーク、 $R_t = 7.646$ 分、368.1[M+H]⁺、390.1[M+Na]⁺のマイナーなUVピーク)。 30 40

【0151】

【化40】

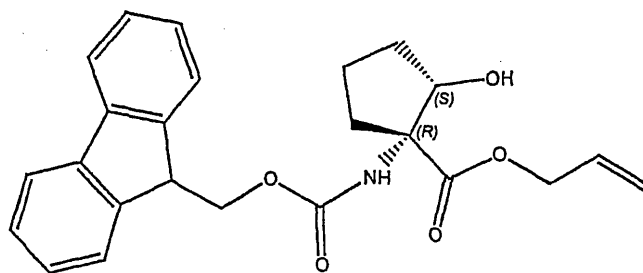
δ H (CDCl₃ at 298K); 1.60-2.16 (4H, CH₂CH₂CH₂ and 1H, CH₂CH₂CH₂, m), 2.35 (1H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.10 (1H, OH, brs), 4.24 (1H, Fmoc H-9, m), 4.36-4.57 (3H, Fmoc CH₂ and CHOH, m), 5.93 (1H, NH, s), 7.28-7.33 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.34-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.54-7.62 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.72-7.79 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

10

(5) 1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2S-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルの調製

【0152】

【化41】



20

ジクロロメタン (14 ml) における 1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2S-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸 (1.75 g、4.8 mmol) 及びトリカプリルメチルアンモニウムクロライド (トリカプリルメチルアンモニウムクロライド) (1.93 g、4.8 mmol) の溶液を、水 (14 ml) における炭酸水素ナトリウム (0.4 g、4.8 mmol) の攪拌溶液に添加した後、臭化アリル (1.44 ml、16.7 mmol) を一度に添加した。2相混合物を20時間攪拌した後、水 (50 ml) で希釈し、生成物をジクロロメタンで抽出した (2×50 ml)。合わせた有機層を乾燥し (MgSO₄)、溶剤を真空中で除去して、無色の油を得、これを、ヘプタン：酢酸エチル 10：3→20：7の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(1R, 2S)-1-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルが無色の油として残った (1.32 g、67%)。TLC (単一のUVスポット、R_f=0.25, ヘプタン：酢酸エチル 3：1)、分析用HPLC R_t=20.371分 (メジャー)、R_t=19.706分 (マイナー) 及びHPLC-MS (R_t=9.412分、408.1 [M+H]⁺、430.1 [M+Na]⁺ のメインUVピーク; R_t=9.102分、408.1 [M+H]⁺、430.1 [M+Na]⁺ のマイナーなUVピーク)。

30

40

【0153】

【化42】

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.6-2.63 (7H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, OH, m), 4.8-4.27 (1H, Fmoc H-9, m), 4.29-4.48 (3H, H-2 and Fmoc CH_2 , m), 4.57-4.66 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, brs), 5.22 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, dd, $J = 10.4, 1.0\text{Hz}$), 5.29 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, d, $J = 13.6\text{Hz}$), 5.77 (1H, NH, brs), 5.82-5.94 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, m), 7.27-7.32 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.55-7.62 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

10

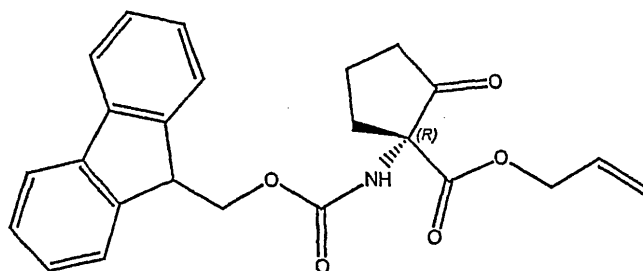
^{13}C (CDCl_3 at 298K); 20.37 (d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.52/32.29 and 34.20 (both d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 47.58/47.52 (u, Fmoc C-9), 66.53 (d, Fmoc CH_2), 67.34 (d, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 76.0 (q, CCO_2CH_2), CHOH under CHCl_3 ?, 118.97 (d, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$), 120.39 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.49 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.45/127.46 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.09 (u, Fmoc C-3 and C-6), 132.09 (u, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$), 141.72 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.20/144.33 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 156.76 (q, OCON), 173.61 (q, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

20

(6) 1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2-オキソシクロペンタンカルボン酸アリルエステルの調製

【0154】

【化43】



30

ジクロロメタン (1.0 ml) におけるジメチルスルホキシド (0.224 ml、3.15 mmol) の溶液を、20分かけて -70°C でジクロロメタン (2.5 ml) における塩化オキサリル (0.132 ml、1.51 mmol) の攪拌溶液に窒素下で添加した。この混合物を10分間攪拌した後、ジクロロメタン (3 ml) における (1R, 2S)-1-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステル (0.535 g、1.31 mmol) の溶液を20分にわたって添加した。この混合物を10分間攪拌した後、トリエチルアミン (0.92 ml、6.57 mmol) を5分かけて滴下した。次に、冷却浴を取り除いて、周囲温度で45分間攪拌し続けた。飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 ml) を添加した後、生成物をジエチルエーテルで抽出した ($2 \times 50\text{ ml}$)。合わせたエーテル層を、水 (25 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、さらに溶剤を真空中で除去して、無色の油 (520 mg) を得、これを、ヘプタン：酢酸エチル (3:1) で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(1R)-1-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2

40

50

ーオキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルが無色の油として残った (0.43 g、81%)。TLC (単一のUVスポット、 $R_f = 0.30$ 、ヘプタン：酢酸エチル 2 : 1)、 $R_t = 19.993$ 分のメインピークを有する分析用HPLC、HPLC-MS ($R_t = 10.132$ 分、406.1 [M+H]⁺、428.1 [M+Na]⁺の単一のUVピーク)。

【0155】

【化44】

¹H (CDCl₃ at 298K); 2.15-2.23 (2H, CH₂CH₂CH₂, m), 2.46-2.70 (4H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.21 (1H, Fmoc H-9, t, $J = 7.1$ Hz), 4.35 (2H, Fmoc CH₂, d, $J = 7.1$), 4.66 (2H, CH₂CH=CH₂, brs), 5.26-5.35 (2H, CH₂CH=CH₂, m), 5.80-5.91 (1H, CH₂CH=CH₂, m), 6.14 (1H, NH, brs), 7.27-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.54-7.60 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

10

¹³C (CDCl₃ at 298K); 19.19 (d, CH₂CH₂CH₂), 34.53 and 36.87 (both d, CH₂CH₂CH₂), 47.42 (u, Fmoc C-9), 67.43 and 67.665 (both d, Fmoc CH₂ and CH₂CH=CH₂), 67.85 (q, CCO₂CH₂), 119.92 (d, CH₂CH=CH₂), 120.40 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.52 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.51 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.16 (u, Fmoc C-3 and C-6), 131.09 (u, CH₂=CHCH₂), 141.68 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.00/144.16 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 155.25 (q, OCON), 169.25 (q, CO₂CH₂CH=CH₂) 211.30 (q, COCH₂CH₂).

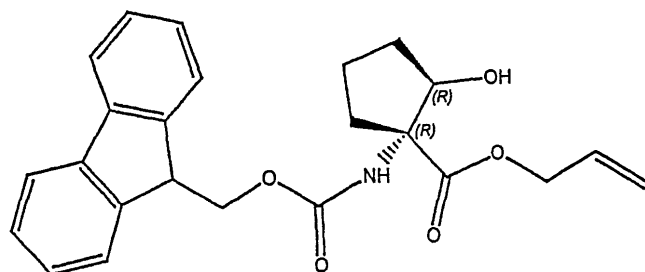
20

(7) 1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2R-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルの調製

【0156】

30

【化45】



40

水素化ホウ素ナトリウム (39 mg、1.04 mmol) を、0℃で1度にメタノール (6 ml) における1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2-ーオキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステル (0.42 g、1.04 mmol) の攪拌溶液に添加した。この混合物を10分間攪拌した後、溶剤を真空中で除去したところ、残渣が残った。水 (20 ml) 及びジクロロメタン (20 ml) を添加した後、1M塩酸を加えて、混合物を酸性にした (pH ~ 1.5)。ジクロロメタン層を集めた後、水層をジクロロメタン (20 ml) で抽出した。合わせたジクロロメタン層を飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 ml) で洗浄した。飽和塩化ナトリウム水溶液をジクロロメタン (10 ml) で抽出した後、ジクロロメタン層を合わせて、さらに乾燥し (MgSO₄)、溶

50

剤を真空中で除去して、無色の油 (420 mg) を得、これをヘプタン：酢酸エチル 7 : 3 → 13 : 7 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、1R- (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) -2R-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルが無色の油として残った (288 mg, 68%)。TLC (単一のUVスポット、Rf = 0.25、ヘプタン：酢酸エチル 3 : 1)、分析用HPLC Rt = 19.680分 (メジャー)、Rt = 20.323分 (マイナー) 及びHPLC-MS (Rt = 9.076分、408.1 [M+H]⁺、430.0 [M+Na]⁺ のメインUVピーク; Rt = 9.451分、408.1 [M+H]⁺、430.0 [M+Na]⁺ のマイナーなUVピーク)。4-トルエンスルホン酸一水和物 (30 mg, 0.16 mmol) を、トルエン (12 ml) におけるこの油 (230 mg) の溶液に添加した後、混合物を100℃に75分間加熱した。この油 (上記と同様の方法を用いて調製した) の2個のさらなるバッチ (170 mg 及び 35 mg) を、量を適当に測って4-トルエンスルホン酸一水和物で同様にして処理した後、これら3個のトルエン混合物を合わせて、溶剤を真空中で除去して、残渣を得、これを、ヘプタン：酢酸エチル 7 : 3 → 13 : 7 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(1R, 2R) 1- (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) -2-ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステルが無色の油として残った (380 mg)。TLC (単一のUVスポット、Rf = 0.25、ヘプタン：酢酸エチル 3 : 1)、分析用HPLC Rt = 18.141分の単一のUVピーク及びHPLC-MS (Rt = 9.140分、408.1 [M+H]⁺、430.1 [M+Na]⁺ の単一のUVピーク)。

【0157】

【化46】

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.72-2.44 (6H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.12-4.19 (1H, H-2, m), 4.27 (1H, Fmoc H-9, t, J = 6.5Hz), 4.37-4.55 (3H, Fmoc CH₂ and OH, m), 4.60-4.75 (2H, CH₂CH=CH₂, brs), 5.25 (1H, CH₂CH=CH₂, d, J = 10.5Hz), 5.30-5.39 (2H, CH₂CH=CH₂ and NH, m), 5.83-5.96 (1H, CH₂CH=CH₂, m), 7.29-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.39-7.44 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.58-7.65 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.77-7.80 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

¹³C (CDCl₃ at 298K); 20.92 (d, CH₂CH₂CH₂), 32.46 and 35.63 (both d, CH₂CH₂CH₂), 47.52 (u, Fmoc C-9), 66.55 and 67.37 (both d, Fmoc CH₂ and CH₂CH=CH₂), 69.43 (q, CCO₂CH₂), 80.50 (u, CHOH), 118.98 (d, CH₂=CHCH₂), 120.43 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.41 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.47/127.49 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.14/128.16 (u, Fmoc C-3 and C-6), 132.08 (u, CH₂=CHCH₂), 141.73 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.00/144.23 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 156.86 (q, OCON), 172.99 (q, CO₂CH₂CH=CH₂).

(8) 2R-tert-ブトキシ-1R- (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) シクロペンタンカルボン酸アリルエステルの調製

【0158】

【化47】

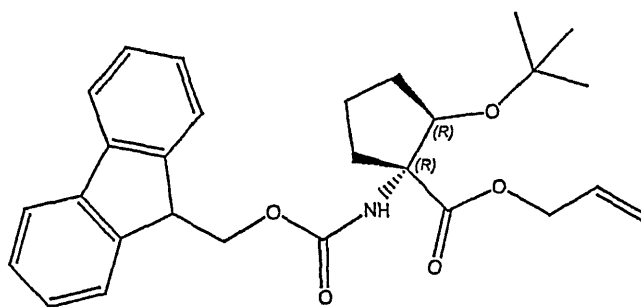
10

20

30

40

50



10

ジクロロメタン（5 ml）における 1 R -（9 H -フルオレン-9 -イルメトキシカルボ
 ニルアミノ）- 2 R -ヒドロキシシクロペンタンカルボン酸アリルエステル（360 mg
 、0.88 mmol）の攪拌溶液を、-70℃に密閉した加圧容器中で冷却した後、イソ
 プチレンガス（～3 ml）を溶液中に凝縮させた。濃硫酸（25 μl）を添加した後、加
 圧容器を密閉した。この混合物を周囲温度で20時間攪拌した後、-70℃に冷却した。
 N -メチルモルホリン（50 μl）を加えた後、開放した加圧容器を周囲温度まで加温し
 た。この混合物を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 ml）及び水（25 ml）で希
 釈した後、生成物をジクロロメタンで抽出した（50 ml、次に2×25 ml）。合わせた
 ジクロロメタン層を、飽和塩化ナトリウム水溶液（25 ml）で洗浄し、乾燥し（Na₂SO₄）、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣（370 mg）を、ヘプタン：酢酸エ
 チル 4：1→7：3の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィー
 によって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、2 R -tert
 -ブトキシ-1 R -（9 H -フルオレン-9 -イルメトキシカルボニルアミノ）シクロ
 ペンタンカルボン酸アリルエステルが無色の油として残った（305 mg、75%）。T
 LC（単一のUVスポット、R_f=0.50、ヘプタン：酢酸エチル 2：1）、分析用
 HPLC R_t=22.623分及びHPLC-MS（R_t=11.611分、408.
 1 [M - t Bu + 2 H]⁺、486.1 [M + Na]⁺の単一のUVピーク）。

20

【0159】

【化48】

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.06 (9H, tBu , s), 1.80-2.41 (6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, m), 4.21 (1H, Fmoc H-9, t, $J = 6.8\text{Hz}$), 4.26-4.50 (3H, Fmoc CH_2 and H-2, m), 4.58-4.74 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, brs), 5.21 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, d, $J = 10.4\text{Hz}$), 5.35 (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, d, $J = 17.2\text{Hz}$), 5.84-6.01 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ and NH , m), 7.26-7.30 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.37-7.39 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.57-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.70-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

10

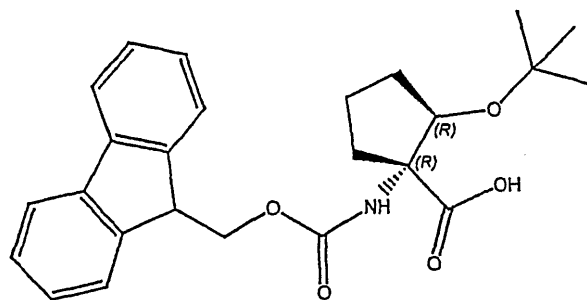
^{13}C (CDCl_3 at 298K); 21.69/21.47 (d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.98 and 33.82 (both d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 47.63 (u, Fmoc C-9), 66.54 and 66.89 (both d, Fmoc CH_2 and $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 70.07 and 74.03 (both q, CCO_2CH_2 and OCMe_3), 79.51 (u, CHOCMe_3), 118.53 (d, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$), 120.38 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.46 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.46 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.07 (u, Fmoc C-3 and C-6), 132.40 (u, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$), 141.70 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.32 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 155.13 (q, OCON), 173.00 (q, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

20

(9) 2 R-tert-ブトキシ-1 R-(9 H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)シクロペンタンカルボン酸の調製

【0160】

【化49】



30

テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (15 mg、0.013 mmol)、ジクロロメタン (5 ml)、次にフェニルトリヒドロシラン (153 μl 、1.24 mmol)を、窒素下で2 R-tert-ブトキシ-1 R-(9 H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)シクロペンタンカルボン酸アリルエステル (288 mg、0.62 mmol)に連続して添加した。この混合物を、45分間攪拌した後、0.01 M塩酸 (30 ml)を添加し、生成物をクロロホルムで抽出した (1 $\times$ 20 ml、次に1 $\times$ 10 ml)。合わせたクロロホルム層を乾燥し (Na_2SO_4)、溶剤を真空中で除去した。残渣 (460 mg)を、ヘプタン：酢酸エチル 2：1 $\rightarrow$ 1：3の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、2 R-tert-ブトキシ-1 R-(9 H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)シクロペンタンカルボン酸が無色の油として残った (205 mg、78%)。TLC (単一のUVスポット、 $R_f = 0.25$ 、ヘプタン：酢酸エチル 1：2)、分析用HPLC $R_t = 19.539$ 分及びHPLC-MS ($R_t = 9.850$ 分、368.1 $[\text{M}-\text{tBu}+2\text{H}]^+$ 、446.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の

40

50

単一のUVピーク)。

【0161】

【化50】

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.22 (9H, $t\text{-Bu}$, s), 1.77-2.37 (6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, m), 4.22 (1H, Fmoc H-9, t, $J = 6.8\text{Hz}$), 4.27-4.36 (2H, Fmoc CH_2 , m), 4.65 (1H, H-2, brs), 5.39 (1H, NH , brs), 7.27-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.56-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.73-7.76 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

10

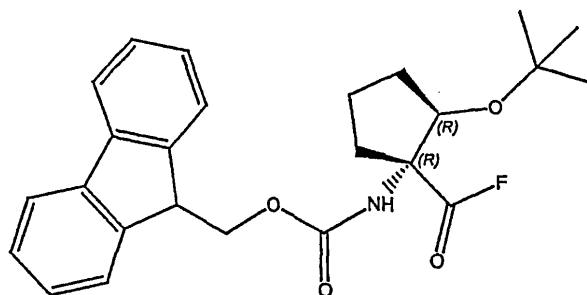
^{13}C (CDCl_3 at 298K); 21.48 (d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.70 and 35.31 (both d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 47.56 (u, Fmoc C-9), 67.22 (d, Fmoc CH_2), 68.77 (q, CCO_2CH_2 or OCMe_3 other peak under chloroform?), 78.58 (u, CHOCMe_3), 120.37 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.54 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.47 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.09/128.12 (u, Fmoc C-3 and C-6), 141.69/141.73 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.02/144.38 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 156.05 (q, OCON), 174.89 (q, CO_2H).

20

(10) (2R-tert-ブトキシ-1R-フルオロカルボニルシクロペンチル)カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステルの調製

【0162】

【化51】



30

ピリジン (53 μl 、0.66 mmol)、次にシアヌル酸フッ化物 (71 μl 、0.85 mmol) を、窒素下でジクロロメタン (5 ml) における 2R-tert-ブトキシ-1R-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)シクロペンタンカルボン酸 (159 mg、0.38 mmol) の攪拌溶液に、0℃で連続して添加した。懸濁液を、0℃で30分間、次に周囲温度で5時間、攪拌した。砕いた氷 (~10 ml) 及び氷冷した水 (10 ml) を添加した後、生成物をジクロロメタン (20 ml) で抽出した。ジクロロメタン層を乾燥し (MgSO_4)、溶剤を真空中で除去して、(2R-tert-ブトキシ-1R-フルオロカルボニルシクロペンチル)カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステルを薄茶色の油として得 (115 mg、71%)、これをさらに精製せずに使用した。TLC (単一のUVスポット、 $R_f = 0.45$ 、ヘプタン：酢酸エチル 2:1)、分析用HPLC $R_t = 23.933$ 分のメインUVピーク及びHPLC-MS ($R_t = 11.439$ 分、370.1 $[\text{M}^+ - \text{t-Bu} + 2\text{H}]^+$ 、448.1 [

40

50

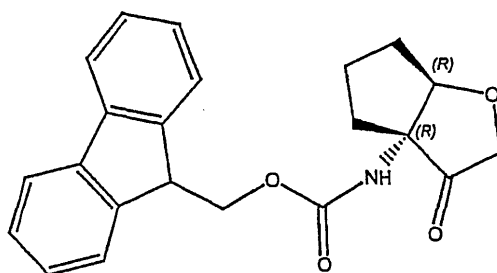
M + Na]⁺ のメインUVピーク)。

【0163】

(11) (3aR, 6aR) (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステルの調製

【0164】

【化52】



10

a) エーテル性ジアゾメタン [60℃で水 (1.5 ml) / エタノール (3.0 ml) における水酸化ナトリウム (1.05 g) にジエチルエーテル (15 ml) におけるジアザルド (diazald) (0.94 g、~3 mmol) を添加することにより生成] を、0℃でジクロロメタン (2 ml) における (1R, 2R) (2-tert-ブトキシ-1-フルオロカルボニルシクロペンチル) カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (115 mg、0.27 mmol) の攪拌溶液に添加した。この溶液を、0℃で20分間、次に周囲温度で20時間、攪拌した。酢酸 (0.6 ml、10.5 mmol) を添加した後、溶液を、tert-ブチルメチルエーテル (50 ml) を添加する前に、5分間攪拌した。エーテル層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (40 ml)、次に水 (2×30 ml) で洗浄した後、乾燥し (Na₂SO₄)、溶剤を真空中で除去した。残渣 (130 mg) を、ヘプタン：酢酸エチル 4：1→1：3の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、[2R-tert-ブトキシ-1R-(2-ジアゾアセチル)シクロペンチル] カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (16 mg) が油として残り、これをさらに精製せずに使用した。

20

30

【0165】

b) 酢酸：水 (4：1、1.0 ml) における塩化リチウム (15 mg、0.36 mmol) の溶液を、[2R-tert-ブトキシ-1R-(2-ジアゾアセチル)シクロペンチル] カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (16 mg) に添加した。この溶液を2.5時間攪拌した後、クロロホルム (25 ml) 及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (25 ml) を添加した。クロロホルム層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (25 ml)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (25 ml) で洗浄し、乾燥し (Na₂SO₄)、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣 (16 mg) を、ヘプタン：酢酸エチル 31：9→3：1の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、(3aR, 6aR) (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) カルバミン酸9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (11.0 mg) が白色固体として残った。TLC (単一のUVスポット、R_f = 0.3、ヘプタン：酢酸エチル 2：1)、分析用HPLC (R_t = 18.872分のメインUVピーク及びHPLC-MS (R_t = 9.208分、364.0 [M+H]⁺、386.0 [M+Na]⁺ のメインUVピーク)。

40

【0166】

【化53】

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.55-2.19 (6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, m), 4.15 (1H, H-2, d, $J = 16.8\text{Hz}$), 4.19 (1H, Fmoc H-9, t, $J = 6.7\text{Hz}$), 4.31 (1H, H-2, d, $J = 16.8\text{Hz}$), 4.36-4.44 (2H, Fmoc CH_2 , m), 4.74 and 4.97 (each 1H, H-6a and NH , brs), 7.29-7.36 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.38-7.44 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.53-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.80 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

^{13}C (CDCl_3 at 298K); 24 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33 and 37 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 48 (u, Fmoc C-9), 68 (Fmoc CH_2), 70 (C-3a), 72 (d, C-2), 87 (u, C-6a), 120 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128 (u, Fmoc C-3 and C-6), 142 (Fmoc C-4' and C-5'), 144 (Fmoc C-1' and C-8'), 156 (OCON), 215 (C-3).

10

スキーム 2 の一般的な詳細に従って、必要な 2 環式の構成単位、(3 a R, 6 a R) (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル) カルバミン酸 9 H-フルオレン-9-イルメチルエステル (8) を、下記のようにして、構成単位-リンカー構築物 (10) に変換した。

20

【0167】

(3 a R, 6 a R) (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3 a-イル) カルバミン酸 9 H-フルオレン-9-イルメチルエステル (8) (26.0 mg, 0.072 mmol) を、酢酸ナトリウム 3 水和物 (14.6 mg, 0.107 mmol, 1.5 当量) を含むエタノール (1.75 mL) 及び水 (0.25 mL) の混合液に溶解した。4-[[(ヒドラジノカルボニル) アミノ] メチル] シクロヘキサノカルボン酸トリフルオロアセテート (23.6 mg, 0.072 mmol, 1.0 当量, Murphy, A. M. et al, J. Am. Chem. Soc., 114, 3156-3157, 1992) を添加し、混合物を 24 時間還流した。クロロホルム (35 mL) を添加し、有機溶液を HCl (2 × 15 mL, ~pH 3)、次にブライン (1 × 15 mL) で洗浄し、乾燥し (Na_2SO_4)、真空中で還元することによって、未精製の構成単位-リンカー構築物 (10) を無色のガムとして得た。収率 40.8 mg、分析用 HPLC Rt = 17.57 及び 18.08 分に 2 個の生成物のピーク (cis/trans 幾何異性体)、HPLC-MS (双方とも 561 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、1121 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ の 2 × UV ピーク)。未構築物 (10) を、構築物のローディングに直接使用した。

30

【0168】

スキーム 2 の一般的な詳細に従って、必要な構成単位-リンカー構築物 (10) を、下記のようにして、ローディングされた構成単位-リンカー構築物 (11) を提供する固相に結合させた。

40

【0169】

構成単位-リンカー構築物 (10) (0.066 mmol)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 25.0 mg, 0.066 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物及び (HOBt, 10.1 mg, 0.066 mmol) を、ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し、N-メチルモルホリン (NMM, 14.4 μL , 0.13 mmol) を添加した。5 分間予め活性化した後、遊離アミンギア (20 × 1.2 mmol)、次にジメチルホルムアミド (0.5 mL) を添加し、一晩放置した。次に、消費されたカップリング溶液を遊離アミンクラウン (2 × 10 μmol) に添加し、一晩放置した。標準的な洗浄及び分析から、87% でローディングが示された。

50

【0170】

スキーム2の一般的な詳細に従って、必要なローディングされた構成単位ーリンカー構築物(11)を、下記のようにして、固相上で作製した。

【0171】

ローディングされた構築物(11)を、標準的なFmoc脱保護及びFmoc-Tyr(OBu^t)-OH、次に4-tert-ブチル安息香酸との順次カップリングによって、実施例1の(3aR, 6aR) 4-tert-ブチル-N-[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イルカルバモイル)エチル]ベンズアミドにした。この未精製例示物を切断して、分析した(一般的な技術を参照)。HPLC Rt=17.99分(>90%)、HPLC-MS 465.2 [M+H]⁺、951.4 [2M+Na]⁺。 10

【0172】

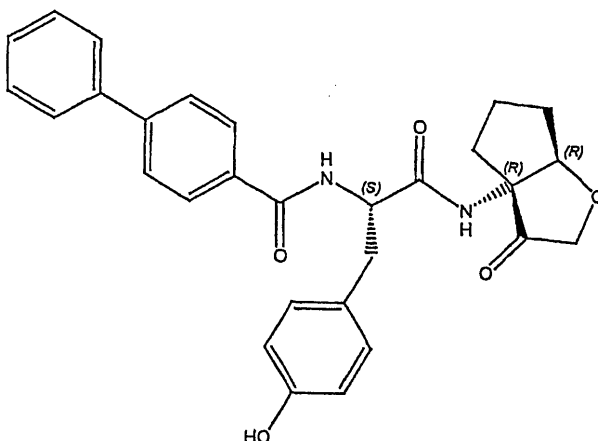
下記実施例(2~12)を、実施例1で詳述したのと同様にして調製し、必要な試薬を用いてカップリングして、全長分子を得た。

【0173】

実施例2 (3aR, 6aR) ビフェニル-4-カルボン酸[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イルカルバモイル)エチル]アミド

【0174】

【化54】



HPLC Rt=17.43分(>95%)、HPLC-MS 485.2 [M+H]⁺。

【0175】

実施例3 (3aR, 6aR) ナフタレン-1-カルボン酸[2-(4-ヒドロキシフェニル)-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イルカルバモイル)エチル]アミド

【0176】

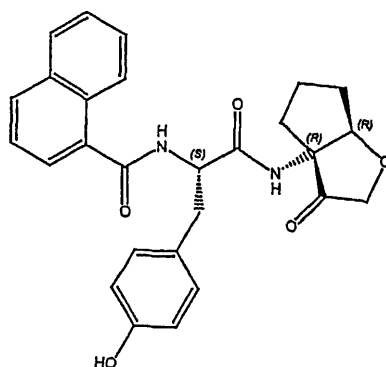
【化55】

10

20

30

40



10

HPLC $R_t = 15.195$ 分 ($> 95\%$)、HPLC-MS $459.2 [M+H]^+$ 。

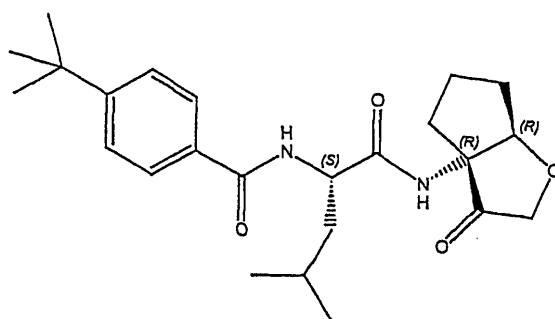
【0177】

実施例4 (3aR, 6aR) 4-tert-ブチル-N-[3-メチル-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イルカルバモイル)ブチル]ベンズアミド

【0178】

【化56】

20



30

HPLC $R_t = 20.158$ 分 ($> 80\%$)、HPLC-MS $415.1 [M+H]^+$ 、 $851.3 [2M+Na]^+$ 。

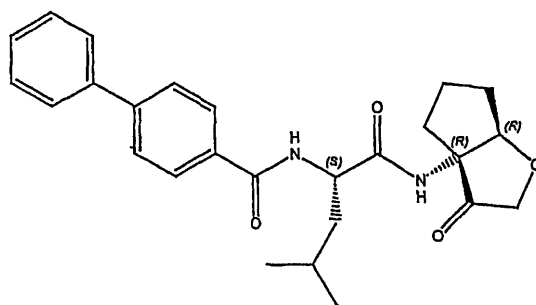
【0179】

実施例5 (3aR, 6aR) ビフェニル-4-カルボン酸-N-[3-メチル-1S-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イルカルバモイル)ブチル]ベンズアミド

【0180】

【化57】

40



HPLC $R_t = 19.53$ 分 ($> 85\%$)、HPLC-MS $435.2 [M+H]^+$ 、 $891.4 [2M+Na]^+$ 。

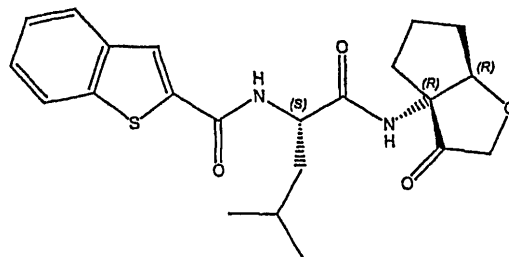
50

【0181】

実施例6 (3aR, 6aR) ベンゾ [b] チオフェン-2-カルボン酸 [3-メチルー1S-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル) プチル] アミド

【0182】

【化58】



10

HPLC $R_t = 18.36$ 分 ($>80\%$)、HPLC-MS $415.1 [M+H]^+$ 、 $851.3 [2M+Na]^+$ 。

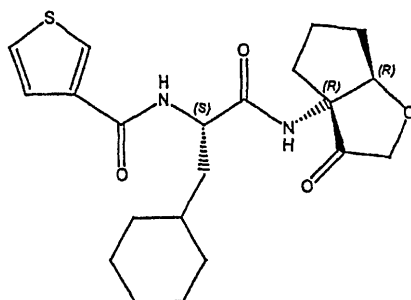
【0183】

実施例7 (3aR, 6aR) チオフェン-3-カルボン酸 [2-シクロヘキシル-1S-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イルカルバモイル) エチル] アミド

20

【0184】

【化59】



30

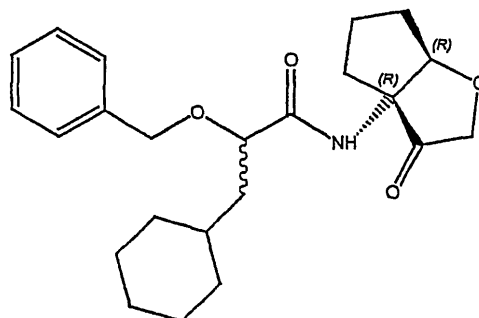
HPLC $R_t = 17.79$ 分 ($>85\%$)、HPLC-MS $405.2 [M+H]^+$ 、 $831.3 [2M+Na]^+$ 。

【0185】

実施例8 (2RS, 3aR, 6aR) 2-ベンジルオキシ-3-シクロヘキシル-N-(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル) プロピオンアミド

【0186】

【化60】



40

50

HPLC Rt = 21.77-21.97分 (>90%)、HPLC-MS 386.3 [M+H]⁺。

【0187】

(a) 3-シクロヘキシル-2S-ヒドロキシプロピオン酸 (化合物 (14) スキーム 4) の調製

水 (40 ml) における亜硝酸ナトリウム (12.1 g、175 mmol) の溶液を、1.5 時間にわたって 0℃ で 0.5 M 硫酸 (120 ml、60 mmol) における (S)- α -アミノシクロヘキサプロピオン酸水和物 (5 g、26.5 mmol) の攪拌懸濁溶液に滴下した。この混合物を 20 時間かけて周囲温度にまで加温した。生成物をジエチルエーテルで抽出した (2×25 ml) 後、エーテル層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し (2×25 ml)、乾燥し (Na₂SO₄)、溶剤を真空中で除去した。残渣 (5.3 g) を、ジエチルエーテル (10 ml) 及びヘプタン (25 ml) から再結晶化して、3-シクロヘキシル-2S-ヒドロキシプロピオン酸を白色固体として得た、収率 2.4 g、(53%)。

【0188】

【化 6 1】

δ_H (400MHz, CDCl₃ at 298K), 0.89-1.35 (5H, m) and 1.51-1.86 (7H, m) (OCHCH₂ and cyclohexyl), 4.32 (1H, OCHCH₂, m)

20

(b) 2RS-ベンジルオキシ-3-シクロヘキシルプロピオン酸 (化合物 (15) スキーム 4) の調製

水素化ナトリウム (265 mg の油における 60% 分散液、6.6 mmol) を、5 分にわたって 0℃ で 3-シクロヘキシル-2S-ヒドロキシプロピオン酸 (0.52 g、3.0 mmol)、ジメチルホルムアミド (5 ml) 及びジクロロメタン (5 ml) の攪拌混合物に 2 回に分けて添加した。この混合物を 0℃ で 5 分間、次に周囲温度で 45 分間攪拌した。次に、臭化ベンジル (0.45 ml、3.8 mmol) を加えた後、この混合物を、ジメチルホルムアミド (5 ml) を添加する前に、1 時間、攪拌した。4 時間攪拌した後、ヨウ化カリウム (50 mg、0.3 mmol) を添加した。混合物を 20 時間攪拌した後、55℃ で 1 時間加熱し、さらに周囲温度まで冷却して、水 (15 ml) に注いだ。飽和塩化ナトリウム水溶液 (5 ml) を添加した後、混合物をジクロロメタン (5 ml、次に 10 ml) で抽出して、これを捨てた。水層を 1 M 塩酸 (10 ml) で酸性化した後、ジクロロメタンで抽出した (2×10 ml)。ジクロロメタン層を乾燥し (MgSO₄)、溶剤を真空中で除去した。残渣 (0.55 g) をジメチルホルムアミド (8 ml) に溶解した後、水素化ナトリウム (190 mg の油における 60% 分散液、4.75 mmol) を添加する前に 0℃ に冷却した。この混合物を 30 分間攪拌した後、ポリマー結合イソシアネート (380 mg、2 mmol N g⁻¹) を添加した。この混合物を周囲温度で 2 時間攪拌した後、水 (15 ml) に注いだ。1 M 塩酸 (10 ml) を添加した後、生成物をジクロロメタン (2×10 ml) で抽出し、乾燥し (Na₂SO₄)、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣を、メタノール：ジクロロメタン 0：1→1：20 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、2RS-ベンジルオキシ-3-シクロヘキシルプロピオン酸を無色の油として得た、収率 41 mg (5.2%)。

30

40

【0189】

HPLC-MS (Rt = 9.47 分、261.2 [M-H]⁻、285.2 [M+Na]⁺、547.3 [2M+Na]⁺ の単一のメイン UV ピーク)。

【0190】

【化 6 2】

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.72-1.03 (2H, cyclohexane, m), 1.08-1.38 (3H, cyclohexane, m), 1.45-1.93 (6H + 2H β , cyclohexane, m), 3.93-4.18 (1H α ; OCHCO), 4.35-4.53 (1H, $\underline{CH_2O}$, d, $J = 11.52$ Hz), 4.68-4.88 (1H, $\underline{CH_2O}$, d, $J = 11.54$ Hz), 7.20-7.47 (5H, ArH, m), 9.36 (1H, OH, brs).

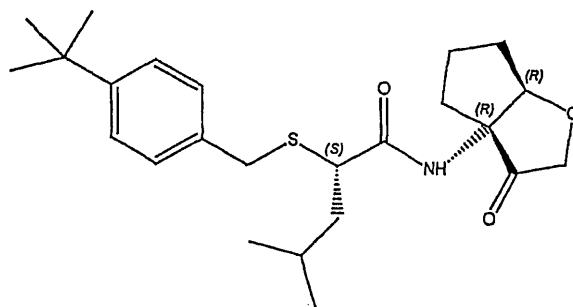
化合物 (15) を、(Fmoc の標準的な除去後) ローディングされた構成単位ーリンカー構築物 (11) に標準的な条件下でカップリングした後、切断して、実施例 8 を得た。

【0191】

実施例 9 (3aR, 6aR) 2-(4-tert-ブチルベンジルスルファニル)-4-メチルペンタン酸 (3-オキソヘキサヒドロシクロペント [b] フラン-3a-イル) アミド

【0192】

【化63】



HPLC $R_t = 23.67$ 分 ($>80\%$)、HPLC-MS $418.3 [M+H]^+$ 。

【0193】

(a) 2R-ブromo-4-メチルペンタン酸 (化合物 (17)、スキーム 5) の調製
水 (15 ml) における亜硝酸ナトリウム (5.1 g, 73 mmol) の溶液を、水 (1000 ml) における D-ロイシン (8.75 g, 67 mmol)、臭化カリウム (29.75 g, 0.25 mol) 及び濃硫酸 (8.6 ml) の攪拌混合液に 0℃ で 5 時間かけて滴下した。この混合物を 0℃ で 30 分間、次に周囲温度で 20 時間攪拌した。生成物をジエチルエーテルで抽出した (2 × 150 ml) 後、合わせたエーテル層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し (2 × 100 ml)、乾燥し ($MgSO_4$)、さらに溶剤を真空中で除去した。残渣を、メタノール：ジクロロメタン 1:50 → 1:20 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去したところ、2R-ブromo-4-メチルペンタン酸 (17) が無色の油として残った、収率 1.60 g、(12.3%)。TLC (単一のスポット、 $R_f = 0.2$ 、メタノール：ジクロロメタン 1:20)。加えて、若干不純物のある生成物の第二の収穫 (5.2 g, 40%) が得られた。

【0194】

【化64】

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.95 and 0.99 (both 3H, $\underline{CH_3CH}$, d, $J = 6.55$ Hz), 1.77-1.89 (1H, $\underline{CH_3CH}$, m), 1.93 (2H β , m), 4.31 (1H α , t, $J = 7.7$ Hz), 9.3 (1H, $\underline{CO_2H}$, brs).

(b) 2S-(4-tert-ブチルベンジルスルファニル)-4-メチルペンタン酸の調製 (化合物 (19)、スキーム 5)

10

20

30

40

50

ジメチルホルムアミド (15 ml) における 2 R-ブromo-4-メチルペンタン酸 (化合物 (17)、1.1 g、5.6 mmol) 及び (4-(tert-ブチル)フェニル)メタンチオール (1.0 g、5.6 mmol) の溶液に窒素を 5 分間流した後、0 °C に冷却した。トリエチルアミン (0.79 ml、5.7 mmol) を 1 分かけて滴下した後、混合物を周囲温度で 2 日間攪拌した。溶剤を真空中で除去し、残渣を、メタノール：ジクロロメタン 0 : 1 → 1 : 20 の勾配で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去すると、残渣が残り、これを酢酸エチル：ヘプタン 2 : 5 で溶出してシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去して、2 S-(4-tert-ブチルベンジルスルファニル)-4-メチルペンタン酸 (19) を無色の油として得た、収率 150 mg、(9%)。TLC (単一のスポット、R_f = 0.2、ヘプタン：酢酸エチル 5 : 2)、R_t = 22.117 分のメインピークを有する分析用 HPLC、HPLC-MS (R_t = 11.072 分、317.2 [M+Na]⁺ の単一のメイン UV ピーク)。

10

【0195】

【化65】

δ_H (400MHz, CDCl₃ at 298K), 0.70 and 0.85 (both 3H, CH₃CH, d, *J* = 6.3), 1.29 (9H, (CH₃)₃C, s), 1.44-1.51 (1H, CH₃CH, m), 1.62-1.75 (2H β , m), 3.15-3.20 (1H α , m), 3.81 and 3.88 (both 1H, SCH₂, d, *J* = 13.2Hz), 7.25-7.35 (4H, aromatic).

20

化合物 (19) を、(Fmoc の標準的な除去後) ローディングされた構成単位ーリンカー構築物 (11) に標準的な条件下でカップリングした後、切断して、実施例 9 を得た。

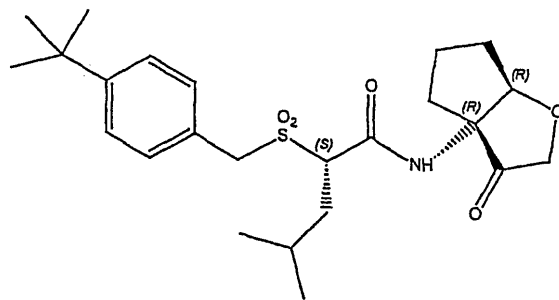
【0196】

実施例 10 (3aR, 6aR) 2-(4-tert-ブチルフェニルメタンスルホニル)-4-メチルペンタン酸 (3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル)-アミド

【0197】

【化66】

30



HPLC R_t = 21.86 分 (>80%)、HPLC-MS 450.2 [M+H]⁺。

40

【0198】

スキーム 9 化合物 (19) を、(Fmoc の標準的な除去後) ローディングされた構成単位ーリンカー構築物 (11) に標準的な条件下でカップリングした。この中間のローディングされたチオエーテル (1.2 μmole ギア) を、5 時間、ジクロロメタン (200 μL) における m-クロロ過安息香酸 (5 当量、65% 試薬、1.6 mg) で酸化した後、標準的な洗浄を行ない、さらに切断して、実施例 10 を得た。

【0199】

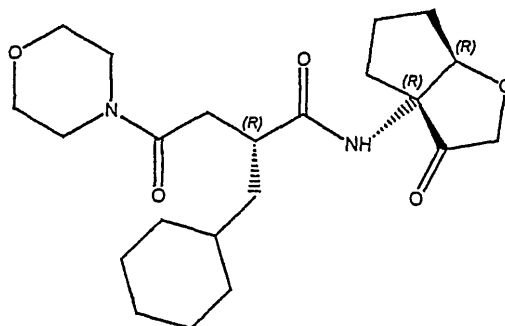
実施例 11 (3aR, 6aR) 2-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-N-(3-オキソヘキサヒドロシクロペンタ [b] フラン-3a-イル

50

ル)ーブチルアミド

【0200】

【化67】



10

HPLC-MS 407.1 $[M+H]^+$ 、835.1 $[2M+Na]^+$ 。

【0201】

(a) 2R-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸メチルエステルの調製

1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド・HCl (1.12 g、5.69 mmol)、次に1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物 (0.87 g、5.69 mmol) を、アルゴン下で0℃でジメチルホルムアミド (10 ml) における2R-(シクロヘキシルメチル)コハク酸1-メチルエステル (化合物(24)、1.0 g、4.38 mmol) の攪拌溶液に添加した。この混合物を25分間攪拌した後、モルホリン (0.7 ml、8.76 mmol) を1分かけて滴下し、周囲温度で16時間攪拌し続けた。生成物を酢酸エチル (200 ml) で抽出した後、1.0 M 塩酸 (3×100 ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (3×100 ml)、水 (100 ml)、さらに飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、さらに溶剤を真空中で除去して、2R-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸メチルエステルをオフホワイトの固体として得た、収率1.22 g、(94%)。HPLC-MS (R_t=7.91分、298.1 $[M+H]^+$ 、617.3 $[2M+Na]^+$ の単一のピーク)。

20

30

【0202】

(b) 2R-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸の調製 (化合物(25)、スキーム7)

水 (27 ml) における水酸化リチウム-水和物 (0.51 g、12.18 mmol) の溶液を、0℃でテトラヒドロフラン (55 ml) 及びメタノール (27 ml) における2R-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸メチルエステル (1.21 g、4.06 mmol) の攪拌溶液に添加した。この混合物を1時間周囲温度で攪拌した後、水 (100 ml) で希釈した。水層をジエチルエーテルで抽出し (2×50 ml)、これを捨てた後、1 M 塩酸でpH=1~2に酸性化した。生成物をジクロロメタンで抽出した (3×50 ml) 後、合わせたエーテル層を水 (2×50 ml)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (2×50 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、さらに溶剤を真空中で除去したところ、残渣が残った。この残渣をメタノール：ジクロロメタン 1:100→3:100の勾配で溶出してシリカゲルによるクロマトグラフィーによって精製した。適当な画分を合わせ、溶剤を真空中で除去して、2R-シクロヘキシルメチル-4-モルホリン-4-イル-4-オキソ-酪酸 (25) を白色固体として得た、収率0.82 g、(71%)。HPLC-MS (R_t=6.769分、284.2 $[M+H]^+$ 、589.2 $[2M+Na]^+$ の単一のピーク)。

40

【0203】

【化68】

50

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.77-0.90 (2H, $\underline{CH_2}$ (cyclohexane), m), 1.05-1.40 (4H, $\underline{CH_2}$ (cyclohexane), m), 1.50-1.90 (7H, $\underline{CH}$ (cyclohexane), $\underline{CH_2}$ (cyclohexane), m), 2.30-2.44 (2H β , m), 2.64-2.77 (1H α , m), 2.96-3.10 (1H, $\underline{OH}$, brs), 3.40-3.78 (8H, $\underline{CH_2OCH_2}$ and $\underline{CH_2NCH_2}$, m).

化合物(25)を、(Fmocの標準的な除去後)ローディングされた構成単位ーリンカー構築物(11)に標準的な条件下でカップリングした後、切断して、実施例11を得た。

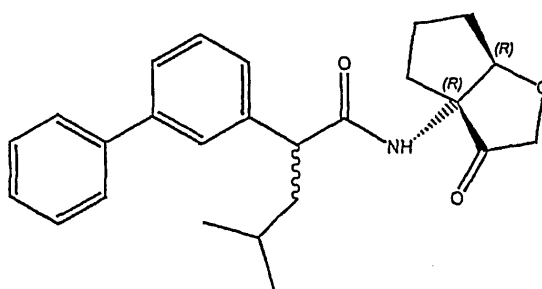
10

【0204】

実施例12 (3aR, 6aR) 2-ビフェニル-3-イル-4-メチル-ペンタン酸(3-オキソ-ヘキサヒドロシクロペンタ[b]フラン-3a-イル)-アミド

【0205】

【化69】



20

HPLC $R_t = 20.53$ 分 ($>90\%$)、HPLC-MS $392.3 [M+H]^+$ 。

【0206】

(a) ビフェニル-3-イル-酢酸メチルエステルの調製(化合物(27)、スキーム8)

30

濃硫酸(588 μ L)を、メタノール(100 mL)における3-ブロモフェニル酢酸(10 g、46.5 mmol)の溶液に添加した。この混合物を1.5時間還流した後、周囲温度に冷却し、減圧下で蒸発させて、残渣を得た。この残渣をジエチルエーテル(500 mL)に再度溶解し、水(2 $\times$ 100 mL)、ブライン(100 mL)で洗浄し、乾燥し($MgSO_4$)、さらに減圧下で蒸発させて、3-ブロモフェニル酢酸メチルエステル(10.65 g)を得た。この3-ブロモフェニル酢酸メチルエステルを、トルエン(117 mL)に溶かした後、フェニルボロン酸(6.8 g、55.69 mmol)、次に炭酸ナトリウムの水溶液(93 mL、2 M)及びテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(1.6 g、1.41 mmol)を添加した。この混合物を一晩攪拌した後、周囲温度に冷却し、飽和塩化アンモニウム(100 mL)の水溶液を添加した。この混合物を酢酸エチルで抽出し(2 $\times$ 200 mL)、乾燥し(Na_2SO_4)、さらに減圧下で蒸発させて、残渣を得た。酢酸エチル：ヘプタン(3：48)を溶出液として用いたシリカ(200 g)による残渣のフラッシュクロマトグラフィーによって、ビフェニル-3-イル酢酸メチルエステルを得た、収率10.5 g、(99%)。TLC(単一のスポット、 $R_f = 0.24$ 、ヘプタンにおける10%酢酸エチル)、分析用HPLC $R_t = 19.55$ 分、HPLC-MS ($R_t = 9.35$ 分、227.1 $[M+H]^+$ の単一のメインUVピーク)。

40

【0207】

【化70】

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K) 3.76 (2H, s, $CH_2CO_2CH_3$), 3.77 (3H, s, OCH_3), 7.34-7.66 (9H, m, biphenyl-3-yl).

(b) ビフェニル-3-イル-酢酸の調製

水 (39 mL)、次に水酸化リチウム-水和物 (4.2 g、101.5 mmol) を、メタノール (265 mL) におけるビフェニル-3-イル酢酸メチルエステル (11.43 g、50.57 mmol) の溶液に添加した。この混合物を周囲温度で2時間攪拌した後、有機溶液を減圧下で除去した。混合物を希釈塩酸 (1 M、80 mL) で酸性化し、クロロホルムで抽出し (2×100 mL)、乾燥し ($MgSO_4$)、さらに減圧下で蒸発させて、ビフェニル-3-イル酢酸を白色固体として得た、収率 10.6 g、(99%)、分析用 HPLC $R_t = 16.565$ 分、HPLC-MS ($R_t = 7.91$ 分、213.1 [M+H]⁺ の単一のメイン UV ピーク)。
【0208】
【化71】

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K) 3.77 (2H, s, $CH_2CO_2CH_3$), 7.28-7.52 (9H, m, biphenyl-3-yl).

20

(c) 2RS-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンテ-4-エン酸 (2RS-biphenyl-3-yl-4-methylpent-4-enoic acid) の調製

無水テトラヒドロフラン (84 mL) におけるビフェニル-3-イル酢酸 (7.0 g、33 mmol) の溶液を、 $-78^\circ C$ で無水テトラヒドロフラン (84 mL) におけるリチウムジイソプロピルアミド (36.4 mL、ヘキサンにおける 2 M 溶液) の溶液に滴下した。この混合物を $0^\circ C$ まで加温し、40 分間攪拌した。次に、混合物を $-78^\circ C$ まで冷却し、3-ブロモ-2-メチルプロペン (4.97 mL) をすばやく添加した。この混合物を、 $-78^\circ C$ で1時間攪拌した後、水 (28 mL) を添加して、有機溶液を減圧下で除去した。さらに、混合物を塩酸 (6 M、14 mL) で酸性化し、酢酸エチルで抽出し (3×100 mL)、乾燥し ($MgSO_4$)、減圧下で蒸発させて、残渣を得た。メタノール：ジクロロメタン (3:97) を溶出液として用いたシリカ (400 g) による残渣のフラッシュクロマトグラフィーによって、不純物を含む2-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンテ-4-エン酸 (8.3 g) が得られた。メタノール：ジクロロメタン (1.5:98.5) を用いたシリカ (400 g) による残渣のフラッシュクロマトグラフィーによって、純粋な2-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンテ-4-エン酸が得られた、収率 5.27 g、(60%)、TLC (単一の UV スポット、 $R_f = 0.28$ 、ジクロロメタンにおける 5% メタノール)、分析用 HPLC $R_t = 19.99$ 分、HPLC-MS ($R_t = 9.57$ 分、267.1 [M+H]⁺ の単一のメイン UV ピーク)。
【0209】
【化72】

40

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 1.765 (3H, s, CH_3), 2.53 (1H, dd, $J = 6.6$ and 14.7 Hz, 3- H_1), 2.91 (1H, dd, $J = 8.9$ and 14.7 Hz, 3- H_1), 3.92 (1H, dd, $J = 6.6$ and 8.9 Hz, 2-H), 4.79 (2H, d, $J = 10.7$ Hz, 5- H_2), 7.30-7.62 (9H, m, biphenyl-3-yl).

(d) 2RS-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンタン酸の調製 (化合物 (28)、スキーム 8)

炭素上のパラジウム (Palladium on carbon) (10%、300 mg) を、 $0^\circ C$ でエタノール (40 mL) における 2RS-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンテ-4-エン酸 (50

1 g、3.76 mmol) の溶液に一部ずつ添加した。次に、水素雰囲気を導入し、混合物を周囲温度まで加温した。この混合物を18時間攪拌した後、水素雰囲気を除去し、混合物をセライトで濾過し、触媒をエタノール(40 mL)で洗浄した。合わせた有機濾液を減圧下で濃縮して、残渣を得、これをメタノール：ジクロロメタン(1：99)を溶出液として用いたシリカ(150 g)でフラッシュクロマトグラフィーにかけることによって、2RS-ビフェニル-3-イル-4-メチルペンタン酸を得た、収率980 mg、(98%)、TLC(単一のUVスポット、 $R_f = 0.45$ 、ジクロロメタンにおける5%メタノール)、分析用HPLC $R_t = 20.92$ 分、HPLC-MS ($R_t = 10.15$ 分、 $269.1 [M+H]^+$ 、 $291.1 [M+Na]^+$ の単一のメインUVピーク)

10

【0210】

【化73】

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.93 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, $2 \times CH_3$), 1.52-1.57 (1H, m, 4- H_1), 1.71-1.76 (1H, m, 3- H_1), 1.97-2.05 (1H, m, 3- H_1), 3.66 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, 2- H_1), 7.32-7.60 (9H, m, biphenyl-3-yl).

化合物(28)をローディングされた構成単位-リンカー構築物(11)に標準的な条件下でカップリングした後、切断して、実施例12を得た。

20

【0211】

実施例A システインプロテアーゼ活性に関するアッセイ

本発明の化合物を、化合物の阻害の特徴を明瞭にするように設計された数多くの文献に基づいた生化学的なアッセイの一で試験してもよい。これらのタイプのアッセイのデータから、化合物の潜在性及び反応の率を測定、定量できる。この情報は、単独であるいは他の情報と組み合わせて、所定の薬理学的な効果を生じるのに必要な化合物の量が測定できるであろう。

【0212】

一般的な材料および方法

特記しない限り、すべての一般的な化学物質及び生化学物質は、Sigma Chemical Company, Poole, Dorset, U.K.からまたはFisher Scientific UK, Loughborough, Leicestershire, U.K.のいずれかから購入した。吸光度アッセイは、SpectraMax PLUS384 platereader (Molecular Devices, Crawley, U.K.)を用いて平底の96ウェルプレート(Spectra; Greiner Bio-One Ltd., Stonehouse, Gloucestershire, U.K.)で行なった。蛍光高スループットアッセイ(Fluorescence highthroughput assay)は、384ウェルのマイクロタイタープレート(Corning Costar 3705 plates, Fisher Scientific)または96ウェルの「U」底マイクロフオーW1マイクロタイタープレート('U' bottomed Microfluor W1 microtitre plate)(Thermo Labsystems, Ashford, Middlesex, U.K.)で行なった。蛍光アッセイは、SpectraMax Gemini fluorescence plate reader (Molecular Devices)を用いてモニターした。7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)または7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(AFC)蛍光体のいずれかを用いる基質では、アッセイは、365 nmの励起波長及び450 nmの発光波長(emission wavelength)でモニターし、蛍光プレートリーダーをAMCで校正した。3-アミノ-ベンゾイル(Abz)蛍光体を用いる基質では、アッセイは、310 nmの励起波長及び445 nmの発光波長でモニターし；蛍光プレートリーダーを3-アミノ-ベンズアミド(Fluka)で校正した。特記しない限り、すべてのペプチダーゼ基質は、Bachem UK, St. Helens, Merseyside, UKから購入した。蛍光共鳴エネルギー転移方法(fluorescence resonance energy transfer methodology)を用いた基質(即ち、FRET-系基質(FRET-based substrate))は、公表された方法(Atherton & Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford, U.K., 1989)を用いて Incenta Limitedで合成され、蛍光ドナーとしてAbz(2-アミノベンゾイル)を及び蛍光

30

40

50

消光剤として3-ニトロチロシン [Tyr (NO₂)] を用いた (Meldal, M. and Breddam, K., Anal. Biochem., 195, 141-147, 1991)。ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホネート (HEPES)、トリス-ヒドロキシメチルアミノメタン (トリス) ベース、ピストリス-プロパン及びすべての生物界面活性剤 (例えば、CHAPS、チッタージェント (zwittergent) など) は、CNBiosciences UK, Beeston, Nottinghamshire, U.Kから購入した。グリセロールは、Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.Kから購入した。基質または阻害剤のストック溶液は、100%ジメチルスルホキシド (DMSO) (Rathburns, Glasgow, U.K.) 中で10 mM以下に作製され、適当に必要なように希釈した。すべての場合において、アッセイ中のDMSO濃度は1% (v/v) 未満に維持した。

10

【0213】

アッセイプロトコルは、先の文献 (表1; Barrett, A.J., Rawlings, N.D. 及び Woessner, J.F., 1998, Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London及びこの引用文献) に基づき、局所アッセイプロトコルに適するのに必要なように修飾した。酵素を反応を開始するのに必要であるように添加し、生成物への基質の変換時の蛍光の変化によって判断される際の、活性を経時的にモニターした。すべてのアッセイは25 ± 1 °Cで行なった。

【0214】**【表1】**

表1 本明細書に記載される酵素アッセイは、先の文献に従って行なった

酵素	緩衝液	基質	参考文献
カテプシンB	I	Z-Phe-Arg-AMC	a, b
カテプシンH	II	Bz-Phe-Val-Arg-AMC	a, b
カテプシンL	I	Ac-Phe-Arg-AMC	b, c
カテプシンS	I	Boc-Val-Leu-Lys-AMC	c, d
カスパーゼ1	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	e
カスパーゼ2	III	Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC	f
カスパーゼ3	III	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC	g, h
カスパーゼ4	III	Suc-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC	f
カスパーゼ5	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	
カスパーゼ6	III	Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC	i, j, k
カスパーゼ7	III	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC	
カスパーゼ8	III	Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC	l
カスパーゼ9	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	
カスパーゼ10	III	Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC	
クルジパイン	IV	D-Val-Leu-Lys-AMC	m, n
CPB2.8ΔCTE	XI	Pro-Phe-Arg-AMC	q
S. Aureus 細胞外 システインプロテアーゼ	I	Abz-Ile-Ala-Ala-Pro-Tyr(NO ₂)- Glu-NH ₂	o
クロストリパイン		Z-Gly-Gly-Arg-AMC	p
FMDV LP	V	Abz-Arg-Lys-Leu-Lys-Gly-Ala- Gly-Ser-Tyr(NO ₂)-Glu-NH ₂	r
トリプシン	VI	Z-Gly-Gly-Arg-AMC	s
カルパインμ	VII	Abz-Ala-Asn-Leu-Gly-Arg-Pro- Ala-Leu-Tyr(NO ₂)-Asp-NH ₂	t
カルパインm	VIII	Abz-Lys-Leu-Cys(Bzl)-Phe-Ser- Lys-Gln-Tyr(NO ₂)-Asp-NH ₂	t
カテプシンK	IX	Z-Phe-Arg-AMC	u
カテプシンX	X		v, w

10

20

30

I : 1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール及び1 mM CaCl₂を含む10 mM BTP、pH 6.5 40

II : 1 mM EDTA、142 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM CaCl₂、0.035 mM チッタージェント3-16 (Zwittergent3-16)を含む10 mM BTP、pH 6.5

III : 50 mM HEPES、pH 7.2、10%グリセロール、0.1% CHAPS、142 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM DTT

IV : 1 mM EDTA及び10 mM L-システインを含む100 mM リン酸ナトリウム、pH 6.75

V : 1 mM EDTA、10 mM L-システイン及び0.25% (w/v) CHAPSを含む50 mM トリスアセテート、pH 8.4 50

V I : 5 m M C a C l ₂ を含む 1 0 m M H E P E S、p H 8 . 0

V I I : 2 m M 2 -メルカプトエタノール及び 1 0 0 μ M C a C l ₂ を含む 1 0 m M H E P E S、p H 7 . 5

V I I I : 2 m M 2 -メルカプトエタノール及び 2 0 0 μ M C a C l ₂ を含む 1 0 m M H E P E S、p H 7 . 5

I X : 1 0 m M L -システイン及び 1 m M E D T A を含む 1 0 0 m M 酢酸ナトリウム；p H 5 . 5

X : 1 0 m M L -システイン；0 . 0 5 % (w / v) ブリッジ 3 5 及び 1 m M E D T A を含む 1 0 0 m M 酢酸ナトリウム；p H 5 . 5

X I : 1 0 m M L -システイン；1 4 2 m M 塩化ナトリウム及び 1 m M E D T A を含む 1 0 0 m M 酢酸ナトリウム；p H 5 . 5 10

【 0 2 1 5 】

【 化 7 4 】

- ^a Barrett, A.J., *Biochem. J.*, 187, 909-912, 1980
- ^b Barrett, A.J. and Kirschke, H., *Methods Enzymol.*, 80, 535-561, 1981
- ^c Quibell, M. and Taylor, S., *WO0069855*, 2000
- ^d Bromme, D., Steinert, ., Freibe, S., Fittkau, S., Wiederanders, B., and Kirschke, H., *Biochem. J.*, 264, 475-481, 1989
- ^e Rano, T.A., *et. al.*, *Chem. Biol.*, 4, 149, 1997
- ^f Talanian, R.V., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 272, 9677, 1997
- ^g Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirer, G.G. and Earnshaw, W.C., *Nature.*, 371, 768-774, 1994
- ^h Han, Z., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 272, 13432, 1997
- ⁱ Takahashi, A., *et. al.*, *PNAS*, 93, 8395, 1996
- ^j Martins, L.M., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 272, 7421, 1997
- ^k Nagata, S., *Cell.*, 88, 355, 1997
- ^l Harris, J.L., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 273, 27364, 1998
- ^m Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martinez, J. and Franke de Cazzulo, B.M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1037, 186-191, 1990
- ⁿ Cazzulo, J.J., Bravo, M., Raimondi, A., Engstrom, U., Lindeberg, G. and Hellman, U., *Cell Mol. Biol.*, 42, 691-696, 1996
- ^o Potempa, J., Dubin, A., Korzus, G. and Travis, J., *Biochem. J.*, 263, 2664-2667, 1988
- ^p Kembhavi, A.A., Buttle, D.J., Rauber, P. and Barrett, A.J., *FEBS Lett.*, 283, 277-280, 1991
- ^q Alves, L.C., *et. al.*, *Mol. Biochem. Parasitol*, 116, 1-9, 2001.
- ^r Guarné, *et.al.*, *J. Mol. Biol.*, 302, 1227-1240, 2000.
- ^s Halfon and Craik, (Barret, Rawlings and Woessner, eds.), in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 12-21, 1998.
- ^t Sasaki, *et. al.*, (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 12489-12494, 1984.
- ^u Bossard, M.J., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 12517-12524, 1996
- ^v Santamaria, I., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 273, 16816-16823, 1998
- ^w Klemencic, J, *et al.*, *Eur.J.Biochem.*, 267, 5404-5412, 2000

10

20

30

40

50

トリパノソーマ クルージ クルジパインペプチダーゼ活性アッセイ

トリパノソーマ クルージ Dm 28 (Trypanosoma cruzi Dm28) エピマステイゴート由来の、野生型のクルジパインは、Dr. Julio Scharfstein (Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) から得た。活性アッセイは、2.5 nM 酵素を用いて 1 mM EDTA 及び 10 mM L-

システインを含む100mM リン酸ナトリウム、pH6.75中で行なわれた。Ac-
Phe-Arg-AMC (K_M^{app} = 約12 μ M) 及び D-Val-Leu-Lys-
AMC (K_M^{app} = 約4 μ M) を、基質として用いた。定常的に、Ac-FR-AMC
を、 K_M^{app} と等しい濃度で使用し、D-Val-Leu-Lys-AMCを、25 μ
Mの濃度で使用した。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光
の増加の傾斜から求めた。

【0216】

メキシコリーシュマニア(*Leishmania mexicana*)システインプロテアーゼB (CPB) ペ
プチダーゼ活性アッセイ

C末端拡張を持たない野生型の組み換えCPB (即ち、CPB2.8ACTE; Sanderson 10
, S.J., et. al., Biochem. J., 347, 383-388, 2000) を、Dr. Jeremy Mottram (Wellcom
e Centre for Molecular Parasitology, The Anderson College, University of Glasgow,
Glasgow, U.K.) から得た。活性アッセイは、0.25 nMの酵素を用いて1mM ED
TA; 200mM NaCl 及び10mM DTT (Alves, L.C., et. al., Mol. Biochem
. Parasitol, 116, 1-9, 2001) を含む100mM 酢酸ナトリウム; pH5.5中に行な
われた。Pro-Phe-Arg-AMC (K_M^{app} = 約38 μ M) を K_M^{app} と等
しい濃度で基質として使用した。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニター
された蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0217】

カテプシンペプチダーゼ活性アッセイ

ウシカテプシンS、ヒトカテプシンL、ヒトカテプシンH及びヒトカテプシンBは、CNBi
osciencesから得た。組み換えヒトカテプシンS、ヒトカテプシンK及びヒトカテプシン
Xは、Dr. Boris Turk (Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia) から得た。特記
しない限り、すべてのペプチダーゼ活性アッセイは、1mM EDTA、5mM 2-メ
ルカプトエタノール及び1mM CaCl_2 を含む10mM ビスートリス-プロパン (B
TP)、pH6.5中に行なった。ヒトカテプシンH活性アッセイは、10mM BTP
、pH6.5、142mM NaCl_2 、1mM CaCl_2 、1mM EDTA、1m
M DTT、0.035mM チッタージェント3-16中に行なった。ヒトカテプシン
Kアッセイは、20mM L-システイン及び1mM EDTAを含む100mM 酢酸
ナトリウム; pH5.5中に行なった (Bossard, M.J., et. al., J. Biol. Chem., 21, 1 30
2517-12524, 1996)。ヒトカテプシンXアッセイは、20mM L-システイン; 0.0
5% (w/v) ブリッジ35及び1mM EDTAを含む100mM 酢酸ナトリウム
; pH5.5中に行なった (Santamaria, I., et. al., J. Biol. Chem., 273, 16816-1682
3, 1998; Klemencic, J, et al., Eur. J. Biochem., 267, 5404-5412, 2000)。アッセイ
に使用される最終的な酵素濃度は、0.5 nM ウシカテプシンS、1 nM カテプシン
L、0.1 nM カテプシンB、0.25 nM カテプシンK; 1 nM カテプシンX及
び10 nM カテプシンHであった。阻害アッセイでは、カテプシンS、カテプシンL、
カテプシンB、カテプシンK及びカテプシンHに使用される基質は、それぞれ、boc-
Val-Leu-Lys-AMC (K_M^{app} = 約30 μ M)、Ac-Phe-Arg-
AMC (K_M^{app} = 約20 μ M)、Z-Phe-Arg-AMC (K_M^{app} = 約40 40
 μ M)、Z-Leu-Arg-AMC (K_M^{app} = 約2 μ M); Bz-Phe-Val
-Arg-AMC (K_M^{app} = 約150 μ M) であった。それぞれの場合において、各
アッセイに使用される基質濃度は K_M^{app} に等しくした。基質の生成物への変換率は、
経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0218】

トリプシンペプチダーゼ活性アッセイ

ヒト膵臓トリプシン (ヨウ素化グレード; CN Biosciences) 活性アッセイは、0.1 nM
トリプシンを用いて5mM CaCl_2 を含む10mM HEPES、pH8.0中
で行なった。阻害アッセイでは、Z-Gly-Gly-Arg-AMC (K_M^{app} = 約8
4 μ M) を、 K_M^{app} と等しい濃度で基質として使用した。基質の生成物への変換率は 50

、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0219】

クロストリパインペプチダーゼ活性アッセイ

クロストリパイン(Sigma)活性アッセイは、0.3 nM 酵素を用いて1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール及び1 mM CaCl_2 を含む10 mM BTP、pH 6.5 中で行なった。阻害アッセイでは、Z-Gly-Gly-Arg-AMC (K_M^{app} = 約100 μM) を、 K_M^{app} と等しい濃度で基質として使用した。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0220】

カルパインペプチダーゼ活性アッセイ

カルパイン(ヒト赤血球 μ -カルパイン及びブタの腎臓 m-カルパイン; CNBiosciences) 活性アッセイを、25 nM のいずれかの酵素(Sasaki, et. al., J. Biol. Chem., 259, 12489-12494, 1984)を用いて2 mM 2-メルカプトエタノール及び CaCl_2 を含む10 mM HEPES、pH 7.5 中で行なった。 μ -カルパイン阻害アッセイでは、緩衝液に100 μM CaCl_2 を含ませ、Abz-Ala-Asn-Leu-Gly-Arg-Pro-Ala-Leu-Tyr(NO_2)-Asp-NH₂ (K_M^{app} = 約20 μM ; IncentaLimited) を基質として使用した。m-カルパイン阻害アッセイでは、アッセイ緩衝液に200 μM CaCl_2 を含ませ、Abz-Lys-Leu-Cys(Bzl)-Phe-Ser-Lys-Gln-Tyr(NO_2)-Asp-NH₂ (K_M^{app} = 約22 μM ; IncentaLimited) を基質として使用した。双方の場合において、アッセイに使用される基質濃度は K_M^{app} に等しくした。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0221】

細胞外S. aureus V8システインペプチダーゼ(スタフィロパイン) ペプチダーゼ活性アッセイ

S. aureus V8は、Prof. S. Arvidson, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden から得た。細胞外S. aureus V8システインペプチダーゼ(スタフィロパイン) 活性アッセイを、部分精製されたS. aureus V8培養物の上清(Dr. Peter Lambert, Aston University, Birmingham, U.K. から得た)を用いて行なった。活性アッセイを、2倍希釈した部分精製抽出物を用いて1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール及び1 mM CaCl_2 を含む10 mM BTP、pH 6.5 中で行なった。阻害アッセイでは、Abz-Ile-Ala-Ala-Pro-Tyr(NO_2)-Glu-NH₂ (K_M^{app} = 約117 μM ; IncentaLimited) を、 K_M^{app} と等しい濃度で基質として使用した。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0222】

口蹄疫リダーペプチダーゼ(FMDV-LP) 活性アッセイ

組み換え野生型FMDV-LPは、Dr. Tim Skern (Institut für Medizinische Biochemie, Abteilung für Biochemie, Universität Wien, Wien, Austria) から得た。活性アッセイを、10 nM 酵素を用いて1 mM EDTA、10 mM L-システイン及び0.25 % (w/v) CHAPS を含む50 mM トリス・アセテート中に行なった。阻害アッセイでは、Abz-Arg-Lys-Leu-Lys-Gly-Ala-Gly-Ser-Tyr(NO_2)-Glu-NH₂ (K_M^{app} = 約51 μM ; IncentaLimited) を、 K_M^{app} と等しい濃度で基質として使用した。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

【0223】

カスパーゼペプチダーゼ活性アッセイ

カスパーゼ(Caspase)1-10は、CN BiosciencesまたはBioVision Inc. (Mountain View, CA, USA) から得、すべてのアッセイを、アッセイ当たり0.1~1 Uを用いて50 mM HEPES; pH 7.2、10 % (v/v) グリセロール、0.1 % (w/v) CHAPS、142 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM ジチオトレイトール(D 50

10

20

30

40

50

TT) 中で行なった。カスパーゼ 1 では、Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 2 では、Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC を基質として使用した；カスパーゼ 3 では、Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 4 では、Suc-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 5 では、Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 6 では、Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 7 では、Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 8 では、Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 9 では、Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC を基質として使用した；カスパーゼ 10 では、Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC を基質として使用した(Nicholson, D. W. 及び Thornberry, N.A., TIBS, 22, 299-306, 1997; Stennicke, H.R. 及び Salvesen, G.S., J. Biol. Chem., 272(41), 25719-25723, 1997; Talanian, R.V., et. al., J. Biol. Chem., 272(15), 9677-9682, 1997; Wolf, B.B. 及び Green, D.R., J. Biol. Chem., 274(18), 20049-20052, 1999)。基質の生成物への変換率は、経時的に連続してモニターされた蛍光の増加の傾斜から求めた。

10

【0224】

基質に関する見かけの巨視的結合（ミカエリス）定数（ K_M^{app} ）の測定

各基質に関する見かけの巨視的結合定数（ K_M^{app} ）を、基質濃度の関数としての酵素活性の依存性から、算出した。観察された比を、横座標の関連基質濃度に対して縦座標にプロットして、データを、式 1 を用いて直接回帰分析(Prism v 3.02; GraphPad, San Diego, USA)にあわせた(Cornish-Bowden, A. Fundamentals of enzyme kinetics Portl 及び Press; 1995, 93-128)。

20

【0225】

【数 1】

$$v_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S_o]}{[S_o] + K_M^{app}} \quad (1)$$

30

式 1 において、「 v_i 」は、観察された初期率であり、「 $V_{\max}^{app}$ 」は、飽和基質濃度での観察された最大活性であり、「 K_M^{app} 」は、基質に関する見かけの巨視的結合（ミカエリス）定数であり、「 $[S_o]$ 」は、初期基質濃度である。

【0226】

阻害定数の測定

各化合物に関する見かけの阻害定数（ K_i ）を、阻害が可逆的であり、純競合メカニズム(pure-competitive mechanism)によって起こることに基づいて測定した。 K_i 値は、式 2 を用いて直接回帰分析(Prism v 3.02)によって、阻害剤濃度の関数としての酵素活性の依存性から、算出した(Cornish-Bowden, A., 1995.)。

40

【0227】

【数 2】

$$v_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{[S] + \{K_M^{app} \cdot ([I] / K_i)\}} \quad (2)$$

式 2 において、「 v_i 」は、観察された残存活性であり、「 $V_{\max}^{app}$ 」は、（即ち、阻害剤不存在下での）観察された最大活性であり、「 K_M^{app} 」は、基質に関する見かけの巨視的結合（ミカエリス）定数であり、「 $[S]$ 」は、初期基質濃度であり、「 K_i 」は、見かけの解離定数であり、および「 $[I]$ 」は、阻害剤濃度である。

50

【0228】

見かけの解離定数 (K_i^{app}) が酵素濃度に近づくと、 K_i^{app} 値は、式3に記載された形態の二次解決法(quadratic solution)を用いて算出した(Morrison, J.F. Trends Biochem. Sci., 7, 102-105, 1982; Morrison, J.F. Biochim. Biophys. Acta, 185, 269-286, 1969; Stone, S.R. 及び Hofsteenge, J. Biochemistry, 25, 4622-4628, 1986)。

【0229】

【数3】

$$v_i = \frac{F\{E_o - I_o - K_i^{app} + \sqrt{(E_o - I_o - K_i^{app})^2 + 4 \cdot K_i^{app} \cdot E_o}\}}{2} \quad (3)$$

10

$$K_i^{app} = K_i(1 + [S_o]/K_M^{app}) \quad (4)$$

式3において、「 v_i 」は、観察された残存活性であり、「 F 」は、(即ち、阻害剤不存在下での)観察された最大活性及び最小酵素活性の差であり、「 E_o 」は、全酵素濃度であり、「 K_i^{app} 」は、見かけの解離定数であり、および「 I_o 」は、阻害剤濃度である。曲線を、酵素濃度に関する固定値を用いて非線形回帰分析(Prism)に合わせた。式4は、基質動態を説明するのに使用され、この際、「 K_i 」は、阻害定数であり、「 $[S_o]$ 」は、初期基質濃度であり、および「 K_M^{app} 」は、基質に関する見かけの巨視的結合(ミカエリス)定数である(Morrison, 1982)。

20

【0230】

阻害剤の酵素との反応の二次率(second-order rate)

該当する場合には、各化合物の酵素との反応の観察された率(k_{obs})の濃度依存性を、基質の存在下での擬1次条件下での酵素不活化の割合を測定することによって分析した(Morrison, J.F., TIBS, 102-105, 1982; Tian, W.X. 及び Tsou, C.L., Biochemistry, 21, 1028-1032, 1982; Morrison, J.F. 及び Walsh, C.T., from Meister (Ed.), Advances in Enzymol., 61, 201-301, 1988; Tsou, C.L., from Meister (Ed.), Advances in Enzymol., 61, 381-436, 1988;)。アッセイは、様々な濃度の阻害剤を添加して、基質を含む緩衝液をアッセイすることによって行なった。アッセイを、酵素を反応混合物に添加することによって開始し、蛍光の変化を経時的にモニターした。アッセイ期間中、10%未満の基質が消費された。

30

【0231】

【数4】

$$F = v_s t + \frac{(v_o - v_s)[1 - e^{(k_{obs} \cdot t)}]}{k_{obs}} + D \quad (5)$$

40

活性蛍光経過曲線(activity fluorescence progresscurve)を、式5を用いて非線形回帰分析(Prism)に合わせた(Morrison, 1969; Morrison, 1982); この際、「 F 」は、蛍光応答であり、「 t 」は、時間であり、「 v_o 」は、初期速度であり、「 v_s 」は、平衡定常状態速度であり、「 k_{obs} 」は、観察された擬1次速度定数であり、および「 D 」は、0時間での切片(即ち、曲線の縦座標変位(ordinate displacement))である。2次速度定数は、阻害剤濃度に対する k_{obs} のプロットの線の傾斜(即ち、 $k_{obs} / [I]$)から得られた。基質動態を修正するために、式6が使用され、この際、「 $[S_o]$ 」は、初期基質濃度であり、「 K_M^{app} 」は、基質に関する見かけの巨視的結合(ミカエリス)定数である。

【0232】

50

【数 5】

$$k_{inact} = \frac{k_{obs} \left(1 + [S_o] / K_M^{app} \right)}{[I]} \quad (6)$$

本発明の化合物を、上記したアッセイによって試験したところ、100 μM以下のインビトロのK_i阻害定数でクルジパイン阻害活性または別のCA C1システインプロテアーゼに対する阻害活性を示すことが観察された。本発明の数多くの例示化合物に関する具体的な阻害データを表2に示す。

10

【0233】

【表2】

表2 具体的な阻害データ (K_iはμMとして表わす)

実施例	クルジパイン	ウシカタブシンS	ヒトカタブシンL	ヒトカタブシンK
1	< 2	> 50	> 20	> 100
7	> 50	< 2	> 25	> 50
6	> 20	> 25	> 10	< 2

20

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057246 A2

(51) International Patent Classification: C07D 307/00

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/GB02/00194

(22) International Filing Date: 17 January 2002 (17.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0101204.6 17 January 2001 (17.01.2001) GB
60275.506 13 March 2001 (13.03.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): IN-
CENTA LIMITED [GB/GB]; St John's Innovation
Centre, Cowley Road, Cambridge CB4 0WS (GB).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): QUIBELL, Martin
[GB/GB]; Incenta Limited, Building 26, Chesterford
Research Park, Little Chesterford, Cambridge CB10 1XL
(GB). RAMJEE, Manoj, Kumar [GB/GB]; Incenta
Limited, Building 26, Chesterford Research Park, Little
Chesterford, Cambridge CB10 1XL (GB).(74) Agent: SHEARD, Andrew, Gregory; Andrew Sheard,
P.O. Box 521, Berkhamsted, Hertfordshire HP4 1YP (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PT, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

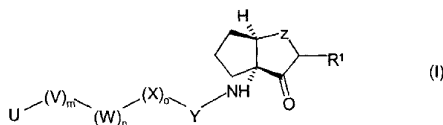
Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the fol-
lowing designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,
PT, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO
patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI
patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, NG, TD, TG)

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PT, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent

[Continued on next page]

(54) Title: INHIBITORS OF CRUZIPAIN AND OTHER CYSTEINE PROTEASES

(57) Abstract: Compounds of general formula (I); wherein R¹, Y, (X)_o, (W)_n, (V)_m, Z and U are as defined in the specification, are inhibitors of cruzipain and other cysteine protease inhibitors and are useful as therapeutic agents, for example in Chagas' disease, or for validating therapeutic target compounds.

WO 02/057246 A2



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SF, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) —
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

INHIBITORS OF CRUZIPAIN AND OTHER
CYSTEINE PROTEASES

THIS INVENTION relates to compounds which are inhibitors of the protease cruzipain, a gene product of the *Trypanosoma cruzi* parasite. In particular, the invention provides compounds that are useful for the therapeutic treatment of *Trypanosoma cruzi* infection, to the use of these compounds, and to pharmaceutical compositions comprising them. Furthermore, this invention relates to compounds which are inhibitors across a broad range of cysteine proteases, to the use of these compounds, and to pharmaceutical compositions comprising them. Such compounds are useful for the therapeutic treatment of diseases in which participation of a cysteine protease is implicated.

The trypanosomal family of parasites have a substantial worldwide impact on human and animal healthcare (McKerrow, J. H., *et al*, *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 821-853, 1993). One parasite of this family, *Trypanosoma cruzi*, is the causative agent of Chagas' disease, which affects in excess of twenty million people annually in Latin and South America, is the leading cause of heart disease in these regions and results in more than 45,000 deaths per annum (Centers for Disease Control and prevention website). In addition, with the increase in migration of the infected population from rural to urban sites and movements from South and Central America into North America, the infection is spreading via blood transfusions, and at birth. The present treatments of choice for *Trypanosoma cruzi* infection, nifurtimox and benznidazole (an NADH fumarate reductase inhibitor, Turrens, JF, *et al*, *Mol Biochem Parasitol.*, 82(1), 125-9, 1996) are at best moderately successful, achieving ~60% cure during the acute phase of infection (see Docampo, R. *Curr. Pharm. Design*, 7, 1157-1164, 2001 for a general discussion) whilst not being prescribed at all during the chronic phase where cardiomyopathy associated heart failure often occurs (Kirchhoff, L. V. *New Engl. J. Med.*, 329, 639-644, 1993). Additionally, these two drugs have serious adverse toxic effects, requiring close medical supervision during treatment, and have been shown to induce chromosomal damage in chagastic infants (Gorla, N. B. *et al*, *Mutat. Res.* 206, 217-220, 1988). Therefore, a strong medical need exists for new effective drugs for the chemotherapeutic treatment of *Trypanosoma cruzi* infection.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-2-

Classically, the identification of enzymes found to be crucial for the establishment or propagation of an infectious disease has been instrumental in the development of successful drugs such as antivirals (e.g. HIV aspartyl protease inhibitors) and anti-bacterials (e.g. β -lactam antibiotics). The search for a similar Achilles heel in parasitic infections has examined numerous enzymes (e.g. parasitic dihydrofolate reductase, see Chowdhury, S. F. *et al*, *J. Med. Chem.*, 42(21), 4300-4312, **1999**; trypanothione reductase, see Li, Z. *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11(2), 251-254, **2001**; parasitic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, see Aranov, A. M. *et al*, *J. Med. Chem.*, 41(24), 4790-4799, **1998**). A particularly promising area of research has identified the role of cysteine proteases, encoded by the parasite, that play a pivotal role during the life cycle of the parasite (McKerrow, J. H., *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 639-644, **1999**). Proteases form a substantial group of biological molecules which to date constitute approximately 2% of all the gene products identified following analysis of several genome sequencing programmes (e.g. see Southan, C. *J. Pept. Sci.*, 6, 453-458, **2000**). Proteases have evolved to participate in an enormous range of biological processes, mediating their effect by cleavage of peptide amide bonds within the myriad of proteins found in nature. This hydrolytic action is performed by initially recognising, then binding to, particular three-dimensional electronic surfaces displayed by a protein, which aligns the bond for cleavage precisely within the protease catalytic site. Catalytic hydrolysis then commences through nucleophilic attack of the amide bond to be cleaved either via an amino acid side-chain of the protease itself, or through the action of a water molecule that is bound to and activated by the protease. Proteases in which the attacking nucleophile is the thiol side-chain of a Cys residue are known as cysteine proteases. The general classification of 'cysteine protease' contains many members found across a wide range of organisms from viruses, bacteria, protozoa, plants and fungi to mammals.

Biological investigation of *Trypanosoma cruzi* infection has highlighted a number of specific enzymes that are crucial for the progression of the parasite's life cycle. One such enzyme, cruzipain, a cathepsin L-like cysteine protease, is a clear therapeutic

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-3-

target for the treatment of Chagas' disease ((a) Cazzulo, J. J. *et al*, *Curr. Pharm. Des.* 7, 1143-1156, **2001**; (b) Caffrey, C. R. *et al*, *Curr. Drug Targets*, 1, 155-162, **2000**). Although the precise biological role of cruzipain within the parasite's life cycle remains unclear, elevated cruzipain messenger RNA levels in the epimastigote developmental stage indicate a role in the nutritional degradation of host-molecules in lysosomal-like vesicles (Engel, J. C. *et al*, *J. Cell. Sci.*, 111, 597-606, **1998**). The validation of cruzipain as a viable therapeutic target has been achieved with increasing levels of complexity. Addition of a general cysteine protease inhibitor, Z-Phe-Ala-FMK to *Trypanosoma cruzi*-infected mammalian cell cultures blocked replication and differentiation of the parasite, thus arresting the parasite life cycle (Harth, G., *et al*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 17-24, **1993**). Administration of a vinyl sulphone-based inhibitor in a *Trypanosoma cruzi*-infected murine animal model not only rescued the mice from lethal infections, but also produced a complete recovery (Engel, J. C. *et al*, *J. Exp. Med.*, 188(4), 725-734, **1998**). Numerous other *in vivo* studies have confirmed that infections with alternative parasites such as *Leishmania major* (Selzer, P. M. *et al*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 11015-11022, **1999**), *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum* (Olson, J. E. *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 633-638, **1999**) can be halted or cured by treatment with cysteine protease inhibitors.

A variety of synthetic approaches have been described towards the design of cruzipain inhibitors. However, although providing a biological 'proof-of-principle' for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection, current inhibitors exhibit a number of biochemical and physical properties that may preclude their clinical development. (e.g. see (a) Brinen, L. S. *et al*, *Structure*, 8, 831-840, **2000**, peptidomimetic vinyl sulphones, possible adverse mammalian cell toxicity (see McKerrow, J. H. and Engel, J. unpublished results cited in Scheidt, K. A. *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 2477-2494, **1998**); (b) Du, X. *et al*, *Chem. Biol.*, 7, 733-742, **2000**, aryl ureas, generally with low μ M activity, and high ClogP values, thus poor aqueous solubility and probably low oral bioavailability; (c) Roush, W. R. *et al*, *Tetrahedron*, 56, 9747-9762, **2000**, peptidyl epoxysuccinates, irreversible inhibitors, with potent activity versus house-keeping mammalian proteases such as cathepsin B; (d) Li, R. *et al*,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-4-

Bioorg. Med. Chem. 4(9), 1421-1427, 1996, bisarylacetylhydrazides and chalcones, polyhydroxylated aromatics; (e) US6143931, WO 9846559, non-peptide α -ketoamides). Of the many different approaches to enzyme inhibition to date, only the cruzipain protease inhibitors have proven effective in curing disease-related animal models of *Trypanosoma cruzi* infection. Therefore, a clear medical need exists to progress these 'proof-of-principle' findings towards clinical candidates, suitable for human use, through the discovery of more efficacious cruzipain inhibitors that have a desirable combination of potency, selectivity, low toxicity and optimised pharmacokinetic parameters.

Cruzipain and indeed many other crucial parasitic proteases belong to the papain-like CA C1 family and have close structural mammalian homologues. Cysteine proteases are classified into 'clans' based upon a similarity in the three-dimensional structure or a conserved arrangement of catalytic residues within the protease primary sequence. Additionally, 'clans' are further classified into 'families' in which each protease shares a statistically significant relationship with other members when comparing the portions of amino acid sequence which constitute the parts responsible for the protease activity (see Barrett, A.J *et al.* in 'Handbook of Proteolytic Enzymes', Eds. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. Publ. Academic Press, 1998, for a thorough discussion). To date, cysteine proteases have been classified into five clans, CA, CB, CC, CD and CE (Barrett, A. J. *et al.*, 1998). A protease from the tropical papaya fruit 'papain' forms the foundation of clan CA, which currently contains over 80 distinct and complete entries in various sequence databases, with many more expected from the current genome sequencing efforts. Proteases of clan CA/family C1 have been implicated in a multitude of disease processes e.g. human proteases such as cathepsin K (osteoporosis), cathepsin S (autoimmune disorders), cathepsin L (metastases) or parasitic proteases such as falcipain (malaria parasite *Plasmodium falciparum*), cruzipain (*Trypanosoma cruzi* infection). Recently a bacterial protease, staphylopin (*S. aureus* infection) has also been tentatively assigned to clan CA. X-ray crystallographic structures are available for a range of the above mentioned proteases in complex with a range of inhibitors e.g. papain (PDB entries, 1pad, 1pe6, 1pip, 1pop, 4pad, 5pad, 6pad, 1ppp, 1the, 1csb,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-5-

1huc), cathepsin K (1au0, 1au2, 1au3, 1au4, 1atk, 1mem, 1bgo, 1ayw, 1ayu), cathepsin L (1cs8), cathepsin S (currently on-hold, but published McGrath, M. E. *et al*, *Protein Science*, 7, 1294-1302, **1998**), cruzain (a recombinant form of cruzipain see Eakin, A. E. *et al*, 268(9), 6115-6118, **1993**) (1ewp, 1aim, 2aim, 1F29, 1F2A, 5 1F2B, 1F2C), staphylopin (1cv8). Each of the structures displays a similar overall active-site topology, as would be expected by their 'clan' and 'family' classification and such structural similarity exemplifies one aspect of the difficulties involved in discovering a selective inhibitor of cruzipain suitable for human use. However, subtle differences in terms of the depth and intricate shape of the active site groove of each

10 CA C1 protease are evident, which may be exploited for selective inhibitor design. Additionally, many of the current substrate-based inhibitor complexes of CA C1 family proteases show a series of conserved hydrogen bonds between the inhibitor and the protease backbone, which contribute significantly to inhibitor potency. Primarily a bidentate hydrogen-bond is observed between the protease Gly66 (C=O)/

15 inhibitor N-H and the protease Gly66(NH)/inhibitor (C=O), where the inhibitor (C=O) and (NH) are provided by an amino acid residue NHCHRCO that constitutes the S2 sub-site binding element within the inhibitor (see Berger, A. and Schechter, I. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 257, 249-264, **1970** for a description of protease binding site nomenclature). A further hydrogen-bond between the protease main-

20 chain (C=O) of asparagine or aspartic acid (158 to 163, residue number varies between proteases) and an inhibitor (N-H) is often observed, where the inhibitor (N-H) is provided by the S1 sub-site binding element within the inhibitor. Thus, the motif X-NHCHRCO-NH-Y is widely observed amongst the prior art substrate-based inhibitors of CA C1 proteases.

25 In the prior art, the development of cysteine protease inhibitors for human use has recently been an area of intense activity. Considering the CA C1 family members, particular emphasis has been placed upon the development of inhibitors of human cathepsins, primarily cathepsin K (osteoporosis), cathepsin S (autoimmune disorders)

30 and cathepsin L (metastases), through the use of peptide and peptidomimetic nitriles (e.g. see WO-A-0109910, WO-A-0051998, WO-A-0119816, WO-A-9924460, WO-A-0049008, WO-A-0048992, WO-A-0049007, WO-A-0130772, WO-A-0055125,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-6-

WO-A-0055126, WO-A-0119808, WO-A-0149288, WO-A-0147886), linear and cyclic peptide and peptidomimetic ketones (e.g. see Veber, D. F. and Thompson, S. K., *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 3(4), 362-369, 2000, WO-A-0170232, WO-A-0178734, WO-A-0009653, WO-A-0069855, WO-A-0029408, WO-A-0134153 to 5 WO-A-0134160, WO-A-0029408, WO-A-9964399, WO-A-9805336, WO-A-9850533), ketoheterocycles (e.g. see WO-A-0055144, WO-A-0055124) and monobactams (e.g. see WO-A-0059881, WO-A-9948911, WO-A-0109169). The prior art describes potent *in vitro* inhibitors, but also highlights the many difficulties in developing a human therapeutic. For example, WO-A-9850533 and WO-A-10 0029408 describe compounds that may be referred to as cyclic ketones and are inhibitors of cysteine proteases with a particular reference towards papain family proteases and as a most preferred embodiment, cathepsin K. WO-A-9850533 describes compounds subsequently detailed in the literature as potent inhibitors of cathepsin K with good oral bioavailability (Witherington, J., 'Tetrahydrofurans as 15 Selective Cathepsin K Inhibitors', RSC meeting, Burlington House, London, 1999). The compounds of WO-A-9850533 were reported to bind to cathepsin K through the formation of a reversible covalent bond between the tetrahydrofuran carbonyl and the active site catalytic cysteine residue (Witherington, J., 1999). Additionally, the same cyclic ketone compounds are described in WO-A-9953039 as part of a wide-ranging 20 description of inhibitors of cysteine proteases associated with parasitic diseases, with particular reference to the treatment of malaria by inhibition of falcipain. However, subsequent literature describes the cyclic ketone compounds of WO-A-9850533 to be unsuitable for further development or for full pharmacokinetic evaluation due to a physiochemical property of the inhibitors, the poor chiral stability of the α -aminoketone chiral centre (Marquis, R. W. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 44(5), 725-736, 2001). WO-A-0069855 describes compounds that may also be referred to as cyclic ketones with particular reference towards inhibition of cathepsin S. The compounds of WO-A-0069855 are considered to be an advance on compounds of WO-A-9850533 due to the presence of the β -substituent on the cyclic ketone ring system 30 that provides increased chiral stability to the α -carbon of the cyclic ketone ring system. In an attempt to solve the problem of poor chiral integrity, subsequent literature has provided a closely related cyclic ketone series to that described in WO-

WO 02/057246

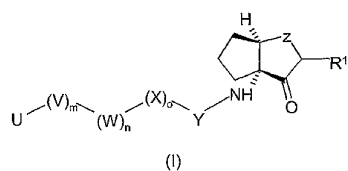
PCT/GB02/00194

-7-

A-9850533, where an approximately 300-fold loss in inhibitor potency was observed upon introduction of an alkyl group in place of the labile α -proton (Marquis, R. W. *et al*, *J. Med. Chem.*, **44**, 1380-1395, **2001**). Additionally, subsequent literature has shown that within the cyclic ketone series described in WO-A-9850533, the α -(*S*) isomer is approximately 10 to 80-fold more potent than the α -(*R*) isomer (Fenwick, A. E. *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 199-202, **2001**).

It has now been discovered that certain compounds, defined by general formula (I), are potent and selective cruzipain protease inhibitors which are useful in the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection. Other compounds defined by general formula (I) are protease inhibitors across a broad range of CA C1 cysteine proteases and compounds useful in the treatment of diseases caused by cysteine proteases. Compounds described by general formula (I) contain an α -alkyl group, of the *R*-stereo-configuration (or the *S*-stereo-configuration when Z = 'S'), yet surprisingly compounds defined by general formula (I) retain good potency. The present invention provides substituted (3*aR*,6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3-yl)alkylamide, (3*aS*,6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3-yl)alkylamide, (3*aR*,6*aS*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopentalen-3-yl)alkylamide or (3*aR*,6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3-yl)alkylamide compounds defined by general formula (I).

Accordingly, the first aspect of the invention provides a compound according to general formula (I):



WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-8-

wherein: $R^1 = C_{0-7}\text{-alkyl}$ (when $C = 0$, R^1 is simply hydrogen), $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$ (when $C = 0$, R^1 is simply an aromatic moiety Ar);

5 $Z = O, S, CR^2R^3$ or NR^4 , where R^4 is chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$;

Each of R^2 and R^3 is independently chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $O-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $O-C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $O-Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $S-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $S-C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $S-Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $NH-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $NH-C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $NH-Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$, $N(C_{0-7}\text{-alkyl})_2$, $N(C_{3-6}\text{-cycloalkyl})_2$ or $N(Ar-C_{0-7}\text{-alkyl})_2$;

10

$Y = CR^5R^6\text{-CO}$, where R^5, R^6 are chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$;

15

$(X)_o = CR^7R^8$, where R^7 and R^8 are independently chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ and $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$ and o is a number from zero to three;

20 $(W)_n = O, S, C(O), S(O)$ or $S(O)_2$ or NR^9 , where R^9 is chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ and $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$ and n is zero or one;

$(V)_m = C(O), C(S), S(O), S(O)_2, S(O)_2NH, OC(O), NHC(O), NHS(O), NHS(O)_2, OC(O)NH, C(O)NH$ or $CR^{10}R^{11}$, where R^{10} and R^{11} are independently chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $Ar-C_{0-7}\text{-alkyl}$ and m is a number from zero to three, provided that when m is greater than one, $(V)_m$ contains a maximum of one carbonyl or sulphonyl group;

25

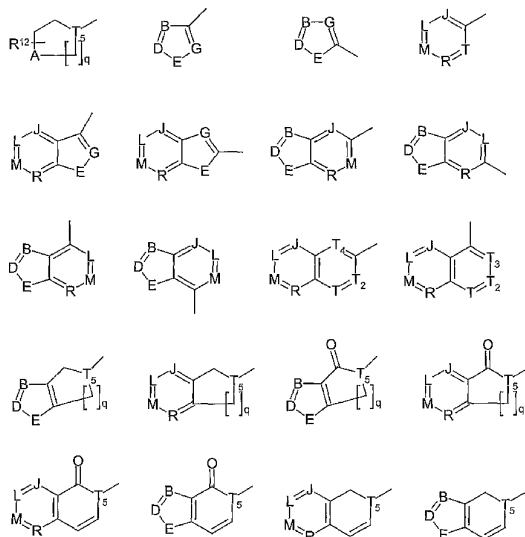
U = a stable 5- to 7-membered monocyclic or a stable 8- to 11-membered bicyclic ring which is either saturated or unsaturated and which includes zero to four heteroatoms (as detailed below):

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-9-



wherein R^{12} is:

5 C_{0-7} -alkyl, C_{3-6} -cycloalkyl, Ar- C_{0-7} -alkyl, O- C_{0-7} -alkyl, O- C_{3-6} -cycloalkyl, O-Ar- C_{0-7} -alkyl, S- C_{0-7} -alkyl, S- C_{3-6} -cycloalkyl, S-Ar- C_{0-7} -alkyl, NH- C_{0-7} -alkyl, NH- C_{3-6} -cycloalkyl, NH-Ar- C_{0-7} -alkyl, N(C_{0-7} -alkyl)₂, N(C_{3-6} -cycloalkyl)₂ or N(Ar- C_{0-7} -alkyl)₂ or, when it is part of the group CHR^{12} or CR^{12} , R^{12} may be halogen;

10

A is chosen from:

CH_2 , CHR^{12} , O, S and NR^{13} ;

wherein R^{12} is as defined above and R^{13} is chosen from:

C_{0-7} -alkyl, C_{3-6} -cycloalkyl and Ar- C_{0-7} -alkyl;

15

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-10-

B, D and G are independently chosen from:

CR^{12} , where R^{12} is as defined above, or N;

E is chosen from:

5 CH_2 , CHR^{12} , O, S and NR^{13} , where R^{12} and R^{13} are defined as above;

J, L, M, R, T, T_2 , T_3 and T_4 are independently chosen from:

CR^{12} and N, where R^{12} is as defined above;

10

T_5 is chosen from:

CH or N;

15 q is a number from one to three, thereby defining a 5-, 6- or 7-membered ring.

B, D, G, J, L, M, R, T, T_2 , T_3 and T_4 may additionally represent an N-oxide ($\text{N} \rightarrow \text{O}$).

20 The present invention includes all salts, hydrates, solvates, complexes and prodrugs of the compounds of this invention. The term "compound" is intended to include all such salts, hydrates, solvates, complexes and prodrugs, unless the context requires otherwise.

25 Appropriate pharmaceutically and veterinarily acceptable salts of the compounds of general formula (I) include salts of organic acids, especially carboxylic acids, including but not limited to acetate, trifluoroacetate, lactate, gluconate, citrate, tartrate, maleate, malate, pantothenate, adipate, alginate, aspartate, benzoate, butyrate, digluconate, cyclopentanate, glucoheptanate, glycerophosphate, oxalate, heptanoate, hexanoate, fumarate, nicotinate, palmoate, pectinate, 3-phenylpropionate, 30 picrate, pivalate, propionate, tartrate, lactobionate, pivolate, camphorate, undecanoate and succinate, organic sulphonic acids such as methanesulphonate, ethanesulphonate, 2-hydroxyethane sulphonate, camphorsulphonate, 2-

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-11-

naphthalenesulphonate, benzenesulphonate, p-chlorobenzenesulphonate and p-toluenesulphonate; and inorganic acids such as hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, bisulphate, hemisulphate, thiocyanate, persulphate, phosphoric and sulphonic acids. Salts which are not pharmaceutically or veterinarily acceptable may still be valuable as intermediates.

Prodrugs are any covalently bonded compounds which release the active parent drug according to general formula (I) *in vivo*. A prodrug may for example constitute an acetal or hemiacetal derivative of the exocyclic ketone functionality present in the (3aR,6aR) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide, (3aS,6aR) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkyl amide, (3aR, 6aS) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkylamide or (3aR, 6aR) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide scaffold. If a chiral centre or another form of isomeric centre is present in a compound of the present invention, all forms of such isomer or isomers, including enantiomers and diastereoisomers, are intended to be covered herein. Compounds of the invention containing a chiral centre may be used as a racemic mixture, an enantiomerically enriched mixture, or the racemic mixture may be separated using well-known techniques and an individual enantiomer may be used alone.

20

'Halogen' as applied herein is meant to include F, Cl, Br, I;

'Heteroatom' as applied herein is meant to include O, S and N;

25 'C₀₋₇-alkyl' as applied herein is meant to include stable straight and branched chain aliphatic carbon chains containing zero (*i.e.* simply hydrogen) to seven carbon atoms such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, t-butyl, pentyl, isopentyl, hexyl, heptyl and any simple isomers thereof. Additionally, any C₀₋₇-alkyl may optionally be substituted at any point by one, two or three halogen atoms (as defined above) for example to give a trifluoromethyl substituent. Furthermore, C₀₋₇-alkyl may contain one or more heteroatoms (as defined above) for example to give
30 ethers, thioethers, sulphones, sulphonamides, substituted amines, amidines,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-12-

guanidines, carboxylic acids, carboxamides. If the heteroatom is located at a chain terminus then it is appropriately substituted with one or two hydrogen atoms. A heteroatom or halogen is only present when C₀₋₇-alkyl contains a minimum of one carbon atom.

5

C₁₋₇-alkyl as applied herein is meant to include the definitions for C₀₋₇-alkyl (as defined above) but describes a substituent that comprises a minimum of one carbon.

10 'C₃₋₆-cycloalkyl' as applied herein is meant to include any variation of 'C₀₋₇-alkyl' which additionally contains a carbocyclic ring such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl. The carbocyclic ring may optionally be substituted with one or more halogens (as defined above) or heteroatoms (as defined above) for example to give a tetrahydrofuran, pyrrolidine, piperidine, piperazine or morpholine substituent.

15

20 'Ar-C₀₋₇-alkyl' as applied herein is meant to include any variation of C₀₋₇-alkyl which additionally contains an aromatic ring moiety 'Ar'. The aromatic ring moiety Ar can be a stable 5 or 6-membered monocyclic or a stable 9 or 10 membered bicyclic ring which is unsaturated, as defined previously for U in general formula (I). The aromatic ring moiety Ar may be substituted by R¹² (as defined above for U in general formula (I)). When C = 0 in the substituent Ar-C₀₋₇-alkyl, the substituent is simply the aromatic ring moiety Ar.

25 Other expressions containing terms such as alkyl and cycloalkyl are intended to be construed according to the definitions above. For example "C₁₋₄ alkyl" is the same as C₀₋₇-alkyl except that it contains from one to four carbon atoms.

30 If different structural isomers are present, and/or one or more chiral centres are present, all isomeric forms are intended to be covered. Enantiomers are characterised by the absolute configuration of their chiral centres and described by the *R*- and *S*-sequencing rules of Cahn, Ingold and Prelog. Such conventions are well known in

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-13-

the art (e.g. see 'Advanced Organic Chemistry', 3rd edition, ed. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985).

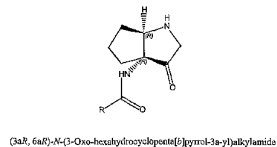
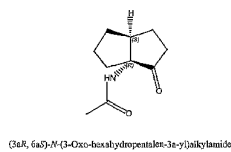
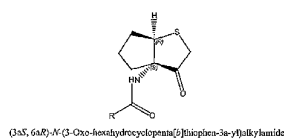
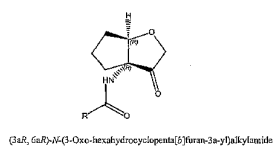
Preferred compounds of general formula (I) include, but are not limited to, those in which, independently or in combination:

Z is O, S, NH or CH₂.

Additionally, preferred compounds of general formula (I) include, but are not limited to, those in which, independently or in combination

Z is NR⁴, where R⁴ is Ar-C₁₋₄-alkyl or a substituted carbonyl or sulphonyl group

Thus, examples of preferred compounds include those containing a (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3*a*-yl)alkylamide, (3*aS*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3*a*-yl)alkylamide, (3*aR*, 6*aS*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3*a*-yl)alkylamide or a (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3*a*-yl)alkylamide bicyclic moiety as shown below.



20

In compounds of general formula (I), it is preferred that R¹ comprises C₀₋₇-alkyl or Ar-C₀₋₇-alkyl. Thus, for example, preferred R¹ moieties include hydrogen, or a

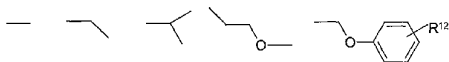
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-14-

straight or branched alkyl chain, or a straight or branched heteroalkyl chain, or an optionally substituted arylalkyl chain, or an optionally substituted arylheteroalkyl chain.

- 5 It is particularly preferred that R^1 is hydrogen or C_{1-4} alkyl or Ar- C_{1-4} -alkyl and examples of such R^1 substituents include, but are not limited to:



- 10 where R^{12} is defined above.

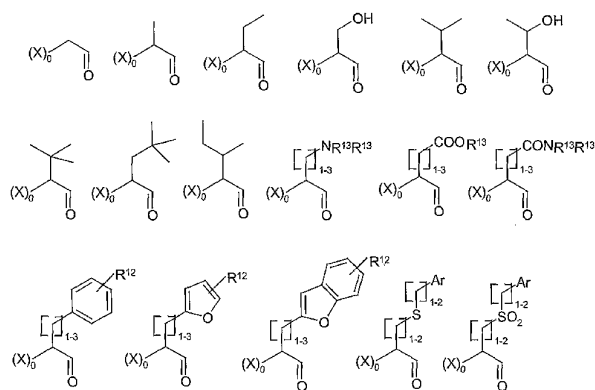
- In preferred compounds of general formula (I), Y is CHR^6CO where R^6 is selected from C_{0-7} -alkyl or Ar- C_{0-7} -alkyl, for example hydrogen, a straight or branched alkyl chain, a straight or branched heteroalkyl chain, an optionally substituted arylalkyl chain or an optionally substituted arylheteroalkyl chain. Additionally, in preferred compounds of general formula (I), R^6 is selected from C_{3-6} -cycloalkyl, for example cyclohexylmethyl.
- 15

Examples of preferred Y substituents include the following:

WO 02/057246

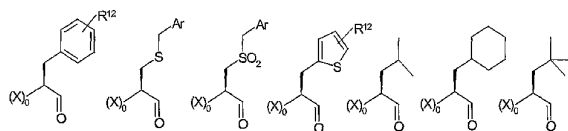
PCT/GB02/00194

-15-



wherein R^{12} , R^{13} and Ar are as defined above.

- 5 More preferred R^6 groups include C_{1-4} -alkyl, which may be substituted with OH, $NR^{13}R^{13}$, $COOR^{13}$, or $CONR^{13}R^{13}$ or cycloalkylmethyl or Ar- C_{1-4} -alkyl, where the aryl group may be substituted with R^{12} ; wherein each R^{12} and R^{13} is independently as defined above.
- 10 Even more preferred R^6 groups comprise Ar- CH_2 -, where the aromatic ring is an optionally substituted phenyl or monocyclic heterocycle. Additionally, even more preferred R^6 groups comprise simple branched alkyl groups such as isobutyl or straight heteroalkyl chains such as benzylsulfanylmethyl or benzylsulphonylmethyl. Furthermore, even more preferred R^6 groups comprise cyclohexylmethyl. Examples
- 15 of even more preferred Y substituents comprise the following,



WO 02/057246

PCT/GB02/00194

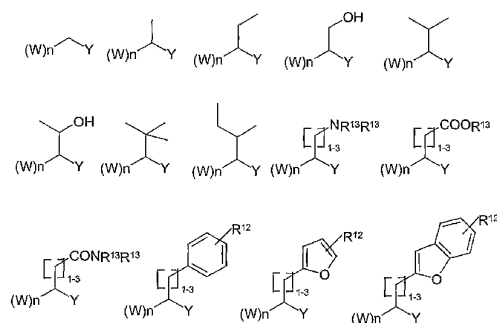
-16-

wherein R^{12} and Ar are as defined previously

It is preferred that in the group $(X)_o$, each of R^7 and R^8 is selected from C_{0-7} -alkyl or Ar- C_{0-7} -alkyl, for example hydrogen, a straight or branched alkyl chain, a straight or branched heteroalkyl chain, an optionally substituted arylalkyl chain or an optionally substituted arylheteroalkyl chain.

More preferred $(X)_o$ groups comprise R^7 chosen from hydrogen; R^8 is C_{1-4} -alkyl, which may be substituted with OH, $NR^{13}R^{13}$, $COOR^{13}$, or $CONR^{13}$, or Ar- C_{1-4} -alkyl, where the aryl group may be substituted with R^{12} , wherein each R^{12} and R^{13} is independently as defined above.

Examples of preferred $(X)_o$ groups include the following:



wherein R^{12} and R^{13} are as defined previously.

Even more preferred compounds of general formula (I), comprise $(X)_o$ groups that are simple alkyl groups such as methylene and where $o = 0$ or 1 .

In the group $(W)_n$, W is preferably O, S, SO_2 , S(O), C(O) or NR^9 , where R^9 is C_{0-4} -alkyl; and n is 0 or 1.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-17-

More preferred compounds of general formula (I), comprise $(W)_n$ groups defined as O, S, SO_2 , $C(O)$ and NH where $n = 0$ or 1.

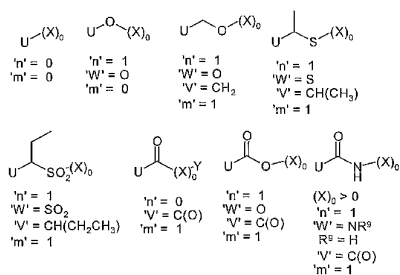
- 5 Yet even more preferred compounds of general formula (I), comprise $(W)_n$ groups defined as NH where $n = 1$.

In the group $(V)_m$:

V is preferably $C(O)$, $C(O)NH$ or CHR^{11} , where R^{11} is C_{0-4} -alkyl; and

- 10 m is 0 or 1.

Preferred V and W substituent combinations encompassed by general formula (I) include, but are not limited to:



- 15

Additionally, a preferred V and W substituent combination encompassed by general formula (I) includes, but is not limited to:

WO 02/057246

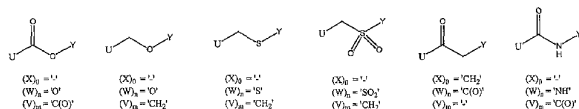
PCT/GB02/00194

-18-

 $(X)_0 = \text{'-'}'$ $n = 1$ $W = NR^0$, $R^0 = \text{'H'}$ $V = C(O)$ $m = 1$

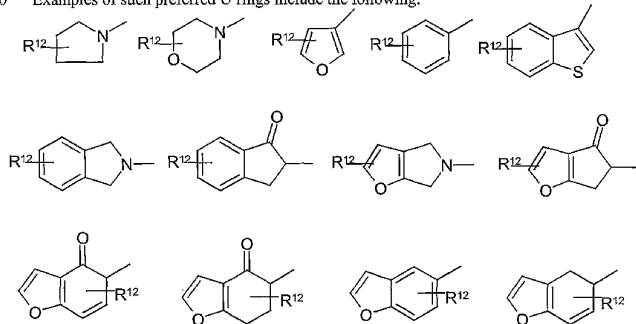
More preferred V, W and X substituent combinations encompassed by general formula (I) comprise, but are not limited to

5



In preferred compounds of general formula (I), U comprises an optionally substituted 5- or 6-membered saturated or unsaturated heterocycle or Ar group or an optionally substituted saturated or unsaturated 9- or 10-membered heterocycle or Ar group.

10 Examples of such preferred U rings include the following:

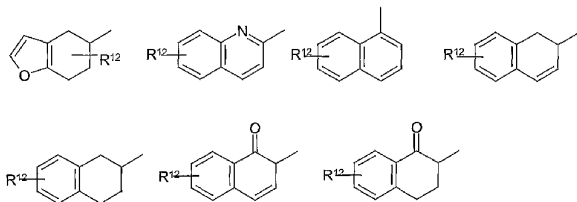


WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-19-

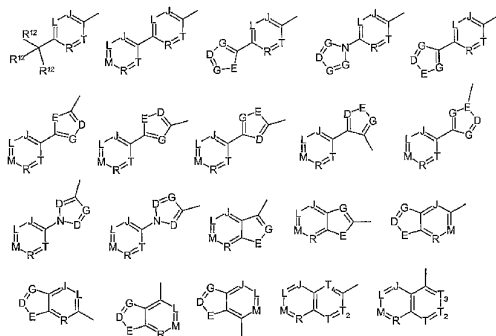
and also the following



5 wherein R^{12} is as defined previously.

More preferred compounds of general formula (I), contain a U group comprising of a bulky alkyl or aryl group at the para position of an aryl Ar. Also, more preferred compounds contain a meta or para-biaryl Ar-Ar, where Ar is as previously defined.

10 Additionally, more preferred compounds contain a 6,6 or 6,5 or 5,6-fused aromatic ring. Examples of more preferred U groups are



WO 02/057246

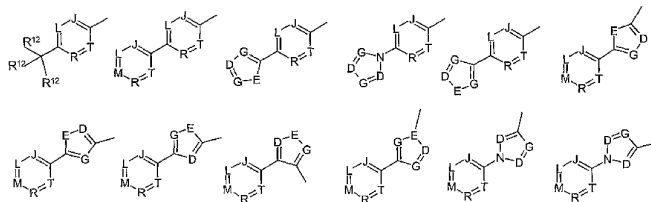
PCT/GB02/00194

-20-

wherein R^{12} , D, E, G, J, L, M, R, T, T_2 , T_3 and T_4 are as defined previously.

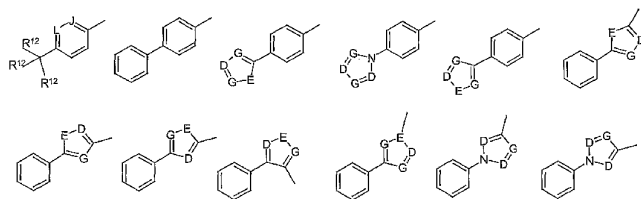
Even more preferred compounds of general formula (I), particularly for inhibition of cruzipain, contain a U group comprising a 6-membered Ar ring containing a bulky

- 5 alkyl or aryl group at the para position, where Ar is as previously defined



wherein R^{12} , D, E, G, J, L, M, R and T are as defined previously

- 10 Yet even more preferred compounds of general formula (I), contain a U group comprising but are not limited to the following,



wherein R^{12} , D, E, G, J and L are as defined previously.

15

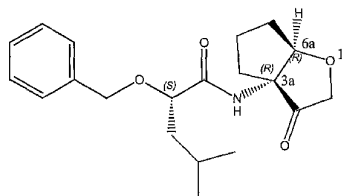
Abbreviations and symbols commonly used in the peptide and chemical arts are used herein to describe compounds of the present invention, following the general

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-21-

- guidelines presented by the IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature as described in *Eur. J. Biochem.*, 158, 9-, 1984. Compounds of formula (I) and the intermediates and starting materials used in their preparation are named in accordance with the IUPAC rules of nomenclature in which the characteristic groups have decreasing priority for citation as the principle group. An example compound of formula (I), compound (1) in which R¹ is H, Z is oxygen, Y is 4-methylpentyl, (X)₀ is zero, (W)_n is oxygen, (V)_m is methylene and U is phenyl is thus named:-

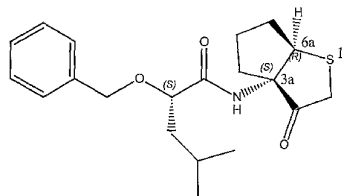


10

(1)

(3aR, 6aR) 2-Benzyl-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

- 15 A second example compound of formula (I), compound (2) in which R¹ is H, Z is sulphur, Y is 4-methylpentyl, (X)₀ is zero, (W)_n is oxygen, (V)_m is methylene and U is phenyl is thus named:-



20

(2)

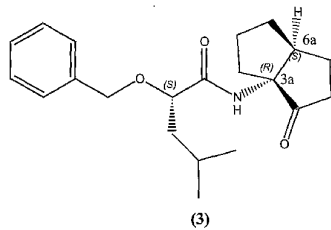
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-22-

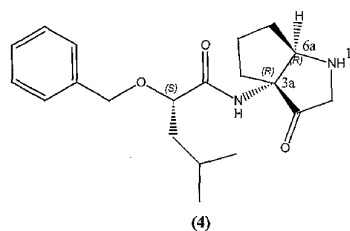
(3a*S*, 6a*R*) 2-Benzoyloxy-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]thiophen-3a-yl)-amide

A third example compound of formula (I), compound (3) in which R¹ is H, Z is methylene, Y is 4-methylpentyl, (X)₀ is zero, (W)_n is oxygen, (V)_m is methylene and U is phenyl is thus named:-



10 (3a*R*, 6a*S*) 2-Benzoyloxy-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-pentalen-3a-yl)-amide

A fourth example compound of formula (I), compound (4) in which R¹ is H, Z is NH, Y is 4-methylpentyl, (X)₀ is zero, (W)_n is oxygen, (V)_m is methylene and U is phenyl is thus named:-



(3a*R*, 6a*R*) 2-Benzoyloxy-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]pyrrol-3a-yl)-amide

20

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-23-

Compounds of the invention include, but are not limited to, the following examples that are the (3*aR*, 6*aR*) isomer of general formula (I) where Z = 'O' and R¹ = 'H', and also include the equivalent analogues included in the full definition of Z and R¹

5

4-*tert*-Butyl-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

10 *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide

4-Dimethylamino-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

15 *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-isopropyl-benzamide

4-Difluoromethoxy-*N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

20

N-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide

25 Naphthalene-2-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

30 Quinoline-6-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-24-

- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-3-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzothiazole-5-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-imidazol-1-yl-benzamide
- 15 *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-25-

3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

5 4-*tert*-Butyl-*N*-[3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-benzamide

N-[3-Methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide

10

4-Dimethylamino-*N*-[3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-benzamide

15 4-Isopropyl-*N*-[3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-benzamide

4-Difluoromethoxy-*N*-[3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-benzamide

20 *N*-[3-Methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-4-trifluoromethyl-benzamide

Naphthalene-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-amide

25

Naphthalene-1-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-amide

30 Quinoline-6-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-butyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-26-

- Benzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- Benzo[*b*]thiophene-3-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 5 Benzo[*b*]thiophene-3-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- Benzo[*b*]thiophene-3-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- N*-[3-Methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-4-imidazol-1-ylbenzamide
- 15 *N*-[3-Methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[3-Methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-27-

- 3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 5 4-*tert*-Butyl-N-[2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide
- N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide
- 10 4-Dimethylamino-*N*-[2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide
- N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-isopropyl-benzamide
- 15 4-Difluoromethoxy-*N*-[2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide
- 20 *N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide
- Naphthalene-2-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- 25 Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- Quinoline-6-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- 30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-28-

- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-3-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 5 Benzothiazole-5-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-imidazol-1-yl-benzamide
- 15 *N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[2-(3-Hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-29-

3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [2-(3-hydroxyphenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

- 5 4-*tert*-Butyl-N-[2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide

10

4-Dimethylamino-*N*-[2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)

- 15 ethyl]-4-isopropyl-benzamide

4-Difluoromethoxy-*N*-[2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-benzamide

- 20 *N*-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide

Naphthalene-2-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

25

Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

Quinoline-6-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-30-

- Benzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[*b*]thiophene-3-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzothiazole-5-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- N*-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-imidazol-1-yl-benzamide
- 15 *N*-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[2-(4-Fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[*b*]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-31-

3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [2-(4-fluorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

5 4-*tert*-Butyl-N-[2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide

10

4-Dimethylamino-*N*-[2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)

15 ethyl]-4-isopropyl-benzamide

4-Difluoromethoxy-*N*-[2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

20 *N*-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide

Naphthalene-2-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

25

Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

Quinoline-6-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-32-

- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-3-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 5 Benzo[b]thiophene-3-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-5-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- N*-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-imidazol-1-yl-benzamide
- 15 *N*-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[2-(4-Chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-33-

3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [2-(4-chlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

5 4-*tert*-Butyl-N-[2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-trifluoromethoxy-benzamide

10

4-Dimethylamino-*N*-[2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

N-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-isopropyl-benzamide

15

4-Difluoromethoxy-*N*-[2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-benzamide

20 *N*-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide

Naphthalene-2-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

25

Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

Quinoline-6-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-34-

- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 5 Benzo[b]thiophene-3-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzothiazole-5-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- N*-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-imidazol-1-yl-benzamide
- 15 *N*-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-4-thiophen-2-ylbenzamide
- N*-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-5-thiophen-2-ylnicotinamide
- 20 2-Phenylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 25 2-Pyridin-3-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 4-Phenylthiophene-2-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 30 2-Thiophen-2-ylthiazole-4-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-35-

3-Phenylpyrrole-1-carboxylic acid [2-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)carbamoyl]-ethyl]-amide

5 2-(4-*tert*-Butyl-benzylsulfanyl)-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

2-(4-*tert*-Butyl-benzylsulfanyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

10

2-(4-*tert*-Butyl-benzylsulfanyl)-3-(3-hydroxyphenyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

2-(4-*tert*-Butyl-benzylsulfanyl)-3-(4-fluorophenyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

15

2-(4-Hydroxybenzyl)-4-oxo-*N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)-4-(3-phenyl-pyrrol-1-yl)-butyramide

20 2-(4-Hydroxybenzyl)-4-oxo-*N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)-4-(3-phenyl-pyrrolidin-1-yl)-butyramide

4-Methyl-2-[2-oxo-2-(3-phenyl-pyrrol-1-yl)-ethyl]-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

25

4-Methyl-2-[2-oxo-2-(3-phenyl-pyrrolidin-1-yl)-ethyl]-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

2-[2-(1,3-Dihydro-isindol-2-yl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-36-

4-(1,3-Dihydro-isoindol-2-yl)-2-(4-hydroxybenzyl)-4-oxo-N-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-butyramide

4-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-2-(4-hydroxybenzyl)-4-oxo-N-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-butyramide

2-[2-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

10 Additional compounds of the invention include, but are not limited to, the following examples that are the (3a*R*, 6a*R*) isomer of general formula (I) where Z = 'O' and R¹ = 'H', and also include the equivalent analogues included in the full definition of Z and R¹

15 Furan-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

Furan-3-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

20 Thiophene-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

25 Thiophene-3-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [3-methyl-1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide

30 Furan-2-carboxylic acid [2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-37-

- Furan-3-carboxylic acid [2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- Thiophene-2-carboxylic acid [[2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- 5 Thiophene-3-carboxylic acid [2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- 10 Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- Furan-2-carboxylic acid [3,3-dimethyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 15 Furan-3-carboxylic acid [3,3-dimethyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- Thiophene-2-carboxylic acid [3,3-dimethyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 20 Thiophene-3-carboxylic acid [3,3-dimethyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- 25 Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [3,3-dimethyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-butyl]-amide
- Furan-2-carboxylic acid [2-benzylsulfanyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide
- 30 Furan-3-carboxylic acid [2-benzylsulfanyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbonyl)-ethyl]-amide

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-38-

- Thiophene-2-carboxylic acid [2-benzylsulfanyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 5 Thiophene-3-carboxylic acid [2-benzylsulfanyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [2-benzylsulfanyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl]-amide
- 10 Furan-2-carboxylic acid [1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-2-phenylmethanesulfonyl-ethyl]-amide
- Furan-3-carboxylic acid [1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-2-phenylmethanesulfonyl-ethyl]-amide
- 15 Thiophene-2-carboxylic acid [1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-2-phenylmethanesulfonyl-ethyl]-amide
- 20 Thiophene-3-carboxylic acid [1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-2-phenylmethanesulfonyl-ethyl]-amide
- Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [1-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-2-phenylmethanesulfonyl-ethyl]-amide
- 25 2-Benzoyloxy-3-cyclohexyl-N-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide
- Morpholine-4-carboxylic acid 2-cyclohexyl-1-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-ylcarbamoyl)-ethyl ester
- 2-Cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-N-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-butyramide
- 30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-39-

2-Biphenyl-3-yl-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

3-Cyclohexyl-2-(furan-2-ylmethylsulfanyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

- 5 3-Cyclohexyl-2-(furan-3-ylmethylsulfanyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

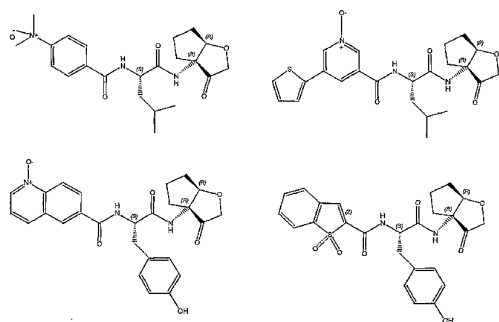
3-Cyclohexyl-2-(furan-2-ylmethanesulfonyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

- 10 3-Cyclohexyl-2-(furan-3-ylmethanesulfonyl)-*N*-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-propionamide

2-(4-*tert*-Butyl-phenylmethanesulfonyl)-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

2-(4-*tert*-Butyl-benzyloxy)-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3a-yl)-amide

- 15 Considering all of the above examples, it is also intended to include the oxidised analogues of capping groups that contain a readily oxidised nitrogen to give the N-oxide or a readily oxidised sulphur to give the sulphone. The following structures are illustrative examples;



WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-40-

To those skilled in the practices of organic chemistry, compounds of general formula (I) may be readily synthesised by a number of chemical strategies, performed either in solution or on the solid phase (see Atherton, E. and Sheppard, R. C. In *'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach'*, Oxford University Press, Oxford, U.K. 1989, for a general review of solid phase synthesis principles). The solid phase strategy is attractive in being able to generate many thousands of analogues, typically on a 5-100mg scale, through established parallel synthesis methodologies (e.g. see (a) Bastos, M.; Maeji, N. J.; Abeles, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6738-6742, 1995).

Therefore, one strategy for the synthesis of compounds of general formula (I) comprises:-

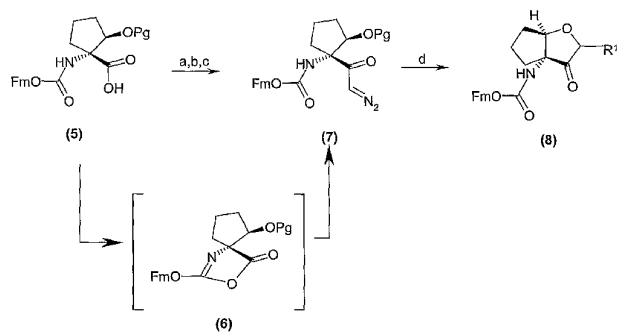
- (a) Preparation of an appropriately functionalised and protected cyclopentane bicyclic ketone building block in solution.
- (b) Attachment of the building block (a) to the solid phase through a linker that is stable to the conditions of synthesis, but readily labile to cleavage at the end of a synthesis (see James, I. W., *Tetrahedron*, *55*(Report N° 489), 4855-4946, 1999, for examples of the 'linker' function as applied to solid phase synthesis).
- (c) Solid phase organic chemistry (see Brown, R. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, 19, 3293-3320, 1998), to construct the remainder of the molecule.
- (d) Compound cleavage from the solid phase into solution.
- (e) Cleavage work-up and compound analysis.

The first stage in a synthesis of compounds of general formula (I) is the preparation in solution of a functionalised and protected building block. A typical scheme towards the (3a*R*,6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide (8) is detailed in Scheme 1.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-41-



Scheme 1. (a) ^tBuOCOCl, NMM, DCM, -15°C, 10mins, under argon. (b) Diazomethane in diethyl ether, -15°C to RT over 1hr. (c) Acetic acid (d) LiCl (10eq) in 80% aq acetic acid, 5°C to RT over 1hr.

- 5 Fmoc(O) denotes the well known amine protecting group 9-fluorenyl methoxycarbonyl (Fmoc, see Atherton, E. and Sheppard, R. C., 1989) and 'Pg' denotes either a free hydroxyl or an hydroxyl protecting group such as *tert*-butyl ether. In the illustrated case, condensation with diazomethane provides R¹ = H.
- 10 Considering step (a), synthesis commences from a suitably protected 1-amino-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid (5). The core aminoacid is accessible through a variety of literature methods such as the asymmetric Strecker or Bucherer-Bergs syntheses e.g. (a) Ohfuné, Y., Nanba, K., Takada, I., Kan, T., Horikawa, N., Nakajima, T. *Chirality*, **9**, 459-462, 1997. (b) Ohfuné, Y., Horikawa, N., *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **55**, 982-993, 1997. (c) Volk, F.-J., Frahm, A. W. *Liebigs Ann. Chem.* 1893-1903, 1996. (d) Fonderkar, K. P., Volk, F.-J., Frahm, A. W. *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 727-735, 1999. Activation of the suitably protected 1-amino-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid (5) via isobutyl chloroformate mixed anhydride, followed by condensation with diazomethane, yields the diazomethylketone intermediate (7). Following the reaction conditions detailed in Scheme 1, formation of the diazoketone is clearly observed. However, an overall
- 15
- 20

improvement in isolated yield of diazoketone (7) is obtained by pre-forming the acyl fluoride of (5), which has a lesser propensity to form the poorly active (5*R*, 6*R*) 6-alkoxy-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy)-3-oxa-1-azaapiro[4,4]non-1-en-4-one (6) and also by leaving the reaction with ethereal diazomethane for 24hr. Treatment of
5 diazomethylketone intermediate (7) with lithium chloride in aqueous acetic acid provides the protected (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide (8). Introduction of simple R¹ substituents may be achieved by condensation of activated (5) with alternatives to diazomethane such as diazoethane (R¹ = CH₃), or 1-phenyloxediazoethane (R¹ = CH₂OPh).

10

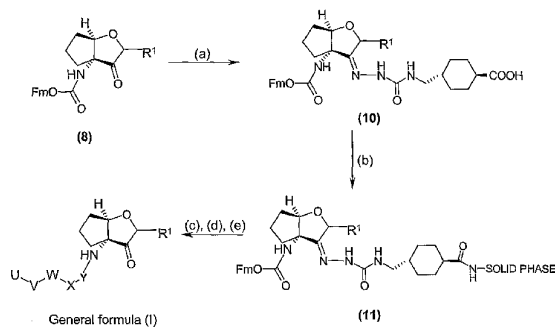
The protected building blocks (synthesis exemplified by (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide (8) detailed in Scheme 1 may be utilised in a solid phase synthesis of inhibitor molecules (steps (b) to (e)). Step (b), the solid phase linkage of an aldehyde or ketone, has previously been described by a
15 variety of methods (e.g. see (a) James, I. W., 1999, (b) Lee, A., Huang, L., Ellman, J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 121(43), 9907-9914, 1999, (c) Murphy, A. M., *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3156-3157, 1992). A suitable method amenable to the reversible linkage of an alkyl ketone functionality such as (8) is through a combination of the previously described chemistries. The semicarbazide, 4-[[[(hydrazinocarbonyl)
20 amino]methyl]cyclohexane carboxylic acid, trifluoroacetate (9) (Murphy, A. M., *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3156-3157, 1992), may be utilised as illustrated in Scheme 2, exemplified by linkage of the (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide (8).

25 Construct (10) is prepared through reaction of the linker molecule (9) and the (3*aR*, 6*aR*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide (8) by reflux in aqueous ethanol / sodium acetate. Although formation of construct (10) is observed at 2hr reaction, optimal formation of construct (10) occurs at 24hr reaction. Standard solid phase techniques (e.g. see Atherton, E. and Sheppard, R. C., 1989) are used to
30 anchor the construct to an amino-functionalised solid phase through the free carboxylic acid functionality of (10), providing the loaded construct (11). Acid mediated cleavage of the fully constructed compounds is optimal at 24hr reaction.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-43-



Scheme 2. (a) (8) in 90% EtOH / H₂O / 1.5eq NaOAc / 4-[[[(hydrazinocarbonyl)amino]methyl]cyclohexane carboxylic acid.trifluoroacetate (9), 24hr reflux. (b) 3eq construct (10) / 3eq HBTU / 3eq HOBt / 6eq NMM, NH₂-SOLID PHASE, DMF, RT, o/n. (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) Range of chemistries to introduce U-V-W-X-Y (e) TFA / H₂O (95:5, v/v), RT, 24hr.

Loaded construct (11) may be reacted with a wide range of carboxylic acids available commercially or in the literature, to introduce the left-hand portion 'U-V-W-X-Y' in general formula (I). In the simplest example, the entire left hand portion of an inhibitor of general formula (I) comprises a capped aminoacid (Scheme 3), providing for example analogues of general formula (I) where R⁵ = 'H', (X)₀ = '-', (W)_n = 'NH', R⁶ = 'H', n = 1, (V)_m = 'CO', m = 1 and U = aryl

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-44-



Scheme 3. (a) 20% piperidine / DMF, 30mins (b) 20eq Fmoc-aminoacid / 20eq HBTU / 20eq HOBt / 40eq NMM, DMF, o/n (c) 5eq carboxylic acid / 5eq HBTU / 5eq HOBt / 10eq NMM, DMF, RT, o/n (d) TFA / H_2O (95:5, v/v), RT, 24hr.

5

Alternatively, carboxylic acids can be prepared in solution by traditional organic chemistry methods and coupled to construct (11) on the solid phase (Schemes 4-8). For example (Scheme 4), treatment in solution of an amino acid, exemplified by (13) with sodium nitrite / H_2SO_4 , provides the α -hydroxyacid, exemplified by (14) (Degerbeck, F. *et al*, *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1*, 11-14, 1993). Treatment of α -hydroxyacid, (14) with sodium hydride in a dimethylformamide / dichloromethane mixture followed by addition of benzyl bromide, provides 2*RS*-benzyloxy-3-cyclohexylpropionic acid (15). Coupling of (15) to the solid phase construct (11) followed by cleavage, provides (16), an example of general formula (I) where $R^5 = 'H'$, $(X)_0 = 'O'$, $(W)_n = 'O'$, $n = 1$, $(V)_m = 'CH_2'$, i.e. R^{10} , $R^{11} = 'H'$, $m = 1$ and $U = \text{phenyl}$. To those skilled in the practices of organic synthesis, a wide variety of aminoacids such as (13) may be converted to the corresponding α -hydroxyacid such as (14) following the general conditions detailed. Additionally, benzylbromide may be replaced by any reasonable $Ar-CR^{10}R^{11}$ -halide, providing many variations of carboxylic acid (15) following the general conditions detailed. In certain instances, it may be advantageous to temporarily protect the carboxylic acid as the methyl ester (for example compound (21), Scheme 6) prior to reaction with the alkylhalide. The ester intermediate is then simply hydrolysed to acid (15). Analogues of (16), exploring a wide range of $(V)_m$ and U in general formula (I) may be prepared through

10

15

20

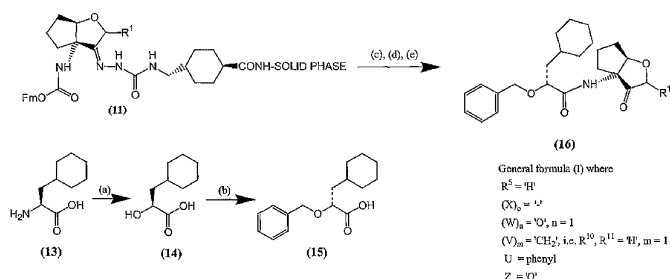
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-45-

the general conditions detailed in Scheme 4. Since the final synthetic step involves a trifluoroacetic acid (TFA) mediated cleavage of the solid phase bound compound, analogues where the substituted ether is labile to TFA may be prepared in solution by an alternative route (see Scheme 11).

5



Scheme 4. (a) $NaNO_2 / H_2SO_4$, $0^\circ C \rightarrow RT$, 2hr (b) 2.3eq NaH , 1:1 DMF / DCM, 1.4eq benzylbromide, o/n (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) 10eq (15) / 10eq HBTU / 10eq HOBt / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (e) TFA / H_2O (95:5, v/v), RT, 24hr.

10

Alternatively, coupling of construct (11) (following removal of Fmoc) with the α -hydroxyacid (14), provides a versatile solid phase bound intermediate 'Y' substituent in general formula (I) that may be reacted with many reagents. For example, the α -hydroxyl can be reacted under Mitsunobu conditions (Hughes, D. L. *Org. React.* (N.Y.), 42, 335-656, 1992) to give ethers (i.e. $X = '-'$, $W = 'O'$), in general formula (I) (see Grabowska, U. *et al*, *J. Comb. Chem.*, 2(5), 475-490, 2000, for an example of Mitsunobu reaction on the solid phase). Alternatively, the α -hydroxyl can be reacted with a carbamoyl chloride to give a carbamate (i.e. $X = '-'$, $W = 'O'$, $V = 'NHC(O)'$, in general formula (I)).

20

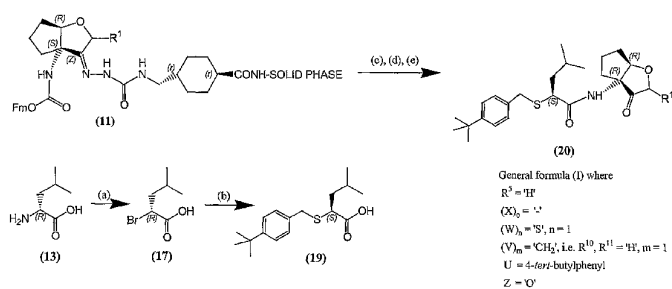
Alternatively, (Scheme 5), treatment in solution of an amino acid, exemplified by (13) with sodium nitrite / H_2SO_4 / potassium bromide provides the α -bromoacid,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-46-

exemplified by (17) (Souers, A. J. *et al*, *Synthesis*, 4, 583-585, 1999) with retention of configuration. Treatment of α -bromoacid (17) with an alkylthiol exemplified by 4-*tert*-butylphenylmethanethiol (18) in dimethylformamide / triethylamine, provides 2*S*-(4-*tert*-butylbenzylsulfanyl)-4-methylpropionic acid (19), with inversion of configuration. Coupling of (19) to the solid phase construct (11) followed by cleavage, provides (20), an example of general formula (I) where $R^5 = 'H'$, $(X)_n = '1'$, $(W)_n = 'S'$, $n = 1$, $(V)_m = 'CH_2'$, i.e. R^{10} , $R^{11} = 'H'$, $m = 1$ and $U = 4$ -*tert*-butylphenyl. To those skilled in the practices of organic synthesis, a wide variety of aminoacids such as (13) may be converted to the corresponding α -bromoacid such as (17) following the general conditions detailed. Additionally, starting with the *S*-isomer of (13) gives the *S*-bromoacid analogue of (17) and *R*-thioether analogue of (19). Additionally, (4-*tert*-butylphenyl)methanethiol (18) may be replaced by any reasonable $Ar-CR^{10}R^{11}-SH$, providing many variations of carboxylic acid (19) following the general conditions detailed. Thus analogues of (20) exploring a wide range of $(V)_m$ and U in general formula (I) may be prepared through the general conditions detailed in Scheme 5.

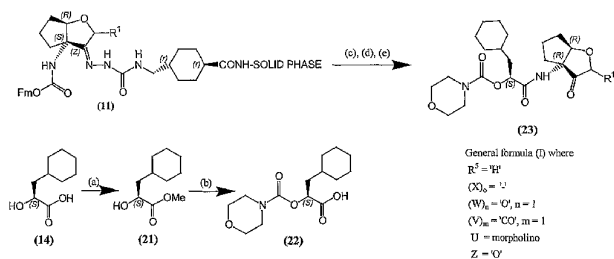


Scheme 5. (a) $NaNO_2 / H_2SO_4$, KBr $0^\circ C \rightarrow RT$, 2hr (b) Alkylthiol (18) / DMF / NEt_3 , o/n (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) 10eq (19) / 10eq HBTU / 10eq HOBt / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (e) TFA / H_2O (95:5, v/v), RT, 24hr.

Alternatively, coupling of construct (11) (following removal of Fmoc) with an α -bromoacid e.g. (17), provides a versatile intermediate 'Y' substituent in general

formula (I) that may be reacted with many reagents. For example, the α -bromide can be displaced with nucleophiles *e.g.* alcohols, thiols, carbanions etc, to give ethers (*i.e.* X = '-', W = 'O', in general formula (I)), thioethers (*i.e.* X = '-', W = 'S', in general formula (I)). The thioethers may optionally be oxidised to the sulphone (see Scheme 9, *i.e.* X = '-', W = 'SO₂', in general formula (I)) (see Grabowska, U. *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2(5), 475-490, **2000**, for an example of bromide displacement and thioether oxidation on the solid phase).

Alternatively, (Scheme 6), treatment of an α -hydroxyacid, exemplified by (14) with trimethylsilylchloride and methanol provides the methyl ester (21). Activation of the free hydroxyl to the chloroformate with phosgene in dichloromethane followed by addition of morpholine, then hydrolysis, provides morpholine-4-carboxylic acid-1S-carboxy-2-cyclohexyl ethyl ester (22). Coupling of (22) to the solid phase construct (11) followed by cleavage, provides (23), an example of general formula (I) where R⁵ = 'H', (X)₀ = '-', (W)_n = 'O', n = 1, (V)_m = 'CO' and U = morpholino. To those skilled in the practices of organic synthesis, a wide variety of α -hydroxyacid esters such as (21) could be converted to the activated chloroformate following the general conditions detailed. Additionally, morpholine may be replaced by any reasonable amine, providing many variations of carboxylic acid (22) following the general conditions detailed. Thus analogues of (23) exploring a wide range of (V)_m and U in general formula (I) may be prepared through the general conditions detailed in Scheme 6.



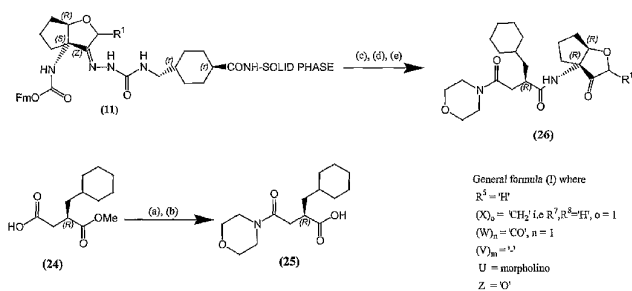
Scheme 6. (a) Me_3SiCl , MeOH , RT, o/n. (b) i. COCl_2 / DCM / o/n, ii. Morpholine / DCM 0°C , 2hr, iii. LiOH in H_2O / dioxan, 0°C . (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) 10eq (22) / 10eq HBTU / 10eq HOBT / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (e) TFA / H_2O (95:5, v/v), RT, 24hr.

5 Alternatively, (Scheme 7), a wide range of alkylsuccinate esters exemplified by 2*R*-cyclohexylmethylsuccinic acid 1-methyl ester (24) are commercially available or readily prepared by known methods (see (a) Azam *et al*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 621-, 1996; (b) Evans *et al*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 103, 2127, 1981; (c) Oikawa *et al*, *Tet. Lett.*, 37, 6169, 1996). Carboxyl activation of alkylsuccinate ester (24) followed by addition of morpholine in dimethylformamide and subsequent ester hydrolysis, provides 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-butyric acid (25). Coupling of (25) to the solid phase construct (11) followed by cleavage, provides (26), an example of general formula (I) where $\text{R}^5 = \text{'H'}$, $(\text{X})_0 = \text{'CH}_2\text{'}$ i.e. $\text{R}^7, \text{R}^8 = \text{'H'}$, $o = 1$, $(\text{W})_n = \text{'CO'}$, $n = 1$, $(\text{V})_m = \text{'-.'}$ and $\text{U} = \text{morpholino}$. To those skilled in the practices of organic synthesis, a wide variety of alkylsuccinate esters such as (24) may be prepared and converted to the corresponding substituted alkylsuccinate acid such as (25) following the general conditions detailed. Additionally, morpholine may be replaced by any reasonable amine, providing many variations of carboxylic acid (25) following the general conditions detailed. Thus analogues of (26) exploring a wide range of $(\text{X})_0$, $(\text{V})_m$ and U in general formula (I) may be prepared through the general conditions detailed in Scheme 7.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-49-



Scheme 7. (a) i.EDC / 1-hydroxybenzotriazole /DMF, 0°C, 30mins. ii. Morpholine, RT, o/n (b) LiOH in H₂O / dioxan, 0°C (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) 10eq (25) / 10eq HBTU / 10eq HOBt / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (e) TFA / H₂O (95:5, v/v), RT, 24hr.

5

Alternatively, (Scheme 8), a wide range of biarylalkylacetic acids, exemplified by 2*RS*-biphenyl-3-yl-4-methylpentanoic acid (**28**) are readily available by known methods (see (a) DesJarlais, R. L. *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9114-9115, **1998**; (b) Oballa, R. M. *et al*, WO 0149288). Coupling of biarylalkylacetic acid (**28**) to the solid phase construct (**11**) followed by cleavage, provides (**29**), an example of general formula (I) where $R^3 = 'H'$, $(X)_n = '.'$, $(W)_n = '.'$, $(V)_m = '.'$ and $U = m$ -biphenyl. To those skilled in the practices of organic synthesis, a wide variety of biarylalkylacetic acids such as (**28**) may be prepared by alkylation of the α -anion of the free acid analogue of (**27**), which in turn is prepared by Suzuki coupling of phenylboronic acid and 3-bromophenylacetic acid methyl ester. Phenylboronic acid may be replaced by a wide range of arylboronic acids in the Suzuki coupling, providing many variations of carboxylic acid (**28**) following the general conditions detailed. Thus analogues of (**29**) exploring a wide range of group 'U' in general formula (I) may be prepared through the general conditions detailed in Scheme 8.

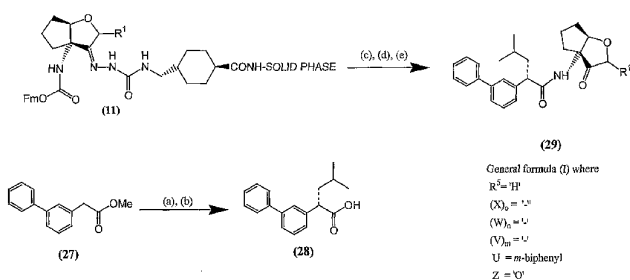
10

15

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-50-



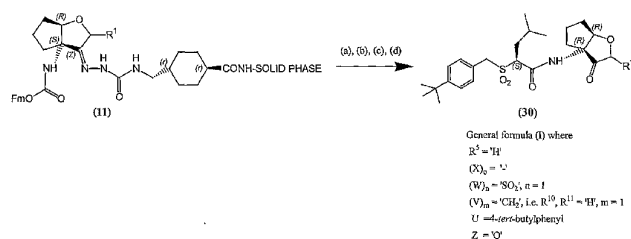
Scheme 8. (a) LiOH in H₂O / dioxan, 0°C (b) i.LDA, THF, 2-methylpropenylbromide. ii. Pd/C, EtOH, H₂ (c) 20% piperidine / DMF, 30mins. (d) 10eq (28) / 10eq HBTU / 10eq HOBt / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (e) TFA / H₂O (95:5, v/v), RT, 24hr.

Many other possibilities for solid phase organic chemistry (e.g. see Brown, R. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **19**, 3293-3320, **1998**, for a review of recent SPOC publications) can be used to derivatise construct (11) towards compounds of general formula (I). For example, the left-hand portion 'U-V-W-X-Y' in general formulae (I) can be partially constructed in solution, coupled to construct (11) and further modified on the solid phase. For example (Scheme 9), a simple extension of Scheme 5 is through the oxidation of the intermediate solid phase bound species, with *m*-chloroperbenzoic acid in dichloromethane prior to cleavage, to give the sulphone analogue (30), an example of general formula (I) where $R^5 = H$, $(X)_0 = ^{1,2}$, $(W)_n = ^{1,2}$, $(V)_m = ^{1,2}$, i.e. R^{10} , $R^{11} = H$, $m = 1$ and $U = 4\text{-tert-butylphenyl}$. As described in Scheme 5, many variations of carboxylic acid (19) may be prepared following the general conditions detailed. Thus analogues of (30) exploring a wide range of $(V)_m$ and U in general formula (I) may be prepared through the general conditions detailed in Schemes 5 and 9.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-51-



Scheme 9. (a) 20% piperidine / DMF, 30mins. (b) 10eq (19) / 10eq HBTU / 10eq HOBt / 20eq NMM, DMF, RT, o/n (c) 5eq *m*-chloroperbenzoic acid / DCM, RT, 5hr. (d) TFA / H_2O (95:5, v/v), RT, 24hr.

- 5 Compounds of general formula (I) are finally released from the solid phase by treatment with trifluoroacetic acid / water, followed by evaporation, lyophilis and standard analytical characterisation.

A second strategy for the synthesis of compounds of general formula (I) comprises:-

10

- (f) Preparation of an appropriately functionalised and protected (3a*R*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide, (3a*S*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkylamide, (3a*R*, 6a*S*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide or (3a*R*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide building block in solution. Preferred protecting groups for solution phase chemistry are the *N*α-*tert*-butoxycarbonyl group and the *N*α-benzyloxycarbonyl group.

15

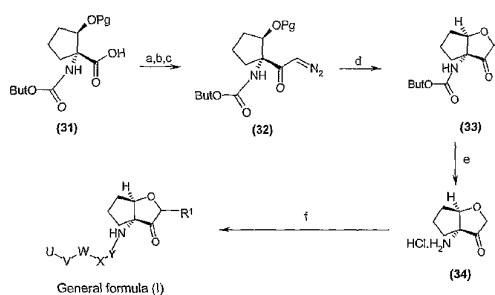
- (g) Standard organic chemistry methods for the conversion of building block (f) towards compounds of general formula (I), (Scheme 10).

20

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-52-



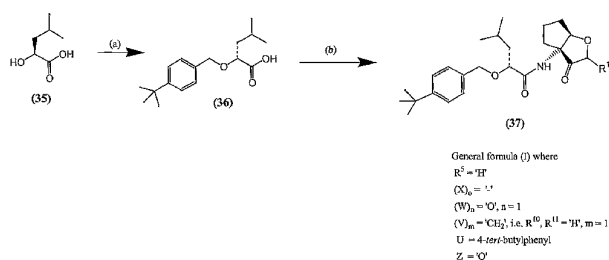
Scheme 10. (a) Pre-formed acyl fluoride (b) Diazomethane in diethyl ether, -15°C to RT over 24hr. (c) Acetic acid (d) LiCl (10eq) in 80%aq acetic acid, 5°C to RT over 1hr. (e) 4M HCl in dioxan, 0°C , 2hrs. (f) Pre-prepared U-V-W-X-Y-COOH / activation e.g. HATU / HOAt / NMM, DMF, RT, o/n.

An attractive alternative to the mixed anhydride activation of (31) is through the use of the pre-formed acyl fluoride (akin to that detailed in Scheme 1). The general strategy detailed in Scheme 10 is particularly useful when the compound of general formula (I) contains a substituent that is labile to trifluoroacetic acid, this being the final reagent used in each of the solid phase Schemes 4-9. For example (Scheme 11), treatment in solution of α -hydroxyacid (35) with sodium hydride in a dimethylformamide / dichloromethane mixture followed by addition of 4-tert-butylbenzyl bromide, provides 2RS-(4-tert-butylbenzyloxy)-4-methylpentanoic acid (36). Coupling of (36) to hydrochloride salt (34), provides (37), an example of general formula (I) where $\text{R}^5 = \text{'H'}$, $(\text{X})_0 = \text{'-'}'$, $(\text{W})_n = \text{'O'}$, $n = 1$, $(\text{V})_m = \text{'CH}_2'$, i.e. $\text{R}^{10}, \text{R}^{11} = \text{'H'}$, $m = 1$ and $\text{U} = 4\text{-tert-butylphenyl}$. To those skilled in the practices of organic synthesis, 4-tert-butylbenzyl bromide may be replaced by any reasonable $\text{Ar-CR}^{10}\text{R}^{11}$ -halide, providing many variations of carboxylic acid (36) under the conditions shown. Thus analogues of (37) exploring a wide range of $(\text{V})_m$ and U in general formula (I) may be prepared through the conditions detailed in Scheme 11.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-53-



Scheme 11. (a) 2.2eq NaH, 1:1 DMF / DCM, 1.25eq 4-*tert*-benzylbromide, 2hr (b) 1eq (36), 1eq BuOCOCl, 2eq NMM, DCM, -15°C, 1hr, under nitrogen, then 1eq (34), RT, o/n..

- 5 A third strategy for the synthesis of compounds of general formula (I) where the addition of U-V-W-X-Y to the protected (3a*R*,6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide, (3a*S*,6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkylamide, (3a*R*,6a*S*) *N*-(3-oxo-hexahydropentalen-3a-yl)alkylamide or (3a*R*,6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide
- 10 building block involves multistep organic reactions comprises:-
- (h) Preparation of an appropriately functionalised and protected (3a*R*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide, (3a*S*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkylamide, (3a*R*, 6a*S*) *N*-(3-oxo-hexahydropentalen-3a-yl)alkylamide or (3a*R*,6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide building block in solution. Preferred protecting groups for solution phase chemistry are the *N*α-*tert*-butoxycarbonyl group and the *N*α-benzyloxycarbonyl group.
- (i) Protection of the ketone functionality of the (3a*R*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]furan-3a-yl)alkylamide, (3a*S*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]thiophen-3a-yl)alkylamide, (3a*R*, 6a*S*) *N*-(3-oxo-hexahydropentalen-3a-yl)alkylamide or (3a*R*, 6a*R*) *N*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[*b*]pyrrol-3a-yl)alkylamide building block e.g. as a dimethylacetal.
- 20

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-54-

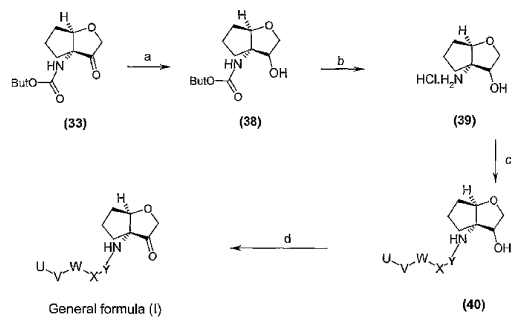
Alternatively, the ketone may be reduced to the achiral secondary alcohols and re-oxidised as the final synthetic step.

- (j) Standard organic chemistry methods for the conversion of building block (i) towards compounds of general formula (I).

5

Intermediates may be prepared in solution, followed by coupling to building block (i) and further derivitisation towards compounds of general formula (I) (see Scheme 12 exemplified by preparation and use of the (3-hydroxyhexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)carbamic acid tert-butyl ester (38)).

10



Scheme 12. (a) Reduction, e.g. NaBH_4 (b) 4M HCl in dioxan, 0°C , 2hrs. (c) Stepwise reaction with intermediates of Y, then X, then W etc., to stepwise construct compounds (40). (d) Oxidation, e.g.

15 Dess-Martin periodane, CH_2Cl_2 .

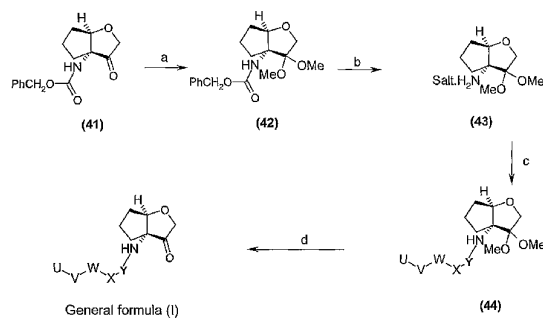
Alternatively, depending upon the types of chemistry used to construct the left hand side U-V-W-X-Y of compounds of general formula (I), the ketone may require protection e.g. as the dimethyl acetal. Such a method is detailed and exemplified in

20 Scheme 13 by the preparation and use of (3,3-dimethoxyhexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)carbamic acid benzyl ester (42).

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-55-



Scheme 13. (a) Triethylorthoformate / pTSA / MeOH. (b) H_2 , Pd-C. (c) Stepwise reaction with intermediates of Y, then X, then W etc., to stepwise construct compounds (44). (d) Trifluoroacetic acid / CH_2Cl_2 / H_2O .

The invention extends to novel intermediates as described above, and to processes for preparing compounds of general formula (I) from each of its immediate precursors. In turn, processes for preparing intermediates from their immediate precursors also form part of the invention.

Compounds of general formula (I) are useful both as laboratory tools and as therapeutic agents. In the laboratory certain compounds of the invention are useful in establishing whether a known or newly discovered cysteine protease contributes a critical or at least significant biochemical function during the establishment or progression of a disease state, a process commonly referred to as 'target validation'.

According to a second aspect of the invention, there is provided a method of validating a known or putative cysteine protease inhibitor as a therapeutic target, the method comprising:

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-56-

- (a) assessing the *in vitro* binding of a compound as described above to an isolated known or putative cysteine protease, providing a measure of potency; and optionally, one or more of the steps of:
- 5 (b) assessing the binding of the compound to closely related homologous proteases of the target and general house-keeping proteases (e.g. trypsin) to provides a measure of selectivity;
- (c) monitoring a cell-based functional marker of a particular cysteine protease activity, in the presence of the compound; and
- 10 (d) monitoring an animal model-based functional marker of a particular cysteine protease activity in the presence of the compound.
- 15 The invention therefore provides a method of validating a known or putative cysteine protease inhibitor as a therapeutic target. Differing approaches and levels of complexity are appropriate to the effective inhibition and 'validation' of a particular target. In the first instance, the method comprises assessing the *in vitro* binding of a compound of general formula (I) to an isolated known or putative cysteine protease, providing a measure of 'potency'. An additional assessment of the binding of a
- 20 compound of general formula (I) to closely related homologous proteases of the target and general house-keeping proteases (e.g. trypsin) provides a measure of 'selectivity'. A second level of complexity may be assessed by monitoring a cell-based functional marker of a particular cysteine protease activity, in the presence of a compound of general formula (I). For example, a 'human osteoclast resorption assay' has been utilised as a cell-based secondary *in vitro* testing system for monitoring the activity of cathepsin K and the biochemical effect of protease inhibitors (e.g. see WO-A-9850533). An 'MHC-II processing – T-cell activation assay' has been utilised
- 25 as a cell-based secondary *in vitro* testing system for monitoring the activity of cathepsin S and the biochemical effect of protease inhibitors (Shi, G-P., *et al*, *Immunity*, 10, 197-206, 1999). When investigating viral or bacterial infections such a
- 30 marker could simply be a functional assessment of viral (e.g. count of mRNA copies)

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-57-

or bacterial loading and assessing the biochemical effect of protease inhibitors. A third level of complexity may be assessed by monitoring an animal model-based functional marker of a particular cysteine protease activity, in the presence of a compound of general formula (I). For example, murine models of *Leishmania* infection, *P. vinckei* infection, malaria (inhibition of falcipain) and *T. cruzi* infection (cruzipain), indicate that inhibition of cysteine proteases that play a key role in pathogen propagation is effective in arresting disease symptoms, 'validating' said targets.

10 The invention therefore extends to the use of a compound of general formula (I) in the validation of a known or putative cysteine protease inhibitor as a therapeutic target.

Compounds of general formula (I) are useful for the *in vivo* treatment or prevention
15 of diseases in which participation of a cysteine protease is implicated.

According to a third aspect of the invention, there is provided a compound of general formula (I) for use in medicine, especially for preventing or treating diseases in which the disease pathology may be modified by inhibiting a cysteine protease.

20 According to a fourth aspect of the invention, there is provided the use of a compound of general formula (I) in the preparation of a medicament for preventing or treating diseases in which the disease pathology may be modified by inhibiting a cysteine protease.

25 Certain cysteine proteases function in the normal physiological process of protein degradation in animals, including humans, *e.g.* in the degradation of connective tissue. However, elevated levels of these enzymes in the body can result in pathological conditions leading to disease. Thus, cysteine proteases have been
30 implicated in various disease states, including but not limited to, infections by *Pneumocystis carinii*, *Trypanoma cruzi*, *Trypanoma brucei brucei* and *Crithidia fusticulata*; as well as in osteoporosis, autoimmunity, schistosomiasis, malaria,

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-58-

tumour metastasis, metachromatic leukodystrophy, muscular dystrophy, amyotrophy, and the like. See WO-A-9404172 and EP-A-0603873 and references cited in both of them. Additionally, a secreted bacterial cysteine protease from *S. Aureus* called staphylopain has been implicated as a bacterial virulence factor (Potempa, J., *et al. J. Biol. Chem.*, 262(6), 2664-2667, 1998).

The invention is useful in the prevention and/or treatment of each of the disease states mentioned or implied above. The present invention also is useful in a methods of treatment or prevention of diseases caused by pathological levels of cysteine proteases, particularly cysteine proteases of the papain superfamily, which methods comprise administering to an animal, particularly a mammal, most particularly a human, in need thereof a compound of the present invention. The present invention particularly provides methods for treating diseases in which cysteine proteases are implicated, including infections by *Pneumocystis carinii*, *Trypanoma cruzi*, *Trypanoma brucei*, *Leishmania mexicana*, *Clostridium histolyticum*, *Staphylococcus aureus*, foot-and-mouth disease virus and *Crithidia fusciculata*; as well as in osteoporosis, autoimmunity, schistosomiasis, malaria, tumour metastasis, metachromatic leukodystrophy, muscular dystrophy and amyotrophy.

Inhibitors of cruzipain, particularly cruzipain-specific compounds, are useful for the treatment of Chagas' disease.

In accordance with this invention, an effective amount of a compound of general formula (I) may be administered to inhibit the protease implicated with a particular condition or disease. Of course, this dosage amount will further be modified according to the type of administration of the compound. For example, to achieve an "effective amount" for acute therapy, parenteral administration of a compound of general formula (I) is preferred. An intravenous infusion of the compound in 5% dextrose in water or normal saline, or a similar formulation with suitable excipients, is most effective, although an intramuscular bolus injection is also useful. Typically, the parenteral dose will be about 0.01 to about 100 mg/kg; preferably between 0.1 and 20 mg/kg, in a manner to maintain the concentration of drug in the plasma at a

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-59-

concentration effective to inhibit a cysteine protease. The compounds may be administered one to four times daily at a level to achieve a total daily dose of about 0.4 to about 400 mg/kg/day. The precise amount of an inventive compound which is therapeutically effective, and the route by which such compound is best administered, is readily determined by one of ordinary skill in the art by comparing the blood level of the agent to the concentration required to have a therapeutic effect. Prodrugs of compounds of the present invention may be prepared by any suitable method. For those compounds in which the prodrug moiety is a ketone functionality, specifically ketals and/or hemiacetals, the conversion may be effected in accordance with conventional methods.

The compounds of this invention may also be administered orally to the patient, in a manner such that the concentration of drug is sufficient to inhibit bone resorption or to achieve any other therapeutic indication as disclosed herein. Typically, a pharmaceutical composition containing the compound is administered at an oral dose of between about 0.1 to about 50 mg/kg in a manner consistent with the condition of the patient. Preferably the oral dose would be about 0.5 to about 20 mg/kg.

No unacceptable toxicological effects are expected when compounds of the present invention are administered in accordance with the present invention. The compounds of this invention, which may have good bioavailability, may be tested in one of several biological assays to determine the concentration of a compound which is required to have a given pharmacological effect.

According to a fifth aspect of the invention, there is provided a pharmaceutical or veterinary composition comprising one or more compounds of general formula (I) and a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier. Other active materials may also be present, as may be considered appropriate or advisable for the disease or condition being treated or prevented.

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-60-

The carrier, or, if more than one be present, each of the carriers, must be acceptable in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient.

- 5 The formulations include those suitable for rectal, nasal, topical (including buccal and sublingual), vaginal or parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal) administration, but preferably the formulation is an orally administered formulation. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form, e.g. tablets and sustained release capsules, and may be prepared by
10 any methods well known in the art of pharmacy.

- Such methods include the step of bringing into association the above defined active agent with the carrier. In general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active agent with liquid carriers or finely
15 divided solid carriers or both, and then if necessary shaping the product. The invention extends to methods for preparing a pharmaceutical composition comprising bringing a compound of general formula (I) in conjunction or association with a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier or vehicle.

- 20 Formulations for oral administration in the present invention may be presented as: discrete units such as capsules, cachets or tablets each containing a predetermined amount of the active agent; as a powder or granules; as a solution or a suspension of the active agent in an aqueous liquid or a non-aqueous liquid; or as an oil-in-water liquid emulsion or a water in oil liquid emulsion; or as a bolus etc.

- 25 For compositions for oral administration (e.g. tablets and capsules), the term "acceptable carrier" includes vehicles such as common excipients e.g. binding agents, for example syrup, acacia, gelatin, sorbitol, tragacanth, polyvinylpyrrolidone (Povidone), methylcellulose, ethylcellulose, sodium carboxymethylcellulose,
30 hydroxypropylmethylcellulose, sucrose and starch; fillers and carriers, for example corn starch, gelatin, lactose, sucrose, microcrystalline cellulose, kaolin, mannitol, dicalcium phosphate, sodium chloride and alginic acid; and lubricants such as magnesium stearate, sodium stearate and other metallic stearates, glycerol stearate

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-61-

stearic acid, silicone fluid, talc waxes, oils and colloidal silica. Flavouring agents such as peppermint, oil of wintergreen, cherry flavouring and the like can also be used. It may be desirable to add a colouring agent to make the dosage form readily identifiable. Tablets may also be coated by methods well known in the art.

- 5 A tablet may be made by compression or moulding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared by compressing in a suitable machine the active agent in a free flowing form such as a powder or granules, optionally mixed with a binder, lubricant, inert diluent, preservative, surface-active or dispersing agent. Moulded tablets may be made by moulding in a
10 suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent. The tablets may be optionally be coated or scored and may be formulated so as to provide slow or controlled release of the active agent.

- Other formulations suitable for oral administration include lozenges comprising the
15 active agent in a flavoured base, usually sucrose and acacia or tragacanth; pastilles comprising the active agent in an inert base such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia; and mouthwashes comprising the active agent in a suitable liquid carrier.

Parenteral formulations will generally be sterile.

- 20 According to a sixth aspect of the invention, there is provided a process for the preparation of a pharmaceutical or veterinary composition as described above, the process comprising bringing the active compound(s) into association with the carrier, for example by admixture.

- 25 Preferred features for each aspect of the invention are as for each other aspect *mutatis mutandis*.

The invention will now be illustrated with the following examples:

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-62-

Solution Phase Chemistry – General Methods

All solvents were purchased from ROMIL Ltd (Waterbeach, Cambridge, UK) at SpS or Hi-Dry grade unless otherwise stated. General peptide synthesis reagents were
5 obtained from Chem-Impex Intl. Inc. (Wood Dale IL 60191. USA). Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated plates (Merck aluminium sheets silica 60 F254, part no. 5554). Visualisation of compounds was achieved under ultraviolet light (254nm) or by using an appropriate staining reagent. Flash column purification was performed on silica gel 60 (Merck 9385). All analytical
10 HPLC were obtained on Phenomenex Jupiter C₄, 5 μ , 300A, 250 x 4.6mm, using mixtures of solvent A = 0.1%aq trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B = 90% acetonitrile / 10% solvent A on automated Agilent systems with 215 and / or 254nm UV detection. Unless otherwise stated a gradient of 10 – 90% B in A over 25 minutes at 1.5mL / min was performed for full analytical HPLC analysis. HPLC-MS
15 analysis was performed on an Agilent 1100 series LC/MSD, using automated Agilent HPLC systems, with a gradient of 10 – 90% B in A over 10 minutes on Phenomenex Columbus C₈, 5 μ , 300A, 50 x 2.0mm at 0.4mL / min. Nuclear magnetic resonance (NMR) were obtained on a Bruker DPX400 (400MHz ¹H frequency; QXI probe) in the solvents and temperature indicated. Chemical shifts are expressed in parts per million (δ) and are referenced to residual signals of the solvent. Coupling constants
20 (*J*) are expressed in Hz.

Solid Phase Chemistry – General Methods

25 Example inhibitors (1-12) were prepared through a combination of solution and solid phase Fmoc-based chemistries (see 'Solid Phase Peptide Synthesis', Atherton, E. and Sheppard, R. C., IRL Press Ltd, Oxford, UK, 1989, for a general description). An appropriately protected and functionalised building block was prepared in solution (e.g. compound (8), Scheme 1), then reversibly attached to the solid phase through an
30 appropriate linker. Rounds of coupling / deprotection / chemical modification e.g. oxidation were then performed until the full length desired molecule was complete

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-63-

(Scheme 2). Example inhibitors (1-12) were then released (cleaved) from the solid phase, analysed, purified and assayed for inhibition verses a range of proteases.

Generally, multipins (polyamide 1.2 → 10μmole loadings, see
5 www.mimotopes.com) were used for the solid phase synthesis, although any suitable
solid phase surface could be chosen. In general, the 1.2μmole gears were used to
provide small scale crude examples for preliminary screening, whilst the 10μmole
crowns were used for scale-up synthesis and purification of preferred examples.
Standard coupling and Fmoc deprotection methods were employed (see Grabowska,
10 U. *et al*, *J. Comb. Chem.* 2(5), 475-490, 2000, for a thorough description of solid
phase multipin methodologies).

Preparation of Initial Assembly

15 Building Block-linker constructs (e.g.(10)) were carboxyl activated with 2-(1H-
benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluoro phosphate (HBTU, 1
mole equivalent), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT, 1 mole equivalent) and
N-methylmorpholine (NMM, 2 mole equivalents) in dimethylformamide (DMF,
typically 1 to 10mL) for 5 minutes. Amino functionalised DA/MDA crowns or
20 HEMA gears (10μmole per crown / 1.2μmole per gear, 0.33 mole equivalent of total
surface amino functionalisation compared to activated construct) were added,
followed by additional DMF to cover the solid phase surface. The loading reaction
was left overnight. Following overnight loading, crowns / gears were taken through
standard cycles washing, Fmoc deprotection and loading quantification (see
25 Grabowska, U. *et al*) to provide loaded Building Block-linker constructs (e.g.(11)).
Analysis indicated virtually quantitative loading in all examples.

Coupling Cycles

30 The coupling of standard Fmoc-aminoacids (10 or 20 mole equivalent) were
performed via carboxyl activated with 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-
tetramethyluronium hexafluoro phosphate (HBTU, 10 or 20mole equivalent), 1-

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-64-

hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt, 10 or 20mole equivalent) and N-methylmorpholine (NMM, 20 or 40mole equivalents) in dimethylformamide, with pre-activation for 5 minutes. Activated species were dispensed to the appropriate wells of a polypropylene 96-well plate (Beckman, 1mL wells, 500µL solution per well for crowns or 250µL solution per well for gears) in a pattern required for synthesis. Loaded free amino Building Block-linker constructs (e.g.(11)) were added and the coupling reaction left overnight. Following overnight coupling, crowns / gears were taken through standard cycles washing and Fmoc deprotection (see Grabowska, U. *et al*). Identical activation and coupling conditions were used for the coupling of a range of carboxylic acids (R-COOH). Alternatively, chloroformates e.g. morpholine-4-carbonylchloride (10mole equivalent), were coupled in DMF with the addition of NMM (10mole equivalents).

Acidolytic Cleavage Cycle

A mixture of 95% TFA / 5% water was pre-dispensed into two polystyrene 96-well plates (Beckman, 1mL wells, 600µL solution per well for crowns or 300µL solution per well for gears) in a pattern corresponding to that of the synthesis. The completed multipin assembly was added to the first plate (mother plate), the block covered in tin foil and cleaved for 24hours. The cleaved multipin assembly was then removed from the first plate and added to the second plate (washing plate) for 15 minutes. The spent multipin assembly was then discarded and the mother / washing plates evaporated on an HT-4 GeneVac plate evaporator.

Analysis and Purification of Cleaved Examples

(a) Ex 1.2µmole Gears. 100µL dimethylsulphoxide (DMSO) was added to each post cleaved and dried washing plate well, thoroughly mixed, transferred to the corresponding post cleaved and dried mother plate well and again thoroughly mixed. 10µL of this DMSO solution was diluted to 100µL with a 90% acetonitrile / 10% 0.1%aq TFA mixture. 20µL aliquots were analysed by HPLC-MS and full analytical HPLC. In each case the crude example molecules gave the

WO 02/057246

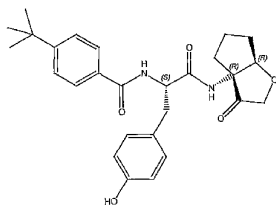
PCT/GB02/00194

-65-

expected $[M + H]^+$ ion and an HPLC peak at $> 80\%$ (by 215nm UV analysis). This provided an approximately 10mM DMSO stock solution of good quality crude examples for preliminary protease inhibitory screening.

- (b) Ex 10μmole Crowns. 500μL of a 90% acetonitrile / 10% 0.1%aq TFA mixture was added to each washing plate well, thoroughly mixed, transferred to the corresponding mother plate well and again thoroughly mixed. 5μL of this solution was diluted to 100μL with a 90% acetonitrile / 10% 0.1%aq TFA mixture. 20μL aliquots were analysed by HPLC-MS and full analytical HPLC. In each case the crude example molecules gave the expected $[M + H]^+$ ion and an HPLC peak at $> 80\%$ (by 215nm UV analysis). The polystyrene blocks containing crude examples were then lyophilised.
- (c) Individual examples (ex (b)) were re-dissolved in a 1 : 1 mixture of 0.1% aq TFA / acetonitrile (1mL) and purified by semi-preparative HPLC (Phenomenex Jupiter C₄, 5μ, 300A, 250 x 10mm, a 25-90% B in A gradient over 25mins, 4.0mL/min, 215nm UV detection). Fractions were lyophilised into pre-tared glass sample vials to provide purified examples (typically 2 to 4mg, 40 to 80% yield).
- (d) Purified examples were dissolved in an appropriate volume of DMSO to provide a 10mM stock solution, for accurate protease inhibitory screening.

- 20 EXAMPLE 1. (3*aR*, 6*aR*) 4-*tert*-Butyl-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3-ylcarbamoyl) ethyl]benzamide



WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-66-

Following the general details from Scheme 1, the required bicycle building block (3*aR*, 6*aR*) (3-Oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-yl) carbamic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester (**8**) was prepared as follows.

5

(1) Preparation of (2*S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid 2-oxo-cyclopentyl ester

10 a) A solution of cyclopentanone (11.6 ml, 130mmol) in methanol (250 ml) was added drop-wise at 0°C over 20 minutes to a stirred solution of potassium hydroxide (85% tech., 22.1 g, 335mmol) in methanol (75 ml). The mixture was stirred at 0°C for 30 minutes then 2-iodosylbenzoic acid (36.45 g, 138mmol) was added in portions over 1 hour. The mixture was allowed to warm to ambient temperature over 4 hours, then stirred at ambient temperature for 20 hours. The majority of solvent was removed *in vacuo* then the product was extracted into dichloromethane (400 ml), then the extracts were washed with water (2 x 250 ml), dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo* to leave 2,2-dimethoxycyclopentanol as a colourless oil (11.98 g) which was used without further purification.

20 b) 4-(Dimethylamino)pyridine (1.0 g, 8.2mmol) was added at 0°C to a stirred suspension of 2,2-dimethoxycyclopentanol (11.98 g, 82mmol), (S)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid (23.9 g, 90.3mmol) and 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (23.6 g, 123.1 mmol) in dichloromethane (500 ml). The mixture was stirred at 0°C for 4 hours, then it was washed with water (2 x 300 ml) and saturated aqueous sodium chloride solution (200 ml), dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo* to leave (2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid 2,2-dimethoxy cyclopentyl ester as yellow oil (36.0 g) which was used without further purification.

30

c) 4-Toluenesulphonic acid monohydrate (1.7 g, 9.2mmol) was added to a stirred solution of (2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid

WO 02/057246

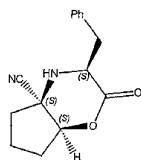
PCT/GB02/00194

-67-

2,2-dimethoxycyclopentyl ester (36 g, 91.6mmol) in acetone (450 ml) at ambient temperature. The solution was stirred for 3 days then water (600 ml) and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (200 ml) were added, then the product was extracted into ethyl acetate (600 ml). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 400ml), then the combined ethyl acetate solutions were washed with saturated aqueous sodium chloride solution (2 x 150ml), dried (Na_2SO_4) and the solvent removed *in vacuo*. The residue (18.05 g) was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 3:1 $\rightarrow$ 2:1. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid 2-oxocyclopentyl ester as a colourless oil (18.05 g, 40% from cyclopentanone). TLC (single UV spot, R_f = 0.25, heptane : ethyl acetate 7:3), analytical HPLC with main broad peak R_t = 17.9-19.2mins, HPLC-MS (main broad UV peak with R_t = 9.04-9.24mins, 248.1 $[\text{M} - \text{Boc} + 2\text{H}]^+$, 370.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 717.3 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$).

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.42 (9H, 3 x CH_3 , s), 1.79-2.48 (6H, 3 x cyclopentyl CH_2 , m), 3.06-3.28 (2H, CH_2Ph , m), 4.60-5.20 (3H, $\text{COCHO} + \text{CHN} + \text{NH}$, m), 7.17-7.36 (5H, aromatic).

(2) Preparation of (4*aS*, 7*aS*) 3*S*-Benzyl-2-oxo-hexahydrocyclopenta[1,4]oxazine-4*aS*-carbonitrile



Trifluoroacetic acid (75ml) was added drop-wise at 0°C over 60 minutes to a stirred solution of (2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-phenylpropionic acid 2-oxocyclopentyl ester (17.05g, 49.1mmol) in dichloromethane (250 ml). The

WO 02/057246

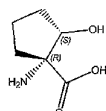
PCT/GB02/00194

-68-

mixture was stirred at 0°C for 75 minutes then the majority of solvent was removed *in vacuo*. Toluene (75 ml) was added to the residue then the solvent was removed *in vacuo* to obtain an oil which was dissolved in acetonitrile (700 ml). Magnesium sulphate (29.5 g) then sodium acetate (20.1 g) were added to the stirred solution. The resulting suspension was stirred for 90 minutes then solids were removed by filtration, then solvents removed *in vacuo*. The residue was dissolved in propan-2-ol (650 ml) then stirred under nitrogen. Trimethylsilyl cyanide (13.1 ml, 98.4mmol) was added drop-wise over 15 minutes then zinc chloride (49 ml, 1M solution in diethyl ether) was added over 40 minutes. The mixture was stirred for 18 hours then cautiously added to saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (750 ml). The mixture was diluted with water (750 ml) then the product was extracted into diethyl ether (3 x 500 ml). The combined ethereal solutions were washed with saturated aqueous sodium chloride solution (350 ml), dried (MgSO₄) and the solvents removed *in vacuo* to obtain a brown oil (10.05 g) which was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 4:1 → 3:2. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (3*S*, 4*aR*, 7*aS*) 3-benzyl-2-oxohexahydrocyclopenta[1,4]oxazine-4*a*-carbonitrile as a white solid (4.54 g, 36%). TLC (single UV spot, R_f = 0.45, heptane : ethyl acetate 3:1), analytical HPLC R_t = 14.521mins, HPLC-MS (single main UV peak with R_t = 7.645mins, 257.2 [M + H]⁺, 279 [M + Na]⁺).

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.70-2.29 (7H, 3 x CH₂ + NH, m), 2.84 (1H, CH₂CHN, dd, *J* = 14.3, 8.8Hz), 3.52 (1H, CH₂CHN, dd, *J* = 14.3, 3.6Hz), 3.90 (1H, CH₂CHN, dd, *J* = 9.8, 3.6Hz), 4.74 (1H, CHO, dd, *J* = 6.8, 5Hz), 7.15-7.32 (5H aromatic).

(3) Preparation of 1*R*-Amino-2*S*-hydroxycyclopentanecarboxylic acid



WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-69-

$tert$ -Butylhypochlorite (4.0 ml, 35.4mmol) was added drop-wise under nitrogen at 0°C over 2 minutes to a stirred suspension of (3*S*, 4*aR*, 7*aS*) 3-benzyl-2-oxohexahydrocyclopenta[1,4]oxazine-4*a*-carbonitrile (4.53 g, 17.7mmol) in diethyl ether (350 ml). The mixture was stirred at 0°C for 140 minutes then triethylamine (7.4 ml, 53mmol) was added drop-wise over 30 minutes. The resulting suspension was stirred at 0°C for 3 hours then at ambient temperature for 23 hours. Insoluble materials were removed by filtration, then the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography over silica gel eluting with heptane : ethyl acetate (7:3). Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave a white solid (3.3 g, TLC [single UV spot, R_f = 0.3, heptane : ethyl acetate 2:1], analytical HPLC R_t = 16.071mins) which was cooled to 0°C then concentrated hydrochloric acid at 0°C was added in one portion. The suspension was allowed to warm to ambient temperature over 2 hours then stirred for 20 hours. The reaction mixture was partitioned equally between six pressure vessels that were sealed then heated at 100°C for 26 hours then allowed to cool to ambient temperature. The reaction mixtures were recombined then the product extracted into water (400 ml) then washed with diethyl ether (2 x 200 ml) and the solvents removed *in vacuo* to leave a residue that was purified over Dowex 50WX4-200 ion exchange resin eluting consecutively with 0.01M hydrochloric acid, water and then 1.0M aqueous ammonium hydroxide solution. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave a solid which was freeze-dried from a mixture of water : acetonitrile (1:1) three times to obtain (1*R*, 2*S*) 1-amino-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid as a light brown solid (1.73 g, 67%). HPLC-MS (not UV active R_t = 0.541 mins, 146.1 [M + H]⁺).

¹H (D₂O at 298K); 1.50-1.90 (4H, 2 x CH₂, m), 2.16-2.25 (2H, CH₂, m), 4.36 (1H, CHOH, dd, *J* = 8.3, 7.7Hz).
¹³C (D₂O at 298K); 21.56 (d, CH₂CH₂CH₂), 33.46 and 35.00 (both d, CH₂CH₂CH₂), 69.74 (CNH₂), 77.54 (u, CHOH), 178.33 (CO₂H).

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-70-

(4) Preparation of 1*R*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2*S*-hydroxycyclopentanecarboxylic acid

(0.67 g, 4.6mmol) was added at 0°C to a stirred solution of sodium carbonate (1.0 g, 9.7mmol) in water:1,4-dioxan (2:1, 45 ml). A solution of 9-fluorenylmethyl chloroformate (1.25 g, 4.85mmol) in 1,4-dioxan (15 ml) was added drop-wise over 30 minutes. The resultant suspension was stirred for 75 minutes at 0°C then at ambient temperature for 45 minutes. Water (200 ml) was added then the cloudy solution washed with chloroform (2 x 140 ml). Chloroform (100 ml) was added and the mixture acidified with 1M hydrochloric acid (pH ~ 2). The chloroform layer was separated then the aqueous layer re-extracted with chloroform (2 x 100 ml). The chloroform extracts which had been separated from the acidified aqueous layer were combined then dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo* to leave a colourless oil to which heptane (100 ml) was added before storing at -80°C for 16 hours. The solvent was rapidly decanted from the oily residue which was washed with heptane (5 ml) then remaining solvents removed *in vacuo* to obtain (1*R*, 2*S*) 1-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid as an oil (1.27 g, 75%). TLC (main UV spot, R_f = 0.20, minor UV spot, R_f = 0.15, 20% MeOH in CHCl₃), analytical HPLC Rt = 17.172mins (major), Rt = 16.800mins (minor) and HPLC-MS (main UV peak with Rt = 7.840mins, 368.1 [M + H]⁺, 390.1 [M + Na]⁺, minor UV peak with Rt = 7.646mins, 368.1 [M + H]⁺, 390.1 [M + Na]⁺).

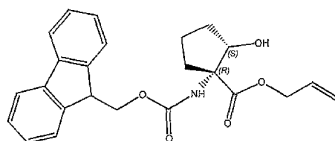
¹H (CDCl₃ at 298K); 1.60-2.16 (4H, CH₂CH₂CH₂ and 1H, CH₂CH₂CH₂, m), 2.35 (1H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.10 (1H, OH, brs), 4.24 (1H, Fmoc H-9, m), 4.36-4.57 (3H, Fmoc CH₂ and CHOH, m), 5.93 (1H, NH, s), 7.28-7.33 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.34-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.54-7.62 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.72-7.79 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-71-

(5) Preparation of 1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2*S*-hydroxycyclopentanecarboxylic acid allyl ester



A solution of 1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2*S*-hydroxy
 5 cyclopentanecarboxylic acid (1.75 g, 4.8mmol) and triethylammonium
 chloride (1.93 g, 4.8mmol) in dichloromethane (14 ml) was added to a stirred
 solution of sodium hydrogen carbonate (0.4 g, 4.8mmol) in water (14 ml), then
 allyl bromide (1.44 ml, 16.7mmol) was added in one portion. The biphasic
 10 mixture was stirred for 20 hours then diluted with water (50ml) and the product
 extracted into dichloromethane (2 x 50 ml). The combined organic layers were
 dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo* to obtain a colourless oil
 which was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a
 gradient of heptane : ethyl acetate 10:3 → 20:7. Appropriate fractions were
 combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (1*R*, 2*S*) 1-(9*H*-fluoren-
 15 9-ylmethoxycarbonylamino)-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid allyl ester
 as a colourless oil (1.32 g, 67%). TLC (single UV spot, R_f = 0.25, heptane :
 ethyl acetate 3:1), analytical HPLC R_t = 20.371mins (major), R_t = 19.706min
 (minor) and HPLC-MS (main UV peak with R_t = 9.412mins, 408.1 [M + H]⁺,
 430.1 [M + Na]⁺; minor UV peak with R_t = 9.102mins, 408.1 [M + H]⁺, 430.1
 20 [M + Na]⁺).

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.6-2.63 (7H, CH₂CH₂CH₂, OH, m), 4.8-4.27 (1H, Fmoc
 H-9, m), 4.29-4.48 (3H, H-2 and Fmoc CH₂, m), 4.57-4.66 (2H, CH₂CH=CH₂,
 25 brs), 5.22 (1H, CH₂CH=CH₂, dd, *J* = 10.4, 1.0Hz), 5.29 (1H, CH₂CH=CH₂, d,
J = 13.6Hz), 5.77 (1H, NH, brs), 5.82-5.94 (1H, CH₂CH=CH₂, m), 7.27-7.32
 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

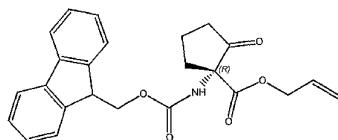
-72-

6), 7.55-7.62 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

δ C (CDCl₃ at 298K); 20.37 (d, CH₂CH₂CH₂), 32.52/32.29 and 34.20 (both d, CH₂CH₂CH₂), 47.58/47.52 (u, Fmoc C-9), 66.53 (d, Fmoc CH₂), 67.34 (d, CH₂CH=CH₂), 76.0 (q, CCO₂CH₂), CHOH under CHCl₃?, 118.97 (d, CH₂=CHCH₂), 120.39 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.49 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.45/127.46 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.09 (u, Fmoc C-3 and C-6), 132.09 (u, CH₂=CHCH₂), 141.72 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.20/144.33 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 156.76 (q, OC(=O)N), 173.61 (q, CCO₂CH₂CH=CH₂).

10

(6) Preparation of 1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-oxo-cyclopentanecarboxylic acid allyl ester



15 A solution of dimethyl sulphoxide (0.224 ml, 3.15mmol) in dichloromethane (1.0 ml) was added under nitrogen to a stirred solution of oxalyl chloride (0.132 ml, 1.51mmol) in dichloromethane (2.5 ml) at -70°C over 20 minutes. The mixture was stirred for 10 minutes then a solution of (1*R*, 2*S*) 1-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid allyl ester (0.535 g, 1.31mmol) in dichloromethane (3 ml) added over 20 minutes. The mixture was stirred for 10 minutes then triethylamine (0.92 ml, 6.57mmol) added drop-wise over 5 minutes. The cooling bath was then removed and stirring continued for 45 minutes at ambient temperature. Saturated aqueous ammonium chloride solution (50 ml) was added then the product extracted into diethyl ether (2 x 50 ml). The combined ethereal layers were washed with water (25 ml), dried (MgSO₄) and the solvent was removed *in vacuo* to obtain a colourless oil (520 mg) which was purified by flash

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

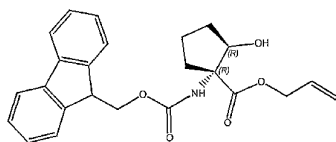
-73-

chromatography over silica gel eluting with heptane : ethyl acetate (3:1). Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (1R) 1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-oxocyclopentane carboxylic acid allyl ester as a colourless oil (0.43 g, 81%). TLC (single UV spot, R_f = 0.30, heptane : ethyl acetate 2:1), analytical HPLC with main peak Rt = 19.993mins, HPLC-MS (single UV peak with Rt = 10.132mins, 406.1 [M + H]⁺, 428.1 [M + Na]⁺).

¹H (CDCl₃ at 298K); 2.15-2.23 (2H, CH₂CH₂CH₂, m), 2.46-2.70 (4H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.21 (1H, Fmoc H-9, t, J = 7.1Hz), 4.35 (2H, Fmoc CH₂, d, J = 7.1), 4.66 (2H, CH₂CH=CH₂, brs), 5.26-5.35 (2H, CH₂CH=CH₂, m), 5.80-5.91 (1H, CH₂CH=CH₂, m), 6.14 (1H, NH, brs), 7.27-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.54-7.60 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

¹³C (CDCl₃ at 298K); 19.19 (d, CH₂CH₂CH₂), 34.53 and 36.87 (both d, CH₂CH₂CH₂), 47.42 (u, Fmoc C-9), 67.43 and 67.665 (both d, Fmoc CH₂ and CH₂CH=CH₂), 67.85 (q, CCO₂CH₂), 119.92 (d, CH₂CH=CH₂), 120.40 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.52 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.51 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.16 (u, Fmoc C-3 and C-6), 131.09 (u, CH₂=CHCH₂), 141.68 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.00/144.16 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 155.25 (q, OCON), 169.25 (q, CO₂CH₂CH=CH₂) 211.30 (q, COCH₂CH₂).

(7) Preparation of 1R-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2R-hydroxy cyclopentanecarboxylic acid allyl ester



Sodium borohydride (39 mg, 1.04mmol) was added to a stirred solution of 1R-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-oxocyclopentanecarboxylic acid

allyl ester (0.42 g, 1.04mmol) in methanol (6 ml) at 0°C in one portion. The mixture was stirred for 10min then solvents removed *in vacuo* to leave a residue. Water (20 ml) and dichloromethane (20 ml) were added followed by 1M hydrochloric acid to acidify the mixture (pH ~ 1.5). The dichloromethane layer was collected then the aqueous layer extracted with dichloromethane (20 ml). The combined dichloromethane layers were washed with aqueous saturated sodium chloride solution (20 ml). The aqueous saturated sodium chloride solution was extracted with dichloromethane (10 ml) then the dichloromethane layers were combined then dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo* to obtain a colourless oil (420 mg) which was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 7:3 → 13:7. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave 1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2*R*-hydroxycyclopentane carboxylic acid allyl ester as a colourless oil (288 mg, 68%). TLC (single UV spot, R_f = 0.25, heptane : ethyl acetate 3:1), analytical HPLC Rt = 19.680mins (major), Rt = 20.323min (minor) and HPLC-MS (main UV peak with Rt = 9.076mins, 408.1 [M + H]⁺, 430.0 [M + Na]⁺; minor UV peak with Rt = 9.451mins, 408.1 [M + H]⁺, 430.0 [M + Na]⁺). 4-Toluenesulphonic acid monohydrate (30 mg, 0.16mmol) was added to a solution of the oil (230 mg) in toluene (12 ml) then the mixture heated at 100 °C for 75 minutes. Two further batches (170 mg and 35 mg) of the oil (prepared using the same procedure as above) were similarly treated with 4-toluenesulphonic acid monohydrate with appropriate scaling of quantities, then the three toluene mixtures were combined and solvents removed *in vacuo* to obtain a residue which was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 7:3 → 13:7. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (1*R*, 2*R*) 1-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2-hydroxycyclopentanecarboxylic acid allyl ester as a colourless oil (380 mg). TLC (single UV spot, R_f = 0.25, heptane : ethyl acetate 3:1), analytical HPLC single UV peak with Rt = 18.141mins and HPLC-MS (single UV peak with Rt = 9.140mins, 408.1 [M + H]⁺, 430.1 [M + Na]⁺).

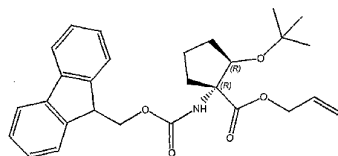
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-75-

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.72-2.44 (6H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.12-4.19 (1H, H-2, m)
 4.27 (1H, Fmoc H-9, t, J = 6.5Hz), 4.37-4.55 (3H, Fmoc CH₂ and OH, m),
 4.60-4.75 (2H, CH₂CH=CH₂, brs), 5.25 (1H, CH₂CH=CH₂, d, J = 10.5Hz),
 5.30-5.39 (2H, CH₂CH=CH₂ and NH, m), 5.83-5.96 (1H, CH₂CH=CH₂, m),
 7.29-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.39-7.44 (2H aromatic, Fmoc H-
 3 and H-6), 7.58-7.65 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.77-7.80 (2H
 aromatic, Fmoc H-4 and H-5).
¹³C (CDCl₃ at 298K); 20.92 (d, CH₂CH₂CH₂), 32.46 and 35.63 (both d,
 CH₂CH₂CH₂), 47.52 (u, Fmoc C-9), 66.55 and 67.37 (both d, Fmoc CH₂ and
 CH₂CH=CH₂), 69.43 (q, CCO₂CH₂), 80.50 (u, CHOH), 118.98 (d,
 CH₂=CHCH₂), 120.43 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.41 (u, Fmoc C-1 and C-8),
 127.47/127.49 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.14/128.16 (u, Fmoc C-3 and C-6),
 132.08 (u, CH₂=CHCH₂), 141.73 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.00/144.23 (q,
 Fmoc C-1' and C-8'), 156.86 (q, OC(=O)N), 172.99 (q, CO₂CH₂CH=CH₂).

(8) Preparation of 2*R*-*tert*-Butoxy-1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)
 cyclopentanecarboxylic acid allyl ester



20

A stirred solution of 1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-2*R*-hydroxy
 cyclopentanecarboxylic acid allyl ester (360 mg, 0.88mmol) in
 dichloromethane (5 ml) was cooled in a sealed pressure vessel to -70°C then
 isobutylene gas (~3 ml) condensed into the solution. Concentrated sulphuric
 acid (25 µl) was added then the pressure vessel sealed. The mixture was stirred
 at ambient temperature for 20 hours then cooled to -70°C. *N*-Methylmorpholine
 (50 µl) was added then the unsealed pressure vessel allowed to warm to

25

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-76-

ambient temperature. The mixture was diluted with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (50 ml) and water (25 ml) then the product extracted into dichloromethane (50 ml then 2 x 25ml). The combined dichloromethane layers were washed with saturated aqueous sodium chloride solution (25 ml), dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue (370 mg) was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 4:1 → 7:3. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave 2*R*-*tert*-butoxy-1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)cyclopentanecarboxylic acid allyl ester as a colourless oil (305 mg, 75%). TLC (single UV spot, R_f = 0.50, heptane : ethyl acetate 2:1), analytical HPLC R_t = 22.623mins and HPLC-MS (single UV peak with R_t = 11.611mins, 408.1 [M - ^tBu + 2H]⁺, 486.1 [M + Na]⁺).

¹H (CDCl₃ at 298K); 1.06 (9H, ^tBu, s), 1.80-2.41 (6H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.21 (1H, Fmoc H-9, t, *J* = 6.8Hz), 4.26-4.50 (3H, Fmoc CH₂ and H-2, m), 4.58-4.74 (1H, CH₂CH=CH₂, brs), 5.21 (1H, CH₂CH=CH₂, d, *J* = 10.4Hz), 5.35 (1H, CH₂CH=CH₂, d, *J* = 17.2Hz), 5.84-6.01 (2H, CH₂CH=CH₂ and NH, m), 7.26-7.30 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.37-7.39 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.57-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.70-7.77 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

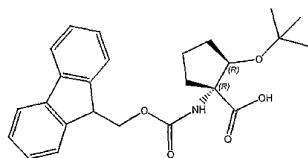
¹³C (CDCl₃ at 298K); 21.69/21.47 (d, CH₂CH₂CH₂), 32.98 and 33.82 (both d, CH₂CH₂CH₂), 47.63 (u, Fmoc C-9), 66.54 and 66.89 (both d, Fmoc CH₂ and CH₂CH=CH₂), 70.07 and 74.03 (both q, CCO₂CH₂ and OCM₃), 79.51 (u, CHOCMe₃), 118.53 (d, CH₂=CHCH₂), 120.38 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125.46 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.46 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128.07 (u, Fmoc C-3 and C-6), 132.40 (u, CH₂=CHCH₂), 141.70 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.32 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 155.13 (q, OCON), 173.00 (q, CO₂CH₂CH=CH₂).

(9) Preparation of 2*R*-*tert*-Butoxy-1*R*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)cyclopentanecarboxylic acid

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-77-



Tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (15 mg, 0.013mmol),
 dichloromethane (5 ml) then phenyltrihydrosilane (153 μ l, 1.24mmol) were
 5 added consecutively to 2R-tert-butoxy-1R-(9H-fluoren-9-ylmethoxy
 carbonylamino)cyclopentane carboxylic acid allyl ester (288 mg, 0.62mmol)
 under nitrogen. The mixture was stirred for 45 minutes then 0.01M
 hydrochloric acid (30 ml) added and the product extracted into chloroform (1 x
 20 ml then 1 x 10 ml). The combined chloroform layers were dried (Na_2SO_4)
 10 and the solvent removed *in vacuo*. The residue (460 mg) was purified by flash
 chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl
 acetate 2:1 $\rightarrow$ 1:3. Appropriate fractions were combined and the solvents
 removed *in vacuo* to leave 2R-tert-butoxy-1R-(9H-fluoren-9-
 ylmethoxycarbonylamino)cyclopentanecarboxylic acid as a colourless oil (205
 15 mg, 78%). TLC (single UV spot, R_f = 0.25, heptane : ethyl acetate 1:2),
 analytical HPLC R_t = 19.539mins and HPLC-MS (single UV peak with R_t =
 9.850mins, 368.1 $[\text{M} - ^t\text{Bu} + 2\text{H}]^+$, 446.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$).

^1H (CDCl_3 at 298K); 1.22 (9H, ^tBu , s), 1.77-2.37 (6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, m), 4.22
 20 (1H, Fmoc H-9, t, J = 6.8Hz), 4.27-4.36 (2H, Fmoc CH_2 , m), 4.65 (1H, H-2,
 brs), 5.39 (1H, NH , brs), 7.27-7.35 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.36-
 7.41 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.56-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and
 H-8), 7.73-7.76 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

^{13}C (CDCl_3 at 298K); 21.48 (d, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.70 and 35.31 (both d,
 25 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 47.56 (u, Fmoc C-9), 67.22 (d, Fmoc CH_2), 68.77 (q, $\text{C}=\text{O}_2\text{CH}_2$
 or OCMe_3 other peak under chloroform?), 78.58 (u, CHOCMe_3), 120.37 (u,
 Fmoc C-4 and C-5), 125.54 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127.47 (u, Fmoc C-2 and

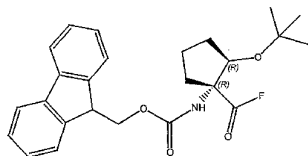
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-78-

C-7), 128.09/128.12 (u, Fmoc C-3 and C-6), 141.69/141.73 (q, Fmoc C-4' and C-5'), 144.02/144.38 (q, Fmoc C-1' and C-8'), 156.05 (q, OCON), 174.89 (q, CO₂H).

- 5 (10) Preparation of (2*R*-*tert*-Butoxy-1*R*-fluorocarbonyl-cyclopentyl)carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester



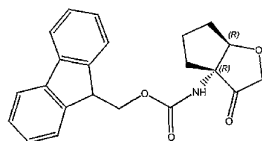
- 10 Pyridine (53 μ l, 0.66mmol) then cyanuric fluoride (71 μ l, 0.85mmol) were added consecutively at 0°C to a stirred solution of 2*R*-*tert*-butoxy-1*R*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)cyclopentanecarboxylic acid (159 mg, 0.38mmol) in dichloromethane (5 ml) under nitrogen. The suspension was stirred for 30 minutes at 0°C then for 5 hours at ambient temperature. Crushed ice (~10 ml) and ice-chilled water (10 ml) was added, then the product was
- 15 extracted into dichloromethane (20 ml). The dichloromethane layer was dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo* to give (2*R*-*tert*-butoxy-1*R*-fluorocarbonylcyclopentyl)carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester as a pale brown oil (115 mg, 71%) which was used without further purification. TLC (single UV spot, R_f = 0.45, heptane : ethyl acetate 2:1), analytical HPLC main
- 20 UV peak with R_t = 23.933mins and HPLC-MS (main UV peak with R_t = 11.439mins, 370.1 [M - ^tBu + 2H]⁺, 448.1 [M + Na]⁺).

- (11) Preparation of (3*aR*, 6*aR*) (3-Oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-yl)carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-79-



- 5 a) Ethereal diazomethane [generated from diazald (0.94 g, ~3mmol) addition in diethyl ether (15 ml) to sodium hydroxide (1.05 g) in water (1.5 ml)/ethanol (3.0 ml) at 60°C] was added to a stirred solution of (1*R*, 2*R*) (2-*tert*-butoxy-1-fluorocarbonylcyclopentyl)carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester (115 mg, 0.27mmol) in dichloromethane (2ml) at 0°C. The solution was stirred for 20 minutes at °C then at ambient temperature for 20 hours. Acetic acid (0.6 ml, 10.5mmol) was added then the solution was stirred for 5 minutes before adding
- 10 *tert*-butyl methyl ether (50 ml). The ethereal layer was washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (40 ml) then water (2 x 30 ml), then dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue (130 mg) was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 4:1 → 1:3. Appropriate fractions were combined and the
- 15 solvents removed *in vacuo* to leave [2*R*-*tert*-butoxy-1*R*-(2-diazoacetyl)cyclopentyl]carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester (16 mg) as an oil which was used without further purification.
- 20 b) A solution of lithium chloride (15 mg, 0.36mmol) in acetic acid:water (4:1, 1.0 ml) was added to [2*R*-*tert*-butoxy-1*R*-(2-diazoacetyl)cyclopentyl]carbamic acid 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester (16 mg). The solution was stirred for 2.5 hours then chloroform (25 ml) and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (25 ml) was added. The chloroform layer washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (25 ml), saturated
- 25 aqueous sodium chloride solution (25 ml), dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue (16 mg) was purified by flash chromatography

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-80-

over silica gel eluting with a gradient of heptane : ethyl acetate 31:9 $\rightarrow$ 3:1. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave (3aR, 6aR) (3-oxohexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)carbamic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester (11.0 mg) as a white solid. TLC (single UV spot, R_f = 0.3, heptane : ethyl acetate 2:1), analytical HPLC main UV peak with R_t = 18.872mins and HPLC-MS (main UV peak with R_t = 9.208mins, 364.0 [M + H]⁺, 386.0 [M + Na]⁺).

δ H (CDCl₃ at 298K); 1.55-2.19 (6H, CH₂CH₂CH₂, m), 4.15 (1H, H-2, d, J = 16.8Hz), 4.19 (1H, Fmoc H-9, t, J = 6.7Hz), 4.31 (1H, H-2, d, J = 16.8Hz), 4.36-4.44 (2H, Fmoc CH₂, m), 4.74 and 4.97 (each 1H, H-6a and NH, brs), 7.29-7.36 (2H aromatic, Fmoc H-2 and H-7), 7.38-7.44 (2H aromatic, Fmoc H-3 and H-6), 7.53-7.61 (2H aromatic, Fmoc H-1 and H-8), 7.74-7.80 (2H aromatic, Fmoc H-4 and H-5).

δ C (CDCl₃ at 298K); 24 (CH₂CH₂CH₂), 33 and 37 (CH₂CH₂CH₂), 48 (u, Fmoc C-9), 68 (Fmoc CH₂), 70 (C-3a), 72 (d, C-2), 87 (u, C-6a), 120 (u, Fmoc C-4 and C-5), 125 (u, Fmoc C-1 and C-8), 127 (u, Fmoc C-2 and C-7), 128 (u, Fmoc C-3 and C-6), 142 (Fmoc C-4' and C-5'), 144 (Fmoc C-1' and C-8'), 156 (OCON), 215 (C-3).

Following the general details from Scheme 2, the required bicycle building block (3aR, 6aR) (3-Oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl) carbamic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester (**8**) was converted to building block-linker construct (**10**) as follows:

(3aR, 6aR) (3-Oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl) carbamic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester (**8**) (26.0mg, 0.072mmole) was dissolved in a mixture of ethanol (1.75mL) and water (0.25mL) containing sodium acetate.trihydrate (14.6mg, 0.107mmole, 1.5eq). 4-[[[(hydrazinocarbonyl)amino] methyl]cyclohexanecarboxylic acid. trifluoroacetate (23.6mg, 0.072mmole, 1.0eq, Murphy, A. M. *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3156-3157, **1992**) was added and the mixture refluxed for 24hr. Chloroform (35mL) was added and the organics washed with HCl (2 x 15mL, ~ pH3), then brine (1 x 15mL), dried (Na₂SO₄) and reduced *in vacuo* to provide crude

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-81-

building block-linker construct (10) as a colourless gum, yield 40.8mg, analytical HPLC 2 product peaks Rt = 17.57 and 18.08mins (cis / trans geometrical isomers), HPLC-MS (2 x UV peak, both with 561 [M + H]⁺, 1121 [2M + Na]⁺). Crude (10) was used directly for construct loading.

5

Following the general details from Scheme 2, the required building block-linker construct (10) was attached to the solid phase providing loaded building block-linker construct (11) as follows:

- 10 Building block-linker construct (10) (0.066mmole), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HBTU, 25.0mg, 0.066mmole), 1-hydroxybenzotriazole hydrate and (HOBT, 10.1mg, 0.066mmole) were dissolved in dimethylformamide (2mL) and N-methylmorpholine (NMM, 14.4μL, 0.13mmole) added. After pre-activation for 5 minutes, free amine gears (20 x 1.2μmole) were
- 15 added, followed by dimethylformamide (0.5mL) and left overnight. The spent coupling solution was then added to free amine crowns (2 x 10μmole) and left overnight. Standard washing and analyses indicated loading at 87%.

- Following the general details from Scheme 2, the required loaded building block-linker construct (11) was elaborated on the solid phase as follows:
- 20

- Loaded construct (11) was elaborated to EXAMPLE 1 (3aR, 6aR) 4-*tert*-Butyl-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)carbamoyl]ethylbenzamide by standard Fmoc deprotection and sequential coupling with Fmoc-
- 25 Tyr(OBut)-OH then 4-*tert*-butylbenzoic acid. The crude example was cleaved and analysed (see general techniques). HPLC Rt = 17.99mins (>90%), HPLC-MS 465.2 [M + H]⁺, 951.4 [2M + Na]⁺.

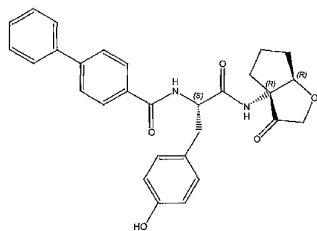
- The following examples (2 – 12) were prepared as detailed for EXAMPLE 1, coupling with the required reagents to provide the full length molecule.
- 30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-82-

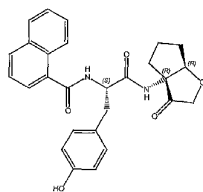
EXAMPLE 2. (3*aR*, 6*aR*) Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) ethyl]amide



HPLC R_t = 17.43mins (> 95%), HPLC-MS 485.2 $[M + H]^+$.

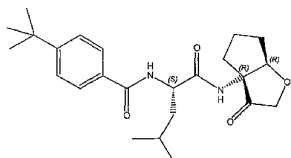
5

EXAMPLE 3. (3*aR*, 6*aR*) Naphthalene-1-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) ethyl]amide



10 HPLC R_t = 15.195mins (> 95%), HPLC-MS 459.2 $[M + H]^+$.

EXAMPLE 4. (3*aR*, 6*aR*) 4-*tert*-Butyl-*N*-[3-methyl-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) butyl]benzamide



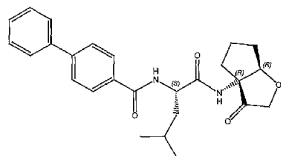
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-83-

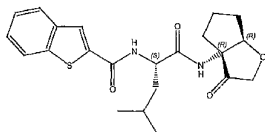
HPLC Rt = 20.158mins (> 80%), HPLC-MS 415.1 [M + H]⁺, 851.3 [2M + Na]⁺.

- EXAMPLE 5. (3*aR*, 6*aR*) Biphenyl-4-carboxylic acid-[3-methyl-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) butyl]benzamide



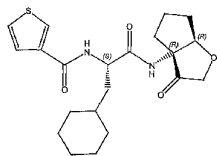
HPLC Rt = 19.53mins (> 85%), HPLC-MS 435.2 [M + H]⁺, 891.4 [2M + Na]⁺.

- 10 EXAMPLE 6. (3*aR*, 6*aR*) Benzo[b]thiophene-2-carboxylic acid [3-methyl-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) butyl]amide



HPLC Rt = 18.36mins (> 80%), HPLC-MS 415.1 [M + H]⁺, 851.3 [2M + Na]⁺.

- 15 EXAMPLE 7. (3*aR*, 6*aR*) Thiophene-3-carboxylic acid [2-cyclohexyl-1*S*-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-ylcarbonyl) ethyl]amide



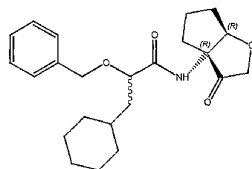
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-84-

HPLC Rt = 17.79mins (>85%), HPLC-MS 405.2 [M + H]⁺, 831.3 [2M + Na]⁺.

- 5 EXAMPLE 8. (2*RS*, 3*aR*, 6*aR*) 2-Benzoyloxy-3-cyclohexyl-N-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)propionamide



HPLC Rt = 21.77-21.97mins (>90%), HPLC-MS 386.3 [M + H]⁺

10

- (a) Preparation of 3-Cyclohexyl-2*S*-hydroxypropionic acid (Compound (14) Scheme 4)

- 15 A solution of sodium nitrite (12.1g, 175mmol) in water (40ml) was added dropwise to a stirred suspension of (*S*)- α -aminocyclohexanepropionic acid hydrate (5g, 26.5mmol) in 0.5M sulphuric acid (120ml, 60mmol) at 0°C over 1.5hours. The mixture was allowed to warm to ambient temperature over 20hours. The product was extracted into diethyl ether (2 x 25ml) then the ethereal layers were washed with saturated aqueous sodium chloride solution (2 x 25ml), dried (Na₂SO₄) and the
- 20 solvents removed *in vacuo*. The residue (5.3g) was recrystallized from diethyl ether (10ml) and heptane (25ml) to give 3-cyclohexyl-2*S*-hydroxypropionic acid as a white solid, yield 2.4 g, (53%).

- 25 δ_H (400MHz, CDCl₃ at 298K), 0.89-1.35 (5H, m) and 1.51-1.86 (7H, m) (OCHCH₂ and cyclohexyl), 4.32 (1H, OCHCH₂, m)

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-85-

(b) Preparation of 2*RS*-Benzyloxy-3-cyclohexylpropionic acid (Compound (15) Scheme 4)

Sodium hydride (265mg of 60% dispersion in oil, 6.6mmol) was added in two portions to a stirred mixture of 3-cyclohexyl-2*S*-hydroxypropionic acid (0.52g, 3.0mmol), dimethylformamide (5ml) and dichloromethane (5ml) at 0°C over 5 minutes. The mixture was stirred at 0°C for 5 minutes then at ambient temperature for 45 minutes. Benzyl bromide (0.45ml, 3.8mmol) was added then the mixture stirred for 1 hour before adding dimethylformamide (5ml). After stirring for 4 hours potassium iodide (50mg, 0.3mmol) was added. The mixture was stirred for 20 hours then heated at 55°C for 1 hour then allowed to cool to ambient temperature and poured into water (15ml). A saturated aqueous sodium chloride solution (5ml) was added then the mixture was extracted with dichloromethane (5ml then 10ml) that was discarded. The aqueous layer was acidified using 1M hydrochloric acid (10 ml) then extracted with dichloromethane (2 x 10ml). The dichloromethane layer was dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue (0.55g) was dissolved in dimethylformamide (8ml) then cooled to 0°C before adding sodium hydride (190mg of 60% dispersion in oil, 4.75mmol). The mixture was stirred for 30 minutes then polymer bound isocyanate (380mg, 2mmolNg⁻¹) added. The mixture was stirred for 2 hours at ambient temperature then poured into water (15ml). 1M Hydrochloric acid (10ml) was added then the product was extracted into dichloromethane (2 x 10ml), dried (Na₂SO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of methanol : dichloromethane 0:1 → 1:20. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to give 2*RS*-benzyloxy-3-cyclohexylpropionic acid as a colourless oil, yield 41mg (5.2%).

HPLC-MS (single main UV peak with Rt = 9.47mins, 261.2 [M - H]⁻, 285.2[M + Na]⁺, 547.3[2M + Na]⁺).

¹H (400MHz, CDCl₃ at 298K), 0.72-1.03 (2H, cyclohexane, m), 1.08-1.38 (3H, cyclohexane, m), 1.45-1.93 (6H + 2H_β, cyclohexane, m), 3.93-4.18 (1H_α, OCH₂CO),

WO 02/057246

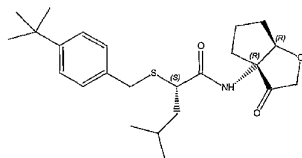
PCT/GB02/00194

-86-

4.35-4.53 (1H, CH₂O, d, $J = 11.52$ Hz), 4.68-4.88 (1H, CH₂O, d, $J = 11.54$ Hz), 7.20-7.47 (5H, ArH, m), 9.36 (1H, OH, brs).

Compound (15) was coupled under standard conditions to loaded building block-linker construct (11) (following standard removal of Fmoc), then cleaved to provide EXAMPLE 8.

EXAMPLE 9. (3*aR*, 6*aR*) 2-(4-*tert*-Butyl-benzylsulfanyl)-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-yl)amide



10

HPLC $R_t = 23.67$ mins ($>80\%$), HPLC-MS 418.3 $[M + H]^+$.

(a) Preparation of 2*R*-Bromo-4-methylpentanoic acid (Compound (17), Scheme 5)

15 A solution of sodium nitrite (5.1g, 73mmol) in water (15ml) was added drop-wise at 0°C over 5 hours to a stirred mixture of D-leucine (8.75g, 67mmol), potassium bromide (29.75g, 0.25mol) and concentrated sulphuric acid (8.6ml) in water (100ml). The mixture was stirred for 30 minutes at 0°C then at ambient temperature for 20 hours. The product was extracted into diethyl ether (2 x 150ml) then the combined
20 ethereal layers were washed with saturated aqueous sodium chloride solution (2 x 100ml), dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of methanol : dichloromethane 1:50 → 1:20. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave 2*R*-bromo-4-methylpentanoic acid (17) as a colourless oil,
25 yield 1.60 g, (12.3%). TLC (single spot, $R_f = 0.2$, methanol : dichloromethane 1:20). Additionally, a second crop (5.2g, 40%) of slightly impure product was obtained

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-87-

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.95 and 0.99 (both 3H, CH_3CH , d, $J = 6.55Hz$), 1.77-1.89 (1H, CH_3CH , m), 1.93 (2H β , m), 4.31 (1H α , t, $J = 7.7Hz$), 9.3 (1H, CO_2H , brs).

5

(b) Preparation of 2*S*-(4-*tert*-butylbenzylsulfanyl)-4-methylpentanoic acid (Compound (19), Scheme 5)

A solution of 2*R*-bromo-4-methylpentanoic acid (compound (17), 1.1g, 5.6mmol) and (4-(*tert*-butyl)phenyl)methanethiol (1.0g, 5.6mmol) in dimethylformamide (15ml) was purged with nitrogen for 5 minutes then cooled to 0°C. Triethylamine (0.79ml, 5.7mmol) was added drop-wise over 1 minute then the mixture was stirred for two days at ambient temperature. The solvents were removed *in vacuo* and residue purified by flash chromatography over silica gel eluting with a gradient of methanol : dichloromethane 0:1 $\rightarrow$ 1:20. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to leave a residue which was purified by flash chromatography over silica gel eluting with ethyl acetate : heptane 2:5. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* to give 2*S*-(4-*tert*-butylbenzylsulfanyl)-4-methylpentanoic acid (19) as a colourless oil, yield 150 mg, (9%). TLC (single spot, $R_f = 0.2$, heptane : ethyl acetate 5:2), analytical HPLC with main peak $R_t = 22.117mins$, HPLC-MS (main UV peak with $R_t = 11.072mins$, 317.2 $[M + Na]^+$).

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.70 and 0.85 (both 3H, CH_3CH , d, $J = 6.3$), 1.29 (9H, $(CH_3)_3C$, s), 1.44-1.51 (1H, CH_3CH , m), 1.62-1.75 (2H β , m), 3.15-3.20 (1H α , m), 3.81 and 3.88 (both 1H, SCH_2 , d, $J = 13.2Hz$), 7.25-7.35 (4H, aromatic).

Compound (19) was coupled under standard conditions to loaded building block-linker construct (11) (following standard removal of Fmoc), then cleaved to provide EXAMPLE 9.

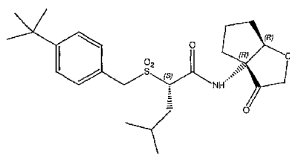
30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-88-

EXAMPLE 10. (3*aR*, 6*aR*) 2-(4-*tert*-Butyl-phenylmethanesulfonyl)-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-yl)-amide

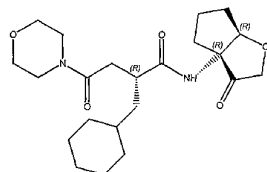


5 HPLC Rt = 21.86mins (>80%), HPLC-MS 450.2 [M + H]⁺.

Scheme 9. Compound (19) was coupled under standard conditions to loaded building block-linker construct (11). (following standard removal of Fmoc). The intermediate loaded thioether (1.2μmole gear) was oxidised with m-chloroperbenzoic acid (5eq, 10 65% reagent, 1.6mg) in dichloromethane (200μL) for 5hrs, followed by standard washing and then cleaved to provide EXAMPLE 10.

EXAMPLE 11. (3*aR*, 6*aR*) 2-Cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-N-(3-oxo-hexahydro-cyclopenta[b]furan-3*a*-yl)-butyramide

15



HPLC-MS 407.1 [M + H]⁺, 835.1 [2M + Na]⁺

20

(a) Preparation of 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-butyric acid methyl ester.

1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide.HCl (1.12g, 5.69mmol) then 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (0.87g, 5.69mmol) were added to a stirred solution of 2*R*-(cyclohexylmethyl)succinic acid 1-methyl ester (compound (24), 1.0g, 4.38mmol) in dimethylformamide (10ml) at 0°C under argon. The mixture was stirred for 25 minutes then morpholine (0.7 ml, 8.76mmol) was added drop-wise over 1 minute and stirring continued at ambient temperature for 16 hours. The product was extracted into ethyl acetate (200ml) then washed with 1.0M hydrochloric acid (3 x 100ml), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution (3 x 100ml), water (100ml), then saturated aqueous sodium chloride solution (100ml), dried (MgSO₄), and the solvent removed *in vacuo* to give 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-butyric acid methyl ester as an off-white solid, yield 1.22g, (94%). HPLC-MS (single peak with Rt = 7.91mins, 298.1 [M + H]⁺, 617.3 [2M + Na]⁺).

(b) Preparation of 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-butyric acid (Compound (25), Scheme 7).

A solution of lithium hydroxide monohydrate (0.51g, 12.18mmol) in water (27ml) was added a stirred solution of 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-yl-4-oxo-butyric acid methyl ester (1.21g, 4.06mmol) in tetrahydrofuran (55ml) and methanol (27ml) at 0°C. The mixture was stirred at ambient temperature for 1 hour then diluted with water (100ml). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (2 x 50ml) which was discarded, then acidified to pH = 1-2 with 1M hydrochloric acid. The product was extracted into dichloromethane (3 x 50ml), then the combined ethereal layers washed with water (2 x 50ml), saturated aqueous sodium chloride solution (2 x 50ml), dried (MgSO₄) and the solvent removed *in vacuo* to leave a residue. The residue was purified by chromatography over silica gel eluting with a gradient of methanol : dichloromethane 1:100 → 3:100. Appropriate fractions were combined and the solvents removed *in vacuo* was to give 2*R*-cyclohexylmethyl-4-morpholin-4-

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

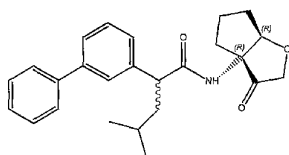
-90-

yl-4-oxo-butyric acid (**25**) as a white solid, yield 0.82 g, (71%). HPLC-MS (single peak with $R_t = 6.769$ mins, $284.2 [M + H]^+$, $589.2 [2M + Na]^+$).

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.77-0.90 (2H, CH_2 (cyclohexane), m), 1.05-1.40 (4H, CH_2 (cyclohexane), m), 1.50-1.90 (7H, CH (cyclohexane), CH_2 (cyclohexane), m), 2.30-2.44 (2H β , m), 2.64-2.77 (1H α , m), 2.96-3.10 (1H, OH, brs), 3.40-3.78 (8H, CH_2OCH_2 and CH_2NCH_2 , m).

Compound (**25**) was coupled under standard conditions to loaded building block-linker construct (**11**) (following standard removal of Fmoc), then cleaved to provide EXAMPLE 11.

EXAMPLE 12. (3*aR*, 6*aR*) 2-Biphenyl-3-yl-4-methyl-pentanoic acid (3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3*a*-yl)-amide



HPLC $R_t = 20.53$ mins (>90%), HPLC-MS 392.3 $[M + H]^+$

(a) Preparation of Biphenyl-3-yl-acetic acid methyl ester (Compound (**27**), Scheme 8)

Concentrated sulphuric acid (588 μ L) was added to a solution of 3-bromophenyl acetic acid (10g, 46.5mmol) in methanol (100mL). The mixture was refluxed for 1.5h and then cooled to ambient temperature and evaporated under reduced pressure to afford a residue. The residue was redissolved in diethyl ether (500mL), washed with water (2 x 100mL), brine (100mL), dried ($MgSO_4$) and then evaporated under reduced pressure to afford 3-bromophenyl acetic acid methyl ester (10.65g). The 3-bromophenyl acetic acid methyl ester was dissolved in toluene (117mL) then phenyl

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-91-

boronic acid (6.8g, 55.69mmol) added, followed by a aqueous solution of sodium carbonate (93mL, 2M) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (1.6g, 1.41mmol). The mixture was stirred overnight then cooled to ambient temperature and an aqueous solution of saturated ammonium chloride (100mL) added. The mixture was
 5 extracted with ethyl acetate (2 x 200mL), dried (Na_2SO_4) and evaporated under reduced pressure to afford a residue. Flash chromatography of the residue over silica (200g) using ethyl acetate : heptane (3 : 48) as the eluent gave biphenyl-3-yl acetic acid methyl ester, yield 10.5g, (99 %), TLC (single UV spot, $R_f \approx 0.24$, 10% ethyl acetate in heptane), analytical HPLC $R_t = 19.55$ min, HPLC-MS (single main UV
 10 peak with $R_t = 9.35$ min, 227.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$).

δ_{H} (400MHz, CDCl_3 at 298K) 3.76 (2H, s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.77 (3H, s, OCH_3), 7.34-7.66 (9H, m, biphenyl-3-yl).

15 (b)Preparation of Biphenyl-3-yl-acetic acid

Water (39mL), followed by lithium hydroxide monohydrate (4.2g, 101.5mmol) were added to a solution of biphenyl-3-yl acetic acid methyl ester (11.43g, 50.57mmol) in methanol (265mL). The mixture was stirred at ambient temperature for 2h then the
 20 organics were removed under reduced pressure. The mixture was acidified with dilute hydrochloric acid (1M, 80mL), extracted with chloroform (2 x 100mL), dried (MgSO_4) and evaporated under reduced pressure to afford biphenyl-3-yl acetic acid as a white solid, yield 10.6g, (99%), analytical HPLC $R_t = 16.565$ min, HPLC-MS (single main UV peak with $R_t = 7.91$ min, 213.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$).

25 δ_{H} (400MHz, CDCl_3 at 298K) 3.77 (2H, s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 7.28-7.52 (9H, m, biphenyl-3-yl).

(c)Preparation of 2RS-Biphenyl-3-yl-4-methylpent-4-enoic acid

30 A solution of biphenyl-3-yl acetic acid (7.0g, 33mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (84mL) was added dropwise to a solution of lithium diisopropyl amide (36.4mL, 2M

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-92-

- solution in hexanes) in anhydrous tetrahydrofuran (84mL) at -78°C . The mixture was allowed to warm to 0°C and stirred for 40 min. The mixture was then cooled to -78°C and 3-bromo-2-methylpropene (4.97mL) rapidly added. The mixture was stirred for 1 h at -78°C then water (28mL) added and the organics removed under reduced pressure. The mixture was then acidified with hydrochloric acid (6M, 14mL), extracted with ethyl acetate (3 x 100 ml), dried (MgSO_4) and evaporated under reduced pressure to afford a residue. Flash chromatography of the residue over silica (400g) using methanol : dichloromethane (3 : 97) as the eluent afforded impure 2-biphenyl-3-yl-4-methylpent-4-enoic acid (8.3 g). Flash chromatography over silica (400g) using methanol : dichloromethane (1.5 : 98.5) afforded pure 2-biphenyl-3-yl-4-methylpent-4-enoic acid, yield 5.27g, (60 %), TLC (single UV spot, $R_f = 0.28$, 5 % methanol in dichloromethane), analytical HPLC $R_t = 19.99$ min, HPLC-MS (single main UV peak with $R_t = 9.57$ min, $267.1 [\text{M} + \text{H}]^+$).
- δ_{H} (400MHz, CDCl_3 at 298K), 1.765 (3H, s, CH_3), 2.53 (1H, dd, $J = 6.6$ and 14.7 Hz, 3- H_1), 2.91 (1H, dd, $J = 8.9$ and 14.7 Hz, 3- H_1), 3.92 (1H, dd, $J = 6.6$ and 8.9 Hz, 2-H), 4.79 (2H, d, $J = 10.7$ Hz, 5- H_2), 7.30-7.62 (9H, m, biphenyl-3-yl).

- (d)Preparation of 2RS-Biphenyl-3-yl-4-methylpentanoic acid (Compound (28), Scheme 8)

- Palladium on carbon (10%, 300mg) was added portionwise to a solution of 2RS-biphenyl-3-yl-4-methylpent-4-enoic acid (1g, 3.76mmol) in ethanol (40mL) at 0°C . A hydrogen atmosphere was then introduced and the mixture allowed to warm to ambient temperature. The mixture was stirred for 18h, then the hydrogen atmosphere removed and the mixture filtered over Celite and the catalyst washed with ethanol (40mL). The combined organic filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a residue, which was flash chromatographed over silica (150g) using methanol : dichloromethane (1 : 99) as the eluent to afford 2RS-biphenyl-3-yl-4-methylpentanoic acid, yield 980mg, (98%), TLC (single UV spot, $R_f = 0.45$, 5 % methanol in dichloromethane), analytical HPLC $R_t = 20.92$ min, HPLC-MS (single main UV peak with $R_t = 10.15$ min, $269.1 [\text{M} + \text{H}]^+$, $291.1 [\text{M} + \text{Na}]^+$).

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-93-

δ_H (400MHz, $CDCl_3$ at 298K), 0.93 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, $2 \times CH_3$), 1.52-1.57 (1H, m, 4- H_1), 1.71-1.76 (1H, m, 3- H_1), 1.97-2.05 (1H, m, 3- H_1), 3.66 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, 2- H_1), 7.32-7.60 (9H, m, biphenyl-3-yl).

- 5 Compound (28) was coupled under standard conditions to loaded building block-linker construct (11), then cleaved to provide EXAMPLE 12.

10 EXAMPLE A. Assays for Cysteine Protease Activity

- 10 The compounds of this invention may be tested in one of a number of literature based biochemical assays that are designed to elucidate the characteristics of compound inhibition. The data from these types of assays enables compound potency and the rates of reaction to be measured and quantified. This information, either alone or in
15 combination with other information, would allow the amount of compound required to produce a given pharmacological effect to be determined.

General materials and methods

- 20 Unless otherwise stated, all general chemicals and biochemicals were purchased from either the Sigma Chemical Company, Poole, Dorset, U.K. or from Fisher Scientific UK, Loughborough, Leicestershire, U.K. Absorbance assays were carried out in flat-bottomed 96-well plates (Spectra; Greiner Bio-One Ltd., Stonehouse, Gloucestershire, U.K.) using a SpectraMax PLUS384 plate reader (Molecular
25 Devices, Crawley, U.K.). Fluorescence high throughput assays were carried out in either 384-well microtitre plates (Corning Costar 3705 plates, Fisher Scientific) or 96-well 'U' bottomed Microfluor W1 microtitre plates (Thermo Labsystems, Ashford, Middlesex, U.K.). Fluorescence assays were monitored using a SpectraMax Gemini fluorescence plate reader (Molecular Devices). For substrates
30 employing either a 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) or a 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) fluorophore, assays were monitored at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 450 nm and the fluorescence plate reader calibrated with AMC. For substrates employing a 3-amino-benzoyl (Abz) fluorophore, assays were monitored at an excitation wavelength of 310 nm and

an emission wavelength of 445 nm; the fluorescence plate reader calibrated with 3-amino-benzamide (Fluka). Unless otherwise indicated, all the peptidase substrates were purchased from Bachem UK, St. Helens, Merseyside, UK. Substrates utilizing fluorescence resonance energy transfer methodology (*i.e.* FRET-based substrates) were synthesized at Incenta Limited using published methods (Atherton & Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press, Oxford, U.K., 1989) and employed Abz (2-aminobenzoyl) as the fluorescence donor and 3-nitro-tyrosine [Tyr(NO₂)] as the fluorescence quencher (Meldal, M. and Breddam, K., *Anal. Biochem.*, 195, 141-147, 1991). Hydroxyethylpiperazine ethanesulfonate (HEPES), tris-hydroxymethyl aminomethane (tris) base, bis-tris-propane and all the biological detergents (*e.g.* CHAPS, zwittergents, *etc.*) were purchased from CN Biosciences UK, Beeston, Nottinghamshire, U.K. Glycerol was purchased from Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K. Stock solutions of substrate or inhibitor were made up to 10 mM in 100 % dimethylsulfoxide (DMSO) (Rathburns, Glasgow, U.K.) and diluted as appropriately required. In all cases the DMSO concentration in the assays was maintained at less than 1% (vol./vol.).

Assay protocols were based on literature precedent (Table1; Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F., 1998, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London and references therein) and modified as required to suit local assay protocols. Enzyme was added as required to initiate the reaction and the activity, as judged by the change in fluorescence upon conversion of substrate to product, was monitored over time. All assays were carried out at 25±1°C.

Table 1. The enzyme assays described herein were carried out according to literature precedents.

Enzyme	Buffer	Substrate	Reference
Cathepsin B	I	Z-Phe-Arg-AMC	a, b
Cathepsin H	II	Bz-Phe-Val-Arg-AMC	a, b
Cathepsin L	I	Ac-Phe-Arg-AMC	b, c
Cathepsin S	I	Boc-Val-Leu-Lys-AMC	c,d
Caspase 1	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	e

Caspase 2	III	Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC	f
Caspase 3	III	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC	g, h
Caspase 4	III	Suc-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC	f
Caspase 5	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	
Caspase 6	III	Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC	i, j, k
Caspase 7	III	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC	
Caspase 8	III	Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC	l
Caspase 9	III	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC	
Caspase 10	III	Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC	
Cruzipain	IV	D-Val-Leu-Lys-AMC	m, n
CPB2.8ΔCTE	XI	Pro-Phe-Arg-AMC	q
<i>S. Aureus</i> Extracellular cysteine peptidase	I	Abz-Ile-Ala-Ala-Pro- Tyr(NO ₂)-Glu-NH ₂	o
Clostripain		Z-Gly-Gly-Arg-AMC	p
FMDV LP	V	Abz-Arg-Lys-Leu-Lys-Gly- Ala-Gly-Ser-Tyr(NO ₂)-Glu- NH ₂	r
Trypsin	VI	Z-Gly-Gly-Arg-AMC	s
Calpain μ	VII	Abz-Ala-Asn-Leu-Gly-Arg-Pro- Ala-Leu-Tyr(NO ₂)-Asp-NH ₂	t
Calpain m	VIII	Abz-Lys-Leu-Cys(Bzl)-Phe-Ser- Lys-Gln-Tyr(NO ₂)-Asp-NH ₂	t
Cathepsin K	IX	Z-Phe-Arg-AMC	u
Cathepsin X	X		v, w

I: 10 mM BTP, pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM CaCl₂

II: 10 mM BTP, pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 142 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂, 0.035 mM Zwittergent 3-16

5

III: 50mM HEPES pH 7.2, 10% Glycerol, 0.1% CHAPS, 142 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-96-

- IV: 100 mM sodium phosphate, pH 6.75 containing 1 mM EDTA and 10 mM L-cysteine
- V: 50 mM trisacetate, pH 8.4 containing 1 mM EDTA, 10 mM L-cysteine and 0.25% (w/v) CHAPS
- 5 VI: 10 mM HEPES, pH 8.0 containing 5 mM CaCl_2
- VII: 10 mM HEPES, pH 7.5 containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 100 μM CaCl_2
- VIII: 10 mM HEPES, pH 7.5 containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 200 μM CaCl_2
- IX: 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 10 mM L-cysteine and 1 mM EDTA
- 10 X: 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 10 mM L-cysteine; 0.05% (w/v) Brij 35 and 1 mM EDTA
- XI: 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 10 mM L-cysteine; 142 mM sodium chloride and 1 mM EDTA
- 15 ^a Barrett, A.J., *Biochem. J.*, 187, 909-912, **1980**
- ^b Barrett, A.J. and Kirschke, H., *Methods Enzymol.*, 80, 535-561, **1981**
- ^c Quibell, M. and Taylor, S., *WO0069855*, **2000**
- ^d Bromme, D., Steinert, J., Freibe, S., Fittkau, S., Wiederanders, B., and Kirschke, H., *Biochem. J.*, 264, 475-481, **1989**
- 20 ^e Rano, T.A., et. al., *Chem. Biol.*, 4, 149, **1997**
- ^f Talanian, R.V., et. al., *J. Biol. Chem.*, 272, 9677, **1997**
- ^g Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirer, G.G. and Earnshaw, W.C., *Nature.*, 371, 768-774, **1994**
- ^h Han, Z., et. al., *J. Biol. Chem.*, 272, 13432, **1997**
- 25 ⁱ Takahashi, A., et. al., *PNAS*, 93, 8395, **1996**
- ^j Martins, L.M., et. al., *J. Biol. Chem.*, 272, 7421, **1997**
- ^k Nagata, S., *Cell*, 88, 355, **1997**
- ^l Harris, J.L., et. al., *J. Biol. Chem.*, 273, 27364, **1998**
- ^m Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martinez, J. and Franke de Cazzulo, B.M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1037, 186-191, **1990**
- 30 ⁿ Cazzulo, J.J., Bravo, M., Raimondi, A., Engstrom, U., Lindeberg, G. and Hellman, U., *Cell Mol. Biol.*, 42, 691-696, **1996**

- ^o Potempa, J., Dubin, A., Korzus, G. and Travis, J., *Biochem. J.*, 263, 2664-2667, **1988**
- ^p Kembhavi, A.A., Buttle, D.J., Rauber, P. and Barrett, A.J., *FEBS Lett.*, 283, 277-280, **1991**
- 5 ^q Alves, L.C., *et. al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 116, 1-9, **2001**.
- ^r Guarné, *et.al.*, *J. Mol. Biol.*, 302, 1227-1240, **2000**.
- ^s Halfon and Craik, (Barret, Rawlings and Woessner, eds.), in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 12-21, **1998**.
- ^t Sasaki, *et. al.*, (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 12489-12494, **1984**.
- 10 ^u Bossard, M.J., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 12517-12524, **1996**
- ^v Santamaria, I., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 273, 16816-16823, **1998**
- ^w Klemencic, J, *et al.*, *Eur.J.Biochem.*, 267, 5404-5412, **2000**

Trypanosoma cruzi cruzipain peptidase activity assays

- 15 Wild-type cruzipain, derived from *Trypanosoma cruzi* Dm28 epimastigotes, was obtained from Dr. Julio Scharfstein (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). Activity assays were carried out in 100 mM sodium phosphate, pH 6.75 containing 1 mM EDTA and
- 20 10 mM L-cysteine using 2.5 nM enzyme. Ac-Phe-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 12 \mu M$) and D-Val-Leu-Lys-AMC ($K_M^{app} \approx 4 \mu M$) were used as the substrates. Routinely, Ac-FR-AMC was used at a concentration equivalent to K_M^{app} and D-Val-Leu-Lys-AMC was used at a concentration of 25 μM . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over
- 25 time.

Leishmania mexicana cysteine protease B (CPB) peptidase activity assays

- Wild-type recombinant CPB without the C-terminal extension (*i.e.* CPB2.8 Δ CTE; Sanderson, S.J., *et. al.*, *Biochem. J.*, 347, 383-388, **2000**) was obtained from Dr. Jeremy Mottram (Wellcome Centre for Molecular Parasitology, The Anderson College, University of Glasgow, Glasgow, U.K.). Activity assays were carried out in 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 1 mM EDTA; 200 mM NaCl and 10 mM
- 30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-98-

DTT (Alves, L.C., *et. al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **116**, 1-9, **2001**) using 0.25 nM enzyme. Pro-Phe-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 38 \mu M$) was used as the substrate at a concentration equivalent to K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over

5 time.

Cathepsin peptidase activity assays

Bovine cathepsin S, human cathepsin L, human cathepsin H and human cathepsin B were obtained from CN Biosciences. Recombinant human cathepsin S, human cathepsin K and human cathepsin X were obtained from Dr. Boris Turk (Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia). Unless otherwise stated, all peptidase activity assays were carried out in 10 mM bis-tris-propane (BTP), pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM $CaCl_2$. Human cathepsin H activity assays were carried out in 10 mM BTP pH 6.5, 142 mM $NaCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.035 mM Zwittergent 3-16. Human cathepsin K assays were carried out in 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 20 mM L-cysteine and 1 mM EDTA (Bossard, M.J., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 12517-12524, **1996**). Human cathepsin X assays were carried out in 100 mM sodium acetate; pH 5.5 containing 20 mM L-cysteine; 0.05% (w/v) Brij 35 and 1 mM EDTA (Santamaria, I., *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16816-16823, **1998**; Klemencic, J, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5404-5412, **2000**). The final enzyme concentrations used in the assays were 0.5 nM bovine cathepsin S, 1 nM cathepsin L, 0.1 nM cathepsin B, 0.25 nM Cathepsin K; 1 nM cathepsin X and 10 nM cathepsin H. For the inhibition assays, the substrates used for cathepsin S, cathepsin L, cathepsin B, cathepsin K and cathepsin H were boc-Val-Leu-Lys-AMC ($K_M^{app} \approx 30 \mu M$), Ac-Phe-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 20 \mu M$), Z-Phe-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 40 \mu M$), Z-Leu-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 2 \mu M$); Bz-Phe-Val-Arg-AMC ($K_M^{app} \approx 150 \mu M$) respectively. In each case the substrate concentration used in each assay was equivalent to the K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

Trypsin peptidase activity assays

Human pancreatic trypsin (iodination grade; CN Biosciences) activity assays were carried out in 10 mM HEPES, pH 8.0 containing 5 mM CaCl_2 using 0.1 nM trypsin.

- 5 For the inhibition assays, Z-Gly-Gly-Arg-AMC ($K_M^{\text{app}} \approx 84 \mu\text{M}$) was used as the substrate at a concentration equivalent to K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

10 Clostripain peptidase activity assays

Clostripain (Sigma) activity assays were carried out in 10 mM BTP, pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1mM CaCl_2 using 0.3 nM enzyme. For the inhibition assays, Z-Gly-Gly-Arg-AMC ($K_M^{\text{app}} \approx 100 \mu\text{M}$) was used

- 15 as the substrate at a concentration equivalent to K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

Calpain peptidase activity assays

- 20 Calpain (human erythrocyte μ -calpain and porcine kidney m-calpain; CN Biosciences) activity assays were carried out in 10 mM HEPES, pH 7.5 containing 2 mM 2-mercaptoethanol and CaCl_2 using 25 nM of either enzyme (Sasaki, *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12489-12494, **1984**). For μ -calpain inhibition assays, the buffer contained 100 μM CaCl_2 and Abz-Ala-Asn-Leu-Gly-Arg-Pro-Ala-Leu-Tyr(NO_2)-Asp-NH₂ ($K_M^{\text{app}} \approx 20 \mu\text{M}$; Incenta Limited) was used as the substrate. For m-calpain inhibition assays, the assay buffer contained 200 μM CaCl_2 and Abz-Lys-Leu-Cys(Bzl)-Phe-Ser-Lys-Gln-Tyr(NO_2)-Asp-NH₂ ($K_M^{\text{app}} \approx 22 \mu\text{M}$; Incenta Limited) was used as the substrate. In both cases the substrate concentration employed in the
- 25
- 30 assays was equivalent to the K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-100-

Extracellular *S. aureus* V8 cysteine peptidase (staphylopain) peptidase activity assays

S. aureus V8 was obtained from Prof. S. Arvidson, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Extracellular *S. aureus* V8 cysteine peptidase (staphylopain) activity assays were carried out using partially purified *S. aureus* V8 culture supernatant (obtained from Dr. Peter Lambert, Aston University, Birmingham, U.K.). Activity assays were carried out in 10 mM BTP, pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1mM CaCl₂ using two-times diluted partially purified extract. For the inhibition assays, Abz-Ile-Ala-Ala-Pro-Tyr(NO₂)-Glu-NH₂ ($K_M^{app} \approx 117 \mu\text{M}$; Incenta Limited) was used as the substrate at a concentration equivalent to K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

Foot-and-mouth disease leader peptidase (FMDV-LP) activity assays

Recombinant wild-type FMDV-LP was obtained from Dr. Tim Skern (Institut für Medizinische Biochemie, Abteilung für Biochemie, Universität Wien, Wien, Austria). Activity assays were carried out in 50 mM trisacetate, pH 8.4 containing 1 mM EDTA, 10 mM L-cysteine and 0.25% (w/v) CHAPS using 10 nM enzyme. For the inhibition assays, Abz-Arg-Lys-Leu-Lys-Gly-Ala-Gly-Ser-Tyr(NO₂)-Glu-NH₂ ($K_M^{app} \approx 51 \mu\text{M}$, Incenta Limited) was used as the substrate at a concentration equivalent to K_M^{app} . The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

Caspase peptidase activity assays

Caspases 1-10 were obtained from CN Biosciences or BioVision Inc. (Mountain View, CA, USA) and all assays were carried out in 50mM HEPES; pH 7.2, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (w/v) CHAPS, 142 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT) using 0.1-1 U per assay. For caspase 1, Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 2, Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC was used as the substrate; for caspase 3, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC was used as the

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-101-

substrate; for caspase 4, Suc-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 5, Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 6, Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 7, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 8, Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 9, Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC was used as the substrate; for caspase 10, Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC was used as the substrate (Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A., *TIBS*, 22, 299-306, 1997; Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S., *J. Biol. Chem.*, 272(41), 25719-25723, 1997; Talanian, R.V., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(15), 9677-9682, 1997; Wolf, B.B. and Green, D.R., *J. Biol. Chem.*, 274(29), 20049-20052, 1999). The rate of conversion of substrate to product was derived from the slope of the increase in fluorescence monitored continuously over time.

Measurement of the apparent macroscopic binding (Michaelis) constants (K_M^{app}) for substrates

The apparent macroscopic binding constant (K_M^{app}) for each substrate was calculated, from the dependence of enzyme activity as a function of substrate concentration. The observed rates were plotted on the ordinate against the related substrate concentration on the abscissa and the data fitted by direct regression analysis (Prism v 3.02; GraphPad, San Diego, USA) using Equation 1 (Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics* Portland Press; 1995, 93-128.).

$$v_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S_o]}{[S_o] + K_M^{app}} \quad (1)$$

25

In Equation 1 ' v_i ' is the observed initial rate, ' $V_{\max}^{app}$ ' is the observed maximum activity at saturating substrate concentration, ' K_M^{app} ' is the apparent macroscopic binding (Michaelis) constant for the substrate, ' $[S_o]$ ' is the initial substrate concentration.

Measurement of the inhibition constants

The apparent inhibition constant (K_i) for each compound was determined on the basis that inhibition was reversible and occurred by a pure-competitive mechanism. The K_i values were calculated, from the dependence of enzyme activity as a function of inhibitor concentration, by direct regression analysis (Prism v 3.02) using Equation 2 (Cornish-Bowden, A., 1995).

$$v_i = \frac{V_{\max}^{\text{app}} [S]}{[S] + \{K_M^{\text{app}} ([I] / K_i)\}} \quad (2)$$

In Equation 2 ' v_i ' is the observed residual activity, ' $V_{\max}^{\text{app}}$ ' is the observed maximum activity (*i.e.* in the absence of inhibitor), ' K_M^{app} ' is the apparent macroscopic binding (Michaelis) constant for the substrate, '[S]' is the initial substrate concentration, ' K_i ' is the apparent dissociation constant and '[I]' is the inhibitor concentration.

In situations where the apparent dissociation constant (K_i^{app}) approached the enzyme concentrations, the K_i^{app} values were calculated using a quadratic solution in the form described by Equation 3 (Morrison, J.F. *Trends Biochem. Sci.*, 7, 102-105, 1982; Morrison, J.F. *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 269-286, 1969; Stone, S.R. and Hoisteenge, J. *Biochemistry*, 25, 4622-4628, 1986).

$$v_i = \frac{F \{E_o - I_o - K_i^{\text{app}} + \sqrt{(E_o - I_o - K_i^{\text{app}})^2 + 4 K_i^{\text{app}} E_o}\}}{2} \quad (3)$$

$$K_i^{\text{app}} = K_i (1 + [S_o] / K_M^{\text{app}}) \quad (4)$$

In Equation 3 ' v_i ' is the observed residual activity, ' F ' is the difference between the maximum activity (*i.e.* in the absence of inhibitor) and minimum enzyme activity, ' E_o ' is the total enzyme concentration, ' K_i^{app} ' is the apparent dissociation constant and ' I_o ' is the inhibitor concentration. Curves were fitted by non-linear regression

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-103-

analysis (Prism) using a fixed value for the enzyme concentration. Equation 4 was used to account for the substrate kinetics, where ' K_i ' is the inhibition constant, ' $[S_0]$ ' is the initial substrate concentration and ' K_M^{app} ' is the apparent macroscopic binding (Michaelis) constant for the substrate (Morrison, 1982).

5

The second-order rate of reaction of inhibitor with enzyme

Where applicable, the concentration dependence of the observed rate of reaction (k_{obs}) of each compound with enzyme was analysed by determining the rate of enzyme inactivation under pseudo-first order conditions in the presence of substrate (Morrison, J.F., *TIBS*, 102-105, 1982; Tian, W.X. and Tsou, C.L., *Biochemistry*, 21, 1028-1032, 1982; Morrison, J.F. and Walsh, C.T., from Meister (Ed.), *Advances in Enzymol.*, 61, 201-301, 1988; Tsou, C.L., from Meister (Ed.), *Advances in Enzymol.*, 61, 381-436, 1988). Assays were carried out by addition of various concentrations of inhibitor to assay buffer containing substrate. Assays were initiated by the addition of enzyme to the reaction mixture and the change in fluorescence monitored over time. During the course of the assay less than 10% of the substrate was consumed.

20

$$F = v_s t + \frac{(v_o - v_s) [1 - e^{(k_{obs} t)}]}{k_{obs}} + D \quad (5)$$

The activity fluorescence progress curves were fitted by non-linear regression analysis (Prism) using Eq. 5 (Morrison, 1969; Morrison, 1982); where ' F ' is the fluorescence response, ' t ' is time, ' v_o ' is the initial velocity, ' v_s ' is the equilibrium steady-state velocity, ' k_{obs} ' is the observed pseudo first-order rate constant and ' D ' is the intercept at time zero (i.e. the ordinate displacement of the curve). The second order rate constant was obtained from the slope of the line of a plot of k_{obs} versus the inhibitor concentration (i.e. $k_{obs}/[I]$). To correct for substrate kinetics, Eq. 6 was used, where ' $[S_0]$ ' is the initial substrate concentration and ' K_M^{app} ' is the apparent macroscopic binding (Michaelis) constant for the substrate.

30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-104-

$$k_{inact} = \frac{k_{cat}(1 + [S_2]/K_M^{app})}{[I]} \quad (6)$$

Compounds of the invention were tested by the above described assays and observed to exhibit cruzipain inhibitory activity or inhibitory activity against an alternative CA C1 cysteine protease with an *in vitro* Ki inhibitory constant of less than or equal to 100μM. Exemplary inhibition data for a number of example compounds of the invention are given in table 2.

Table 2. Exemplary inhibition data (Ki expressed as μM).

EXAMPLE N ^o	Cruzipain	Bovine Cathepsin S	Human Cathepsin L	Human Cathepsin K
1	<2	>50	>20	>100
7	>50	<2	>25	>50
6	>20	>25	>10	<2

WO 02/057246

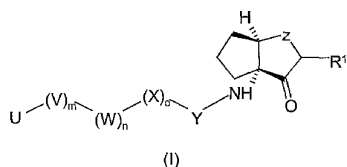
PCT/GB02/00194

-105-

CLAIMS

1. A compound according to general formula (I): -

5



wherein: $R^1 = C_{0-7}\text{-alkyl}$ (when $C = 0$, R^1 is simply hydrogen), $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$ (when $C = 0$, R^1 is simply an aromatic moiety Ar);

10

$Z = O, S, CR^2R^3$ or NR^4 , where R^4 is chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$;

15

Each of R^2 and R^3 is independently chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $O\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $O\text{-}C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $O\text{-}Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $S\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $S\text{-}C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $S\text{-}Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $NH\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $NH\text{-}C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$, $NH\text{-}Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$, $N(C_{0-7}\text{-alkyl})_2$, $N(C_{3-6}\text{-cycloalkyl})_2$ or $N(Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl})_2$;

20

$Y = CR^5R^6\text{-CO}$, where R^5, R^6 are chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ or $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$;

25

$(X)_o = CR^7R^8$, where R^7 and R^8 are independently chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ and $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$ and o is a number from zero to three;

$(W)_n = O, S, C(O), S(O)$ or $S(O)_2$ or NR^9 , where R^9 is chosen from $C_{0-7}\text{-alkyl}$, $C_{3-6}\text{-cycloalkyl}$ and $Ar\text{-}C_{0-7}\text{-alkyl}$ and n is zero or one;

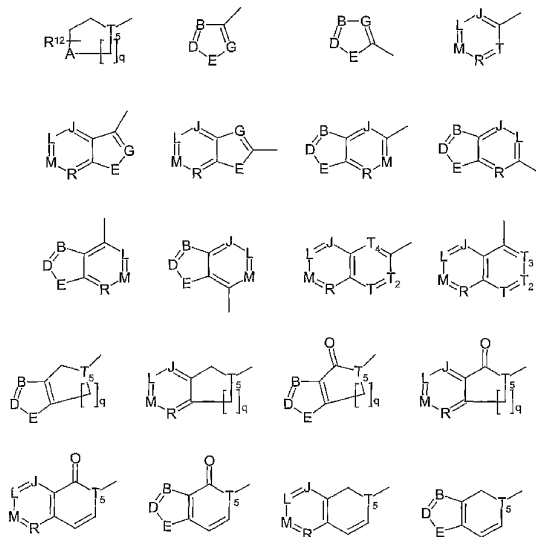
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-106-

5 $(V)_m = C(O), C(S), S(O), S(O)_2, S(O)_2NH, OC(O), NHC(O), NHS(O),$
 $NHS(O)_2, OC(O)NH, C(O)NH$ or $CR^{10}R^{11}$, where R^{10} and R^{11} are
independently chosen from C_{0-7} -alkyl, C_{3-6} -cycloalkyl, $Ar-C_{0-7}$ -alkyl and
10 m is a number from zero to three, provided that when m is greater than
one, $(V)_m$ contains a maximum of one carbonyl or sulphonyl group;

10 U = a stable 5- to 7-membered monocyclic or a stable 8- to 11-membered
bicyclic ring which is either saturated or unsaturated and which includes
zero to four heteroatoms (as detailed below):



wherein R^{12} is:

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-107-

5 C₀₋₇-alkyl, C₃₋₆-cycloalkyl, Ar-C₀₋₇-alkyl, O-C₀₋₇-alkyl, O-C₃₋₆-cycloalkyl, O-Ar-C₀₋₇-alkyl, S-C₀₋₇-alkyl, S-C₃₋₆-cycloalkyl, S-Ar-C₀₋₇-alkyl, NH-C₀₋₇-alkyl, NH-C₃₋₆-cycloalkyl, NH-Ar-C₀₋₇-alkyl, N(C₀₋₇-alkyl)₂, N(C₃₋₆-cycloalkyl)₂ or N(Ar-C₀₋₇-alkyl)₂ or, when it is part of the group CHR¹² or CR¹², R¹² may be halogen;

A is chosen from:

CH₂, CHR¹², O, S and NR¹³;

wherein R¹² is as defined above and R¹³ is chosen from:

10 C₀₋₇-alkyl, C₃₋₆-cycloalkyl and Ar-C₀₋₇-alkyl;

B, D and G are independently chosen from:

CR¹², where R¹² is as defined above, or N;

15 E is chosen from:

CH₂, CHR¹², O, S and NR¹³, where R¹² and R¹³ are defined as above;

J, L, M, R, T, T₂, T₃ and T₄ are independently chosen from:

20 CR¹² and N, where R¹² is as defined above;

T₅ is chosen from:

CH or N;

25 q is a number from one to three, thereby defining a 5-, 6- or 7-membered ring.

2. A compound as claimed in claim 1 wherein Z is O, S, NH or CH₂.

30 3. A compound as claimed in claim 1 wherein Z is NR⁴, where R⁴ is Ar-C₁₋₄-alkyl or a substituted carbonyl or sulphonyl group.

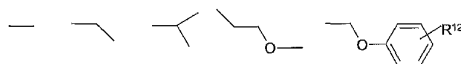
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-108-

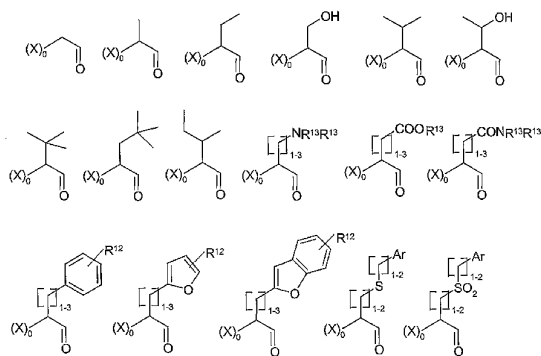
4. A compound as claimed in claim 1, 2 or 3 wherein R^1 comprises C_{0-7} -alkyl or Ar- C_{0-7} -alkyl.

5. A compound as claimed in claim 4 wherein R^1 is selected from hydrogen or one of the following moieties:



6. A compound as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein Y is CR^5R^6CO where R^5, R^6 are selected from C_{0-7} -alkyl, C_{3-6} -cycloalkyl or Ar- C_{0-7} -alkyl.

7. A compound as claimed in claim 6 where Y is selected from one of the following moieties:



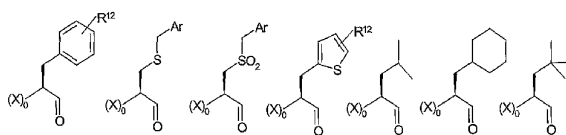
15 wherein R^{12}, R^{13} and Ar are as defined above.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-109-

8. A compound as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein Y is CHR^6CO where R^6 is Ar-CH_2- , where the aromatic ring is an optionally substituted phenyl or monocyclic heterocycle.
- 5 9. A compound as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein Y is CHR^6CO where R^6 is a simple branched alkyl group or a straight heteroalkyl chain.
10. A compound as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein Y is CHR^6CO where R^6 comprises cyclohexylmethyl.
- 10 11. A compound as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein Y is selected from the following:



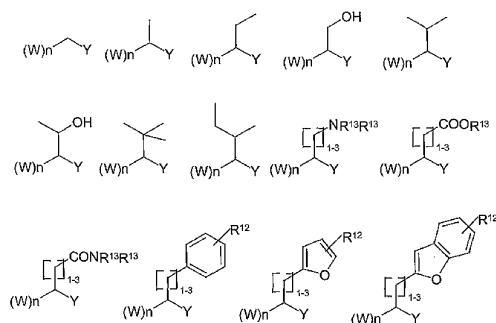
wherein R^{12} and Ar are as defined previously.

- 15 12. A compound as claimed in any one of claims 1 to 11 wherein, in the group $(\text{X})_6$, X is CR^7R^8 and each of R^7 and R^8 is selected from C_{0-7} -alkyl or Ar-C_{0-7} -alkyl.
13. A compound as claimed in any one of claims 1 to 11, wherein $(\text{X})_6$ is one of
- 20 the following moieties:

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-110-



wherein R^{12} and R^{13} are as defined previously.

14. A compound as claimed in any one of claims 1 to 11, wherein $(X)_o$ is a simple alkyl group and where $o = 0$ or 1 .
15. A compound as claimed in any one of claims 1 to 14 wherein, in the group $(W)_n$:
- W is O, S, SO_2 , SO, C(O) or NR^9 , where R^9 is C_{0-4} -alkyl; and n is 0 or 1.
16. A compound as claimed in any one of claims 1 to 14 wherein, in the group $(W)_n$:
- W is O, S, SO_2 , C(O) or NH where n is 0 or 1.
17. A compound as claimed in any one of claims 1 to 14 wherein, in the group $(W)_n$:
- NH where n is 1.
18. A compound as claimed in any one of claims 1 to 17 wherein, in the group $(V)_m$:
- V is C(O), C(O)NH or CHR^{11} , where R^{11} is C_{0-4} -alkyl; and

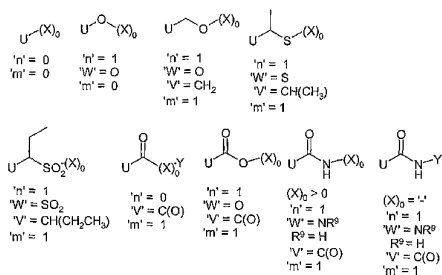
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-111-

m is 0 or 1.

19. A compound as claimed in any one of claims 1 to 17 wherein the combination $(V)_m$ and $(W)_m$ is one of the following:



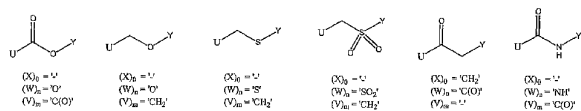
5

20. A compound as claimed in claim 19, wherein the combination $(V)_m$ and $(W)_m$ is one of the first eight structures depicted in claim 19.

21. A compound as claimed in claim 19, wherein the combination $(V)_m$ and $(W)_m$

10 is the ninth structure depicted in claim 19.

22. A compound as claimed in any one of claims 1 to 17 wherein the combination $(X)_0$, $(V)_m$ and $(W)_m$ is one of the following:



[illegible]

10 25. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23 wherein U comprises a bulky alkyl or aryl group at the para position of an aryl Ar.

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

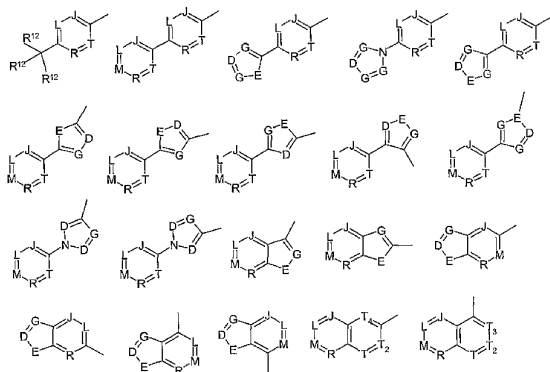
-113-

26. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23 wherein U comprises a meta or para-biaryl Ar-Ar, where Ar is as previously defined.

27. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23 wherein U comprises a 6,6 or 6,5 or 5,6-fused aromatic ring.

28. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23, wherein U represents a group:

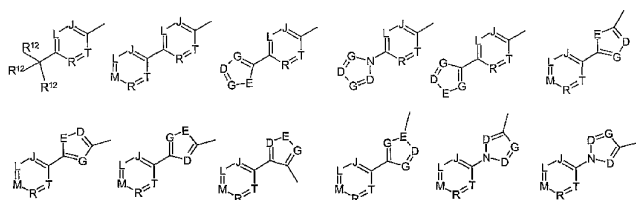
10



wherein R¹², D, E, G, J, L, M, R, T, T₂, T₃ and T₄ are as defined previously.

29. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23, wherein U represents a group

15



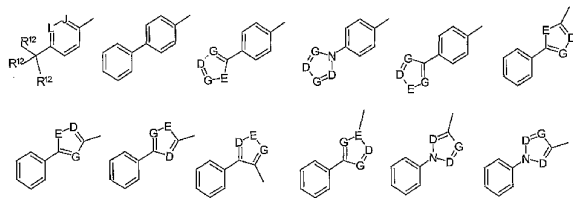
WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-114-

wherein R^{12} , D, E, G, J, L, M, R and T are as defined previously.

30. A compound as claimed in any one of claims 1 to 23, wherein U represents a
5 group



wherein R^{12} , D, E, G, J and L are as defined previously.

- 10 31. A method of validating a known or putative cysteine protease inhibitor as a
therapeutic target, the method comprising:

(a) assessing the *in vitro* binding of a compound as claimed in any one of claims 1
to 30 to an isolated known or putative cysteine protease, providing a measure of
15 'potency'; and optionally, one or more of the steps of:

(b) assessing the binding of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30 to
closely related homologous proteases of the target and general house-keeping
proteases (e.g. trypsin) to provides a measure of 'selectivity';

20 (c) monitoring a cell-based functional marker of a particular cysteine protease
activity, in the presence of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30; and

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-115-

(d) monitoring an animal model-based functional marker of a particular cysteine protease activity, in the presence of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30.

5 32. The use of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30 in the validation of a known or putative cysteine protease inhibitor as a therapeutic target.

33. A compound as claimed in any one of claims 1 to 30 for use in medicine, especially for preventing or treating diseases in which the disease pathology may be modified by inhibiting a cysteine protease.
10

34. The use of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30 in the preparation of a medicament for preventing or treating diseases in which the disease pathology may be modified by inhibiting a cysteine protease.
15

35. A compound as claimed in any one of claims 1 to 30 for use in preventing or treating Chagas' disease.

36. A compound as claimed in any one of claims 25 to 30 for use in preventing or treating Chagas' disease.
20

37. The use of a compound as claimed in any one of claims 1 to 30 in the preparation of a medicament for preventing or treating Chagas' disease.

25 38. The use of a compound as claimed in any one of claims 25 to 30 in the preparation of a medicament for preventing or treating Chagas' disease.

39. A pharmaceutical or veterinary composition comprising one or more compounds as claimed in any one of claims 1 to 30 and a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier.
30

WO 02/057246

PCT/GB02/00194

-116-

40. A process for the preparation of a pharmaceutical or veterinary composition as claimed in claim 39, the process comprising bringing the active compound(s) into association with the carrier, for example by admixture.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057246 A3(51) International Patent Classification: C07D 307/93,
409/12, A61K 31/381, 31/5377, 31/343, A61P 33/02

(21) International Application Number: PCT/GB02/00194

(22) International Filing Date: 17 January 2002 (17.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01/01204.6 17 January 2001 (17.01.2001) GB
60/275,506 13 March 2001 (13.03.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): INCENTA LIMITED (GB/GB); Incenta House, Horizon Park, Barton Road, Cambridge CB3 7AJ (GB).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): QUIBELL, Martin (GB/GB); c/o Incenta House, Horizon Park, Barton Road, Comberton, Cambridge CB3 7AJ (GB). RAMJEE, Manoj, Kumar (GB/GB); c/o Incenta House, Horizon Park, Barton Road, Comberton, Cambridge CB3 7AJ (GB).

(74) Agent: SHEARD, Andrew, Gregory; Andrew Sheard, P.O. Box 521, Berkhamsted, Hertfordshire HP4 1YP (GB).

(81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

GB, GR, IE, IT, IU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iii)) for US only

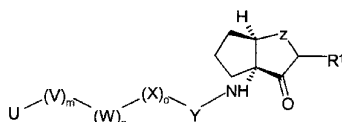
Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments(88) Date of publication of the international search report:
21 November 2002

[Continued on next page]

WO 02/057246 A3

(54) Title: INHIBITORS OF CRUZIPAIN AND OTHER CYSTEINE PROTEASES



(I)

(57) Abstract: Compounds of general formula (I); wherein R¹, Y, (X)_o, (W)_n, (V)_m, Z and U are as defined in the specification, are inhibitors of cruzipain and other cysteine protease inhibitors and are useful as therapeutic agents, for example in Chagas' disease, or for validating therapeutic target compounds.

WO 02/057246 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. PCT/GB 02/00194
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D307/93 C07D409/12 A61K31/381 A61K31/5377 A61K31/343 A61P33/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 69855 A (TAYLOR STEVEN ; MEDIVIR UK LTD (GB); QUIBELL MARTIN (GB); PEPTIMMUN) 23 November 2000 (2000-11-23) abstract; claims page 1	1,31-40
A	WO 00 29408 A (GRIBBLE ANDREW D ; SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); WITHERINGTON JASON) 25 May 2000 (2000-05-25) cited in the application abstract; claims page 1 -page 3 --- -/--	1,31-40
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 September 2002		Date of mailing of the international search report 12/09/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patanklaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, TX 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Paisdor, B

Form PCT/ISA(210) (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00194
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 50533 A (FENWICK ASHLEY EDWARD ;GRIBBLE ANDREW D (GB); SMITHKLINE BEECHAM P) 12 November 1998 (1998-11-12) cited in the application abstract; claims page 1, last paragraph page 38 -page 39; table 1	1, 31-40

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/00194

167 00 02/00194

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0069855	A	23-11-2000	AU	4772200 A	05-12-2000
			BR	0010553 A	02-07-2002
			EP	1178986 A2	13-02-2002
			WO	0069855 A2	23-11-2000
WO 0029408	A	25-05-2000	WO	0029408 A1	25-05-2000
WO 9850533	A	12-11-1998	AU	7562598 A	27-11-1998
			BR	9809306 A	04-07-2000
			CN	1255161 T	31-05-2000
			EP	1003846 A1	31-05-2000
			HU	0002247 A2	28-05-2001
			JP	2001525804 T	11-12-2001
			NO	995434 A	05-11-1999
			NZ	337889 A	28-09-2001
			PL	336856 A1	17-07-2000
			TR	9902766 T2	21-02-2000
			WO	9850533 A1	12-11-1998
			US	2002013360 A1	31-01-2002
			ZA	9803762 A	06-11-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 409/12	A 6 1 P 33/00	1 7 1
// C O 7 M 7:00	C O 7 D 409/12	
	C O 7 M 7:00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114649
弁理士 宇谷 勝幸

(74)代理人 100124615
弁理士 藤井 敏史

(72)発明者 クイベル, マーチン
イギリス, ケンブリッジ シービー 3 7 エージェンシー, コンバートン, バートン ロード, ホリゾン
ン パーク, インセンタ ハウス

(72)発明者 ラムジー, マノー, クマー
イギリス, ケンブリッジ シービー 3 7 エージェンシー, コンバートン, バートン ロード, ホリゾ
ン パーク, インセンタ ハウス

F ターム(参考) 4C037 VA15 VA34

4C063 AA01 BB09 CC92 CC94 DD76 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BA05 BB02 BB03 BC73 GA02 MA05 NA14

ZB37