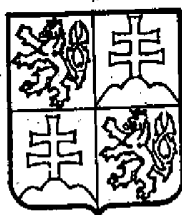


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 12.08.91

(32) 13.08.90

(31) 90/17694

(33) GB

(40) 19.02.92

(21) 02484-91.H

(13) A3

5(51) C 07 K 7/00

(71) SANDOZ A.G., Basilej, CH

(72) Metternich Rainer dr., Inzlingen, DE

(54) Borolysinové analogy peptidů

(57) Borolysinové analogy peptidů obecného vzorce I, kde W je atom vodíku nebo N-chránící skupina, Y je sekvence aminokyselin, Q₁ a Q₂ jsou skupiny -OH, -COR₁, -CONR₁R₂, -NR₁R₂ nebo -OR₃ nebo Q₁ a Q₂ spolu dohromady tvoří diolový zbytek, R₁, R₂ a R₃ jsou různé uhlovodíkové zbytky, popřípadě substituované, R₄ je atom vodíku nebo C₁₋₁₀alkyl, R₅ je skupina -A-X, kde A je dvojvázný uhlovodíkový zbytek, X je -NH₂, -NH-C(NH)-NH₂, -S-C(NH)-NH₂, -N₃, C₁₋₄alkoxy skupina, C₁₋₄alkylthioskupina nebo -Si(CH₃)₃ nebo R₄ a R₅ spolu dohromady tvoří trimethylenovou skupinu a asymetrický atom uhlíku označený * může mít D- nebo L-konfiguraci nebo znamená jakoukoliv jejich směs. Sloučeniny obecného vzorce I mají vlastnosti inhibitorů proteas.

Borolysinové analogy peptidů

Přil.	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	0 3 7 2 4 6
		12. VIII 91

Oblast techniky

Vynález se týká borolysinových analogů peptidů, které mají vlastnosti inhibitorů serinových proteas.

Dosavadní stav techniky

Vynález se týká inhibitorů serinových proteas, jako je thrombin, faktor Xa, kallikrein a plasmin, jakož i jiných serinových proteas, jako prolylendopeptidasy a Ig AI proteasy. Thrombin jako poslední enzym v koagulačním systému štěpí rozpustný fibrinogen na fibrin, který se sřazuje a tvoří nerozpustný gel za vzniku matrice krevní sraženiny (thrombu). Při poruše cévy je tento postup nutný, aby se zabránilo krvácení. Za normálních podmínek není v plasmě přítomno měřitelné množství thrombinu. Zvýšená koncentrace thrombinu může vést ke tvorbě sraženin, které vedou k thromboembolickému onemocnění, jednoho z nejvážnějších současných lékařských problémů.

Thrombin přispívá k hemostatické kontrole několika biologickými reakcemi. Kromě své primární funkce, konverze fibrinogenu na fibrin, thrombin aktivuje faktor XIII, který je odpovědný za síťování fibrinu. Thrombin také působí pozitivním zpětně působícím mechanismem zahrnujícím aktivaci faktorů V a VIII, které jsou oba nutné pro jejich vlastní tvorbu z prothrombinu. Thrombin má další základní úlohu: tím, že se váže na krevní destičky, iniciuje uvolňování destiček a jejich shlukování, děj primárně odpovědný za hemostasu.

Reakce thrombinu jsou dále kontrolovány přirozenými inhibitory v plasmě. Nejdůležitější z nich jsou antithrombin III a heparin. Tyto dvě sloučeniny byly iso-

lovány a jsou terapeuticky a profylakticky používány za podmínek, kdy jsou v nerovnováze v hemostatickém mechanismu s rizikem pro aktivaci prothrombinu.

Syntetické inhibitory thrombinu s orální účinností by byly použitelnými alternativami pro parenterální aplikace těchto přírodních inhibitorů. Převážná část dosavadního výzkumu v této oblasti vedla k syntese dobrých inhibitorů thrombinu *in vitro*, ale až dosud není skutečně dobrý kandidát pro orální použití. Několik dobrých krátkých peptidických substrátů pro thrombin bylo připraveno imitací sekvence aminokyselin ve fibrinogenu. Tyto peptidické substráty byly také transformovány na inhibitory enzymu. Tak chromogenní substráty D-Phe-Pro-Arg-pNA a D-Phe-Pip-Arg-pNA napodobují sekvenci předcházející štěpení vazby thrombinem. Odpovídající reversibilní a ireversibilní inhibitory D-Phe-Pro-Arginal a D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl vykazují *in vitro* inhibici v rozmezí 10⁻⁸ M.

Chlormethylketony jsou obecně příliš nespecifická reakční činidla, aby byla ideální pro terapeutické použití a peptidické aldehydy uváděné jako příklad výše mají zcela nízké hodnoty LD₅₀.

Faktor Xa je koagulační enzym odpovědný za tvorbu thrombinu omezenou proteolysou svého zymogenu, prothrombinu. *In vivo* je na bázi hmot./hmot. faktor Xa alespoň 10 x více thrombogenní než thrombin. To vyplývá z faktu, že faktor Xa je v rozšiřujícím se kaskádovém systému o jeden stupeň výše nad thrombinem tak, že jedna molekula faktoru Xa může generovat ze svého prekursoru mnoho molekul thrombinu. Jeho účinnost může také být způsobena poměrně pomalým odstraňováním faktoru Xa z těla. Thrombin na rozdíl od faktoru Xa se rychle odstraňuje z cirkulující krve do vysoce příbuzných míst na stěně cévy. Centrální posice faktoru Xa na spojení vnitřních a vnějších metabolických cest může z něj tvořit vhodný objekt pro modulace hemostatického mechanismu.

Kallikrein se tvoří z prekallikreinu působením faktoru XII při umístění na povrch s negativním nábojem. Kallikrein naopak může štěpit faktor XII na faktor XIIa a tvořit tak reciproční aktivační systém. Faktor XIIa je prvním enzymem vnitřní části koagulačního systému. Význam kontaktního systému spočívá pravděpodobně v povrchově zprostředkovaném obranném mechanismu a aktivaci systému ve velkém měřítku, které jsou normálně patrné během šoku nebo roztroušené intravaskulární koagulaci (DIC). Role kallikreinu v tomto stadiu spočívá ve štěpení vysokomolekulárního kininogenu s uvolňováním vasodilátoru, bradykininu. Bradykinin také způsobuje zvýšenou vaskulární permeabilitu, bolest a migraci neutrofilních leukocytů. Bylo nalezeno, že inhibitory tvorby kininu mají pozitivní význam při léčení určitých typů zánětů, včetně arthritidy a pankreatitidy a jsou také použitelné při léčení astma. Jediná látka, která dospěla jako inhibitor kallikreinu k uplatnění v klinické praxi, je aprotinin (Trasylol). Aprotinin je polypeptidem molekulární hmotnosti 6500, který tvoří stabilní komplex s proteasou a má vazebnou konstantu 10^{-10} až 10^{-13} M.

Fibrinolýza je proces, který způsobuje enzymatické rozpouštění fibrinogenu a fibrinových chuchvalců. Plasma obsahuje protein plasminogen, který se působením různých aktivátorů převádí na plasmin, proteolytický enzym, jehož aktivita se podobá aktivitě trypsinu. Plasmin štěpí fibrinogen a fibrin na fibrin/fibrinogen degradační produkty.

Za normálních podmínek je fibrinolytický systém v rovnováze s koagulačním systémem. Malé krevní chuchvalce (thromby) vzniklé v krevním oběhu se mohou enzymaticky rozpustit a průtok cévami se může upravit aktivací fibrinolytického systému v těle. Jestliže je fibrinolytická aktivita příliš vysoká, může způsobit delší

krvácení. Tato aktivita se může inhibovat přirozenými inhibitory v krvi.

Prolylendopeptidasa štěpí peptidické vazby na karboxylové části prolinových zbytků s peptidickým řetězcem. Serin proteasa pak snadno degraduje řadu neuropeptidů, včetně látky P, neurotensinu, hormonu uvolňujícího thyrotropin a hormonu uvolňujícího luteinizační hormon a které jsou spojeny se schopností buněk produkovat interleukin 2 (IL-2). Tento enzym je inhibován benzyloxykarbonylprolylprolinalem s $K_i = 14$ nM. Přestože není téměř nic známo o fyziologické roli prolylendopeptidasy, může tato hrát prominentní roli při regulaci biologických aktivit různých neuropeptidů.

Ig A proteinasou katalysované štěpení Ig A, dominantní forma protilátek, která zahrnuje první linii obrany proti infekci, odděluje Fc od antigen-vázajících Fab oblastí molekuly. Dalo by se očekávat, že toto štěpení by rušilo nebo ničilo antimikrobiální aktivitu. Veškeré Ig A identifikované proteinasy tak štěpí po prolinovém zbytku v koncové oblasti lidské Ig A. Peptid prolyl-boronové kyseliny inhibují Ig A 1 proteinasy z *Neisseria gonorrhoea* a *Haemophilus influenzae*, což naznačuje, že tyto enzymy patří ke skupině serin proteas proteolytických enzymů.

Vícenásobná role, jež má thrombin v různých fyziologických procesech, které jsou spojeny s patologickými poruchami, jako je rakovina, záněty a nervové poruchy, ukazuje na možnost použití inhibitorů thrombinu u některých indikací, které nejsou striktně vázány na kardiovaskulární systém.

Bylo nalezeno, že mnoho nádorových buněk vykazuje prokoagulační účinky spojené s vývinem thrombinu. Jako důsledek vzniká lokální fibrinový deposit a koagulace, které se zdají být důležité pro růst nádoru. Navíc

díky působení na endoteliální buňky může thrombin usnadňovat uvolňování nádorových buněk během metastasy mimo cévy. Inhibitory thrombinu tak mohou být užitečné nejen při léčení určitých typů rakoviny, ale také při redukci hyper-srážlivosti, která je často pozorována u pacientů během léčení chemoterapeutickými prostředky.

Aktivace endoteliálních buněk thrombinem indukuje řadu změn vyvolávajících záněty, jako je syntéza uvolňování interleukinu-1, prostaglandinů a faktoru aktivujícího destičky. Dále thrombin indukuje objevení GMP-140 a CD63, dvou adhesivních molekul odpovědných za adhezi leukocytů na endoteliální povrch. Thrombin také zvyšuje cévní permeabilitu pro proteiny, jevu, který zahrnuje neurofilní částice a štěpí interleukin-8-prekursorový protein, peptid, o kterém se předpokládá, že je účasten při respiračních poruchách, revmatické artritidě a žaludeční kolitidě.

Jeho zapojení ve všech těchto procesech vyvolávajících zánět poskytuje možnost, že lze thrombin užít pro léčení chorob vyvolaných zánětem pomocí inhibitorů thrombinu.

Účinek proteasy nexinu-1, modulátoru nervového růstu a specifického přírodního antagonistu thrombinu, se významně a specificky snižuje u pacientů s Alzheimerovou nemocí. Toto spolu s pozorováním, že aktivita obdobná thrombinu byla zvýšená v mozcích pacientů s Alzheimerovou nemocí, naznačuje, že inhibitory thrombinu mohou mít potenciál pro omezení nebo zvrácení neurálních patologických změn spojených s thrombinovou hyperaktivitou.

Boronové kyseliny byly studovány jako inhibitory různých serinových esterás a proteas. První analog aminokyseliny obsahující boronovou kyselinu, který byl použit jako inhibitor proteasy, byl analog boronové kyseliny od N-acetyl-L-fenylalaninu, který byl použit jako inhibitor chymotrypsinu a subtilisinu. Peptidické borono-

vé kyseliny byly použity jako inhibitory chymotrypsinu, subtilisinu a elastase.

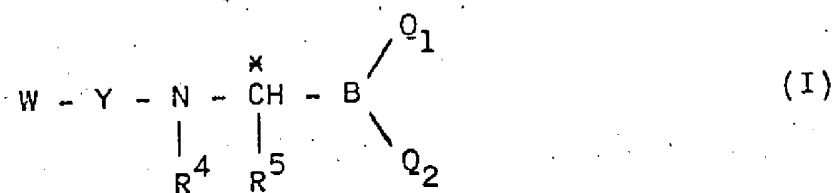
Interakce boronových kyselin s proteasami v biologických systémech je známá a bylo nalezeno, že různé jednoduché boronové kyseliny jsou v podstatě netoxické při použití u lidí. Inhibitory elastase typu peptidických boronových kyselin byly nedávno použity v živočišných pokusech ve vztahu k rozedně. Na rozdíl od peptidických chlormethylketonů, nebyla uváděna žádná toxicita při biologicky účinných dávkách.

Evropská přihláška vynálezu EPA 293 881 popisuje přípravu peptidů obsahujících deriváty lysinu, ornithinu a argininu s C-terminálními boronovými kyselinami a jejich použití jako inhibitorů serinových proteas podobných trypsinu. Ostatní aminokyseliny v peptidech jsou všechny buď D- nebo L-formy 20 aminokyselin vyskytujících se v přírodě.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že lze získat sloučeniny, které mají vynikající vlastnosti inhibitorů serinových proteas podobných trypsinu, jestliže peptid obsahuje alespoň jednu nepřirodní α -aminokyselinu mající hydrofobní postranní řetězec.

Podstatou vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I



kde W je atom vodíku nebo N-chránicí skupina,

Y je sekvence n aminokyselin zvolená tak, že n+1 peptid s aminokyselinou Y-Lys nebo Y-Arg má afinitu k aktivnímu místu proteasy trypsinového typu, kde n je celé číslo od 1 do 10, s výhodou 1 až 4, a kde alespoň jedna aminokyselina je nepřirodní aminokyselinou mající hydrofobní postranní řetězec,

Q_1 a Q_2 , které mohou být stejné nebo různé, jsou vybrány ze skupiny zahrnující -OH, -COR₁, -CONR₁R₂, -NR₁R₂ a OR₃, nebo Q_1 a Q_2 spolu dohromady tvoří diolový zbytek, R₁, R₂ a R₃, které mohou být stejné nebo různé, jsou alkylová skupina s 1 až 10 atomy uhlíku, arylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, arylalkylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku nebo fenylová skupina substituovaná až 3 skupinami vy-

~~brány ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, atom halogenu a alkoxyskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,~~

R₄ je atom vodíku nebo alkylová skupina s 1 až 10 atomy uhlíku,

R₅ je skupina -A-X, kde A je -(CH₂)_z-, kde z je 2, 3, 4 nebo 5, -CH(CH₃)-(CH₂)₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -(CH₂)₂-CH(CH₃)-, -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-(CH₂)₃-, -CH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂-, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -(CH₂)₃-CH(CH₃)-, -(CH₂)₃-C(CH₃)₂ : arylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, arylalkylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, a

X je -NH₂, -NH-C(NH)-NH₂, -S-C(NH)-NH₂-, -N₃, alkoxy- skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, alkylthioskupina s 1 až 4 atomy uhlíku nebo -Si(CH₃)₃ nebo

R₄ a R₅ spolu dohromady tvoří trimethylenovou skupinu a asymetrický atom uhlíku označený * může mít D- nebo L-konfiguraci, nebo znamená jakoukoliv jejich směs.

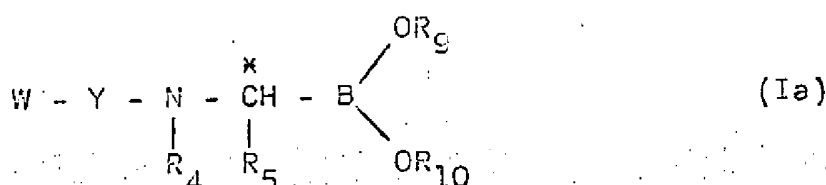
Nepřirodní aminokyselinou se rozumí jakákoliv aminokyselina jiná než D- nebo L- Ala, Arg, Asp, Cys, Gln,

Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr nebo Val.

Výhodnou N-chránicí skupinou W je skupina vzorce $H(CH_2CH_2O)_p-$, kde p je 3 až 30, R_6CO- , R_7OCO- nebo R_8SO_2- , kde R_6 je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku, R_7 je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku, fenyl, benzyl nebo naftyl, a R_8 je fenyl, naftyl nebo alkylfenyl s 1 až 4 atomy uhlíku v alkyly, přičemž skupina R_7OCO- je výhodná. Nejvýhodnější chránicí skupiny jsou ty skupiny vzorce $R_7'OCO-$, kde R_7' je terc.butyl (zde označovaný Boc) a kde R_7' je benzyl (zde označovaný Z).

Výhodnou skupinou R_5 je skupina R_5' , kde R_5' je $-(CH_2)_{z'}-X'$, kde X' je $-NH_2$, $-NH-C(NH)-NH_2$, $-N_3$ nebo $-Si(CH_3)_3$ a z' je 2, 3 nebo 4.

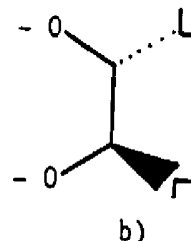
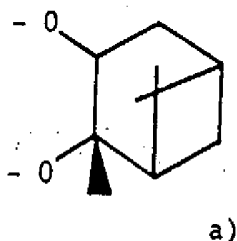
Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny obecného vzorce Ia



kde W, Y, R_4 a R_5 mají výše uvedený význam a R_9 a R_{10} představují zbytek dihydroxysloučeniny.

Jako příklady lze uvést 2,3-butandiol, katechol, 2,3-dimethyl-2,3-butandiol, cyklohexandiol, ethylen-glykol, 1,2-hexandiol, 2,3-hexandiol, diethanolamin nebo alifatické nebo aromatické sloučeniny s hydroxyskupinami, které jsou substituovány na přilehlých atomech uhlíku nebo na atomech uhlíku substituovaných jinými atomy uhlíku.

Obzvláště výhodné jsou sloučeniny, ve kterých Q_1 a Q_2 spolu dohromady tvoří skupinu OPin vzorce a) nebo skupinu vzorce b)



Aminokyseliny tvořící Y jsou α -aminokyseliny, které mohou být vybrány z L-aminokyselin přírodně se vyskytujících v proteinech, jejich odpovídajících enantiomerních D-aminokyselin nebo chemicky modifikovaných α -aminokyselin, jako je γ -piperidid glutamové kyseliny

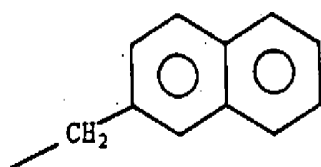
(Glu N ) nebo pipekolová kyselina (Pip), přičemž

alespoň jedna aminokyselina je nepřirodní aminokyselina, mající hydrofobní postranní řetězec.

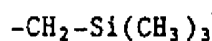
Výhodnými nepřirodními aminokyselinami jsou aminokyseliny obecného vzorce II



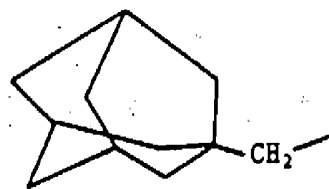
kde R_{11} je hydrofobní skupina. Výhodné hydrofobní skupiny sestávají z methylenové skupiny vázané na popřípadě polární skupinu substituovanou aromatickou skupinu nebo na alicyklickou skupinu mající alespoň dva kruhy a žádné polární substituenty, nebo na terc. butylovou skupinu nebo na trimethylsilylovou skupinu. Výhodnou skupinou R_{11} je skupina R_{11}' , kde R_{11}' je skupina vzorce c), d), e), f), g), h) nebo i)



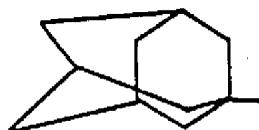
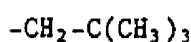
c)



d)

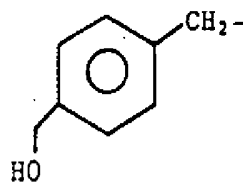


e)

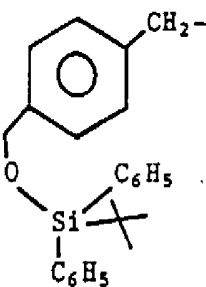


f)

g)



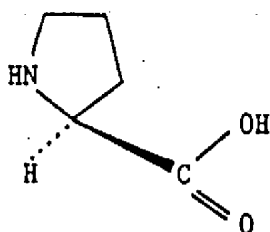
h)



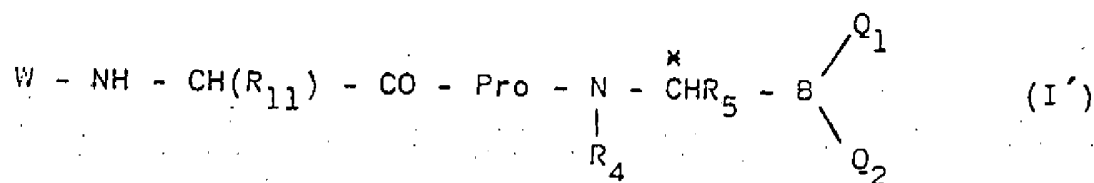
i)

Nepřirodní aminokyseliny vzorce II mohou být v D- nebo L-formě nebo v jakékoliv jejich směsi, avšak výhodná je D-forma.

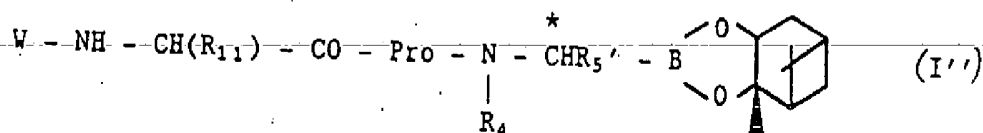
Ještě výhodnějšími jsou inhibitory thrombinu obecného vzorce I, kde Y je sekvence dvou aminokyselin, z nichž N-terminální aminokyselina je nepřirodní aminokyselina a druhá aminokyselina je L-prolin (Pro) vzorce



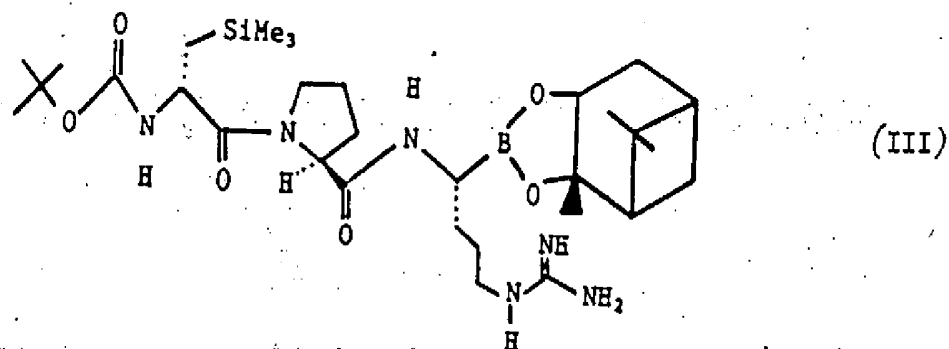
Tyto výhodnější sloučeniny mají obecný vzorec I'



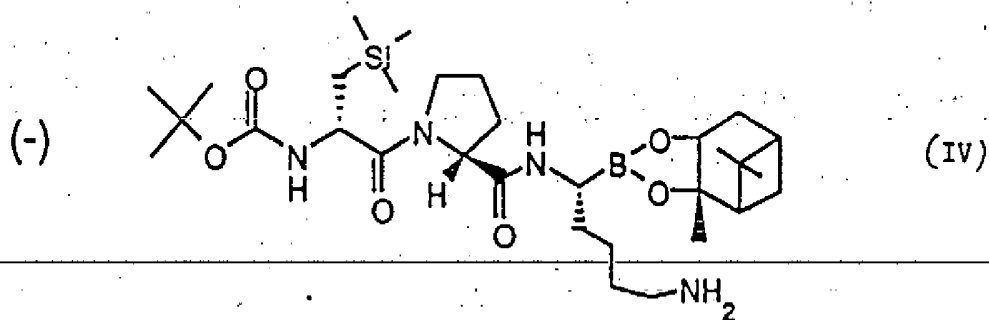
kde W, R₄, R₅, R₁₁, Q₁ a Q₂ mají výše uvedený význam.
Zvláště výhodné jsou sloučeniny obecného vzor-
ce I''



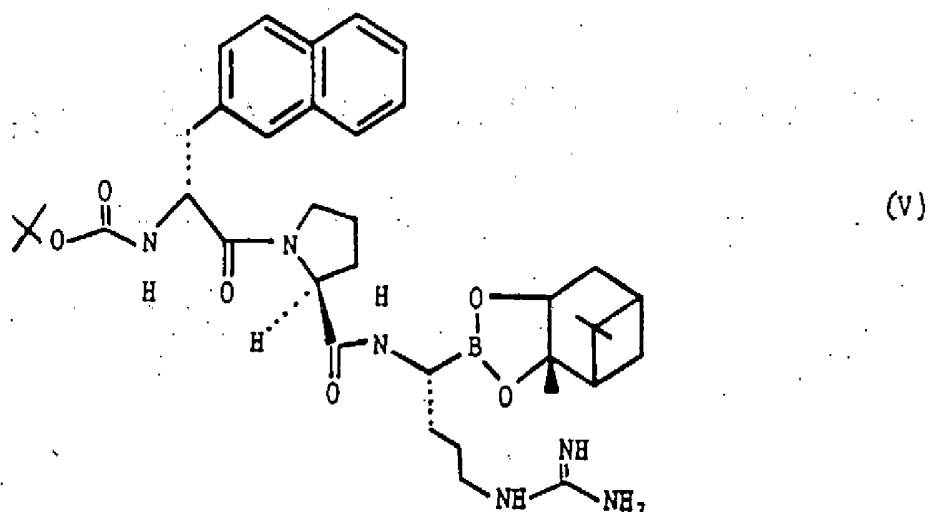
kde W, R₄, R₅ a R₁₁ mají výše uvedený význam.
Nejvýhodnějšími sloučeninami jsou sloučenina
vzorce III.



sloučenina vzorce IV



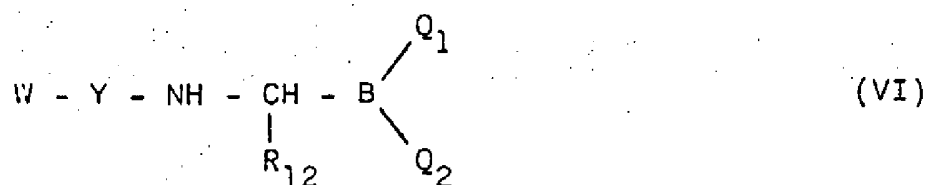
a sloučenina vzorce V



U peptidu se předpokládá, že má afinitu k aktivnímu místu proteasy trypsinového typu, jestliže má tento peptid hodnotu disociační konstanty 10^{-3} M nebo nižší.

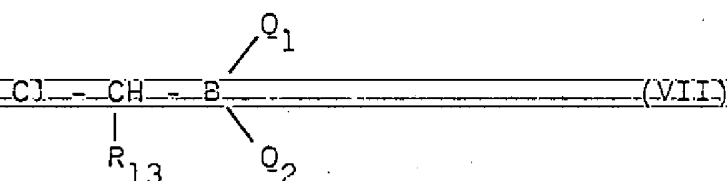
Sloučeniny obecného vzorce I, kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ lze připravit reakcí sloučeniny obecného vzorce I, kde X je $-\text{NH}_2$, reakcí s kyanamidem v organickém rozpouštědle za působení silné kyseliny. Sloučeniny, kde X je $-\text{NH}_2$, lze zase připravit hydrogenací sloučeniny obecného vzorce I, kde X je $-\text{N}_3$. Hydrogenace se může provádět za standardních podmínek, například za použití palladia na uhlí jako katalysátoru.

Sloučeniny obecného vzorce I, kde X je $-\text{N}_3$, lze připravit reakcí sloučeniny obecného vzorce VI

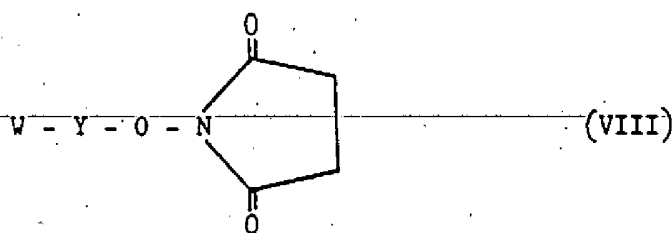


kde W, Y, Q₁ a Q₂ mají výše uvedený význam a R₁₂ je -A-Br, kde A má výše uvedený význam, s azidem sodným v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je dimethylsulfoxid. Sloučeniny obecného vzorce I, kde X je alkylthioskupina, lze připravit reakcí sloučeniny obecného vzorce VI s thiolem v přítomnosti organické base, jako je guanidin.

Meziprodukty obecného vzorce VI, jakož i sloučeniny obecného vzorce I, kde X je -Si(CH₃)₃ nebo alkoxyskupina, lze připravit reakcí sloučeniny obecného vzorce VII



kde Q₁ a Q₂ mají výše uvedený význam a R₁₃ je skupina -A-Br, -A-Oalkyl nebo -A-Si(CH₃)₃, kde A má výše uvedený význam, se sloučeninou vzorce LiN/Si(CH₃)₃/2, načež se provede hydrolysa se 3 molárními ekvivalenty kyseliny a kopulací s chráněným peptidem obecného vzorce VIII



kde W a Y mají výše uvedený význam.

Reakce se s výhodou provádí v bezvodém aprotickém polárním rozpouštědle, například v tetrahydrofuranu, při teplotě mezi -78 °C a teplotou místnosti.

Meziprodukty obecného vzorce VII lze připravit postupem podle práce Matteson a j., *Organometallics* 3, 1284-8 (1984).

Chráněný peptid obecného vzorce VIII lze připravovat postupy běžnými v chemii peptidů, přičemž se vychází z požadované nepřirodní aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou buď obchodně dostupné (například aminokyselina, kde R_{11} je skupina vzorce c)) nebo je lze připravit postupy analogickými postupům popsaným v literatuře, například *Angew. Chem.* 93, 793 (1981) a *J. Am. Chem. Soc.* 109, 6881 (1987).

Sloučeniny obecného vzorce I jsou použitelné jako inhibitory proteas trypsinového typu a lze je použít in vitro pro diagnostické a mechanické studie těchto enzymů. Dále je lze, vzhledem k jejich inhibičnímu působení, použít při prevenci a léčení chorob způsobených nadbytkem enzymu v regulačním systému, například ke kontrole koagulace fibrinolysního systému.

Ty sloučeniny podle vynálezu, které jsou inhibitory thrombinu nebo faktoru Xa, mají antithrombogenní vlastnosti a lze je použít vždy, je-li třeba podávat antithrombogenní činidlo. Obecně se tyto sloučeniny podávají hostiteli orálně nebo parenterálně, čímž se dosáhne antithrombogenního účinku. V případě větších savců, jako jsou lidé, se sloučeniny mohou podávat samotné nebo v kombinaci s farmaceutickými nosiči nebo ředidly v dávce od 0,02 do 15 mg/kg tělesné hmotnosti a s výhodou 1 až 10 mg/kg, čímž se dosáhne antithrombogenního účinku. Sloučeniny lze podávat jako jednu dávku nebo v rozdělených dávkách nebo jako přípravek se zpožděným uvolňováním. Má-li být pro pacienta zřízen mimotělní krevní oběh, podává se 0,1 až 1 mg/kg intravenózně. Pro použití u čisté krve se k zabránění koagulace použije od 1 do 10 mg na 1 litr.

Jako farmaceutická ředidla lze použít známé látky, jako cukry, škroby a vodu, jejichž pomocí lze připravit tablety, kapsle, injikovatelne roztoky a pod. Sloučeniny podle vynálezu lze dále přidávat ke krvi za účelem zabránění její koagulace v jejich sběrných nádobách, v trubkách nebo implantačním zařízeních, ve kterých se krev přechovává.

Výhodou sloučenin podle vynálezu je jejich orální účinnost, rychlý náběh účinnosti a nízká toxicita. Navíc mají sloučeniny podle vynálezu speciální použití při léčení jedinců, kteří jsou hypersensitivní na sloučeniny, jako je heparin.

V následujících příkladech mají použité symboly následující významy :

Z	= benzyloxykarbonyl
Boc	= terc.butoxykarbonyl
Ac	= acetyl
MeOH	= methylalkohol
EtOAc	= ethylacetát
DCC	= dicyklohexylkarbodiimid
HONSu	= N-hydroxysukcinimid
OPin	= pinandiol
THF	= tetrahydrofuran
n-Bu	= n-butyl
Np	= p-nitrofenyl
TLC	= chromatografie na tenké vrstvě
Bzl	= benzyl
Baa	= $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br})\text{B}-$
TMSal	= trimethylsilýlalanin
Adal	= adamantylalanin
Naphal	= 2-naftylalanin
BoroGrn	= $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{B}-$
BoroArg	= $-\text{NH}-\text{CH}-/\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2/\text{B}-$
Adgly	= 1-adamantylglycin
BoroProOPin	= analog prolinu, kde $-\text{COOH}$ skupina je nahrazena skupinou B-OPin
BoroLys	= $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{B}-$

BoroHArg = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)\text{B}-$
BoroMpg = $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_3)\text{B}-$
p-OH-Me-Phal = p-hydroxymethyl-fenylalanin
p-TBDPS-O-Me-Phal = p-terc. butyldifenylsilyloxymethyl-
fenylalanin.

Kinetické parametry K_1 , K_{on} a K_{off} se stanoví jako inhibice enzymem katalysované hydrolysy peptid-arg-pNa. Hydrolysa poskytuje p-nitroanilin a jeho uvolňování v závislosti na čase se kvantifikuje měřením optické propustnosti při 405 nm. Stanovují se tak rychlosti inhibovaných a neinhibovaných reakcí.

Kinetická měření se provádějí na testovací desce s 96 prohlubněmi kombinované s kinetickým čtecím zařízením s jednou buňkou. Aktivní místo lidského thrombinu se titruje tak, že se rozpustí v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,4 obsahujícího 0,1 M NaCl a 0,1 % albuminu z hovězího sera na zásobní roztok obsahující 400 nM aktivního enzymu. Pro chromogenní test se tento roztok rozpustí ve stejném pufru na 0,4 nM. Substrát, 2AcOH-H-D-cyklohexyl-ala-arg-pNa, se rozpustí ve stejném pufru na 0,5 mM koncentraci. Inhibitory se nejprve rozpustí ve směsi cremophor/ethanol-1:1 a pak se zředí destilovanou vodou na 1 mM zásobní roztok. Další zředění se provádějí výše popsaným fosfátovým pufrem.

Testy se iniciují přidáním 100 μl enzymového roztoku ke směsi obsahující 100 μl inhibitoru a 50 μl roztoku substrátu. Uvolňování p-nitroanilinu hydrolysou peptidyl-p-nitroanilidu jako substrátu se sleduje 30 minut až 1 hodinu měřením zvýšení optické propustnosti při 405 nm. Získaná data se použijí pro výpočet kinetických parametrů v přítomnosti a bez přítomnosti inhibitoru. I když se nevylučují jiné mechanismy účinku, charakterisace této skupiny inhibitorů thrombinu se omezuje na dva hlavní pozorované mechanismy, jmenovitě na rychlou,

reversibilní a pomalou, pevně vázanou kompetitivní inhibici. Kinetické konstanty těchto inhibitorů probíhající rychlým reversibilně vázaným mechanismem, jmenovitě rychlou vazbou (s počáteční rychlostí v_0 kontroly $> v_0$ s inhibitorem) při $I_t \gg E_t$ (celková inhibiční koncentrace/celková koncentrace enzymu) se vypočítávají lineárně regresivní metodou z křivky $1/v$ proti koncentraci inhibitoru $/I/$. Hodnota K_i se vypočítává z horizontálního průsečíku $K_{i,app}$ rovnicí (1)

$$K_{i,app} = K_i (1 + S/K_M) \quad (1)$$

Jestliže rychlost interakce s enzymem je pomalá (v_0 není ovlivněna inhibitorem) a pevná (K_i je blízké nebo nižší než E_t) tak, že se inhibice rovnovážné rychlosti dosahuje pouze pomalu, průběh tvorby pNa je pak popsán rovnicí (2)

$$P = V_s t + \frac{(V_0 - V_s)}{K_{obs}} / 1 - \exp(-K_{obs} t) \quad (2)$$

kde P je množství vzniklé pNa za dobu t , V_0 je původní rychlost, V_s je rychlost v rovnovážném stavu a K_{obs} je zdánlivá celková reakční rychlost jako funkce E_t , I_t , $K_{i,app}$ a pozorované rychlostní konstanty druhého řádu (K_{on}) pro interakci mezi inhibitorem a enzymem. Údaje z měření pomalé, pevně vázané inhibice se zpracují rovnicí (2) nelineární regresní analýsou, která poskytne výpočty K_{obs} . Hodnoty pro K_{on} , K_{off} a $K_{i,app}$ se pak získají z grafu K_{obs} versus $/I/$. Hodnoty pro K_{off} jsou dány vertikálním průsečíkem, zatímco hodnoty K_{on} a K_i se vypočítávají ze strmosti a horizontálního průsečíku, popřípadě použitím rovnice (1).

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Boc-TMSal-Pro-NH-CH/(CH₂)₃N₃/DOPin

A) Boc-D-TMSal-OH

D-TMSal-ethylester (21,5 g, 113,7 mmol), připravený postupem podle Angew. Chem. 93, 793 (1981), se rozpustí v CH₂Cl₂ a přidá se roztok nadbytku Boc₂O v CH₂Cl₂. Po 15 hodinách při teplotě místnosti se přidá 500 ml ledem ochlazené 0,25 N kyseliny chlorovodíkové. Organická vrstva se promyje 5 % NaHCO₃ a roztokem chloridu sodného, potom se vysuší Na₂SO₄ a zahustí se za sníženého tlaku.

Surová látka (bezbarvý olej) se použije přímo ve znydelňovacím stupni. Rozpustí se v methanolu, ochladí se na 0 °C, smísí se s 510 ml 1N NaOH a míchá se při teplotě 0 °C po dobu 3 hodin. Po okyselení 1N kyselinou chlorovodíkovou na pH 1 se směs několikrát extrahuje etherem. Organické vrstvy se spojí, promyjí roztokem chloridu sodného, vysuší se Na₂SO₄ a zahustí se za sníženého tlaku. Produkt (29,7 g oleje) se použije v dalším stupni bez dalšího čištění.

B) Boc-D-TMSal-Pro-ONSu

Boc-D-TMSal-OH (29,7 g, 113,7 mmol) a p-nitrofenol (19,0 g, 136,3 mmol) se rozpustí v EtOAc. Po ochlazení na 0 °C se přidá DCC (23,4 g, 113,6 mmol) a směs se míchá 1 hodinu při teplotě 0 °C a potom 15 hodin při teplotě místnosti. Sraženina se odfiltruje a promyje EtOAc a filtrát se zahustí za sníženého tlaku. Vzniklý olej se čistí rychlou chromatografií (9:1 hexan/EtOAc) a získá se požadovaný produkt Boc-D-TMSal-ONp ve formě bílých krystalů.

Boc-D-TMSal-ONp (51,6 g, 113,7 mmol) se rozpustí v THF a přidá se vodný roztok ekvimolárních množství prolinu a Et_3N . Po 20 hodinách při teplotě místnosti se THF odstraní za sníženého tlaku a vodný zbytek se zředí vodou a potom se několikrát extrahuje EtOAc. U vodné vrstvy se hodnota pH upraví na 3 přidáním 10 % kyseliny citronové. Vzniklý olejovitý produkt se několikrát extrahuje EtOAc. Spojené organické vrstvy se promyjí roztokem chloridu sodného, vysuší se Na_2SO_4 a zahustí se za sníženého tlaku. Bezbarvý olej se překrystaluje ze směsi etheru a hexanu a získá se dipeptid Boc-D-TMSal-Pro-OH jako bílá krystalická sloučenina, teplota tání 176°C .

Získaný dipeptid (26,0 g, 72,5 mmol) se rozpustí v EtOAc. Po ochlazení na teplotu 0°C se přidá HONSu (9,8 g, 85,5 mmol) a DCC (14,9 g, 72,3 mmol). Směs se nechá při teplotě 0°C po dobu 3 hodin a potom při teplotě místnosti dalších 15 hodin. Směs se znovu ochladí na 0°C , dicyklohexylmočovina se odfiltruje a několikrát se promyje EtOAc. Filtrát se promyje vodným 0,1 M Na_2CO_3 a potom vodným 2 % KHSO_4 .

Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštění za sníženého tlaku se získá Boc-D-TMSal-Pro-ONSu ve formě bílé pěny.

C) Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin

Tento příklad popisuje třístupňový postup prováděný v jedné nádobě, který zahrnuje in situ tvorbu chirálního α -(bistrimethylsilyl)amidoboronátu, hydrolysu dvou trimethylsilylových skupin a kopulaci takto vzniklého α -aminoboronátu s aktivním esterem (Boc-D-TMSal-Pro-ONSu) připraveným ve stupni B. Všechny stupně reakce se provádějí v atmosféře argonu. Chirální α -chlorboronát ((+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-brombutan-1-boronát) (1,75 g, 5,0 mmol) se rozpustí v 2,5 ml THF a přidá se k předchlazenému (-78°C) roztoku

lithiumhexamethyldisilazanu (5 ml 1,0 M roztoku v hexanu, 5,0 mmol). Po 30minutovém míchání při teplotě -78°C se roztok nechá přes noc ohřát na teplotu místnosti. Potom se znovu ochladí na -78°C a přidají se 3 molární ekvivalenty kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Směs se ohřeje na teplotu místnosti a míchá se při této teplotě po dobu 2 hodin. Po opětovném ochlazení na -20°C se přidá roztok aktivního esteru ze stupně B (2,28 g, 5,0 mmol) v 6 ml CH_2Cl_2 a pak se přidá 1,39 ml (10,0 mmol) triethylaminu.

Reakční směs se míchá 1 hodinu při teplotě -13°C , pak se nechá ohřát na teplotu místnosti a míchá se při této teplotě po dobu 2 hodin. Potom se směs přefiltruje, filtrát se zahustí za sníženého tlaku, zbytek se zředí etherem a promyje se 2 N kyselinou chlorovodíkovou, 5 % NaHCO_3 a roztokem chloridu sodného. Organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek stáním vykrystaluje a získá se požadovaný chirální peptid-boronát ve formě bílé krystalické sloučeniny.

D) Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH/ $(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$ /BOPin

Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin, produkt ze stupně C, (804 mg, 1,2 mmol) se rozpustí v 13 ml dimethylsulfoxidu a přidá se azid sodný (156 mg, 2,4 mmol). Směs se míchá 3 hodiny při teplotě místnosti. Přidá se ether a ledová voda a ze směsi se ihned začínou vylučovat bílé krystaly. Bílá sraženina se odfiltruje a promyje etherem. Získá se 0,6 g azidu ve formě bílé krystalické sloučeniny.

P ř í k l a d 2

Boc-D-TMSal-Pro-BoroOrn-OPin

Azid z příkladu 1 (569 mg, 0,9 mmol) se rozpustí ve 25 ml EtOAc a hydrogenuje se v přítomnosti 0,5 g

10 % palladie na uhlí. Po 2,5 hodinách se katalysátor odstraní a roztok se zahustí za sníženého tlaku. Získá se bílá pěna, která se překrystaluje ze směsi EtOAc a etheru a získá se požadovaný produkt ve formě bílé krystalické sloučeniny, teplota tání 200 až 202 °C, $[\alpha]_D^{20} = -11,6^\circ$ (c = 0,5 v MeOH).

P ř í k l a d 3

Boc-D-TMSal-Pro-BoroArg-OPin (benzensulfonát)

Boc-D-TMSal-Pro-BoroOrn-OPin z příkladu 2

(250 mg, 0,412 mmol) se rozpustí ve 2 ml ethanolu. Přidá se benzensulfonová kyselina (65,2 mg, 0,412 mmol). Reakční směs se míchá 15 minut při teplotě místnosti, přidá se kyanamid (86,6 mg, 2,06 mmol) a směs se potom zahřívá k varu pod zpětným chladičem. Vývoj reakce se sleduje RP-TLC, přičemž se pozoruje úbytek skvrny ninhydrinu z výchozího aminu a objevení se Sakaguchiho pruhu produktu. Po 7 dnech, kdy již nebyl detekován žádný amín, se roztok zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v MeOH a chromatografuje se na koloně 5 x 55 cm Sephadexu LH-20 za použití MeOH.

Požadovaný produkt se získá ve formě bílé pěny, $[\alpha]_D^{20} = -45,3^\circ$ (c = 1 v CH₂Cl₂).

P ř í k l a d 4

Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₃N₃)B-OPin

A) (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-5-brompentan-1-boronát

4-brom-1-buten (20,8 ml, 203,3 mmol) se nechá reagovat s katecholboranem (24,4 g, 203,3 mmol) při teplotě 100 °C po dobu 16 hodin. Surový produkt se vakuo-

vě predestiluje a získá se 4-brombutan-1-boronát ve formě bílé krystalické sloučeniny.

(+)-pinandiol (27,7 g, 163 mmol) se rozpustí v THF a přidá se výše připravený 4-brombutan-1-boronát (41,6 g, 163 mmol). Po 1 hodině při teplotě místnosti se THF odstraní za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií (90:10 hexan/EtOAc). Získá se (+)-pinandiol-4-brombutan-1-boronát ve formě bezbarvého oleje.

Požadovaný (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-5-brompentan-1-boronát se připraví postupem podle práce popsané v *Organometallics* 3, 1284 (1984). Methylenchlorid (9,8 ml) v THF se ochladí na -100°C a během 20 minut se přidá n-butyllithium (71,6 ml 1,6 M roztoku, 114,5 mmol). Po 15 minutách při teplotě -100°C se přidá studený (-78°C) roztok (+)-pinandiol-5-brompentan-1-boronátu (32,8 g, 104,1 mmol) v THF. Po další 1 hodině se při teplotě -100°C přidá bezvodý ZnCl_2 (7,1 g, 52,0 mmol) v THF. Po dalších 15 minutách při teplotě -100°C se reakční směs ohřeje na teplotu místnosti a míchá se při této teplotě po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, zbytek se zředí směsí hexanu a vody a extrahuje se několikrát hexanem. Po vysušení Na_2SO_4 a odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku se získá (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-5-brompentan-1-boronát ve formě žlutého oleje, který se použije přímo v následujícím stupni bez dalšího čištění.

B) Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH((CH₂)₄Br)B-OPin

Roztok $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ (65,2 ml 1,0 M roztoku, 65,2 mmol) v THF se ochladí na -78°C . Přidá se α -chlor-boronát ze stupně A) (23,7 g, 65,2 mmol) v THF. Směs se míchá při teplotě -78°C po dobu 1 hodiny a potom při teplotě místnosti po dobu 15 hodin. Potom se reakční směs znovu ochladí na -78°C , přidá se kyselina chlorovodíková

(29,8 ml 6,56 N roztoku, 196 mmol) v dioxenu, roztok se míchá při teplotě -78°C po dobu 45 minut a potom při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Směs se ochladí na -15°C , přidá se Boc-TMSal-Pro-ONSu (29,7 g, 65,2 mmol) podle příkladu 1 v methylenchloridu, načež se přidá triethylamin (18,1 ml, 130,4 mmol), čímž se nastartuje kopulační reakce. Při teplotě -15°C se směs míchá 1 hodinu a potom 2 hodiny při teplotě místnosti. Směs se přefiltruje přes Hyflo a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se zředí směsí etheru a vody a extrahuje se několikrát etherem. Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštění za sníženého tlaku se získá požadovaný produkt Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH $((\text{CH}_2)_4\text{Br})$ B-OPin, který po krystalisaci ze směsi etheru a hexanu poskytne bílou krystalickou sloučeninu, teplota tání 74°C .

C) Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH $((\text{CH}_2)_4\text{N}_3)$ B-OPin

Produkt ze stupně B) (33,3 g, 48,6 mmol) se rozpustí v dimethylsulfoxidu a přidá se azid sodný (6,3 g, 97,2 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Přidá se ether a ledová voda a směs se několikrát extrahuje etherem. Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštění za sníženého tlaku vzniklý olej vykristaluje. Získá se Boc-D-TMSal-Pro-NH-CH $((\text{CH}_2)_4\text{N}_3)$ B-OPin ve formě bílé krystalické sloučeniny, teplota tání 69 až 70°C , $\alpha_{\text{D}} = -74,4^{\circ}$ ($c = 1,0$ v MeOH).

P ř í k l a d . 5

Boc-D-TMSal-Pro-BoroLys-OPin

Azid z příkladu 4 (22,0 g, 34,0 mmol) se rozpustí v EtOAc a hydrogenuje se v přítomnosti 4,0 g 10 % palladia na uhlí. Po 9 hodinách se katalysátor odstraní a roztok se zahustí za sníženého tlaku. Vzniklá pěna se

rozpustí v EtOAc a překrystalováním se získá požadovaný produkt Boc-D-TMSal-Pro-BoroLys-OPin ve formě bílých krystalů, teplota tání 128 až 129 °C, $\alpha_D = -59,6^\circ$ ($c = 1,0$ v MeOH).

P ř í k l a d 6

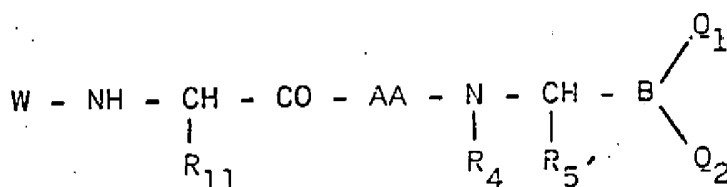
Boc-D-TMSal-Pro-Boro^HArg-OPin (benzensulfonát)

Benzensulfonát sloučeniny Boc-D-TMSal-Pro-BoroLys-OPin z příkladu 5 se rozpustí v ethanolu. Přidá se kyanamid (210 mg, 5,0 mmol) a směs se zahřívá k varu. Průběh reakce se sleduje RT-TLC, přičemž se pozoruje úbytek skvrny ninhydrinu z výchozího aminu a objevení se Sakaguchiho pruhu produktu. Po 7 dnech, kdy již nebyl detekován žádný amin, se roztok zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v MeOH a chromatografuje se na koloně 5 x 55 cm Sephadexu LH-20 za použití MeOH.

Požadovaný produkt se získá ve formě bílé pěny, $\alpha_D = -40,8^\circ$ ($c = 0,5$ v CH_2Cl_2).

P ř í k l a d y 7 až 29

Postupy analogickými postupům podle příkladů 1 až 6 se připraví sloučeniny obecného vzorce



kde R_4 , R_5 , R_{11} , O_1 a O_2 a AA mají významy uvedené v následující tabulce I.

T a b u l k a I

příkl.	W	R ₁₁	R ₄	R ₅	Q ₁ +Q ₂	AA	$[\alpha]_D^{20}$	c	rozpuštědlo
7	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-27,8	0,5	ethanol
8	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-75,0	1,0	methylenchlorid
9	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ N ₃	a)	Pro	-64,7	0,51	methylenchlorid
10	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₂ SiMe ₃	a)	Pro	-57,0	0,5	methylenchlorid
11	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₂ SiMe ₃	a)	Pro	-59,3	1,0	methylenchlorid
12	Ac	c)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-80,2	0,5	methylenchlorid
13	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-42,3	0,5	methylenchlorid
14	Boc	c)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-18,8	0,5	ethanol
15	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-61,7	0,41	methylenchlorid
16	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Pro	-52,4	0,54	methylenchlorid
17	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	b)	Pro	-35,8	1,0	ethylacetát
18	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-10,6	0,5	methylenchlorid
19	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	b)	Gly	+ 8,8	0,5	ethylacetát
20	Ac	c)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-78,6	0,75	methylenchlorid
21	Boc	e)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	b)	Gly	-4,4	0,5	methylenchlorid

pokračování tabulky I

příkl.	W	R ₁₁	R ₄	R ₅	Q ₁ +Q ₂	AA	α/D^{20}	c	rozpuštědlo
22	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ -N ₃	a)	Pro	-76,0 °	0,5	methylenchlorid
23	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	a)	Pro	-25,4 °	0,5	methylenchlorid
24	Boc	f)	H	-(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂	a)	Pro	-34,8 °	0,5	methylenchlorid
25	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	a)	Gly	-14,7 °	1,0	methanol
26	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Gly	-30,6 °	0,5	ethanol
27	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ NH ₂	a)	Asp	-18,4 °	0,5	methanol
28	H	d)	H	-(CH ₂) ₃ NH ₂	a)	Pro	-53,6 °	0,32	methanol
29	Boc	d)	H	-(CH ₂) ₄ OC ₂ H ₅	a)	Pro	-54,2 °	0,5	methanol

P ř í k l a d 30

Boc-D-TMSal-Pro-BoroHpg-OPin

A) (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-methoxybutan-1-boronát

3-methoxy-1-propen (6,0 g, 83,3 mmol) se nechá reagovat s katecholboranem (10,0 g, 83,3 mmol) při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Surový produkt se předestiluje za sníženého tlaku a získá se 3-methoxypropan-1-boronát ve formě bezbarvého oleje. (+)-pinandiol (10,6 g, 62,5 mmol) se rozpustí v THF a přidá se k němu výše připravený 3-methoxypropan-1-boronát (12,0 g, 62,5 mmol). Po 1 hodině při teplotě místnosti se THF odstraní za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií (80:20 hexan/EtOAc). Získá se (+)-pinandiol-3-methoxypropan-1-boronát ve formě bezbarvého oleje.

Požadovaný (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-methoxybutan-1-boronát se připraví postupem podle Organometallics 3, 1284 (1984). Methylenchlorid (2,2 ml) v THF se ochladí na teplotu -100 °C a během 20 minut se přidá n-butyllithium (13,8 ml 1,6 N roztoku, 22,0 mmol). Po 15 minutách při teplotě -100 °C se přidá roztok (+)-pinandiol-3-methoxypropan-1-boronátu (5,04 g, 20 mmol) v THF a dále se přidá bezvodý $ZnCl_2$ (1,42 g, 10,0 mmol). Po dalších 15 minutách při -100 °C se reakční směs ohřeje na teplotu místnosti a při této teplotě se míchá po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, zbytek se zředí etherem a promyje se vodou. Organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a zahustí se na olej, který se čistí rychlou chromatografií (9:1 hexan/EtOAc) a získá se požadovaný (+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-methoxybutan-1-boronát ve formě bezbarvého oleje.

B) Boc-D-TMSal-Pro-BoroMpg-OPin

Roztok $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ (5 ml 1,0 M roztoku, 5,0 mmol) v THF se ochladí na -78°C . Přidá se α -chlorboronát ze stupně A) (1,53 g, 5,0 mmol) v THF. Směs se míchá 1 hodinu při -78°C a potom 15 hodin při teplotě místnosti. Potom se reakční směs znovu ochladí na -78°C , přidá se kyselina chlorovodíková (2,7 ml 5,65 N roztoku, 15,0 mmol) v dioxanu a roztok se míchá 30 minut při teplotě -78°C a potom 2 hodiny při teplotě místnosti. Směs se ochladí na -15°C , přidá se Boc-TMSal-Pro-ONSu (2,26 g, 5,0 mmol) z příkladu 1 v CH_2Cl_2 , načež se přidáním triethylaminu (1,39 ml, 10,0 mmol) nastartuje kopulační reakce. Směs se míchá 1 hodinu při teplotě -15°C a potom 2 hodiny při teplotě místnosti. Směs se přefiltruje přes Hyflo a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se zředí EtOAc a promyje se 0,2 N HCl, 5 % NaHCO_3 a nakonec roztokem chloridu sodného. Po odstranění rozpouštědla se získá olej, který se čistí rychlou chromatografií (EtOAc) a získá se Boc-D-TMSal-Pro-BoroMpg-OPin ve formě bílé pěny, $\alpha_D = -48,8^\circ$ ($c = 0,25$ v CH_2Cl_2).

P ř í k l a d 31

Boc-D-(p-(TBODPS-O)methyl)Phal-Pro-BoroOrn-OPin

A) Boc-D-(p-((1,1-dimethylethyl)difenylsilyl)oxy)methyl-fenylalanin

Aby se selektivně redukovala azidoskupina v substrátu, přidá se thiofenol (7,27 g, 66,0 mmol) k suspenzi SnCl_2 (3,12 g, 16,5 mmol) v CH_2Cl_2 . Přidá se triethylamin (6,8 ml, 49,5 mmol) a získá se žlutý roztok. Dále se přidá Boc-anhydrid (4,8 g, 22,0 mmol) a potom (3(2S),4S)-3-(2-azido-3-(p-((1,1-dimethyl)difenyl-silyl)oxymethyl)-

fenyl-1-oxopropyl)-4-(fenylmethyl)-2-oxazolidinon (%de > 95, 6,8 g, 11,0 mmol), připravený postupem podle J. Am. Chem. Soc. 109, 6881 (1987), ve formě roztoku v CH_2Cl_2 . Směs se míchá 2,5 hodiny při teplotě místnosti, potom se zředí směsí EtOAc a 2 N NaOH a přefiltruje se přes Hyflo. Organická vrstva se promyje 2 % vodným NaHSO_4 , 5 % vodným NaHCO_3 a nakonec roztokem chloridu sodného. Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštění za sníženého tlaku se získá žlutý olej, který se čistí rychlou chromatografií a získá se (3(2S),-4S)-3-(2-(((terc.butoxy)-karbonyl)amino)-3-(p-(((1,1-dimethylethyl)difenylsilyl)oxy)-methyl)-fenyl-1-oxopropyl)-4-(fenylmethyl)-2-oxazolidinon ve formě bílé pěny. Tato sloučenina (2,0 g, 2,88 mmol) se rozpustí ve směsi THF a vody a hydrolysuje se in situ vytvořeným LiOH (5,76 mmol) při teplotě 0°C . Po 1,75 hodiny při teplotě 0°C se přidá Na_2SO_3 (1,25 g, 9,9 mmol) ve vodě. THF se odstraní za sníženého tlaku, pH zbytku se upraví na 1 až 2 a směs se extrahuje třikrát EtOAc. Spojené organické vrstvy se promyjí vodou, vysuší Na_2SO_4 a zahustí se za sníženého tlaku. Po krystalizaci ze směsi hexanu a etheru se získá oxazolidinon ve formě bílých krystalů. Filtrát se zahustí za sníženého tlaku a získá se požadovaná sloučenina uvedená v názvu ve formě bílé pěny.

B) Boc-D-(p-(((1,1-dimethylethyl)difenylsilyl)oxy)-methyl)-fenylalanin-Pro-ONSu

Ke směsi titulní sloučeniny ze stupně A) (1,6 g, 2,88 mmol) a p-nitrofenolu (0,43 g, 3,12 mmol) v EtOAc se při teplotě 0°C přidá DCC (0,59 g, 2,88 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 16 hodin. Po ochlazení na 0°C se sraženina odfiltruje a promyje studeným EtOAc. Filtrát se zahustí za sníženého tlaku. Vzniklý olej (Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-CNp) se použije v dalším stupni bez dalšího čištění.

Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-ONp (2,2 g, 2,88 mmol) se rozpustí v THF a přidá se vodný roztok L-prolinu (365 mg, 3,17 mmol) a Et_3N (0,88 ml, 6,33 mmol). Po 15 hodinách při teplotě místnosti se THF odstraní za sníženého tlaku. Hodnota pH se upraví na 3 přidáním 10 % kyseliny citrónové. Vzniklý olejovitý produkt se extrahuje několikrát EtOAc . Spojené organické vrstvy se promyjí roztokem chloridu sodného, vysuší se Na_2SO_4 a zahustí se za sníženého tlaku. Bezbarvý olej se čistí rychlou chromatografií (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ k eluci p-nitrofenolu a potom 80:20 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$) a získá se Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-OH ve formě bílé pěny.

Tento dipeptid (1,3 g, 2,06 mmol) se rozpustí v EtOAc . Po ochlazení na teplotu 0°C se přidá HONSu (220 mg, 2,47 mmol) a DCC (330 mg, 2,06 mmol). Směs se znovu ochladí na 0°C , dicyklohexylmočovina se odfiltruje a promyje několikrát studeným EtOAc . Filtrát se promyje vodným 0,1 M Na_2CO_3 , 8 % NaHSO_4 a potom roztokem chloridu sodného. Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštění za sníženého tlaku se získá sloučenina uvedená v názvu Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-ONSu ve formě bílé pěny.

C) Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-Baa-OPin

Sloučenina uvedená v názvu se připraví použitím třístupňového postupu prováděného v jedné nádobě, jak byl popsán pro syntesu Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin v příkladu 1/C. Tedy meziprodukt α -aminoboronát, vzniklý reakcí chirálního α -chlorboronátu ((+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-brombutan-1-boronátu) (659 mg, 2,0 mmol) s $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ (2,0 mmol) a hydrolysou s HCl , se nechá reagovat s aktivním esterem ze stupně B) (1,45 g, 2,0 mmol) v přítomnosti Et_3N (4,0 mmol) a získá se sloučenina uvedená v názvu, která se čistí rychlou chromatografií (1:1 hexan/ EtOAc).

D) Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-BoroOrn-OPin

Produkt ze stupně C) (680 mg, 0,72 mmol) se rozpustí v dimethylsulfoxidu a přidá se azid sodný (94 mg, 1,44 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Přidá se směs etheru a ledové vody a ihned se z reakční směsi začnou srážet bílé krystaly. Tato bílá sraženina se odfiltruje a promyje vodou. Získá se Boc-D-(p-TBDPS-O-Me)-Phal-Pro-NH-CH((CH₂)₃N₃)B-OPin ve formě bílé krystalické sloučeniny.

Tento azid (272 mg, 0,3 mmol) se rozpustí v EtOAc a hydrogenuje se v přítomnosti Lindlarova katalysátoru. Po 8 hodinách se katalysátor odstraní a roztok se zahustí za sníženého tlaku. Surový produkt se čistí rychlou chromatografií (EtOAc a pak EtOH) a získá se požadovaná sloučenina uvedená v názvu ve formě bílé pěny.

$\alpha_D = -32,4^\circ$ (c = 0,25 v MeOH).

P ř í k l a d 32

Boc-D-(p-OH-Me)-Phal-Pro-BoroOrn-OPin

Boro-ornithin z příkladu 31 (132 mg, 0,15 mmol) se rozpustí v THF a nechá se reagovat s *n*-Bu₄NF (0,3 ml 1,1 M roztoku, 0,3 mmol). Po 45 minutách při teplotě místnosti se přidá ledová voda a vzniklá směs se extrahuje několikrát EtOAc. Spojené organické vrstvy se vysuší Na₂SO₄ a zahustí se za sníženého tlaku. Vzniklý olej se čistí rychlou chromatografií (EtOAc a pak EtOH) a získá se požadovaná sloučenina uvedená v názvu ve formě bílé pěny, $\alpha_D = -34,0^\circ$ (c = 0,1 v MeOH).

P ř í k l a d 33

Boc-D-TMS-al-Adgly-BoroPro-OPin

A) L-1-adamantylglycin

(3(2S),4S)-3-(2-azido-2-adamant-1-yl-1-oxoethyl)-4-(fenylmethyl)-2-oxazolidon ($[\alpha]_D^{20} > 95$, 9,86 g, 25,0 mmol), připravený podle postupu popsaného v J. Am. Chem. Soc. 109, 6881 (1987), se rozpustí v 320 ml směsi THF a vody (3:1), ochladí se na 0 °C, smísí se se 4 ekvivalenty peroxidu vodíku a 2,0 ekvivalenty LiOH. Vzniklá směs se míchá při teplotě 0 °C, až se substrát spotřebuje (30 minut), a peroxid (perkarboxylát) se propláchne při teplotě 0 °C 10 % nadbytkem 1,5 N vodného Na₂SO₃. Přidá se pufr, vodný NaHCO₃ (pH 9 až 10) a směs se extrahuje několikrát EtOAc, čímž se odstraní oxazolidinon jako pomocný chirální prostředek. Produkt, karboxylová kyselina, se izoluje extrakcí EtOAc okyselené vodní fáze (pH 1 až 2), vysuší se Na₂SO₄ a zahustí se za sníženého tlaku. Požadovaná (S)-azidoadamant-1-yloctová kyselina se izoluje ve formě bílých krystalů (5,29 g) a ta se použije v následujícím stupni bez dalšího čištění. 2(S)-azidoadamant-1-yloctová kyselina (5,29 g, 22,5 mmol) se rozpustí ve 110 ml EtOH a 11,3 ml 2 N HCl a hydrogenuje se v přítomnosti 0,7 g 10 % palladia na uhlí. Po 2,5 hodinách se katalysátor odstraní a roztok se zahustí za sníženého tlaku. Získá se požadovaná aminokyselina ve formě hydrochloridu. Získaný hydrochlorid se suspenduje ve 40 ml vody a nechá se reagovat s 1,9 g pevného NaHCO₃. Získaná aminokyselina se odfiltruje a promyje několikrát vodou. Po vysušení za sníženého tlaku se získá L-1-adamantylglycin ve formě bílé krystalické sloučeniny, $[\alpha]_D^{20} = +3,0^\circ$ (c = 1,0 v MeOH).

B) Boc-D-TMSal-Adgly-ONSu

Boc-D-TMSal-ONp (7,71 g, 20,2 mmol) z příkladu 1 se rozpustí v THF a přidá se vodný roztok ekvimolárních množství 1-adamantylglycinu a Et_3N . Po 20 hodinách při teplotě místnosti se THF odstraní za sníženého tlaku, vodný zbytek se zředí 150 ml 0,1 N HCl a potom se extrahuje několikrát EtOAc . Spojené organické vrstvy se promyjí roztokem chloridu sodného, vysuší se Na_2SO_4 a zahustí se za sníženého tlaku. Olejovitý produkt se chromatografuje na silikagelu (CH_2Cl_2) a získá se dipeptid Boc-D-TMSal-Adgly-OH ve formě oleje. Boc-D-TMSal-Adgly-OH (6,9 g, 15,2 mmol) se rozpustí v 80 ml EtOAc . Po ochlazení na 0°C se přidá HONSu (2,1 g, 18,0 mmol) a DCC (3,1 g, 15,2 mmol). Směs se míchá při teplotě 0°C po dobu 3 hodin a potom dalších 15 hodin při teplotě místnosti. Směs se znovu ochladí na teplotu 0°C , dicyklohexylmočovina se odfiltruje a promyje EtOAc . Filtrát se promyje vodným 0,1 N NaHCO_3 a potom vodným 2 % KHSO_4 . Po vysušení Na_2SO_4 a zahustění za sníženého tlaku se získá Boc-D-TMSal-Adgly-ONSu (7,2 g) ve formě bílé pěny.

C) Boc-D-TMSal-Adgly-BoroPro-OPin

Sloučenina uvedená v názvu se připraví analogickým třístupňovým postupem prováděným v jedné nádobě, který byl popsán pro přípravu Boc-D-TMSal-Pro-Baa-OPin v příkladu 1/C. Díky nízké ^{re}aktivitě stericky bráněného aktivního esteru ze stupně B (2,7 g, 5,0 mmol) meziprodukt, α -aminoboronát, který vznikne reakcí chirálního α -chlorboronátu ((+)-pinandiol-(S)-1-chlor-4-brombutan-1-boronát) (1,7 g, 5,0 mmol) s lithiuhexamethyldisilazanem (5,0 mmol) a hydrolyzou s HCl, cyklisuje na boro-prolinový derivát, který potom reaguje s aktivním esterem ze stupně B za vzniku neočekávaného Boc-D-TMSal-Adgly-

BoroPro-OPin jako hlavního produktu. Rychlou chromatografií (2:1 hexan/EtOAc) surového produktu se získá sloučenina uvedená v názvu (0,48 g) ve formě bílé pěny, která se dále čistí rekrystalizací ze směsi etheru a hexanu a získá se požadovaný produkt Boc-D-TMSal-Adgly-BoroPro-OPin ve formě bílé krystalické sloučeniny, teplota tání 187 až 188 °C, $[\alpha]_D^{20} = +2,8^\circ$ (c = 1,0 v CH₂Cl₂).

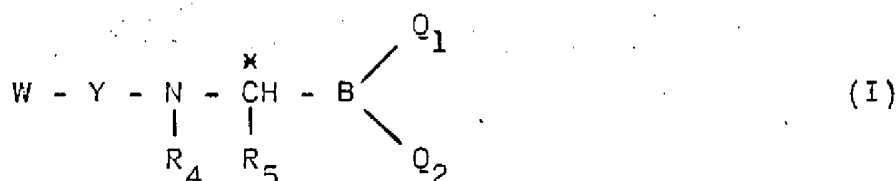
Průmyslová využitelnost

Borolysinové analogy peptidů podle vynálezu lze použít jako inhibitory serinových proteas.

KIL PRO VYHLEDÁVÁNÍ A OBJEVY	ÚŘAD PRO VYHLEDÁVÁNÍ A OBJEVY	12. VIII 91	BOSCO	237246	237246

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučeniny obecného vzorce I



kde W je atom vodíku nebo N-chránicí skupina,

Y je sekvence aminokyselin zvolená tak, že n+1 peptid s aminokyselinou Y-Lys nebo Y-Arg má afinitu k aktivnímu místu proteasy trypsinového typu, kde n je celé číslo od 1 do 10 a kde alespoň jedna aminokyselina je nepřirodní aminokyselinou mající hydrofobní postranní řetězec,

Q₁ a Q₂, které mohou být stejné nebo různé, jsou vybrány ze skupiny zahrnující -OH, -COR₁, -CONR₁R₂, -NR₁R₂ nebo -OR₃, nebo Q₁ a Q₂ spolu dohromady tvoří diolový zbytek,

R₁, R₂ a R₃, které mohou být stejné nebo různé, jsou alkylová skupina s 1 až 10 atomy uhlíku, arylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, arylalkylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku nebo fenylová skupina substituovaná až 3 skupinami vybranými ze skupiny zahrnující alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,

atom halogenu a alkoxy skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,

R₄ je atom vodíku nebo alkylová skupina s 1 až 10 atomy uhlíku,

R₅ je skupina -A-X, kde

A je -(CH₂)_z-, kde z je 2, 3, 4 nebo 5,

-CH(CH₃)-(CH₂)₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -(CH₂)₂-CH(CH₃)-,

-(CH₂)₂-C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-(CH₂)₃-,

-CH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂-, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-,

$-(CH_2)_3-CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2$: arylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, arylalkylová skupina s 6 až 10 atomy uhlíku, a

X je $-NH_2$, $-NH-C(NH)-NH_2$, $-S-C(NH)-NH_2$, $-N_3$, alkoxy- skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, alkylthioskupina s 1 až 4 atomy uhlíku nebo $-Si(CH_3)_3$ nebo

R_4 a R_5 spolu dohromady tvoří trimethylenovou skupinu a asymetrický atom uhlíku označený * může mít D- nebo L-konfiguraci nebo znamená jakoukoliv jejich směs.

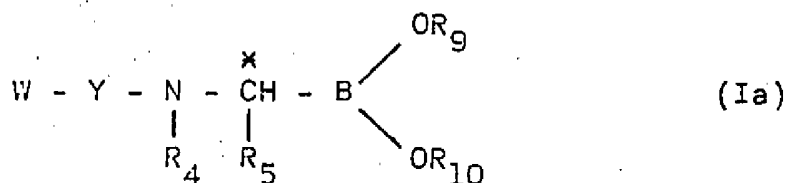
2. Sloučenina podle nároku 1, kde W je $H(CH_2CH_2O)_p-$, R_6CO- , R_7OCO- nebo R_8SO_2- , kde p je 3 až 30,

R_6 je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku,

R_7 je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku, fenyl, benzyl nebo naftyl, a

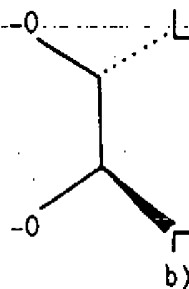
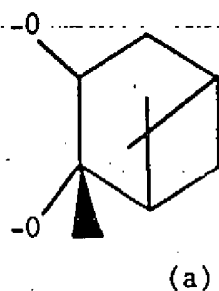
R_8 je fenyl, naftyl nebo alkylfenyl s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylu.

3. Sloučenina podle nároků 1 nebo 2 obecného vzorce Ia

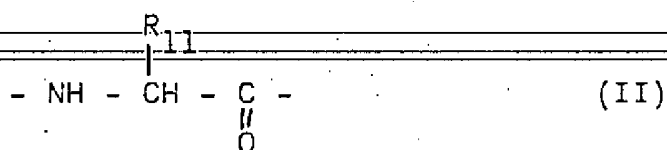


kde W, Y, R_4 a R_5 mají význam uvedený v nárocích 1 nebo 2 a R_9 a R_{10} znamenají zbytek dihydroxysloučeniny.

4. Sloučenina podle nároků 1 nebo 2, kde Q_1 a Q_2 spolu dohromady znamenají skupinu vzorce (a) nebo (b)

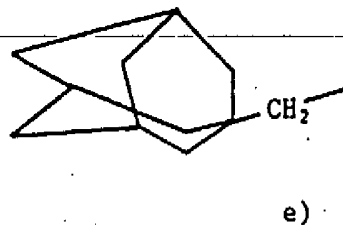
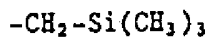
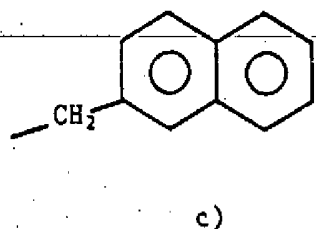


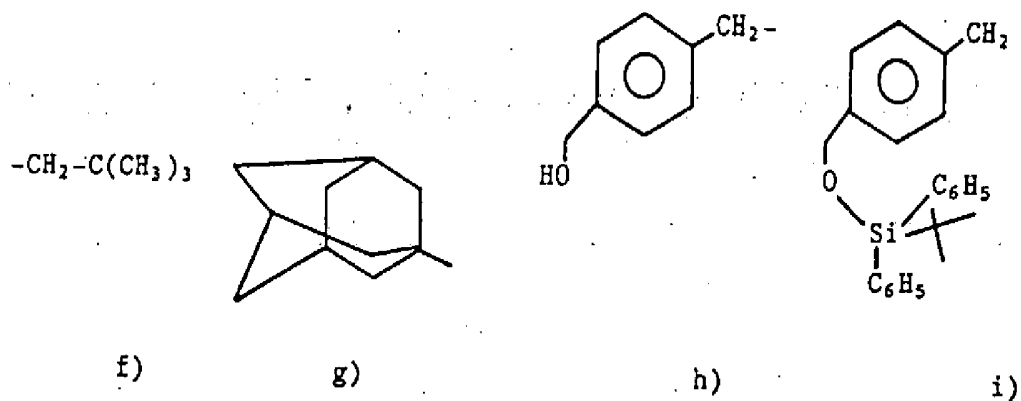
5. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde nepřirodní aminokyselina má obecný vzorec II



kde R_{11} je hydrofobní skupina.

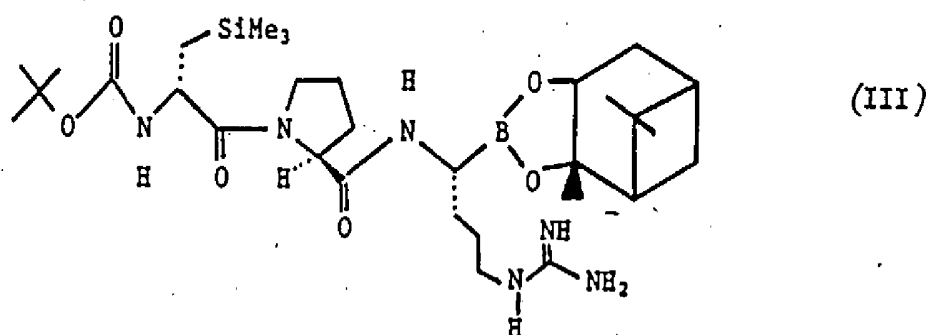
6. Sloučenina podle nároku 5, kde R_{11} je skupina R_{11}' a je to skupina vzorců (c), (d), (e), (f), (g), (h) nebo (i)



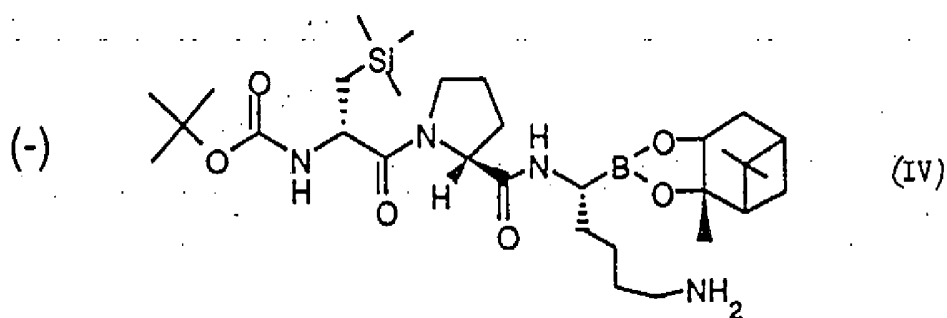


7. Sloučenina podle nároku 1, kde Y je sekvence dvou aminokyselin, z nichž N-terminální aminokyselina je nepřírodní aminokyselina a druhá aminokyselina je L-prolin.

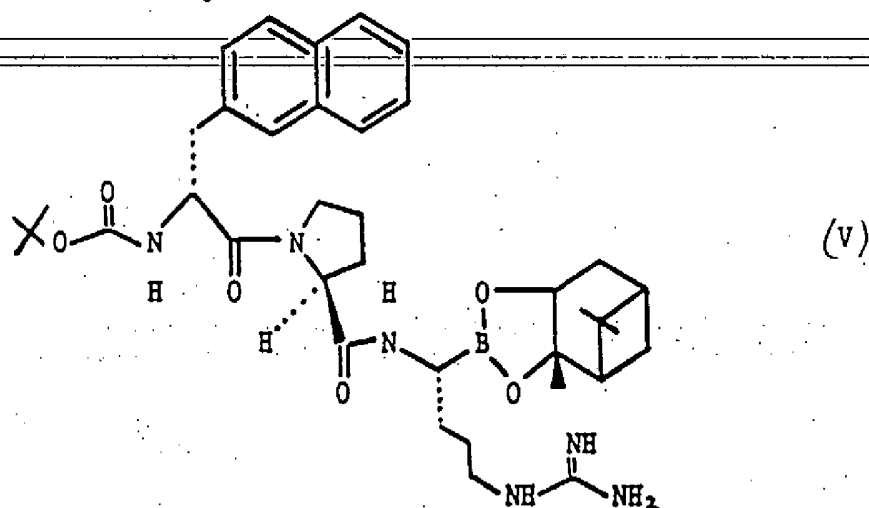
8. Sloučenina podle nároku 1 vzorce III



9. Sloučenina podle nároku 1 vzorce IV



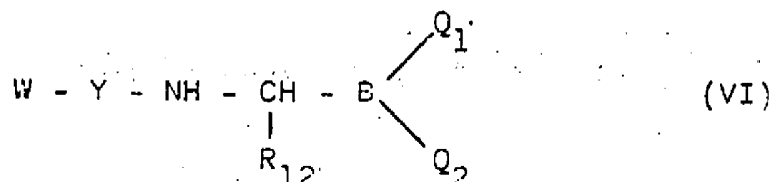
10. Sloučenina podle nároku 1 vzorce V



11. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, vyznačený tím, že

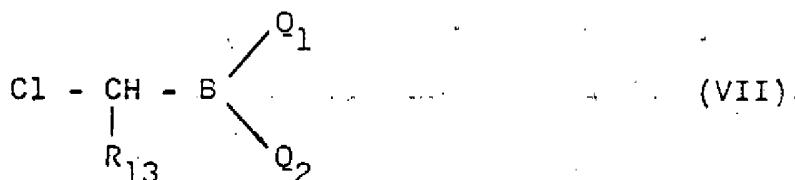
- i) když X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$, nechá se reagovat sloučenina obecného vzorce I, kde X je $-\text{NH}_2$, s kyanamidem,
- ii) když X je $-\text{NH}_2$, hydrogenuje se sloučenina obecného vzorce I, kde X je $-\text{N}_3$.

- iii) když X je $-N_3$, nechá se reagovat sloučenina obecného vzorce VI



kde W, Y, Q_1 a Q_2 mají význam uvedený v nároku 1 a R_{12} je $-A-Br$, kde A má význam uvedený v nároku 1, s azidem sodným,

- iv) když X je $-Si(CH_3)_3$ nebo O-alkyl, nechá se reagovat sloučenina obecného vzorce VII



kde Q_1 a Q_2 mají význam uvedený v nároku 1 a R_{13} je $-A-Si(CH_3)_3$ nebo O-alkyl, s $LiN/Si(CH_3)_3/2$, načež následuje kyselá hydrolysa a kopulace s chráněným peptidem obecného vzorce VIII



kde W a Y mají význam uvedený v nároku 1.

12. Použití sloučenin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 jako inhibitorů serinových proteas trypsino-
vého typu.

13. Terapeutický prostředek obsahující slouče-
ninu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 spolu s farmaceu-
tický přijatelnými přísadami a/nebo ředidly.

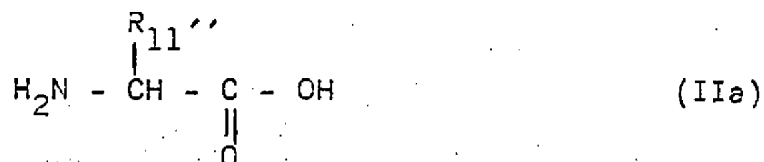
14. Použití terapeutického prostředku podle ná-
roku 13 pro inhibici serinových proteas trypsinového typu.

15. Použití podle nároků 12 a 14, vyznačené tím,
že serinovými proteasami trypsinového typu jsou thrombin,
faktor Xa, kallikrein, plasma, prolylendopeptidasa a
Ig AI proteasa.

16. Terapeutický prostředek mají^{ci} antithrombo-
genní účinnost obsahující sloučeninu podle kteréhokoliv
z nároků 1 až 10 spolu s farmaceuticky přijatelnými pří-
sadami a/nebo ředidly.

17. Použití sloučenin podle kteréhokoliv z ná-
roků 1 až 10 jako inhibitorů thrombinu.

18. Nepřirodní aminokyselina obecného vzorce IIa



kde R_{11}'' je skupina vzorců (d), (e), (f), (g), (h) nebo
(i), jak jsou definovány v nároku 6.