

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.04.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.04.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/194607**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.01.2003**
(Věstník č. 1/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/10869**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/077113**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 3321

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 498/12

C 07 K 7/06

A 61 K 38/08

A 61 P 31/14

(71) Přihlašovatel:

SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Původce:

Chen Kevin X., Iselin, NJ, US;
Arasappan Ashok, Bridgewater, NJ, US;
Venkatraman Srikanth, Woodbridge, NJ, US;
Parekh Tejal N., Woodbridge, NJ, US;
Gu Haining, Shanghai, CN;
Njoroge F. George, Union, NJ, US;
Girijavallabhan Viyyoor M., Parsippany, NJ, US;
Ganguly Ashit, Upper Montclair, NJ, US;
Saksena Anil, Upper Montclair, NJ, US;
Jao Edwin, Warren, NJ, US;
Yao Nanhua H., Irvine, CA, US;
Prongay Andrew J., Stewartsville, NJ, US;
Madison Vincent S., Mountain Lakes, NJ, US;
Vibulbhan Bancha, Kenilworth, NJ, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Makrocyclická sloučenina a farmaceutický
prostředek**

(57) Anotace:

Nové makrocyclické sloučeniny s inhibiční aktivitou na proteázu HCV a způsoby výroby těchto sloučenin. Dále jsou popsány farmaceutické prostředky obsahující tyto makrocycly, které jsou použitelné pro léčení onemocnění souvisejících s proteázou HCV.

CZ 2002 - 3321 A3

Makrocyclická sloučenina a farmaceutický prostředek

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových inhibitorů proteázy viru
5 hepatitidy C („HCV“), farmaceutických prostředků s obsahem jednoho
nebo více těchto inhibitorů, způsobů přípravy těchto inhibitorů a jejich
použití pro léčení hepatitidy C a souvisejících stavů. Vynález zvláště
popisuje nové makrocyclické sloučeniny jako inhibitory serinové
proteázy HCV NS3/NS4a.

10

Dosavadní stav techniky

Virus hepatitidy C (HCV) je RNA virus s pozitivním řetězcem
RNA, o kterém se předpokládá, že je hlavní příčinou non-A, non-B
hepatitidy (NANBH), zvláště s krví asociované NANBH (BB-NANBH)
15 (viz zveřejněná mezinárodní patentová přihláška No. WO 89/04669 a
zveřejněná evropská patentová přihláška No. EP 381 216). NANBH je
třeba odlišovat od jiných typů jaterních onemocnění indukovaných viry,
jako je onemocnění virem hepatitidy A (HAV), virem hepatitidy B
(HBV), virem hepatitidy delta (HDV), cytomegalovirem (CMV) a virem
20 Epstein-Barrové (EBV), stejně jako od jiných forem jaterních
onemocnění, jako je alkoholismus a primární biliární cirhóza.

V nedávné době byla identifikována, klonována a exprimována
proteáza HCV nezbytná pro zpracování (procesing) polypeptidu a
virovou replikaci; (viz např. US patent No. 5,712,145). Tento
25 polyprotein o délce přibližně 3000 aminokyselin, obsahuje ve směru od
aminového konce ke karboxylovému konci protein nukleokapsidy (C),
obalové proteiny (E1 a E2) a několik nestrukturních proteinů (NS1, 2,
3, 4a, 5a a 5b). NS3 je protein o velikosti přibližně 68 kDa, kódovaný

přibližně 1893 nukleotidy genomu HCV, který má dvě odlišné domény: (a) doménu serinové proteázy složenou z přibližně 200 N-koncových aminokyselin; a (b) doménu RNA-dependentní ATPázy na C-konci proteinu. Předpokládá se, že proteáza NS3 patří do chymotrypsinové skupiny z důvodů podobností v proteinové sekvenci, celkové trojrozměrné struktuře a mechanismu katalýzy. Další enzymy podobné chymotrypsinu jsou elastáza, faktor Xa, trombin, trypsin, plasmin, urokináza, tPA a PSA. Serinová proteáza HCV NS3 je odpovědná za proteolýzu polypeptidu (polyproteinu) ve spojeních NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a a NS5a/NS5b a je tedy odpovědná za vytvoření čtyř virových proteinů v průběhu replikace viru. Serinová proteáza HCV NS3 je tedy přitažlivým cílem pro antivirovou chemoterapii.

Bylo zjištěno, že protein NS4a s velikostí přibližně 6 kDa je kofaktorem aktivity serinové proteázy NS3. Autologní štěpení spojení NS3/NS4a serinovou proteázou NS3/NS4a probíhá intramolekulárně (tj. *cis*), zatímco další místa štěpení se zpracovávají intermolekulárně (tj. *trans*).

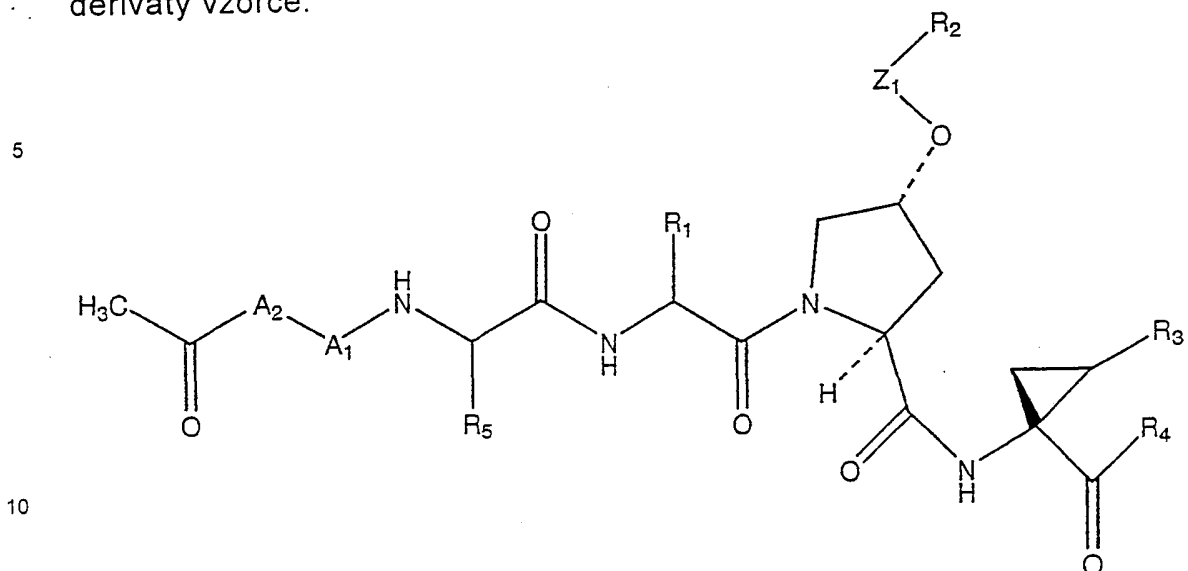
Analýza přirozených míst štěpení proteázy HCV ukázala přítomnost cysteinu v místě P1 a serinu v místě P1', přičemž tyto zbytky jsou ve spojeních NS4a/NS4b, NS4b/NS5a a NS5a/NS5b přísně konzervovány. Spojení NS3/NS4a obsahuje threonin v poloze P1 a serin v poloze P1'. Uvádí se, že substituce Cys→Thr v místě NS3/NS4a odpovídá za požadavek zpracování (procesing) *cis*, namísto *trans*, v tomto spojení, viz například Pizzi a další (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91: 888 - 892, Failla a další (1996) Folding & Design 1: 35 - 42. Štěpicí místo NS3/NS4a je také tolerantnější vůči mutagenезi než jiné místa, viz např. Kollykhalov a další (1994) J. Virol., 68: 7525 - 7533. Bylo také zjištěno, že pro účinné štěpení jsou nezbytné kyselé zbytky proti směru transkripce vzhledem k místu štěpení, viz například Komoda a další (1994) J. Virol., 68: 7351 - 7357.

Mezi inhibitory proteázy HCV, které již byly popsány, patří antioxidanty (viz zveřejněná mezinárodní patentová přihláška No. WO 98/14181), některé peptidy a analogy peptidů (viz zveřejněná mezinárodní patentová přihláška No. WO 98/17679, Landro a další (1997) Biochem, 36: 9340 - 9348, Ingallinella a další (1998) Biochem., 37: 8906 - 8914, Llinàs-Brunet a další (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 1713 - 1718), inhibitory založené na polypeptidu o délce 70 aminokyselin eglin c (Martin a další (1998) Biochem., 37: 11459 - 11468, inhibitory afinitně selektované z lidského pankreatického sekrečního inhibitoru trypsinu (hPSTI-C₃) a soubory fragmentů protilátek nazývaných minibody (MBip) (Dimasi a další (1997) J. Virol., 71: 7461 - 7469), cV_HE2 („kamelizovaný“ fragment variabilní domény protilátky) (Martin a další (1997) Protein Eng., 10: 607 - 614), a α 1-antichymotrypsin (ACT) (Elzouki a další (1997) J. Hepat., 27: 42 - 28). Nedávno byl popsán ribozym navržený pro selektivní ničení RNA viru hepatitidy C (viz BioWorld Today 9 (217): 4 (10. listopadu 1998)).

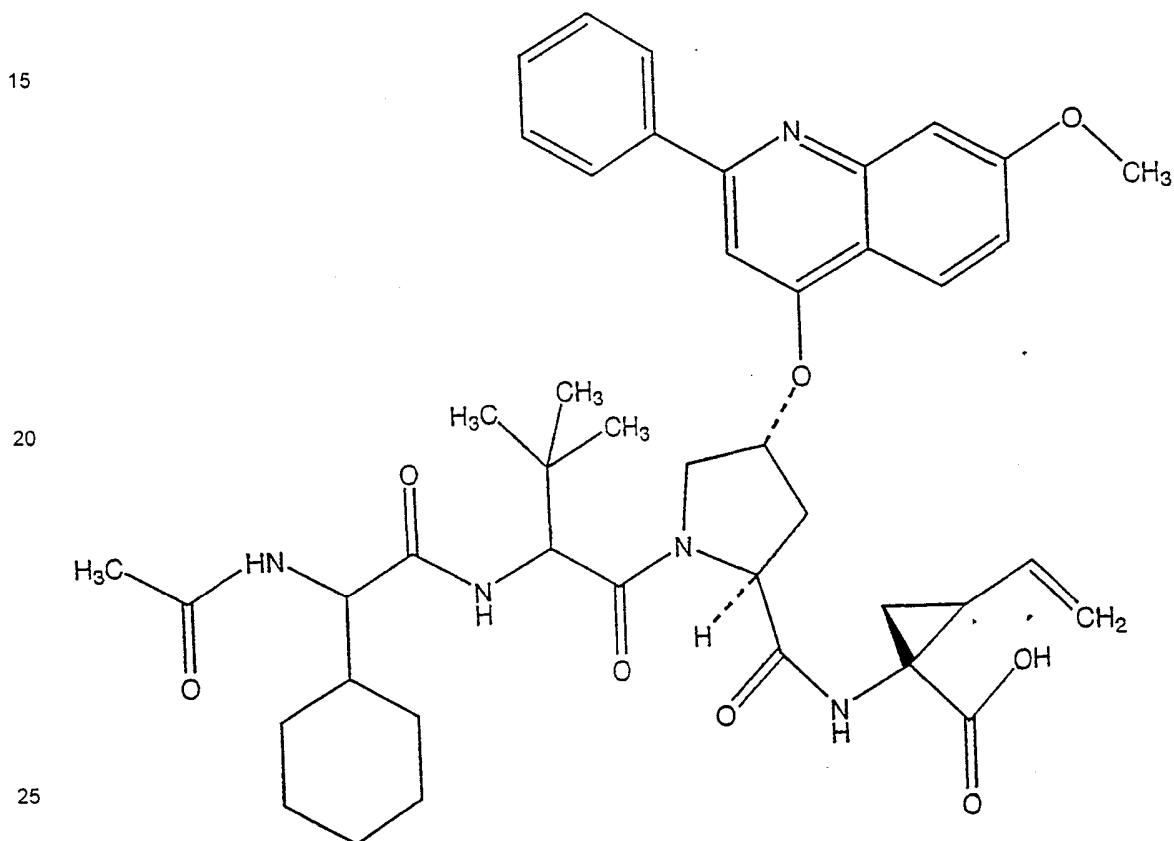
Odkazuje se také na zveřejněné PCT No. WO 98/17679, zveřejněná 30. dubna 1998 (Vertex Pharmaceutical Incorporated); WO 98/22496, zveřejněná 28. května 1998 (F. Hoffmann-La Roche AG); a WO 99/07734, zveřejněná 18. února 1999 (Boehringer Ingelheim Canada Ltd.).

Předpokládá se, že virus HCV způsobuje cirhózu jater a indukci hepatocelulárního karcinomu. Prognóza u pacientů trpících infekcí HCV je v současné době špatná. Infekce HCV se obtížněji léčí než jiné formy hepatitidy v důsledku nedostatku imunity nebo recidiv spojených s infekcí HCV. Současné údaje ukazují míru přežití nižší než 50 % v době čtyř let po diagnóze cirhózy. Pacienti s diagnózou lokalizovaného resektovatelného hepatocelulárního karcinomu mají míru přežití pět let 10 - 30 %, zatímco u pacientů s lokalizovaným neresektovatelným hepatocelulárním karcinomem je míra přežití pět let nižší než 1 %.

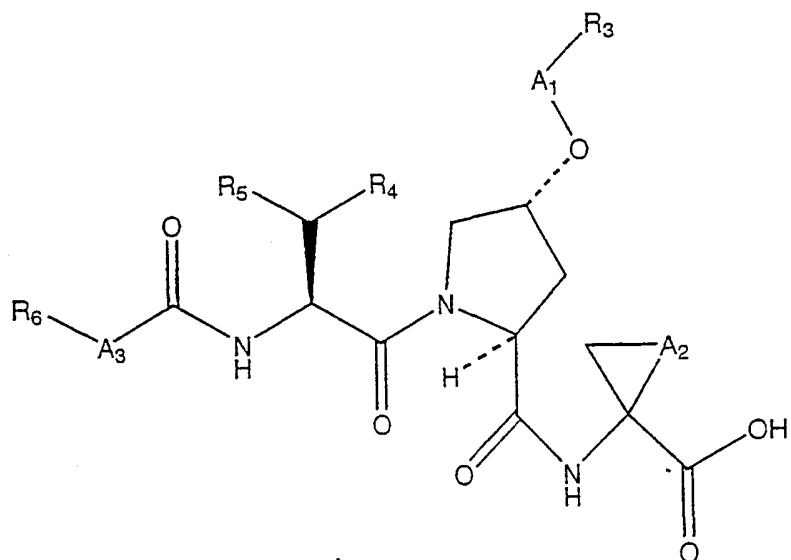
Odkazuje se také na WO 00/09558 (Přihlašovatel: Boehringer Ingelheim Limited; zveřejněný 24. února 2000) popisující peptidové deriváty vzorce:



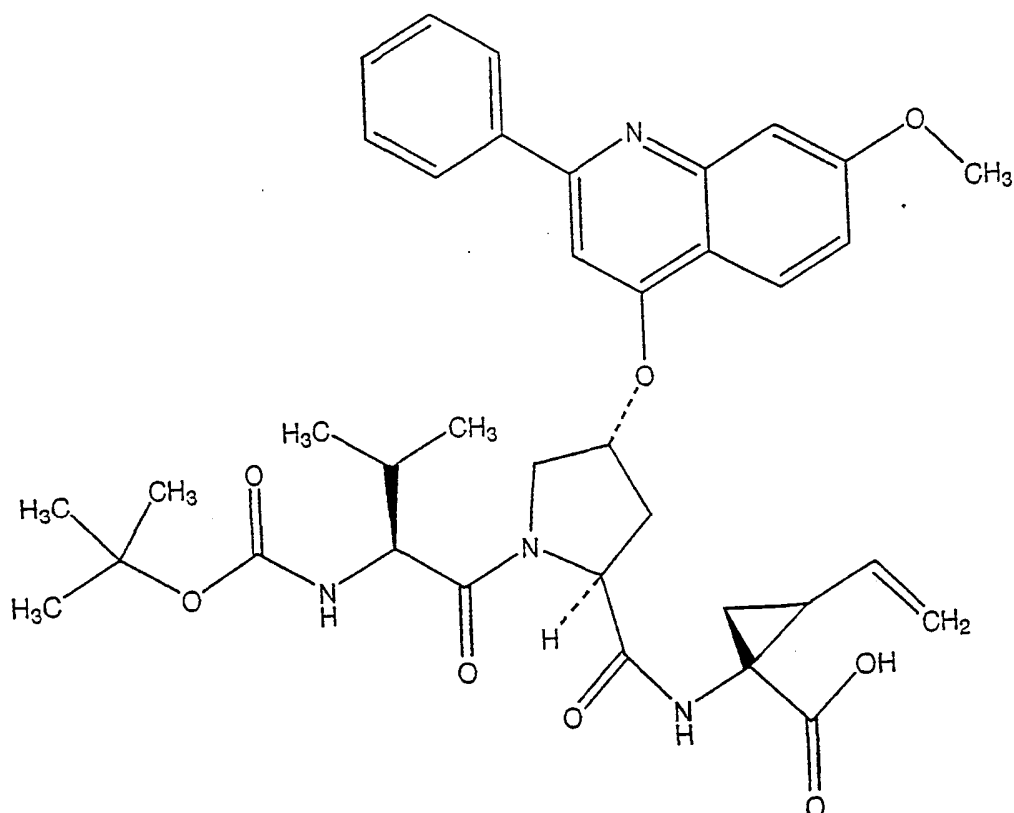
kde v přihlášce jsou definovány různé skupiny obecného vzorce.
Ilustrativní sloučenina této řady je:



5



15



25

V současné době se pro léčení hepatitidy C používá interferon- α (INF_α) a kombinovaná terapie ribavirinem a interferonem, viz např. Berenguer a další (1998), Proc. Assoc. Am. Physicians 110 (2): 98 - 112. Tyto způsoby léčení mají špatné dlouhodobé výsledky a četné vedlejší účinky, viz např. Hoofnagle a další (1997), N. Engl. J. Med., 336: 347. V současnosti není dostupná žádná vakcína proti infekci HCV.

Je zapotřebí nalézt nové způsoby léčení infekce HCV. Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí sloučenin využitelných při léčení nebo prevenci nebo odstraňování jednoho nebo více příznaků hepatitidy C.

Další předmět předkládaného vynálezu je poskytnutí způsobů modulace aktivity serinových proteáz, zvláště serinové proteázy HCV NS3/NS4a, s použitím poskytovaných sloučenin.

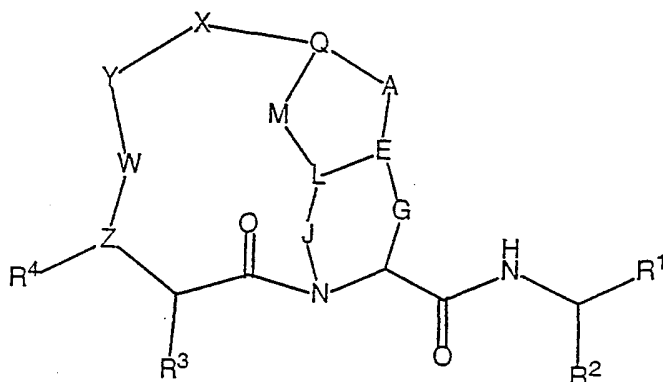
Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí způsobů modulace zpracování (procesingu) polypeptidu HCV s použitím poskytovaných sloučenin.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje novou skupinu makrocyclických inhibitorů proteázy HCV, farmaceutické prostředky s obsahem jedné nebo více těchto sloučenin, způsoby výroby farmaceutických prostředků s obsahem jedné nebo více těchto sloučenin a způsoby léčení, prevence nebo odstraňování jednoho nebo více příznaků hepatitidy C. Poskytují se také způsoby modulace interakce polypeptidu HCV s proteázou HCV. Mezi poskytovanými sloučeninami jsou výhodné sloučeniny inhibující aktivitu serinové proteázy HCV NS3/NS4a. Popisované sloučeniny obecně obsahují přibližně tři nebo více aminokyselinových zbytků a méně než přibližně dvanáct aminokyselinových zbytků.

V hlavním provedení poskytuje předkládaný vynález makrocyclickou sloučeninu vzorce I:

5



Vzorec I

10

kde:

15

20

25

X a Y jsou nezávisle zvoleny ze skupin: alkyl, alkylaryl, heteroalkyl, heteroaryl, arylheteroaryl, alkylheteroaryl, cykloalkyl, alkylether, alkylarylether, arylether, alkylamino, arylamino, alkylarylamino, alkylsulfid, alkylarylsulfid, arylsulfid, alkylsulfon, alkylarylsulfon, arylsulfon, alkylalkylsulfoxid, alkylarylsulfoxid, alkylamid, alkylarylamid, arylamid, alkylsulfonamid, alkylarylsulfonamid, arylsulfonamid, alkylmočovina, alkylarylmočovina, arylmočovina, alkylkarbamát, alkylarylkarbamát, arylkarbamát, alkylhydrazid, alkylarylhidrazid, alkylhydroxamid, alkylarylhdroxamid, alkylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroalkylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylkarbonyl, arylkarbonyl, heteroalkylkarbonyl, heteroaryl-karbonyl, alkoxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxy-karbonyl, alkylaminokarbonyl, arylaminokarbonyl, heteroaryl-aminokarbonyl nebo jejich kombinace, s podmínkou, že skupiny X a Y mohou být popřípadě navíc substituovány skupinami zvolenými ze skupiny aromatická skupina, alkyl, alkylaryl, heteroalkyl, arylheteroaryl, alkylheteroaryl, cykloalkyl, alkylether, alkylarylether, alkylsulfid, alkylarylsulfid, alkylsulfon, alkylarylsulfon, alkylamid, alkylarylamid, alkylsulfonamid,

alkylaminy, alkylarylaminy, alkylarylsulfonamid, alkylmočovina, alkylarylmočovina, alkylkarbamát a alkylarylkarbamát;

- R^1 znamená COR^5 nebo $B(OR)_2$, kde R^5 je H, OH, OR^8 , NR^9R^{10} , CF_3 , C_2F_5 , C_3F_7 , CF_2R^6 , R^6 , COR^7 , kde R^7 je H, OH, OR^8 , CHR^9R^{10} nebo NR^9R^{10} , kde R^6 , R^8 , R^9 a R^{10} jsou nezávisle zvoleny ze skupiny atom vodíku, alkyl, aryl, heteroalkyl, heteroaryl, cykloalkyl, cykloalkyl, arylalkyl, heteroarylalkyl, $CH(R^1)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)R'$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONHCH(R^5)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONHCH(R^5)CONR^{12}R^{13}$, kde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , a R' jsou nezávisle zvoleny ze skupiny atom vodíku, alkyl, aryl, heteroalkyl, heteroaryl, cykloalkyl, alkylaryl, alkylheteroaryl, arylalkyl a heteroalkyl;
- Z je zvoleno ze skupiny O, N, nebo CH;
- W může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je W přítomno, je W zvoleno ze skupiny C=O, C=S nebo SO_2 ;
- Q může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je Q přítomno, je zvoleno ze skupiny CH, N, P, $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CRR')_p$, O, NR, S, nebo SO_2 ; a jestliže je Q nepřítomno, M je také nepřítomno, a A je přímo navázáno na X;
- A je O, CH_2 , $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, $(CRR')_p$, NR, S, SO_2 nebo vazba;

- E je CH, N nebo CR, nebo dvojná vazba k A, L nebo G ;
- G může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je G přítomno, je zvoleno ze skupiny $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, nebo $(CRR')_p$; a jestliže je G nepřítomno, J je přítomno a E je přímo navázáno na atom uhlíku, na který bylo navázáno G;
- J může být nepřítomno nebo přítomno, a jestliže je J přítomno, je zvoleno ze skupiny $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, nebo $(CRR')_p$, SO_2 , NH, NR nebo O; a jestliže je J nepřítomno, G je přítomno a E je přímo navázáno na N;
- L může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je L přítomno, je zvoleno ze skupiny CH, CR, O, S nebo NR; a jestliže je L nepřítomno, může být M přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je M přítomno a L nepřítomno, M je přímo a nezávisle navázáno na E, a J je přímo a nezávisle navázáno na E;
- M může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je M přítomno, je zvoleno ze skupiny O, NR, S, SO_2 , $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, nebo $(CRR')_p$;
- p je číslo 0 až 6; a
- R, R', R^2 , R^3 a R^4 jsou nezávisle zvoleny ze skupiny H; C_1 - C_{10} alkyl; C_2 - C_{10} alkenyl; C_3 - C_8 cykloalkyl; C_3 - C_8 heterocykloalkyl, alkoxy, aryloxy, alkylthio, arylthio, amino, amido, ester, karboxylová kyselina, karbamát, močovina, keton, aldehyd, kyano, nitro; nula až šest atomů kyslíku, dusíku, síry, nebo fosforu;
- (cykloalkyl)alkyl a (heterocykloalkyl)alkyl, kde cykloalkyl je složen ze tří až osmi atomů uhlíku, a nuly až šesti atomů kyslíku, dusíku, síry, nebo fosforu, a alkyl obsahuje jeden až šest atomů uhlíku; aryl; heteroaryl; alkylaryl; a alkylheteroaryl;
- kde uvedené skupiny alkyl, heteroalkyl, alkenyl, heteroalkenyl, aryl, heteroaryl, cykloalkyl a heterocykloalkyl mohou být popřípadě substituovány, přičemž termín „substituovaný“

označuje případnou a vhodnou substituci jednou nebo více skupinami zvolenými ze skupiny alkyl, alkenyl, alkinyl, aryl, aralkyl, cykloalkyl, heterocykl, halogen, hydroxy, thio, alkoxy, aryloxy, alkylthio, arylthio, amino, amido, ester, karboxylová kyselina, karbamát, močovina, keton, aldehyd, kyano, nitro, sulfonamid, sulfoxid, sulfon, sulfonylmočovina, hydrazid a hydroxamát.

Pokud není definováno jinak, všechny technické a vědecké termíny používané v přihlášce mají stejný význam tak jak je běžně chápán odborníkem v příslušném oboru. Tak například termín alkyl (včetně alkylové části skupiny alkoxy) označuje jednovaznou skupinu odvozenou od přímého nebo rozvětveného nasyceného uhlovodíku odstraněním jednoho atomu, která obsahuje 1 až 8 atomů uhlíku, s výhodou 1 až 6 atomů uhlíku;

aryl znamená karbocyklickou skupinu obsahující od 6 do 14 atomů uhlíku obsahující alespoň jeden benzenoidní kruh, přičemž jako možná místa vazby jsou uvažovány všechny dostupné substituovatelné aromatické atomy uhlíku karbocyklické skupiny. Výhodné arylové skupiny zahrnují fenyl, 1-naftyl, 2-naftyl a indanyl, a zvláště fenyl a substituovaný fenyl;

aralkyl znamená skupinu obsahující arylovou skupinu navázanou přes nižší alkyl;

alkylaryl znamená skupinu obsahující nižší alkyl navázaný přes arylovou skupinu;

cykloalkyl znamená nasycený karbocyklický kruh obsahující 3 až 8 atomů uhlíku, s výhodou 5 nebo 6 atomů uhlíku, který je popřípadě substituovaný;

heterocykl znamená, navíc k dále definovaným heteroarylovým skupinám, nasycené a nenasyčené cyklické organické skupiny obsahující alespoň jeden atom O, S a/nebo N přerušující strukturu

karbocyklického kruhu, která se skládá z jednoho nebo dvou fuzovaných kruhů, přičemž každý kruh je 3 až 9-členný a může nebo nemusí obsahovat dvojně vazby postrádající delokalizované pí elektrony, kde kruhová struktura obsahuje 2 až 8, s výhodou 3 až 6 atomů uhlíku, např. 2- nebo 3-piperidinyl, 2- nebo 3-piperazinyl, 2- nebo 3-morfolinyl, nebo 2- nebo 3-thiomorfolinyl;

halogen znamená fluor, chlor, brom a jod;

heteroaryl znamená cyklickou organickou skupinu obsahující alespoň jeden atom O, S a/nebo N přerušující strukturu karbocyklického kruhu a obsahující dostatečný počet delokalizovaných pí elektronů pro poskytnutí aromatického charakteru, přičemž aromatická heterocyklická skupina obsahuje 2 až 14, s výhodou 4 nebo 5 atomů uhlíku, např. 2-, 3- nebo 4-pyridyl, 2- nebo 3-furyl, 2- nebo 3-thienyl, 2-, 4- nebo 5-thiazolyl, 2- nebo 4-imidazolyl, 2-, 4- nebo 5-pyrimidinyl, 2-pyrazinyl, nebo 3- nebo 4-pyridazinyl, atd. Výhodné heteroarylové skupiny jsou 2-, 3- a 4-pyridyl; uvedené heteroarylové skupiny mohou být také popřípadě také substituované.

Vynález zahrnuje také tautomery, rotamery, enantiomery a jiné optické isomery sloučenin vzorce I stejně jako farmaceuticky přijatelné soli a solváty.

Vynález obsahuje v dalším provedení farmaceutické prostředky obsahující jako účinnou složku sloučeninu vzorce I (nebo její sůl, solvát nebo isomery) spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo pomocnou látkou.

Vynález také poskytuje způsoby výroby sloučenin vzorce I, stejně jako způsoby léčení onemocnění, jako například HCV a souvisejících poruch. Při léčení se podává pacientovi trpícímu uvedeným onemocněním nebo onemocněními terapeuticky účinné množství sloučeniny vzorce I nebo farmaceutických prostředků s obsahem sloučeniny vzorce I.

• •

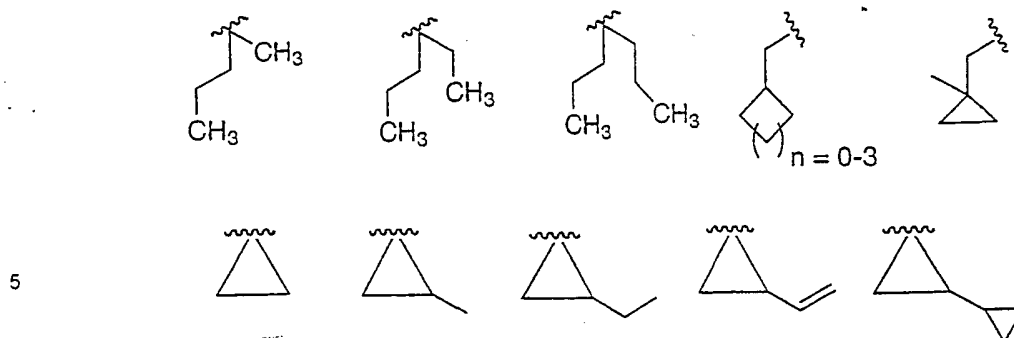
5

10

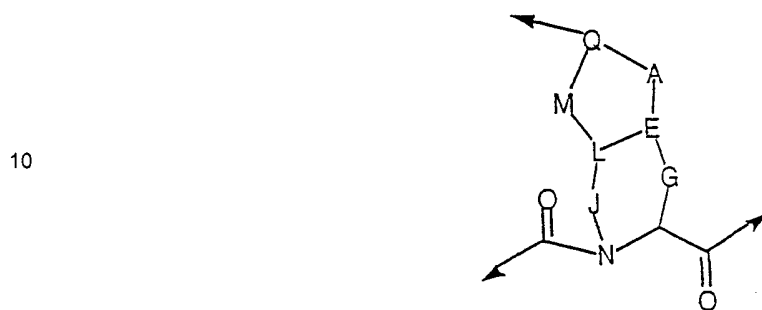


nebo jejich farmaceuticky přijatelné deriváty, jejichž různé definice jsou uvedeny výše. Některá z výhodných provedení zahrnují bez omezení následující definice různých funkčních skupin ve výše uvedených obecných vzorcích I a II. Tak například skupina R^2 ve vzorci I může být zvolena z následujících skupin:

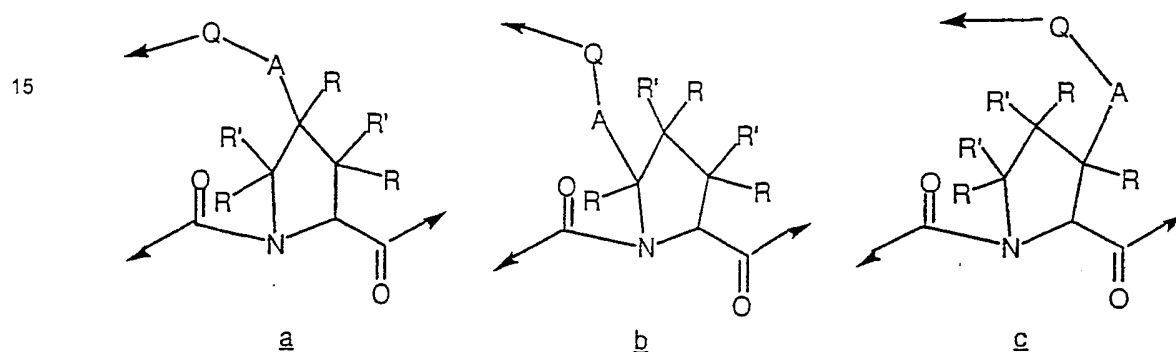




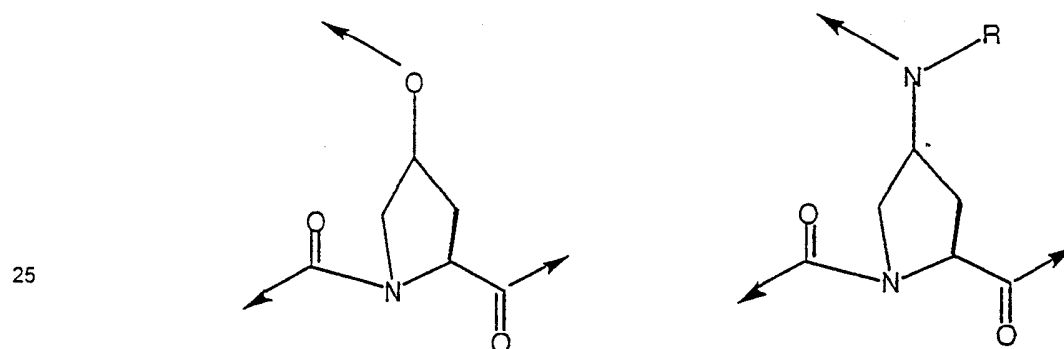
Některé výhodné významy skupiny



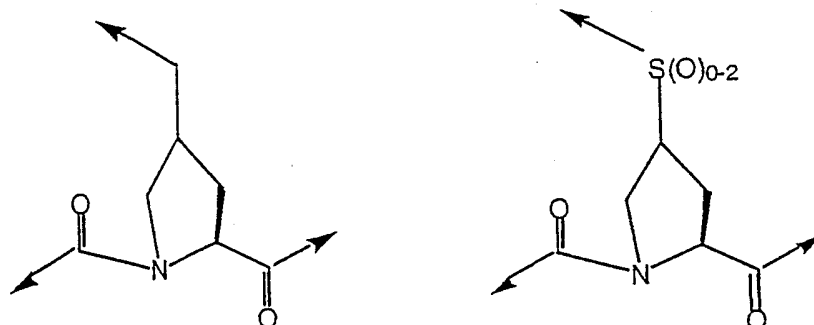
jsou například následující struktury a, b, nebo c:



20 Struktura a může být zvolena z následujících neomezujících typů struktur:

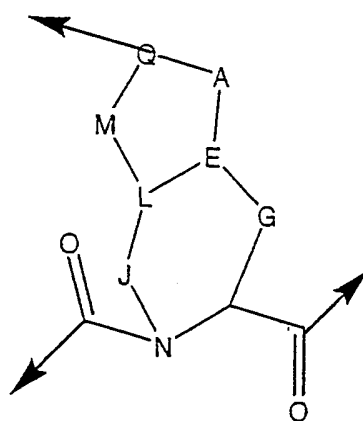


5



Další výhodná provedení zahrnují například sloučeniny, kde skupina:

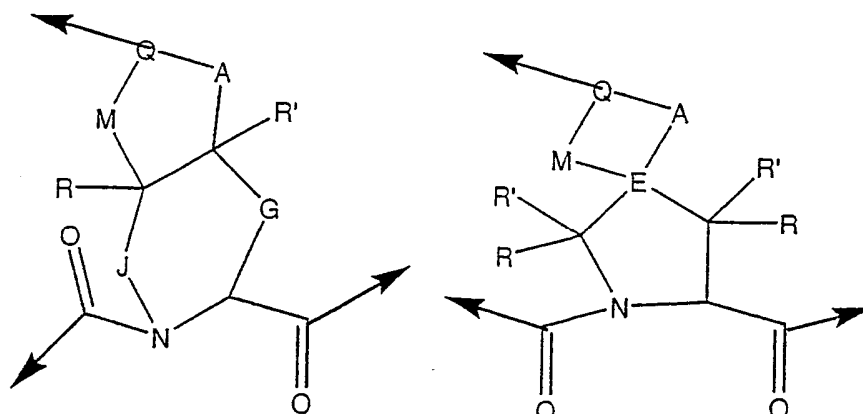
10



15

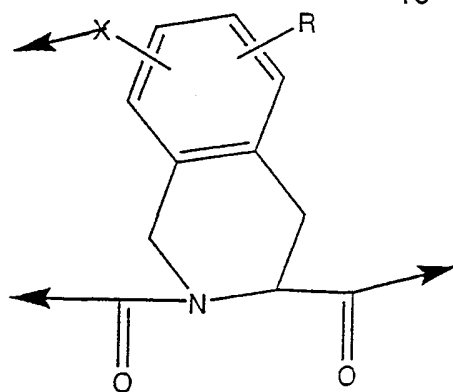
je některou z následujících struktur, přičemž příklady definic pro různé polohy jsou uvedeny v rámci struktur a sloučenin ukázaných později v této části:

20



25

nebo

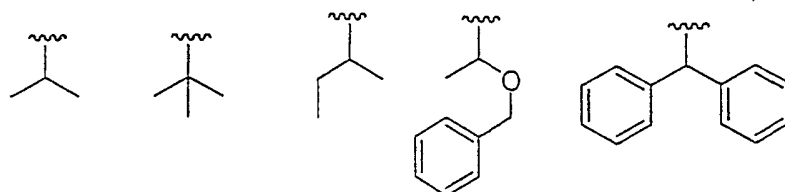


5

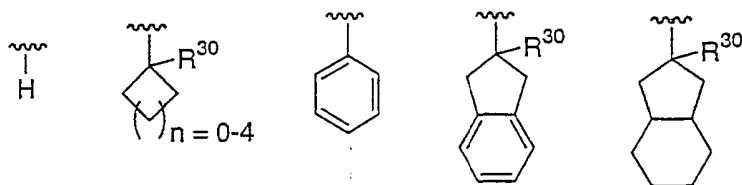
V některých výhodnějších provedeníh jsou skupiny G a J nezávisle zvoleny ze skupin $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, a $(CRR')_p$, a skupina A-E-L-M-Q je aromatický kruh složený ze dvou až osmi atomů uhlíku a 0 až 6 heteroatomů, kde skupiny X a J jsou ve vzájemné poloze *ortho*, *para* nebo *meta*.

10

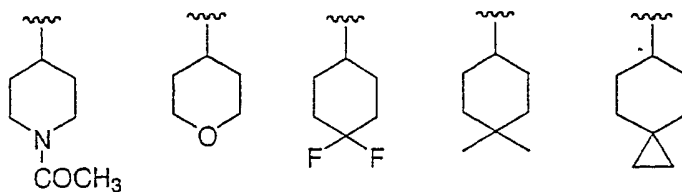
V dalších výhodných provedeníh je skupina R^3 ve vzorci I zvolena z následujících struktur



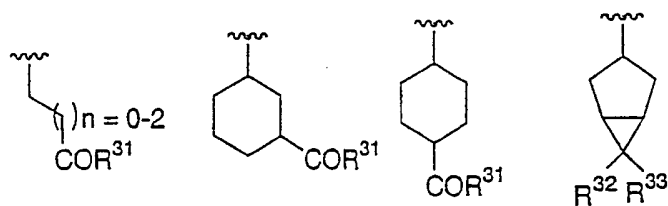
15



20



25



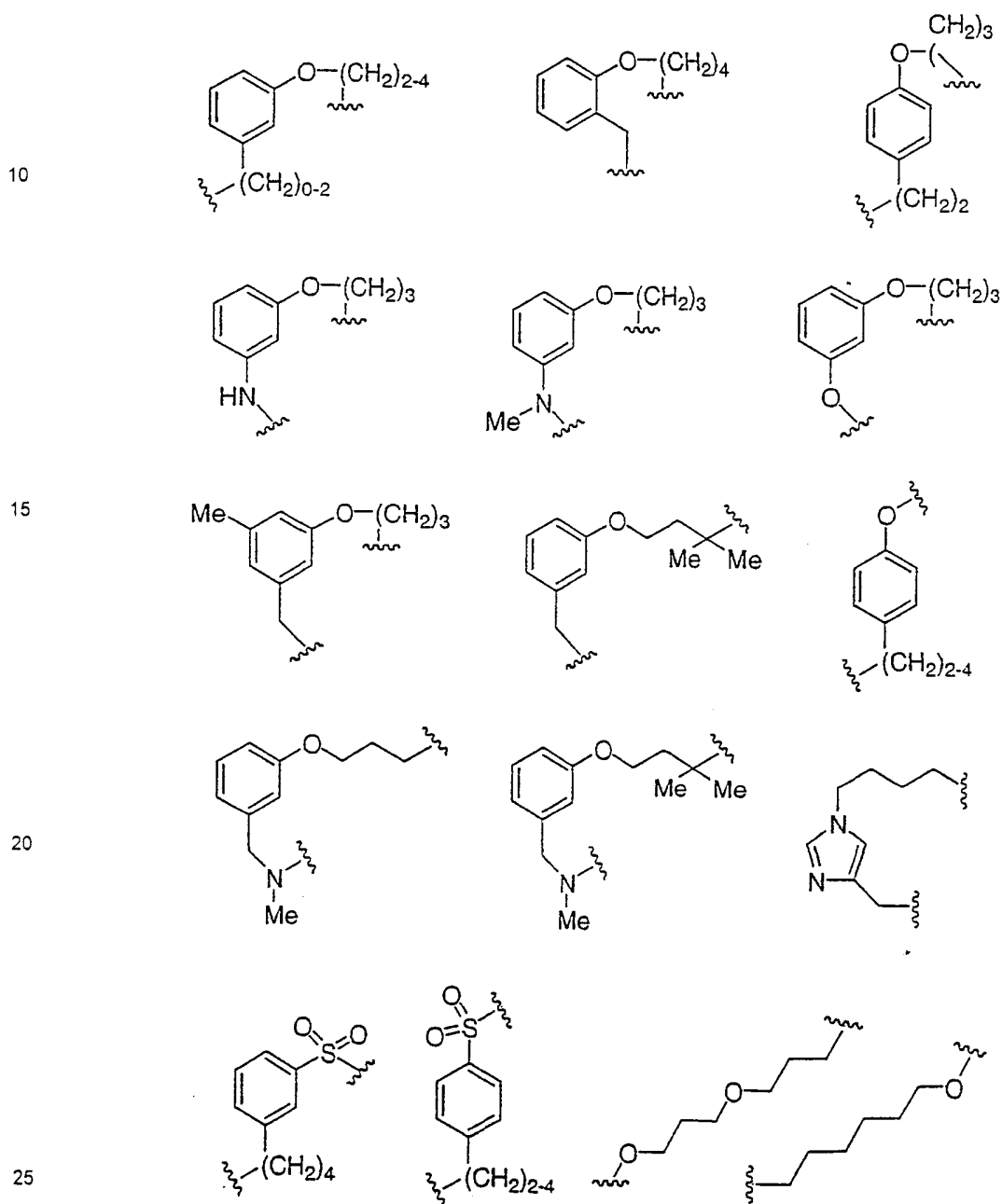
kde

R^{30} je atom vodíku, CH_3 nebo jiné alkylové skupiny;

R^{31} je OH, O-alkyl, NH_2 nebo N-alkyl;

R^{32} a R^{33} mohou být stejné nebo různé a jsou nezávisle zvoleny ze skupiny H, F, Cl, Br a CH_3 ; a

skupina X-Y je zvolena z následujících struktur:



- Několik dalších sloučenin a konkrétních provedení výše uvedených různých definic sloučenin vzorce I je uvedeno v části nároků předkládané přihlášky. Další provedení jsou také reprezentována různými sloučeninami uvedenými v popisu a nárocích.
- 5 Předkládaný vynález je ve svém celku reprezentován těmito konkrétními provedeními, definicemi a omezeními.

Reprezentativní sloučeniny podle vynálezu, které mají vynikající inhibiční účinky na proteázu HCV, jsou uvedeny dále spolu s jejich aktivitou ve formě hodnot K_i v nanomolárním (nM) rozsahu. Číslo
10 příkladů v tabulce 1 znamenají čísla různých struktur v příkladové části přihlášky dále.

Tabulka 1: Výsledky kontinuálního testu aktivity na HCV proteázu

Příklad číslo	K_i^* (nM)
1A	a
1B	b
2	b
3	b
4A	a
4B	b
5	b
6	b
7A	a
7B	b
8	a
9	b
10A	a

10B	b
11	a
12A	a
12B	b
13A	a
13B	b
14	b
15	b
16	b
17	b
18	b
19	b
20A	a
20B	b
21	a
22	b
23	a
24	a
25	a
26A	a
26B	a
27A	a
27B	b
28A	a
28B	b

29A	a
29B	b
30	b
31	b
37A	a
37B	a
38A	a
38B	a
39	a
40	a
41	a
42	a
43	b
44A	a
44B	a
46	a
53A	a
53B	a
56A	a
56B	a
57A	a
57B	b
58	a
59A	b
59B	b

60	a
61	a
62	a
63	a
64	a
65	b
66A	a
66B	b
67A	a
67B	b
68	b
69A	a
69B	b
70A	a
70B	b
71	b
72	b
73	a
74A	a
74B	b
75A	a
75B	b
76	b
77	a
78	a

79	a
80	b
81	a
82	a
83	b
84	a
85	a
86	a
87	a
88	a
89	a
90	a
91	a
92	b
93	a
94	a
95	b
96	a
97	a
98	b
99	a
100	a
101	b
102	a
103	a

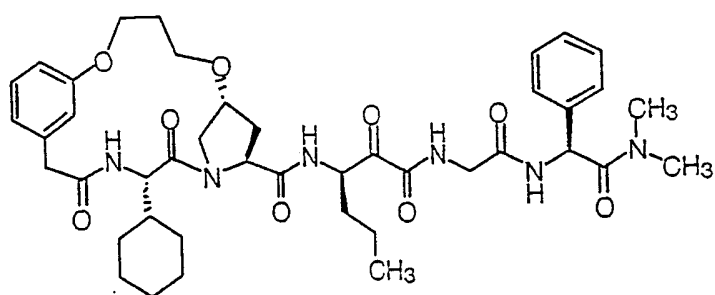
104	a
105	a
106	a
107	a
108	a
109	a
110	b
111	b

Rozmezí K_i^* kontinuálního testu aktivity na HCV proteázu:

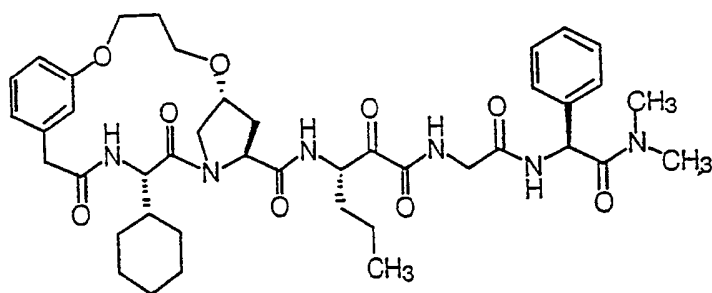
Kategorie b = 1 - 100 nM, kategorie a = 101 nM - 100 μ M

5 Některé Sloučeniny podle vynálezu a způsoby syntézy různých typů sloučenin podle vynálezu se popisují dále v této části a v následujících příkladech.

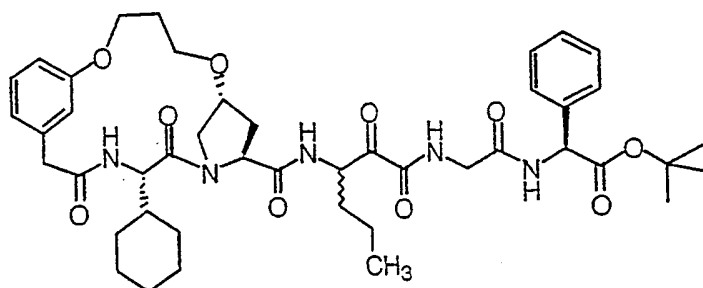
10



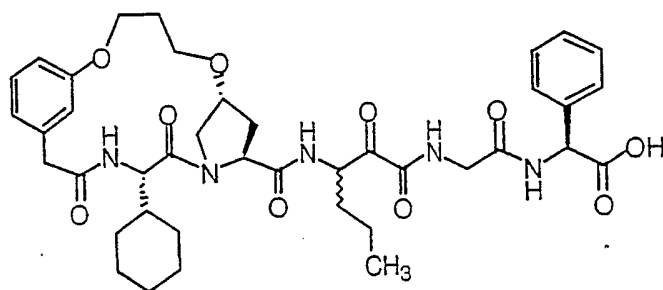
1A



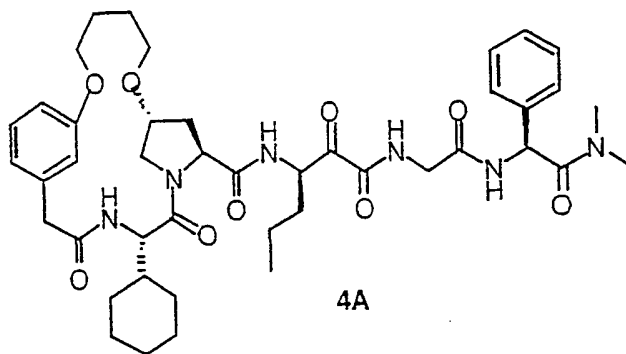
1B



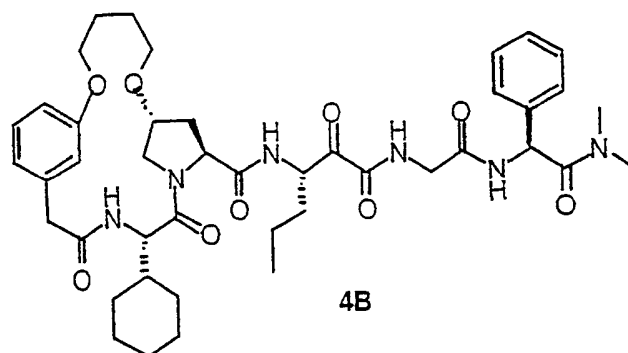
2



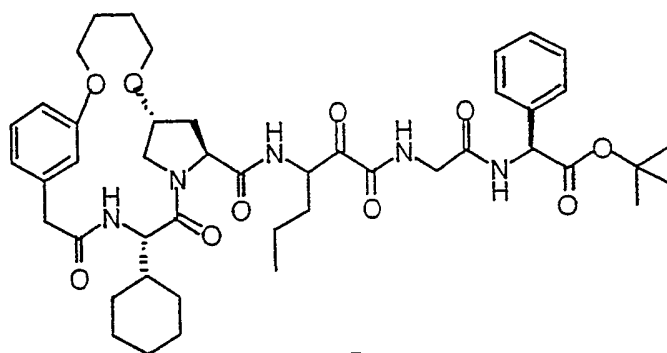
3



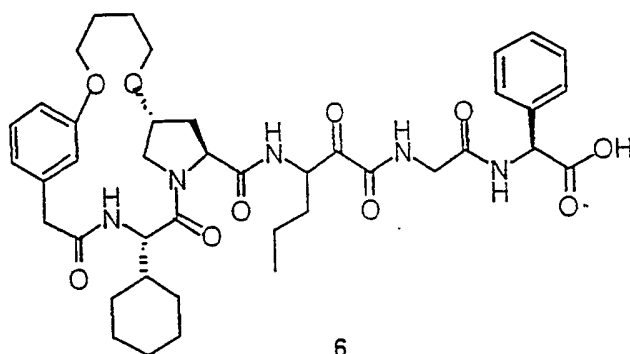
4A



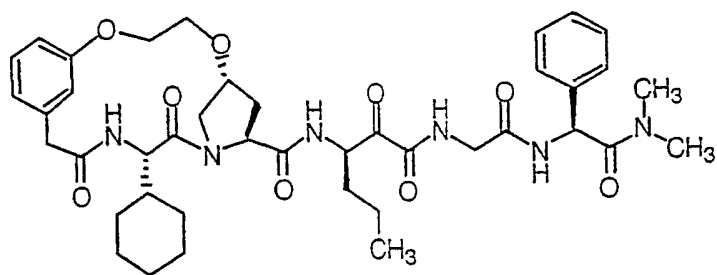
4B



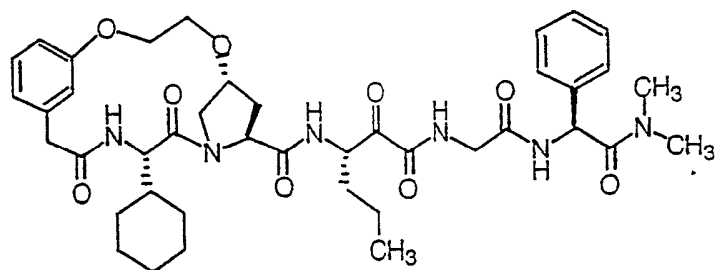
5



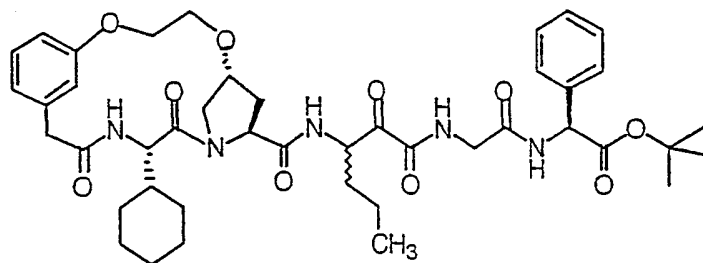
6



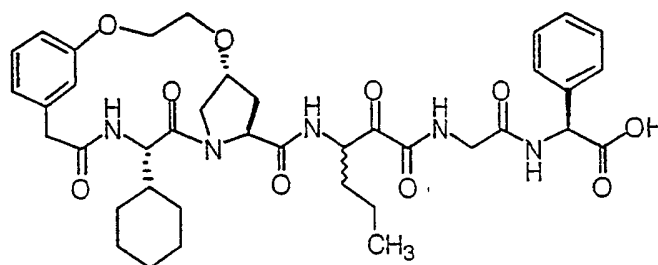
7A



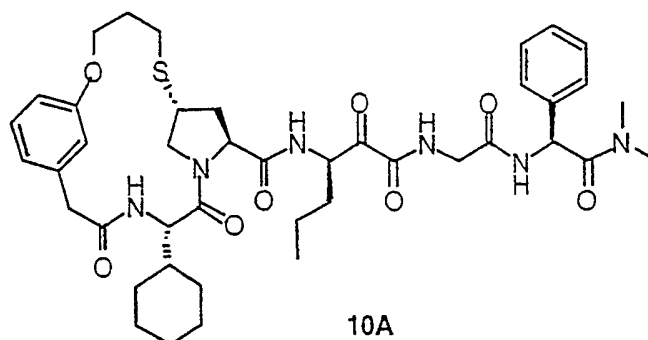
7B



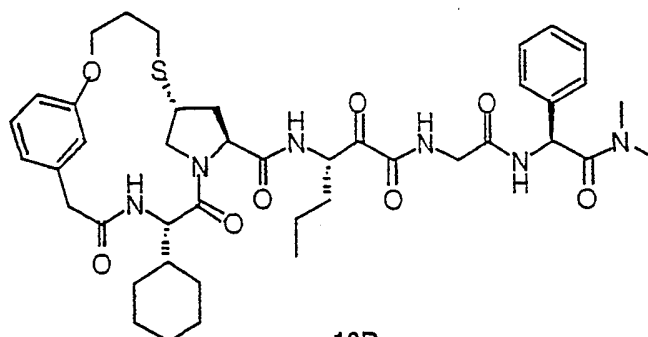
8



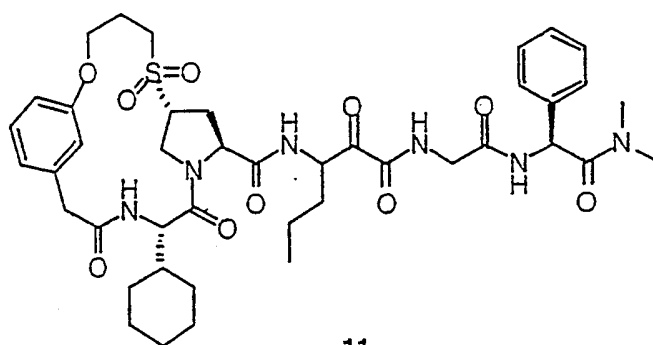
9



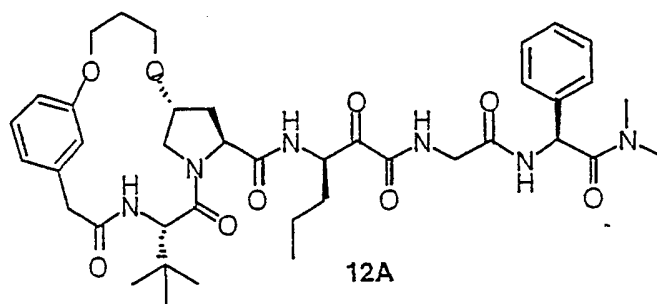
10A



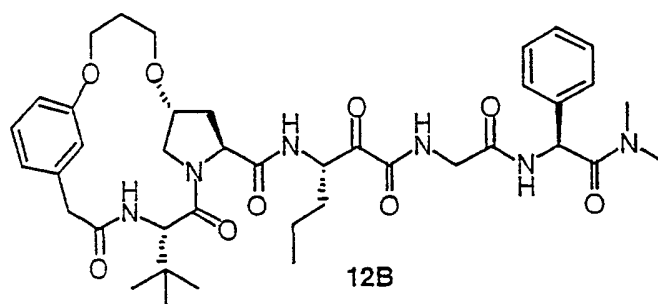
10B



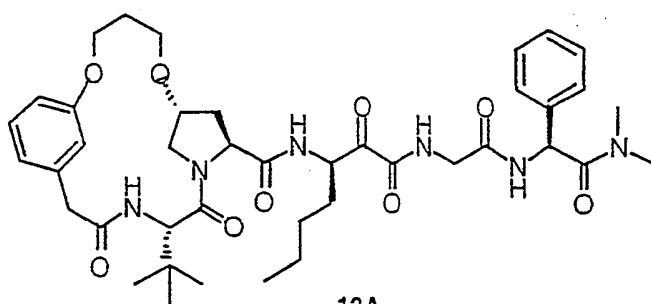
11



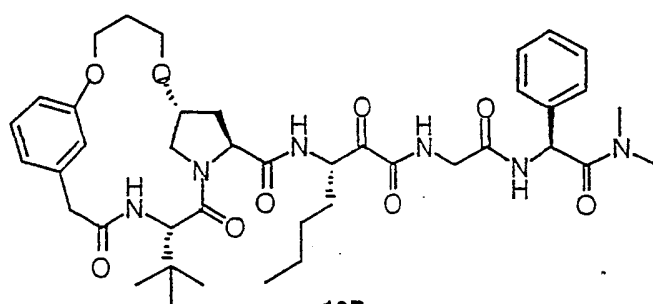
12A



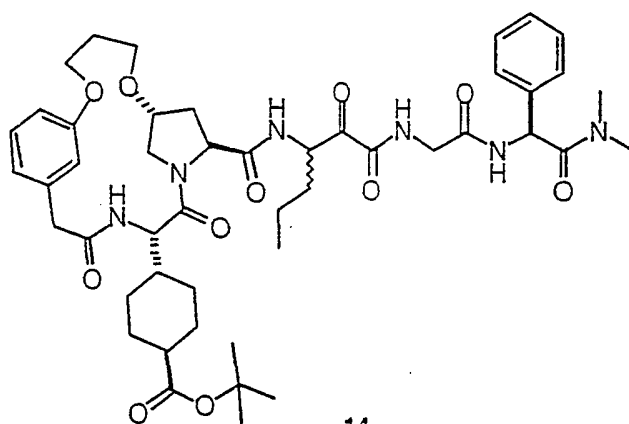
12B



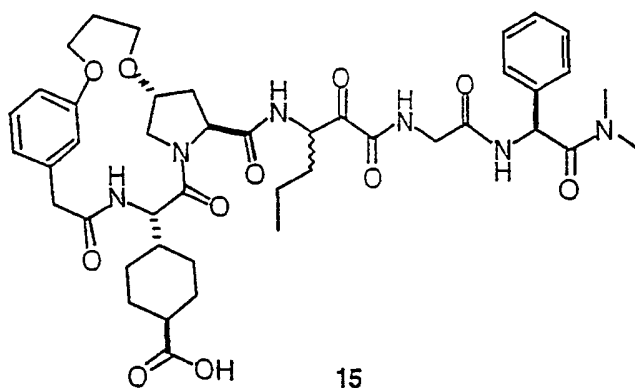
13A



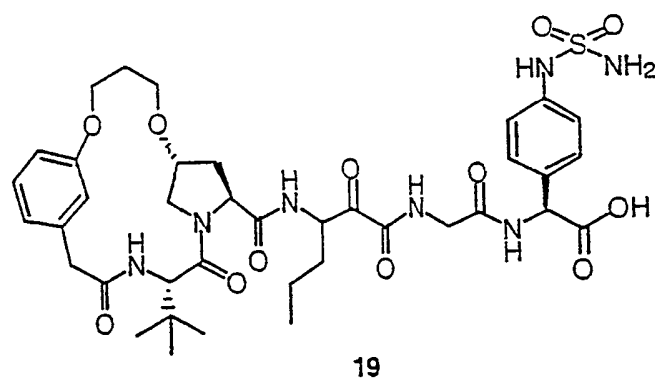
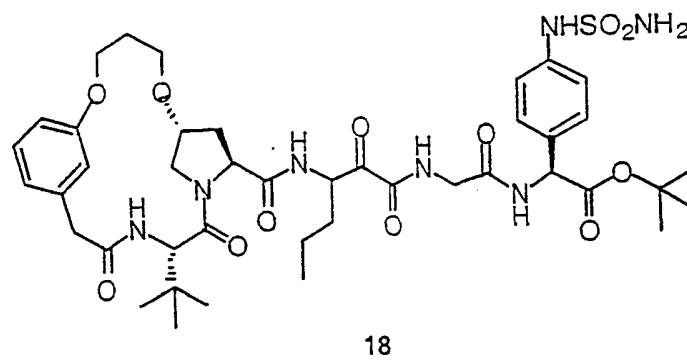
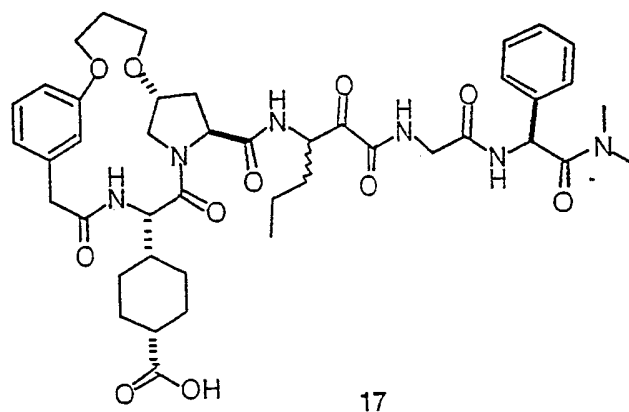
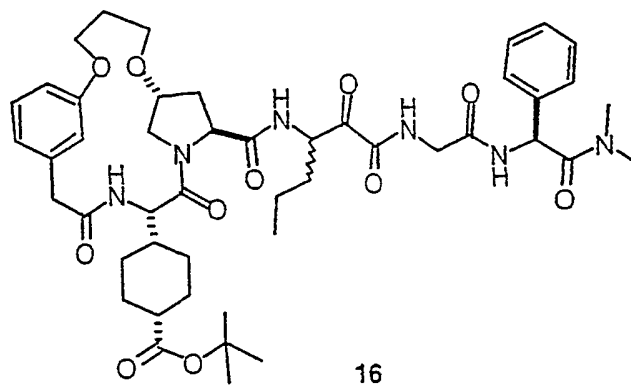
13B

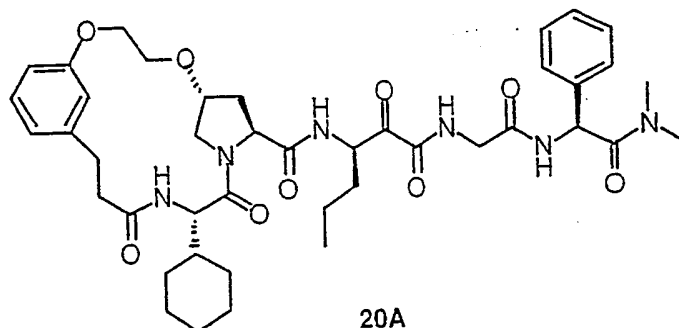


14

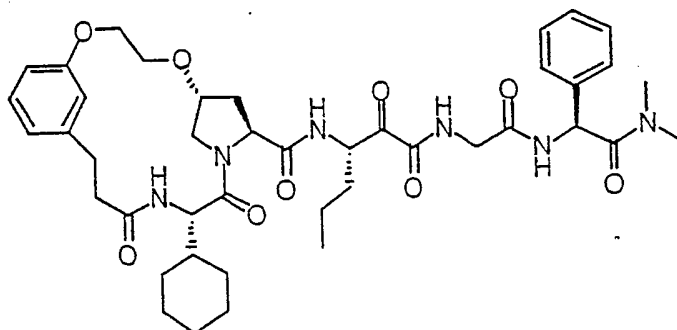


15

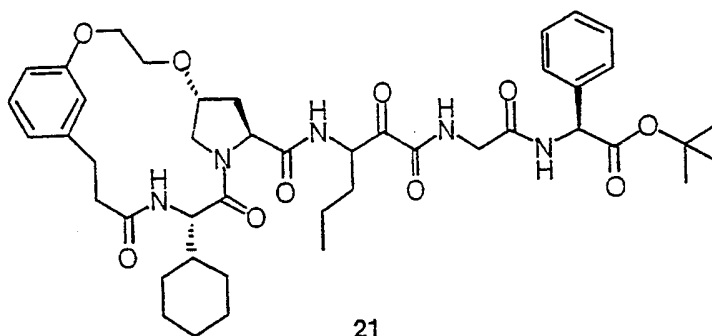




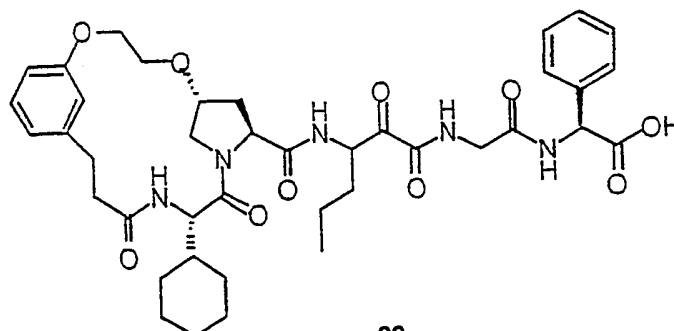
20A



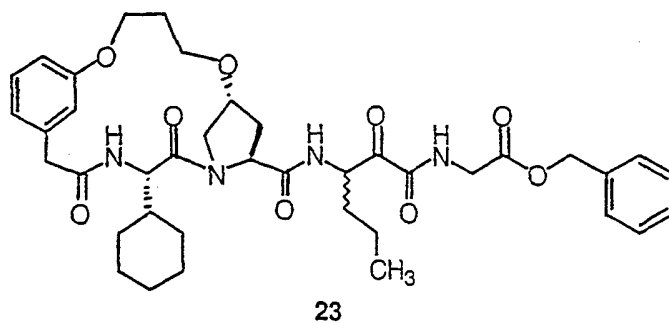
20B



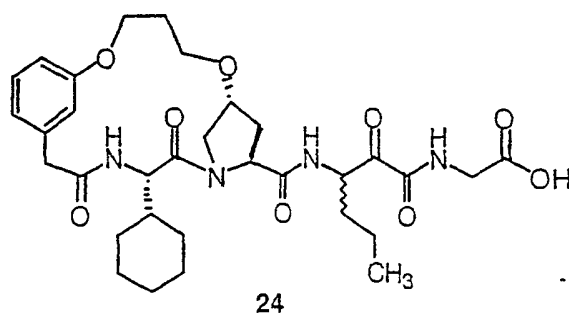
21



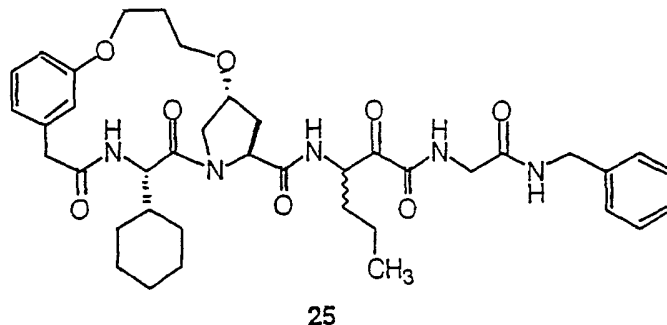
22



23

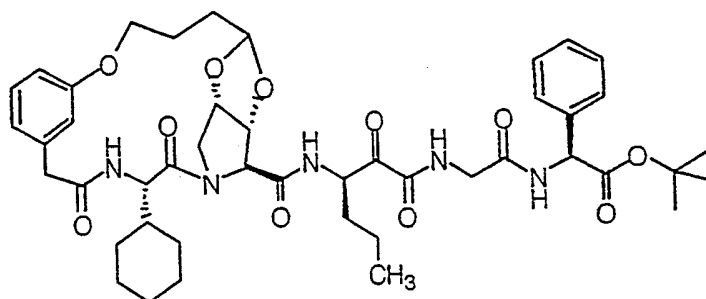


24

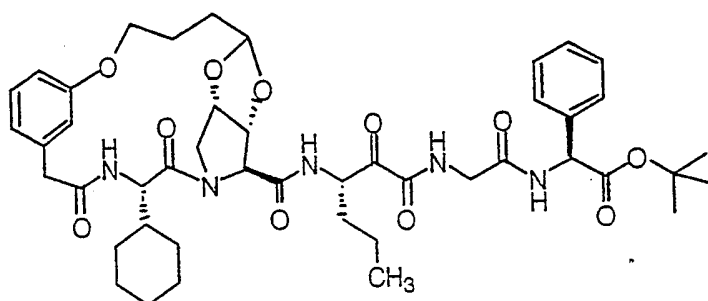


25

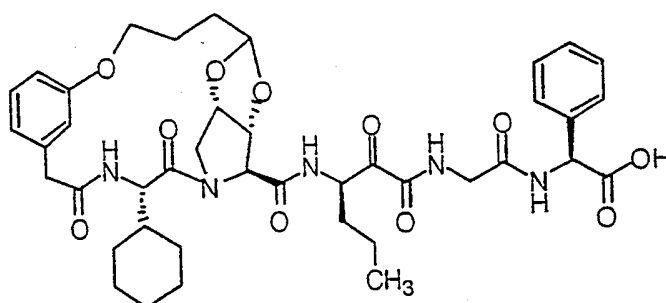




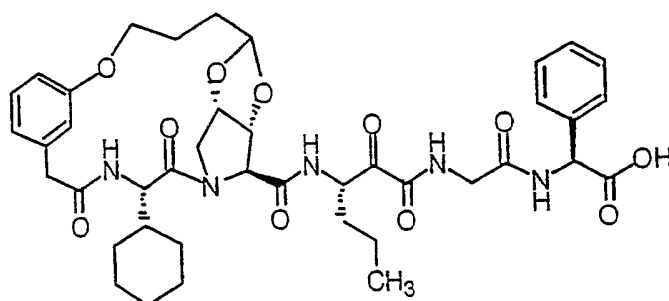
28A



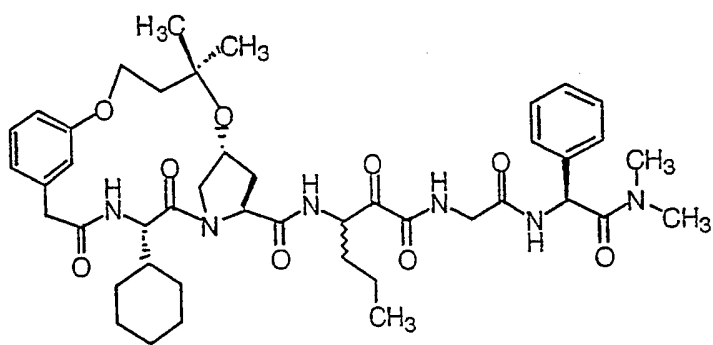
28B



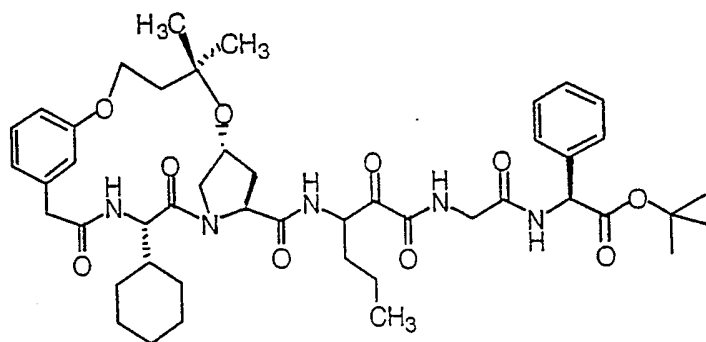
29A



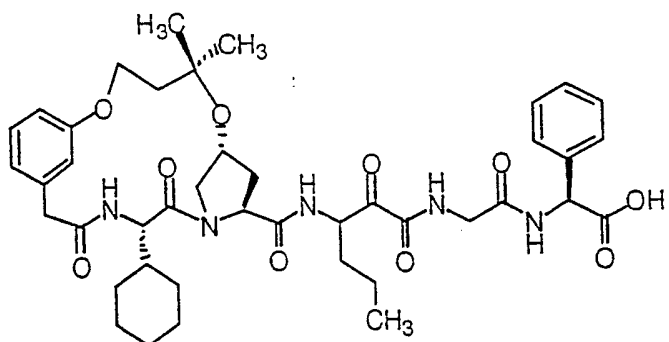
29B



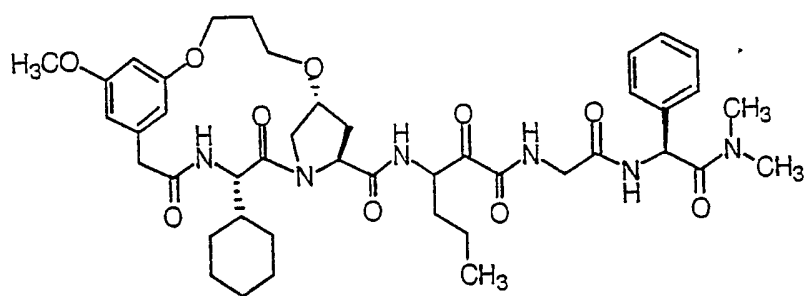
30



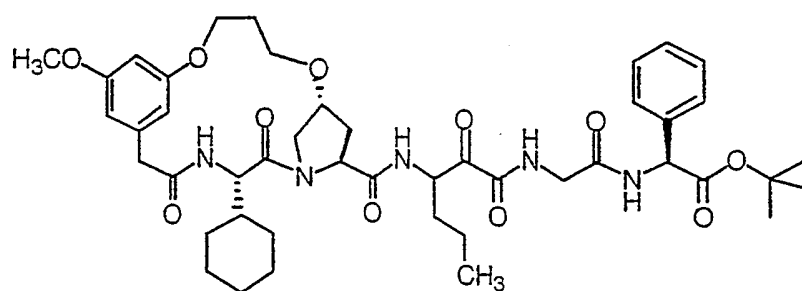
31



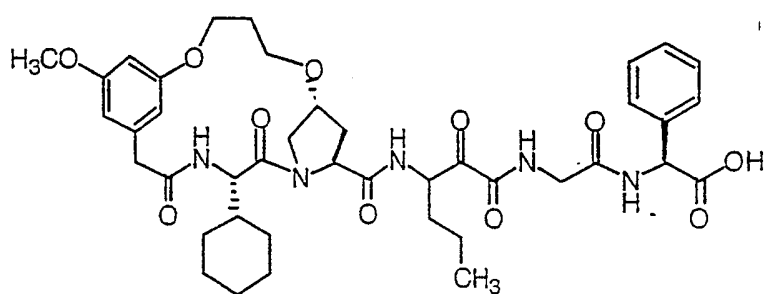
32



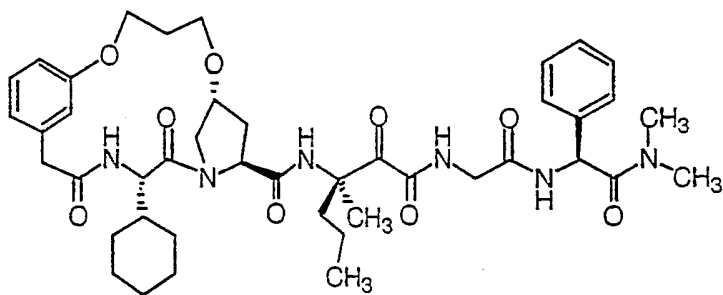
33



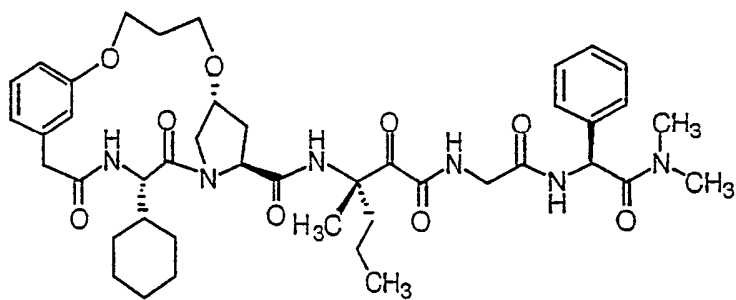
34



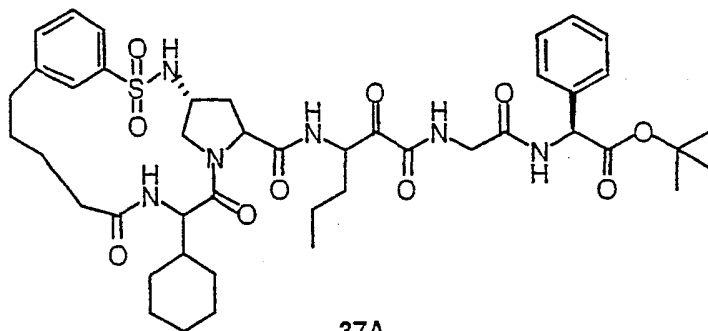
35



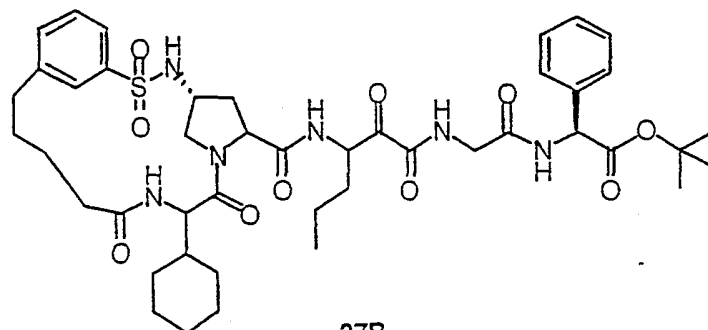
36A



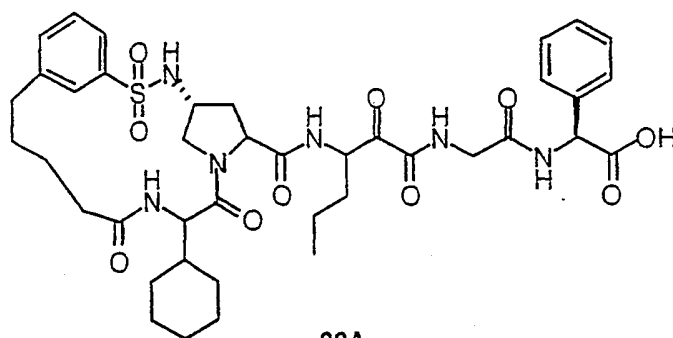
36B



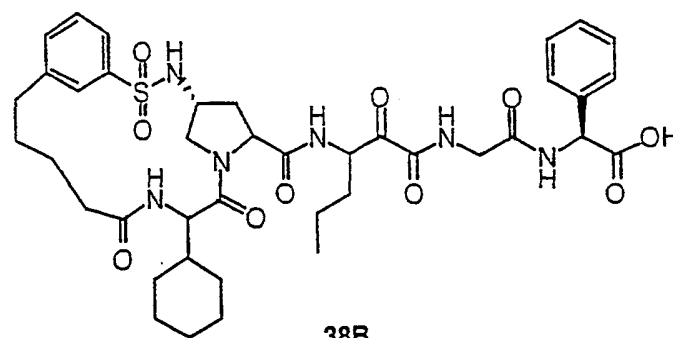
37A



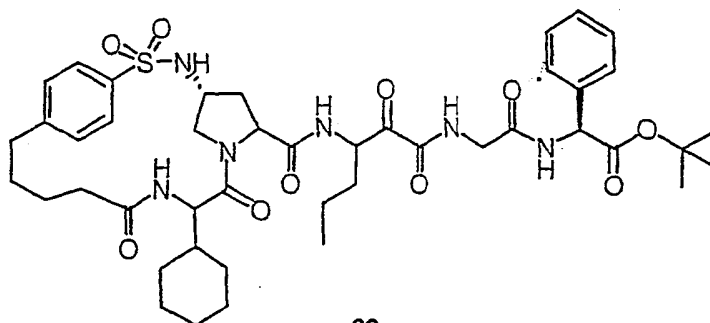
37B



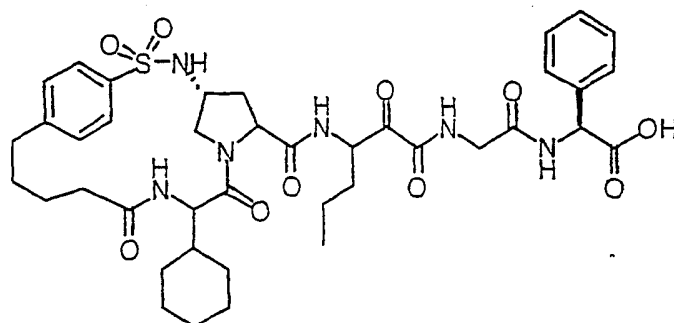
38A



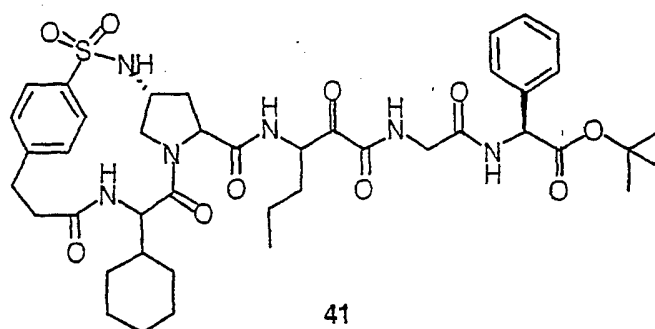
38B



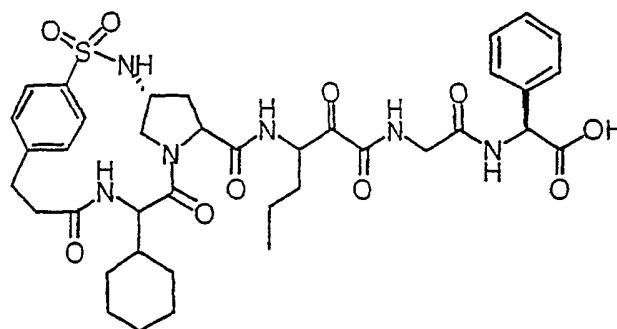
39



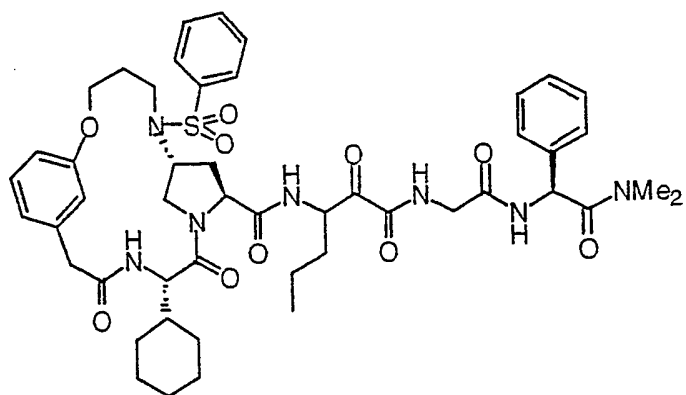
40



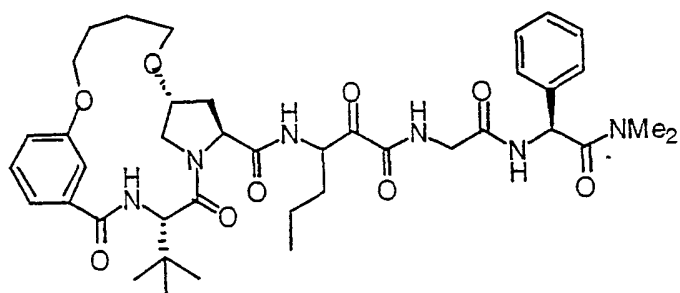
41



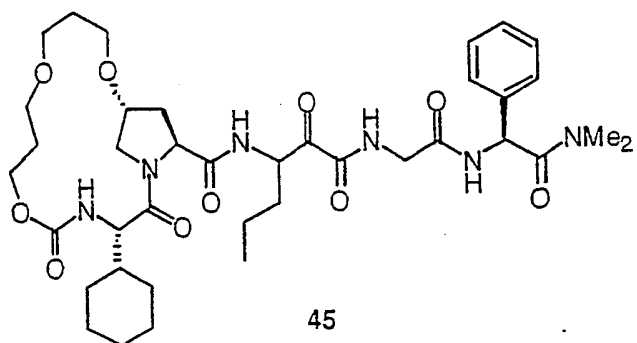
42



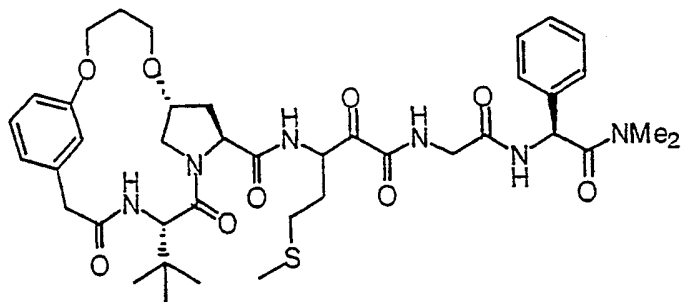
43



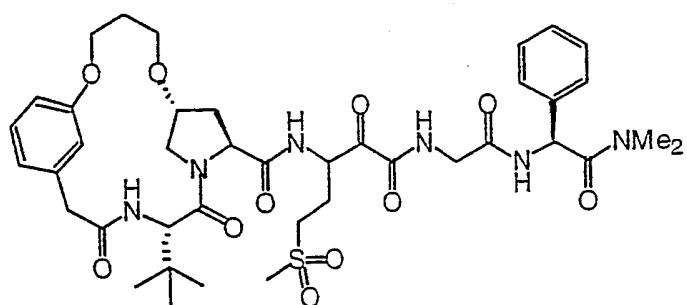
44



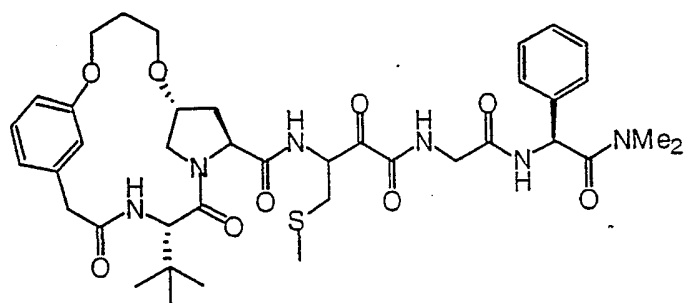
45



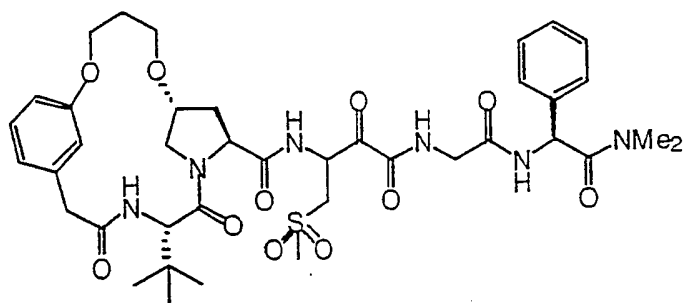
46



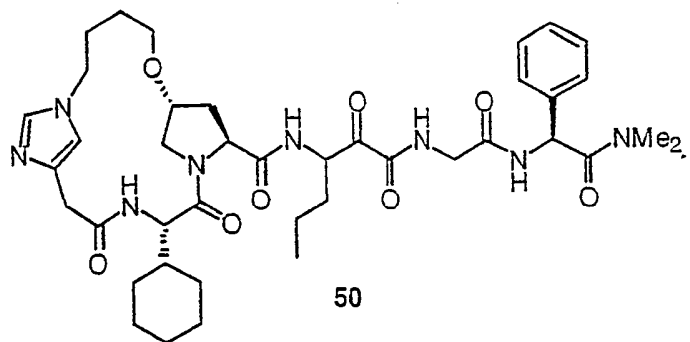
47



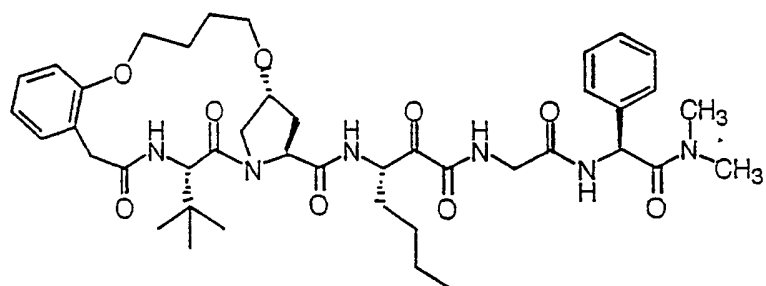
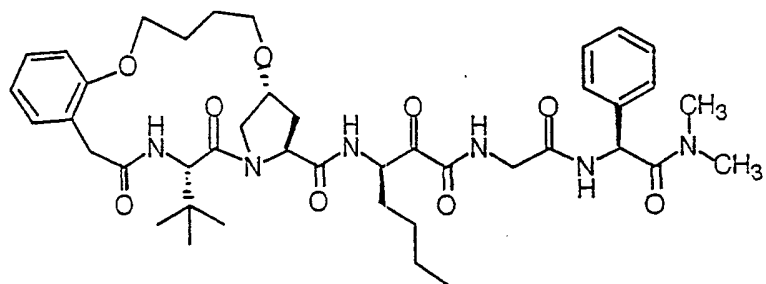
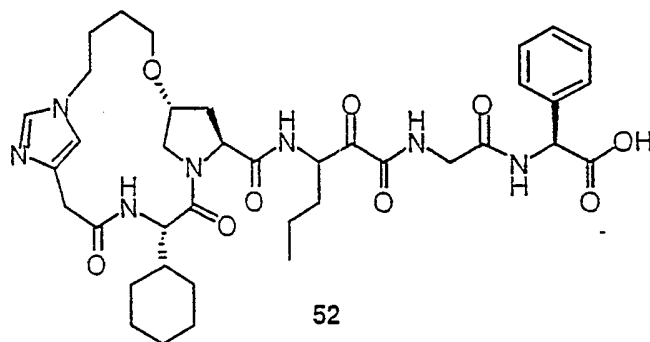
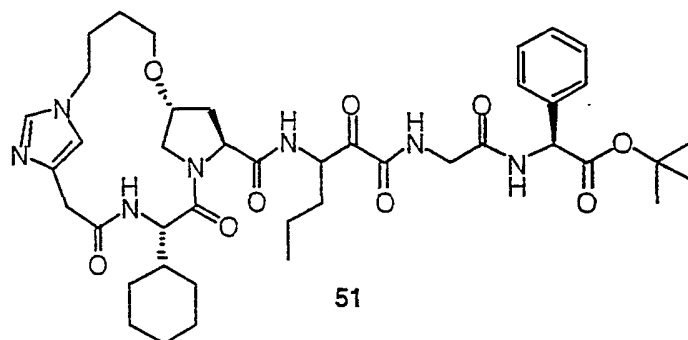
48



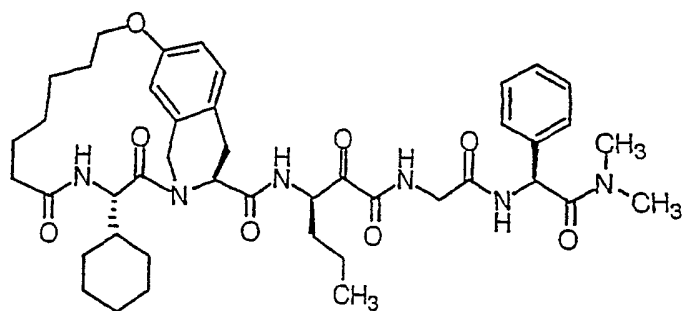
49



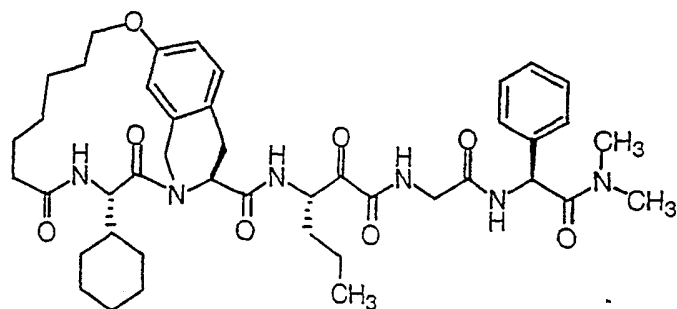
50



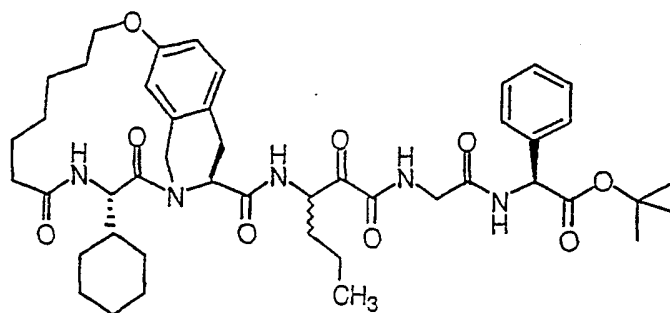




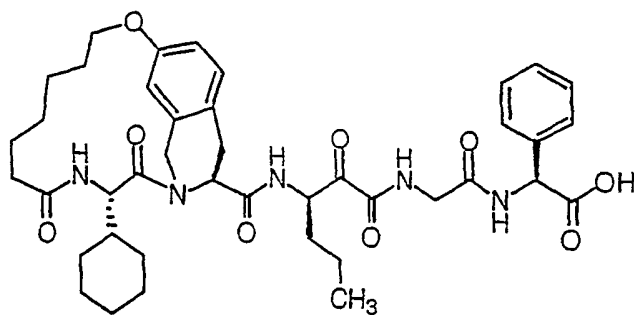
57A



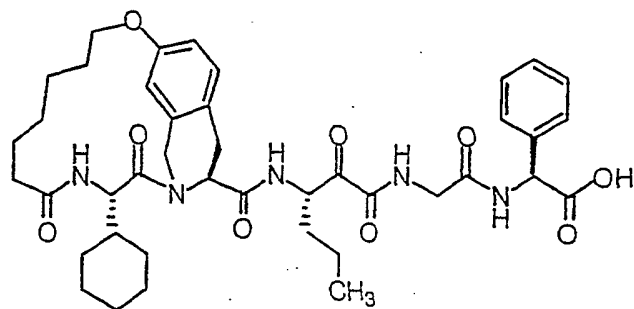
57B



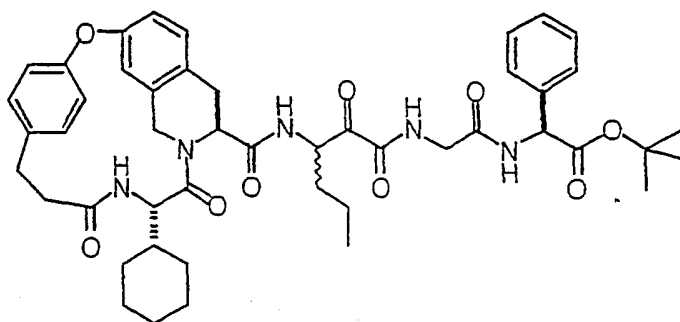
58



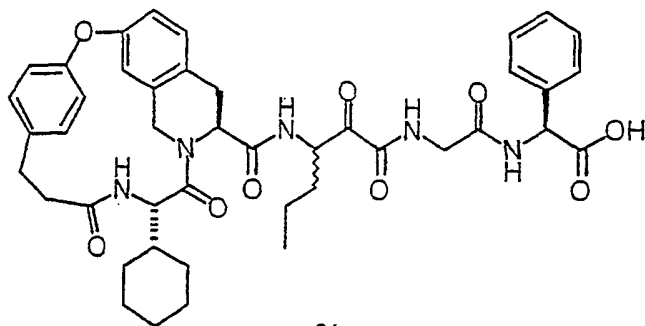
59A



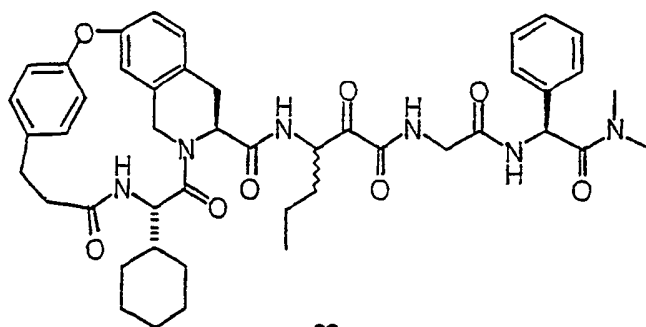
59B



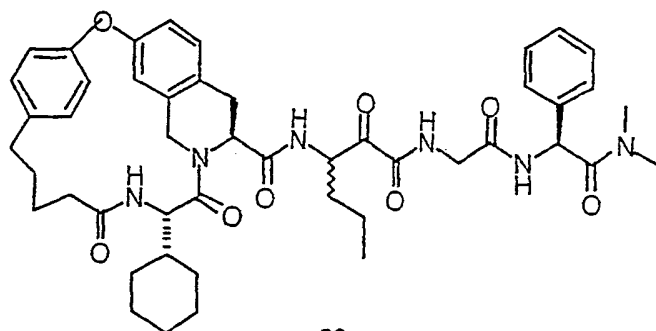
60



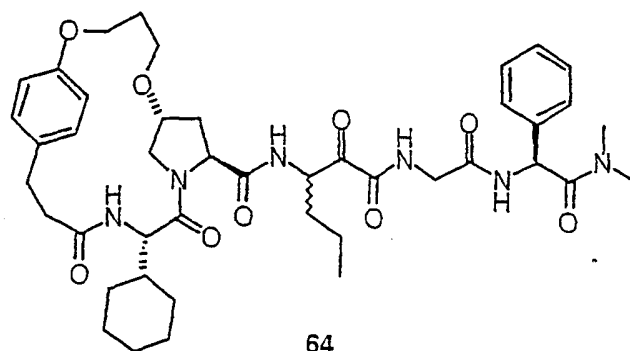
61



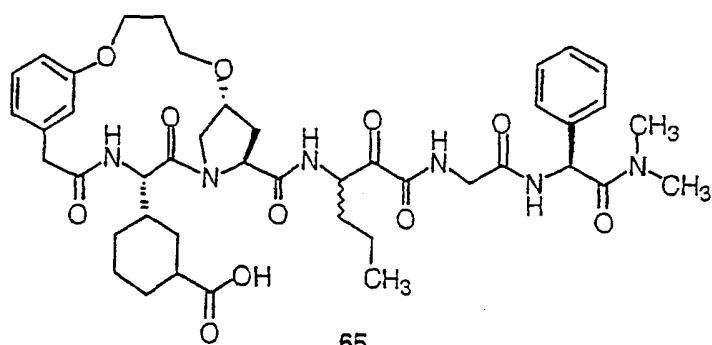
62



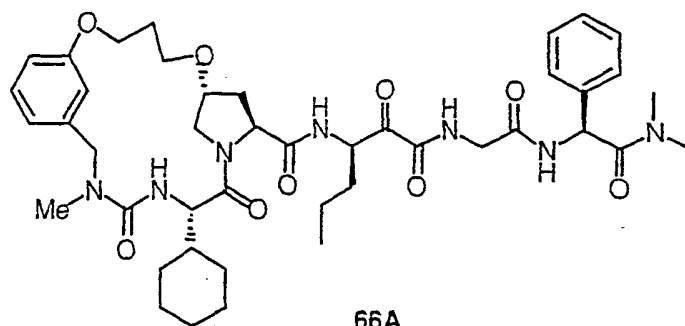
63



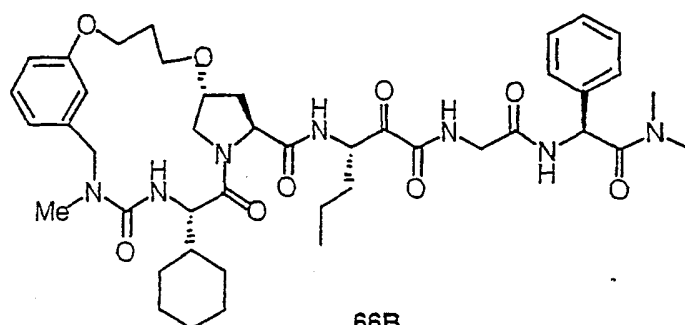
64



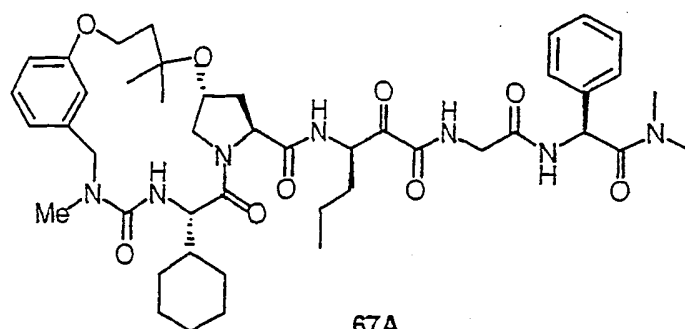
65



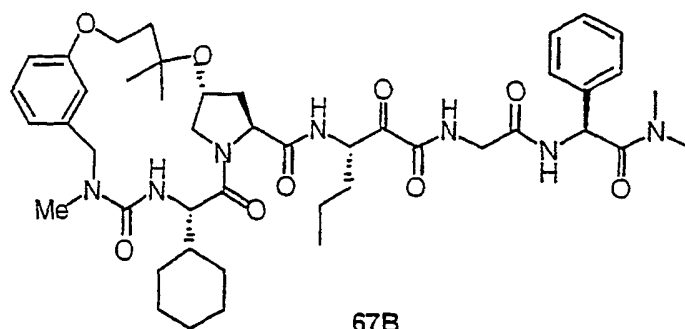
66A



66B



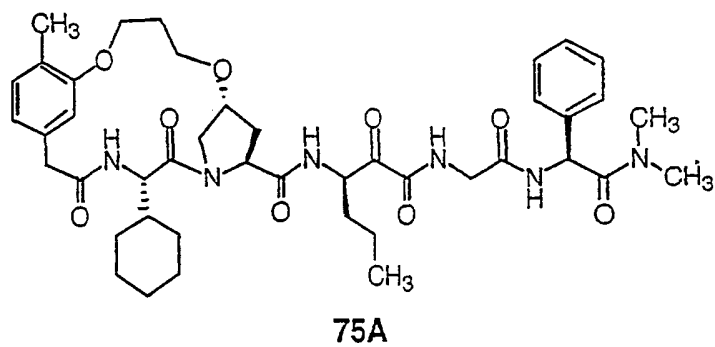
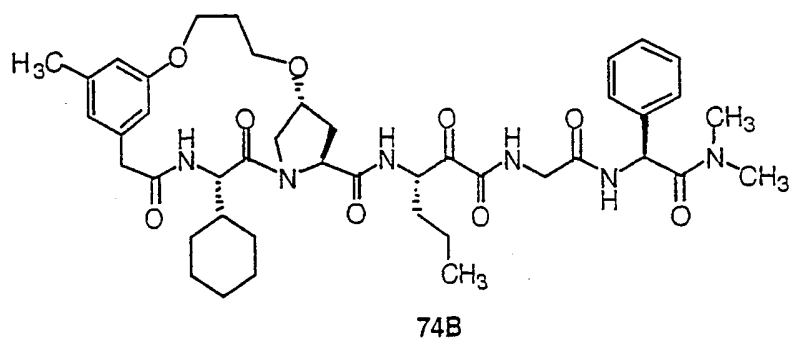
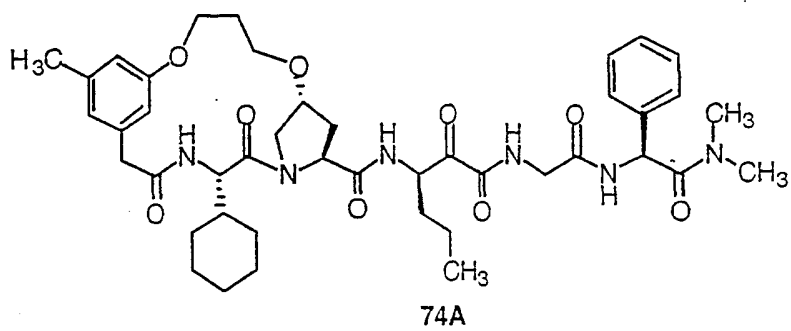
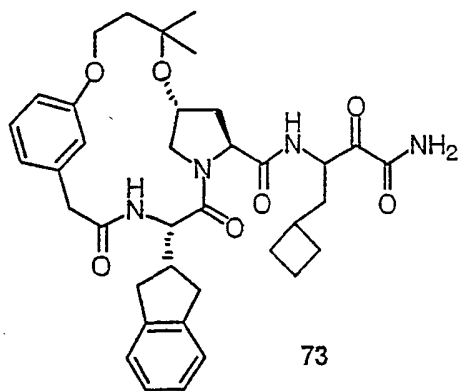
67A

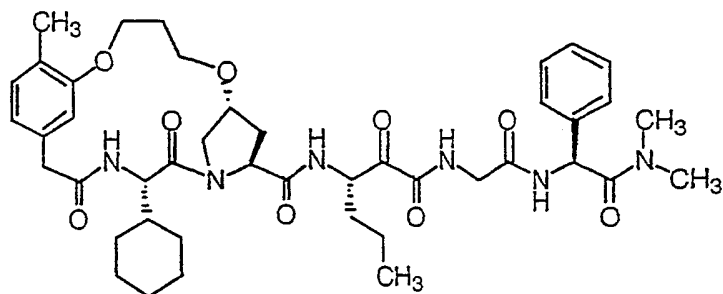


67B

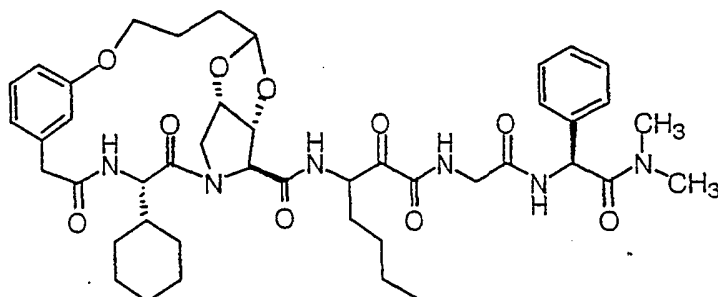




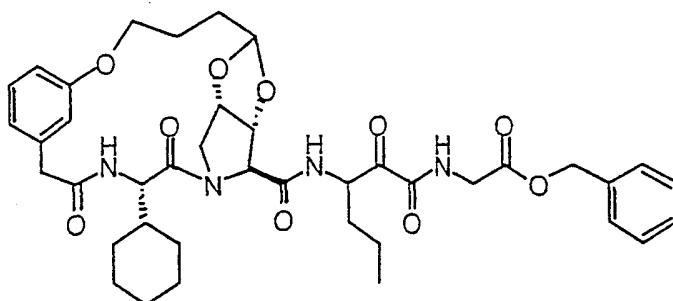




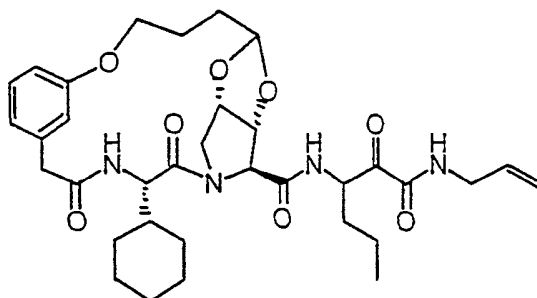
75B



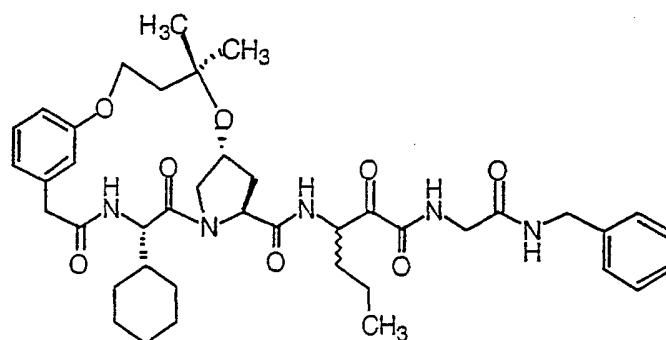
76



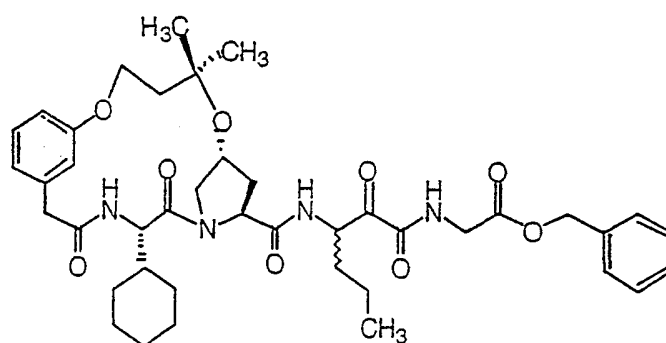
77



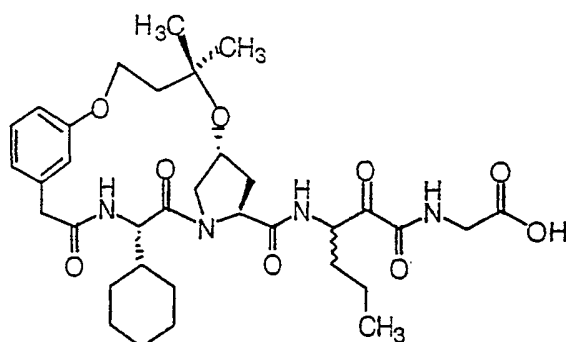
78



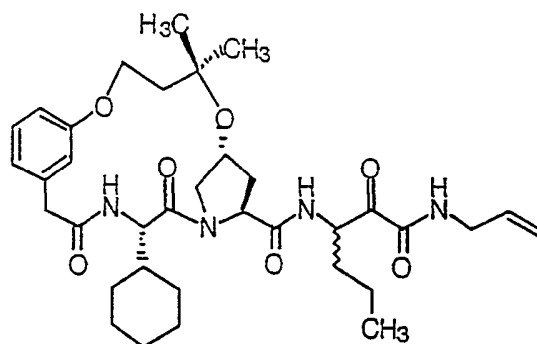
79



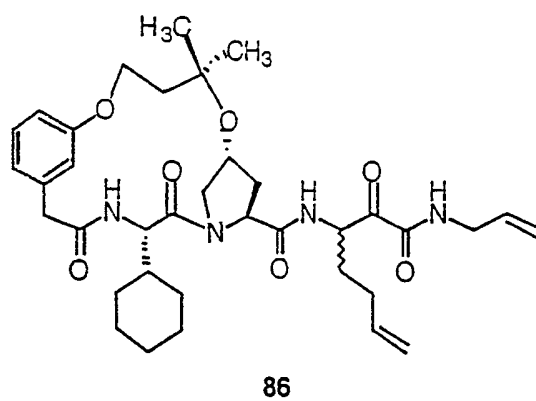
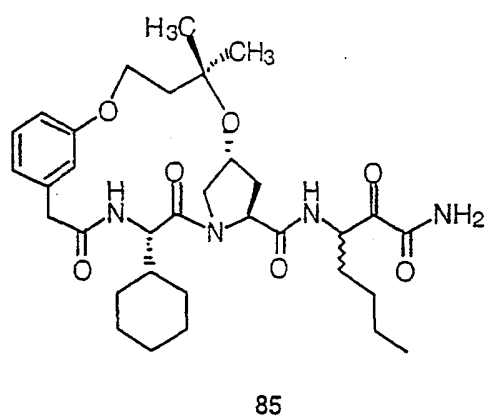
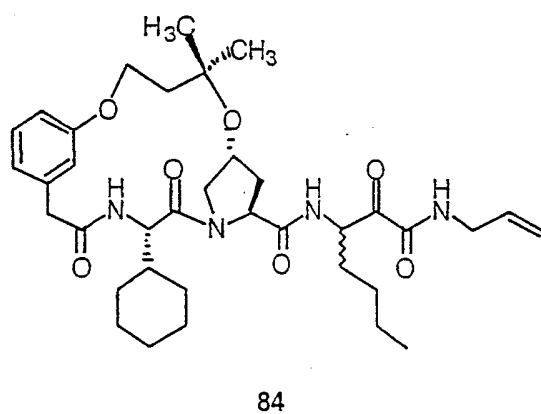
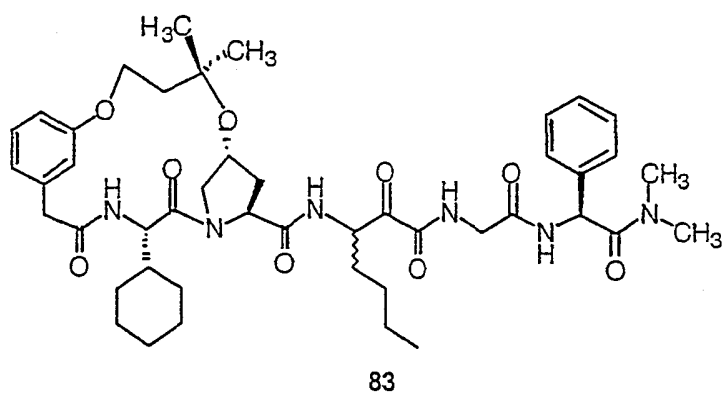
80

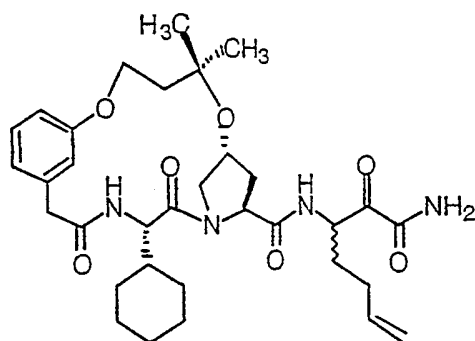


81

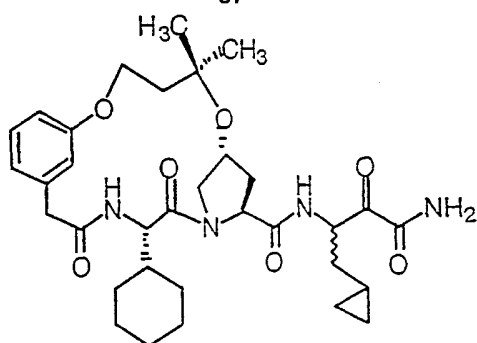


82

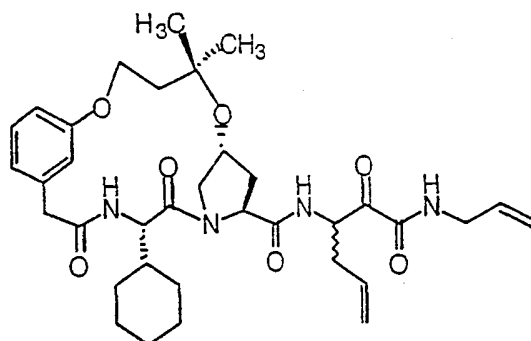




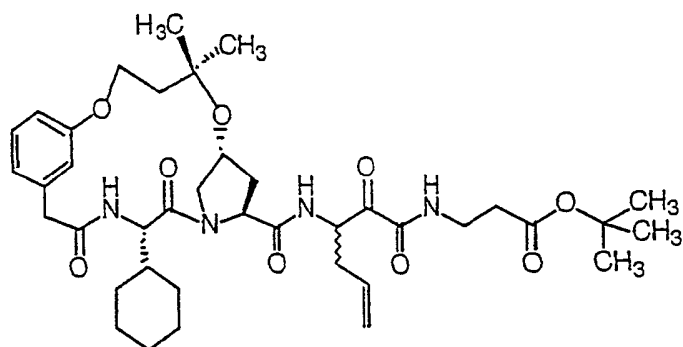
87



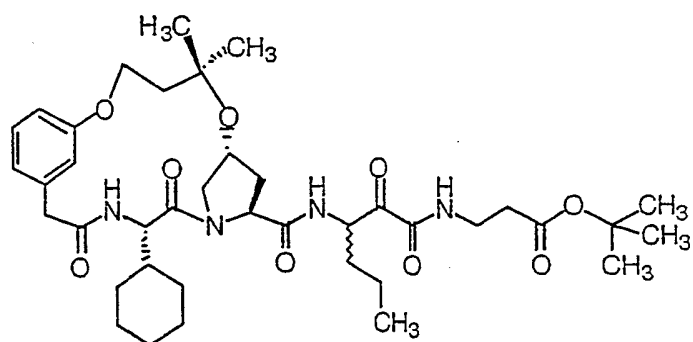
88



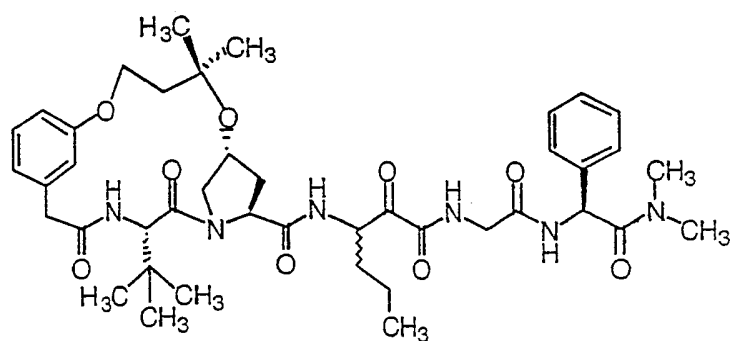
89



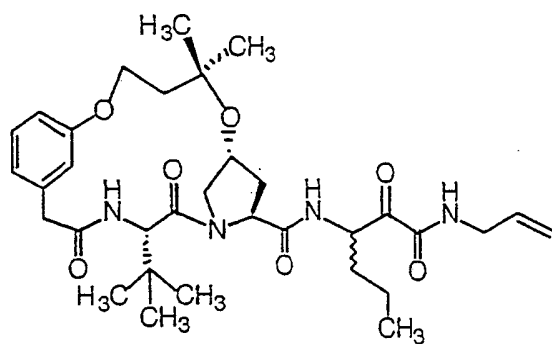
90



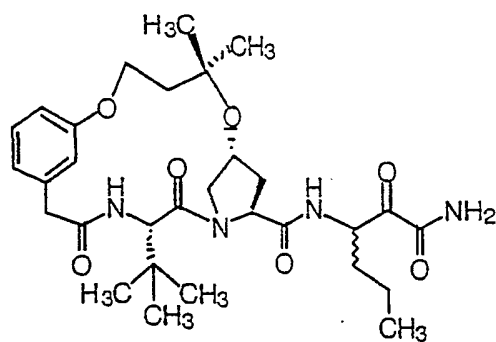
91



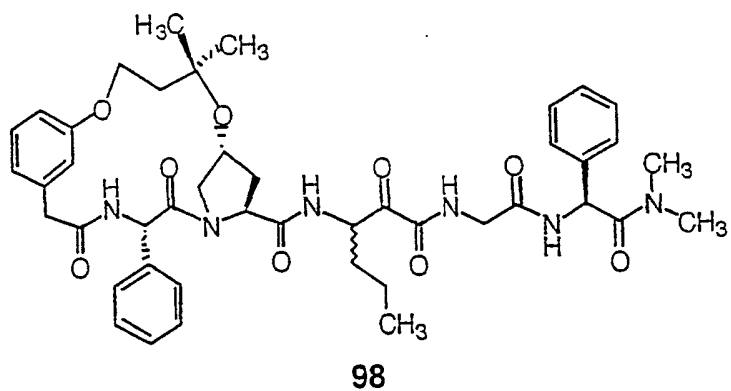
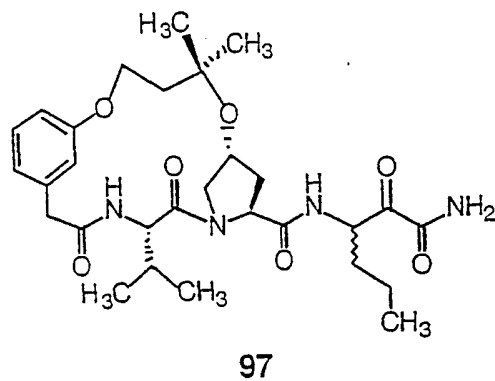
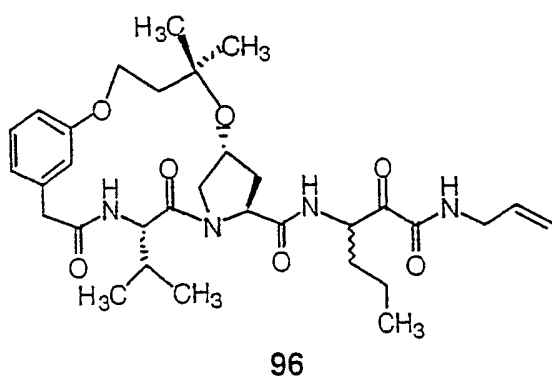
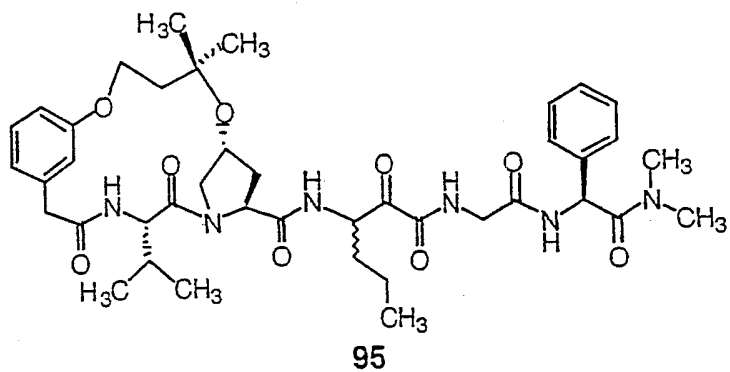
92

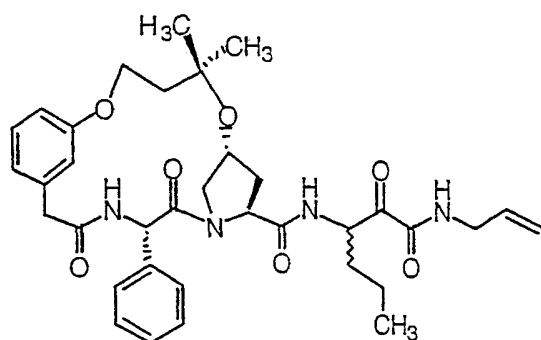


93

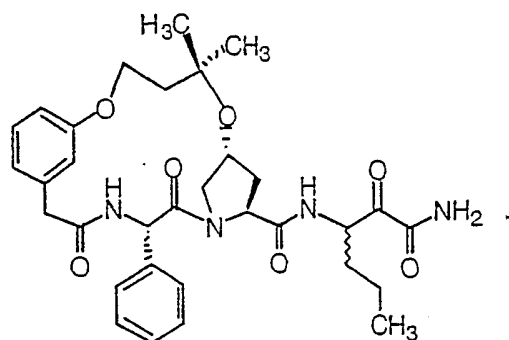


94

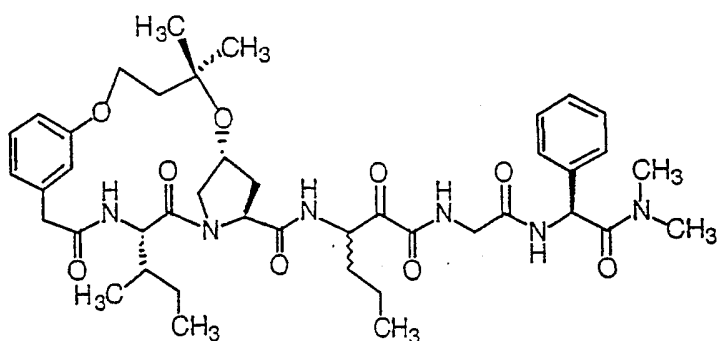




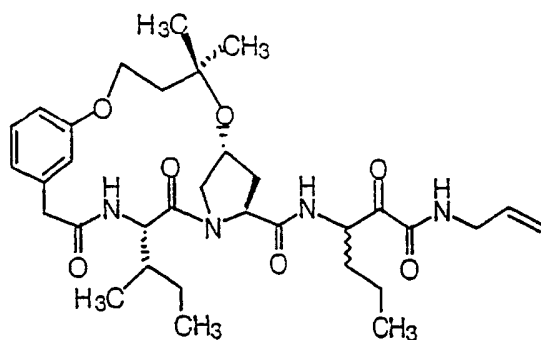
99



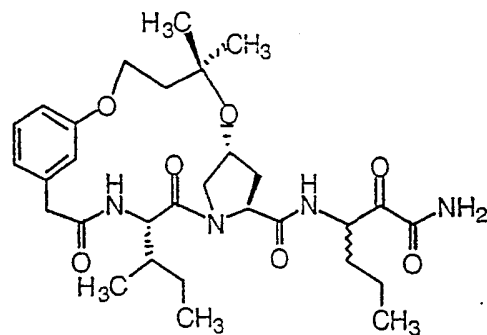
100



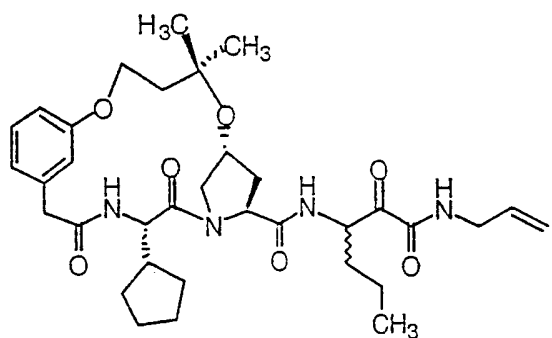
101



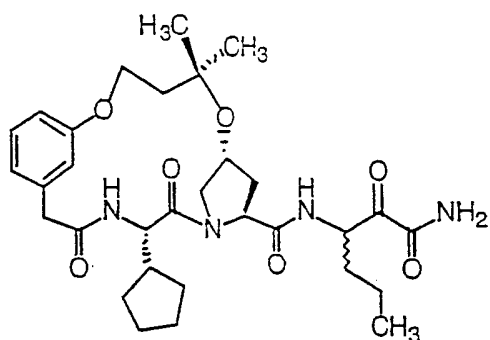
102



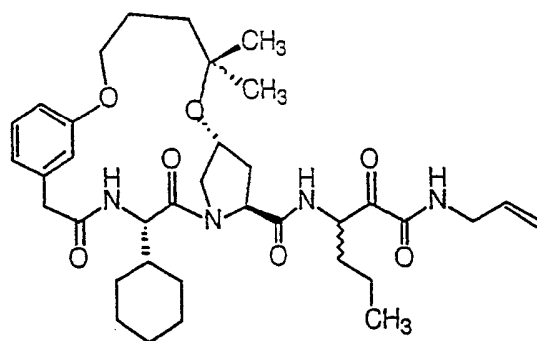
103



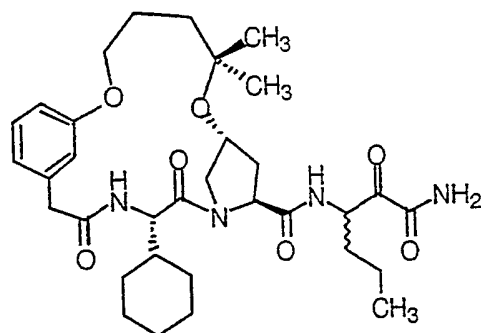
104



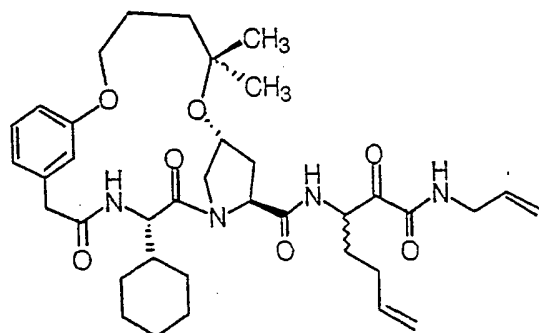
105



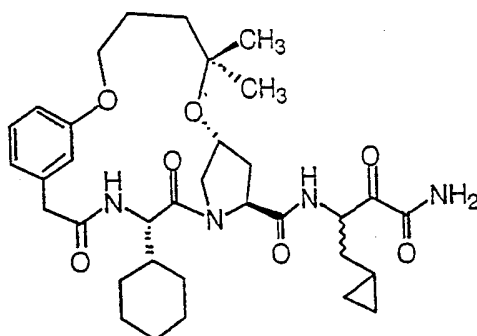
106



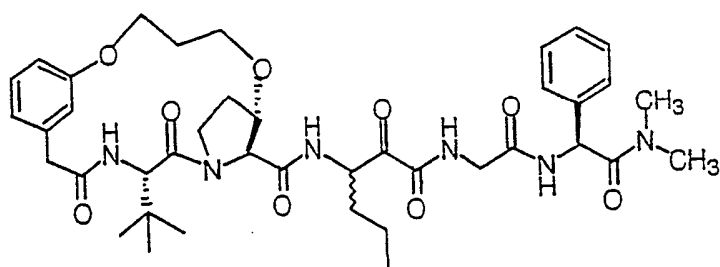
107



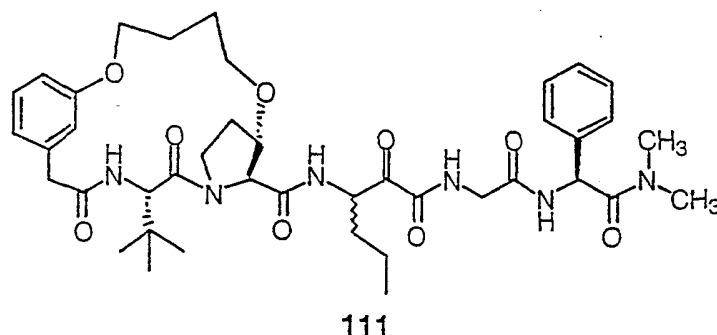
108



109



110



5

V závislosti na struktuře mohou být sloučeniny podle vynálezu ve formě farmaceuticky přijatelných solí s organickými nebo anorganickými kyselinami nebo organickými nebo anorganickými bázemi. Příklady vhodných kyselin pro vytváření takových solí jsou kyselina chlorovodíková, sírová, fosforečná, octová, citronová, šťavelová, malonová, salicylová, jablečná, fumarová, jantarová, askorbová, maleinová, methansulfonová nebo jiné minerální a karboxylové kyseliny dobře známé odborníkům v oboru. Pro vytváření solí s bázemi jsou vhodné báze například NaOH, KOH, NH₄OH, tetraalkylamoniumhydroxid apod.

V dalším provedení poskytuje předkládaný vynález farmaceutické prostředky obsahující výše uvedené makrocyclické sloučeniny jako účinnou složku. Farmaceutické prostředky obecně dále obsahují farmaceuticky přijatelné nosné ředivo, pomocnou látku nebo nosič (zde souhrnně označované jako nosné materiály). Pro své inhibiční účinky na HCV mají tyto farmaceutické prostředky využití při léčení hepatitidy C a souvisejících stavů.

V ještě dalším provedení popisuje předkládaný vynález způsoby výroby farmaceutických prostředků obsahujících makrocyclické sloučeniny podle vynálezu jako účinnou složku. Ve farmaceutických prostředcích podle předkládaného vynálezu se budou účinné složky typicky podávat ve směsi s vhodnými nosiči vhodně zvolenými s ohledem na zamýšlenou formu podávání, tj. orální tablety, kapsle (buď plněné pevnou látkou, polotuhou látkou nebo kapalinou), prášky

30

pro rekonstituci, orální gely, elixíry, dispergovatelné granule, sirupy, suspenze apod., a v souladu s běžnou farmaceutickou praxí. Pro orální podávání ve formě tablet nebo kapslí může být například účinná látka kombinována s jakýmkoli orálním netoxickým farmaceuticky přijatelným inertním nosičem jako je laktóza, škrob, sacharóza, 5 celulóza, stearan hořečnatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, síran vápenatý, talek, mannitol, ethylalkohol (kapalné formy) apod. V případě potřeby mohou být do směsi navíc přidána pojiva, kluzné látky, rozvolňovadla a barviva. Prášky a tablety mohou obsahovat od 10 přibližně 5 do přibližně 95 % hmotnostních účinné složky.

Mezi vhodná pojiva patří škrob, želatina, přírodní cukry, kukuřičná sladidla, přírodní a syntetické gumy jako je akácie, alginát sodný, karboxymethylcelulóza, polyethylenglykol a vosky. Jako kluzné 15 látky mohou být v předkládaných dávkových formách použity kyselina boritá, benzoan sodný, octan sodný, chlorid sodný apod. Mezi rozvolňovadla patří škrob, methylcelulóza, guarová guma apod. V případě potřeby mohou být také obsažena sladidla, příchuti a ochranné látky. Některé výše uvedené látky, totiž rozvolňovadla, řediva, kluzné látky, pojiva apod., se podrobněji popisují dále.

20 Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být také formulovány ve formě s prodlouženým uvolňováním za získání řízené rychlosti uvolňování jedné nebo více složek nebo účinných složek pro dosažení optimalizace terapeutických účinků, například inhibiční aktivity na HCV apod. Mezi vhodné dávkové formy pro prodloužené 25 uvolňování patří vrstvené tablety obsahující vrstvy s různými rychlostmi rozpadávání nebo polymerní matrice s řízeným uvolňováním impregnované účinnými složkami a tvarované ve formě tablet, nebo kapsle obsahující tyto impregnované nebo zapouzdřené porézní polymerní matrice.

30 Mezi prostředky v kapalné formě patří roztoky, suspenze a emulze. Jako příklad je možno uvést vodu nebo roztoky

propylenglykolu ve vodě pro parenterální injekce, nebo přídavek sladidel a sedativ pro orální roztoky, suspenze a emulze. Kapalně formy přípravků mohou rovněž zahrnovat roztoky pro intranazální podávání.

- 5 Aerosolové přípravky vhodné pro inhalaci mohou obsahovat roztoky a pevné látky ve formě prášku, který může být v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem, jako je inertní stlačený plyn, například dusík.

10 Pro přípravu čípků se nejprve roztaví nízkotající vosk jako je směs glyceridů mastných kyselin jako kakaové máslo a účinná složka se ve směsi homogenně disperguje mícháním nebo podobným způsobem mísení. Roztavená homogenní směs se potom nalije do forem běžných tvarů, ponechá se ochladit a tím ztuhnout.

15 Zahrnuty jsou také preparáty v pevné formě, které jsou určeny pro převedení na kapalně preparáty pro orální nebo parenterální podávání krátce před použitím. Mezi tyto kapalně formy patří roztoky, suspenze a emulze.

20 Sloučeniny podle vynálezu mohou být také dodávány transdermálně. Transdermální prostředky mohou být ve formě krémů, pleťových mlék, aerosolů a/nebo emulzí a mohou být obsaženy v transdermální náplasti nebo matrici nebo zásobníku, jak je v oboru pro tento účel běžné.

Sloučenina se s výhodou podává orálně.

25 Farmaceutický prostředek je s výhodou v jednotkové dávkové formě. V takové formě je přípravek rozdělen do jednotkových dávek vhodné velikosti, obsahujících příslušná množství účinných složek, například účinné množství pro dosažení požadovaného cíle.

30 Množství účinné složky podle vynálezu v jednotkové dávce prostředku může být obecně různé nebo může být upraveno od přibližně 1,0 mg do přibližně 1000 mg, s výhodou od přibližně 1,0 do

přibližně 950 mg, výhodněji od přibližně 1,0 do přibližně 500 mg, a typicky od přibližně 1 do přibližně 250 mg, vždy podle konkrétního použití. Skutečně použitá dávka může být různá v závislosti na věku, pohlaví a hmotnosti pacienta a na vážnosti léčeného stavu. Takové
5 způsoby jsou dobře známé odborníkům v oboru.

Orální dávková forma obsahující účinné složky může být obecně podávána člověku jednou nebo dvakrát denně. Množství a četnost podávání se bude upravovat podle úsudku ošetřujícího lékaře. Obecně doporučený denní dávkový režim pro orální podávání může být
10 v rozmezí od přibližně 1,0 mg do přibližně 1000 mg za den, a to v jednotlivé dávce nebo v dělených dávkách.

Některé používané termíny jsou popsány dále:

Kapsle (tobolka) označuje zvláštní nádobku nebo obal vyrobený z methylcelulózy, polyvinylalkoholů nebo denaturovaných želatin nebo
15 škrobu, který udržuje nebo obsahuje prostředky s obsahem účinných složek. Tvrdé kapsle se typicky vyrábějí ze směsí želatin z kostí a vepřové kůže s relativně vysokou pevností gelu. Samotná kapsle může obsahovat malé množství barviv, zakalujících prostředků, plastifikátorů a ochranných látek.

20 Tableta je za lisovaná nebo odlévaná pevná dávková forma obsahující účinné složky s vhodnými ředivy. Tableta může být připravena lisováním směsí nebo granulátů získaných granulací za mokra, granulací za sucha nebo kompaktizací.

Orální gel označuje účinné složky dispergované nebo
25 solubilizované v hydrofilní polotuhé matrici.

Prášek pro rekonstituci označuje práškové směsi obsahující účinné složky a vhodná řediva, které mohou být resuspendovány ve vodě nebo ovocných šťávách.

Diluent nebo ředivo označuje látky, které obvykle tvoří hlavní
30 část prostředku nebo dávkové formy. Mezi vhodná řediva patří cukry

jako je laktóza, sacharóza, mannitol a sorbitol; škroby odvozené od pšenice, kukuřice, rýže a brambor; a celulózy jako je mikrokystalická celulóza. Množství řediva v prostředí se může pohybovat od přibližně 10 do přibližně 90 % hmotnostních z celkového prostředí, s výhodou od přibližně 25 do přibližně 75 %, výhodněji od přibližně 30 do přibližně 60 % hmotnostních, ještě výhodněji od přibližně 12 do přibližně 60 % hmotnostních.

Rozvolňovadlo označuje materiály přidávané k prostředkům s cílem napomoci rozpadu prostředí (desintegraci) a uvolnění léčivých složek. Mezi vhodná rozvolňovadla patří škroby; „za studena rozpustné“ modifikované škroby jako je sodná sůl karboxymethylškrobu; přírodní a syntetické gumy jako je karubová guma, karaja, guar, tragakant a agar; deriváty celulózy jako je methylcelulóza a sodná sůl karboxymethylcelulózy; mikrokystalické celulózy a zesíťené mikrokystalické celulózy jako je sodná sůl kroskarmelózy; algináty jako je kyselina alginová a alginát sodný; jíly jako jsou bentonity; a šumivé směsi. Množství rozvolňovadla v prostředí může být v rozmezí od přibližně 2 do přibližně 15 % hmotnostních prostředí, výhodněji od přibližně 4 do přibližně 10 % hmotnostních.

Pojivo označuje látky, které vážou nebo „lepí“ prášky navzájem a přivádějí je do kohezivního stavu vytvářením granulí, takže ve formulaci slouží jako „lepidlo“. Pojiva zvyšují kohezivní sílu již přítomnou v ředivu nebo objemotvorné látce. Mezi vhodná pojiva patří cukry jako je sacharóza; škroby odvozené od pšenice, kukuřice, rýže a brambor; přírodní gumy jako je akácie, želatina a tragakant; deriváty odvozené z řas jako je kyselina alginová, alginát sodný a alginát vápenatoamonný; celulóзовé materiály jako je methylcelulóza a sodná sůl karboxymethylcelulózy a hydroxypropylmethylcelulóza; polyvinylpyrrolidon; a anorganické látky jako je křemičitan hořečnatohlinitý. Množství pojiva v prostředí může být v rozmezí od přibližně 2 do přibližně 20 % hmotnostních prostředí, výhodněji od

přibližně 3 do přibližně 10 % hmotnostních, ještě výhodněji od přibližně 3 do přibližně 6 % hmotnostních.

Mazadlo označuje látku přidávanou k dávkové formě pro uvolnění tablet, granulí apod., z formy nebo matrice po lisování, snížením tření. Mezi vhodná mazadla patří stearany kovů jako je 5 stearan hořečnatý, stearan vápenatý nebo stearan draselný; kyselina stearová; vosky s vysokou teplotou tání; a ve vodě rozpustná mazadla jako je chlorid sodný, benzoan sodný, octan sodný, oleát sodný, polyethylenglykoly a d,l-leucin. Mazadla se obvykle přidávají v úplně 10 posledním kroku před lisováním, protože musí být přítomna na povrchích granulí a mezi granulemi a částmi tabletovacího lisu. Množství mazadla v prostředku se může pohybovat od přibližně 0,2 do přibližně 5 % hmotnostních prostředku, s výhodou od přibližně 0,5 do přibližně 2 %, výhodněji od přibližně 0,3 do přibližně 1,5 % 15 hmotnostních.

Kluzná látka je látka, která zabraňuje spékání a zlepšuje tokové vlastnosti granulátů, takže dochází k hladkému a stejnoměrnému toku. Mezi vhodné kluzné látky patří oxid křemičitý a talek. Množství kluzné 20 látky v prostředku může být v rozmezí od přibližně 0,1 % do přibližně 5 % hmotnostních z celkového prostředku, s výhodou od přibližně 0,5 do přibližně 2 % hmotnostních.

Barviva jsou pomocné látky, které prostředku nebo dávkové formě propůjčí zbarvení. Mezi tyto pomocné látky mohou patřit potravinářská barviva a potravinářská barviva adsorbovaná na vhodný 25 adsorbent, jako je jíl nebo oxid hlinitý. Množství barviva může být od přibližně 0,1 do přibližně 5 % hmotnostních prostředku, s výhodou od přibližně 0,1 do přibližně 1 %.

Biologická dostupnost označuje rychlost a míru, ve které je účinná složka léčiva nebo terapeutická skupina absorbována do 30 systémového oběhu z podané dávkové formy, ve srovnání se standardem nebo kontrolou.

Běžné způsoby výroby tablet jsou známé. Mezi tyto metody patří suché metody, jako je přímé lisování a lisování granulátů vyrobených kompaktizací, nebo mokré metody nebo další speciální postupy. Běžné metody pro výrobu jiných forem pro podávání, jako jsou například kapsle, čípky apod., jsou rovněž velmi dobře známy.

Další provedení vynálezu se týká použití výše popsanych farmaceutických prostředků pro léčení onemocnění, jako je například hepatitida C apod. Tyto způsoby zahrnují podávání terapeuticky účinného množství farmaceutického prostředku podle vynálezu pacientovi s takovým onemocněním nebo onemocněními v případě potřeby.

Jak je uvedeno výše, vynález zahrnuje tautomery, enantiomery a jiné stereoisomery sloučenin. Jak je odborníkům v oboru zřejmé, některé ze sloučenin podle vynálezu mohou existovat ve formě isomerů. Tyto varianty rovněž spadají do rámce vynálezu.

Další provedení vynálezu se týká způsobu výroby makrocyclických sloučenin podle vynálezu. Tyto sloučeniny mohou být připraveny několika v oboru známými způsoby. Reprezentativní postupy jsou pro ilustraci uvedeny v následujících reakčních schématech. Je třeba rozumět, že i když následující ilustrativní schémata popisují přípravu makrocyclů převážně odvozených od 4-*cis*-hydroxyprolinu („4-*cis*-HYP“) nebo kyseliny 7-hydroxytetrahydroisochinolin-3-karboxylové („TIC“), vhodná substituce které z přirozených nebo syntetických aminokyselin povede k vytvoření požadovaných makrocyclů založených na této substituci.

V popisu schémat, způsobů výroby a v následujících příkladech se používají následující zkratky:

THF:	Tetrahydrofuran
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EtOAc:	Ethylacetát

AcOH:	Kyselina octová
HOObt:	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
EDCI:	Hydrochlorid 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl- -karbodiimidu
NMM:	N-Methylmorfolin
ADDP:	1,1'-(Azodikarbonyl)dipiperidin
DEAD:	Diethylazodikarboxylát
MeOH:	Methanol
EtOH:	Ethanol
Et ₂ O:	Diethylether
Bn:	Benzyl
Boc:	terc-Butyloxykarbonyl
Cbz:	Benzyloxykarbonyl
Cp:	Cyklopentyldienyl
Ts:	p-Toluensulfonyl
Me:	Methyl
PyBrOP:	Tris(pyrrolidino)bromfosfoniumhexafluorofosfát
DMSO:	Dimethylsulfoxid
TFA:	Kyselina trifluorooctová
HObt:	Hydroxybezotriazol
Hünigova báze:	Diisopropylethylamin
BOP:	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium- -hexafluorofosfát
LDA:	Lithiumdiisopropylamid

Ph ₃ P:	Trifenylfosfin
LAH:	Lithiumaluminumhydrid
DMAP:	4-Dimethylaminopyridin
DCC:	Dicyklohexylkarbodiimid
MCPBA:	Kyselina meta-chloroperbenzoová
BINAP:	2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftol
MeCN:	Acetonitril
Pr:	Propyl
Ac:	Acetyl
Ph:	Fenyl

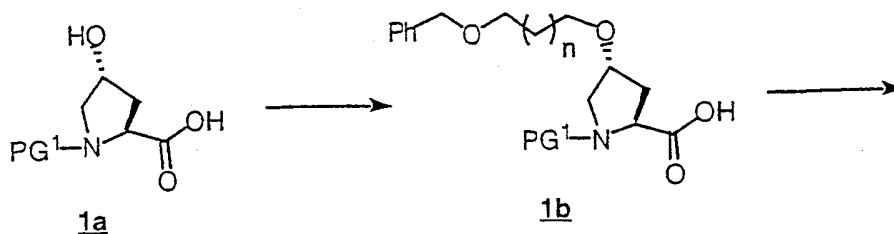
Obecná schémata syntézy

Příprava sloučeniny vzorce **1h**, kde R¹, R², R³ jsou jak definováno výše, R' je alkyl, heteroalkyl (OR'', SR''', NR''R''', kde R'' a R''' jsou alkylové skupiny), halogenový substituent v poloze *ortho*, *meta*, nebo *para* vzhledem k atomu kyslíku; R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; n je od nuly do pěti; x je (CH₂)_m, kde m je jedna až pět, atom kyslíku, NY, kde Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl; a PG¹ a PG² jsou vhodné ochranné skupiny (PG¹ = t-boc, cbz a PG² = H, Bn atd.) je popsána ve schématu 1. Chráněná kyselina 4-hydroxyprolin (**1a**) se alkyluje v poloze 4 alkylbromidem v přítomnosti hydridu sodného. Produkt **1b** se potom převede na ester buď alkoholem za kyselých podmínek nebo trimethylsilyldiazamethanem. Po odstranění ochranných skupin se získaný amin naváže na aminokyselinu chráněnou skupinou Boc v přítomnosti reakčních činidel HOOBt, EDCI.HCl a NMM. Po odstranění skupiny Boc z produktu **1d** se dipeptid ponechá reagovat se substituovanou hydroxyfenyloctovou kyselinou s použitím stejných reakčních podmínek. Katalytická

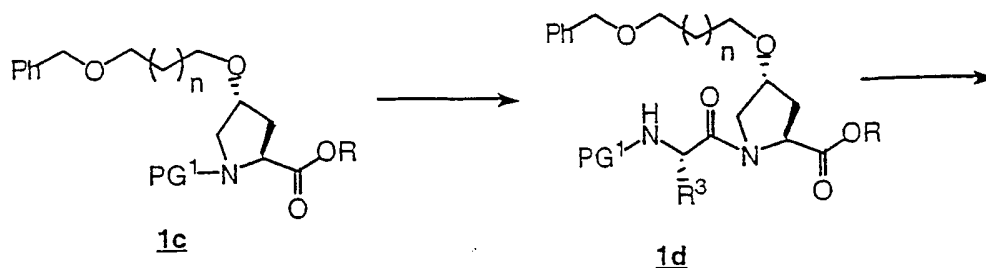
hydrogenace benzyletheru poskytne prekurzor pro makrocyklizaci. Makrocyklizace se provádí za Mitsunobuových podmínek použitím trifenylofosfinu a ADDP (Mitsunobuova reakce je přehledně popsána v článku D. L. Hughes, Org. Reactions, 42 (1992) 335, John Wiley & Sons, New York, L. Paquette, ed.). Po hydrolýze esteru na kyselinu hydroxidem lithným se provede reakce s aminovým meziproduktem za získání sloučeniny **1h**.

Schéma 1

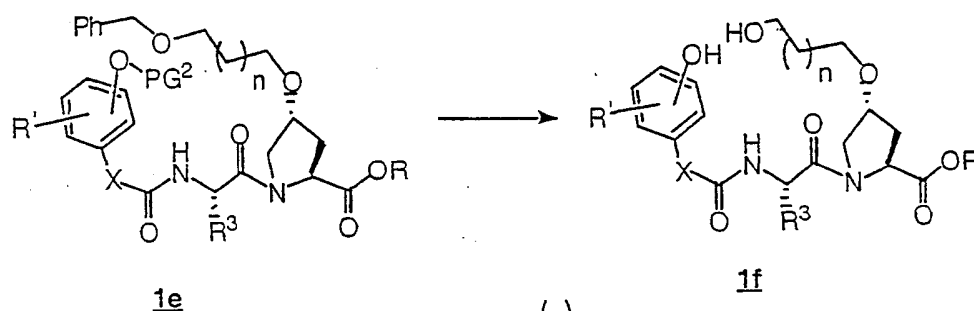
10



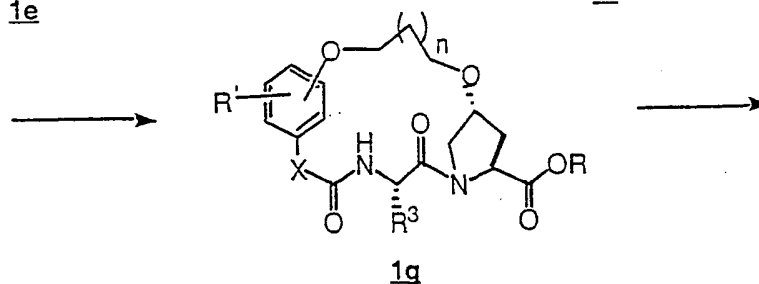
15

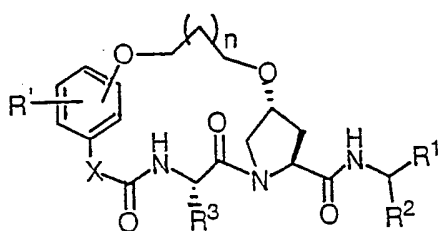


20



25



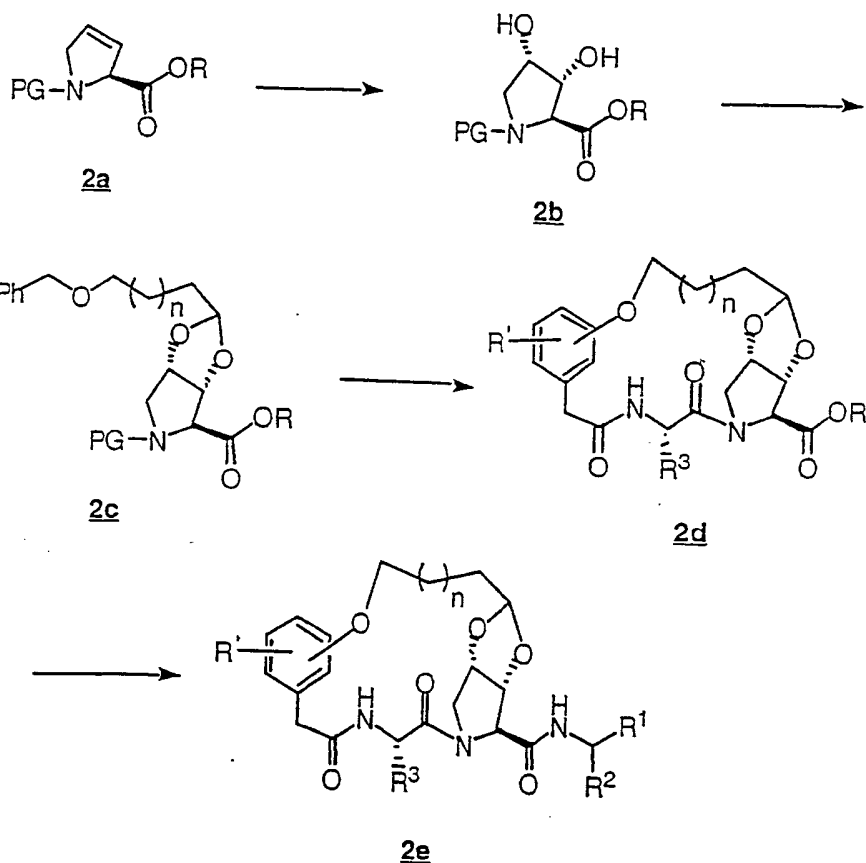


1h

5

Příprava sloučeniny vzorce **2e**, kde R^1 , R^2 , R^3 , R a R' jsou jak definováno výše, je popsána ve schématu 2. Chráněný 3,4-dehydroprolin **2a** se diastereoselektivně dihydroxyluje za získání sloučeniny *cis*-diolu **2b**. Tvorba acetalu mezi sloučeninou **2b** a aldehydem se může provést v přítomnosti katalytického množství kyseliny p-toluensulfonové. Bicyklický prolinový derivát **2c** se převede na makrocyclický ester **2d** a potom na inhibitor HCV **2e** postupem znázorněným ve schématu 1.

15 **Schéma 2**



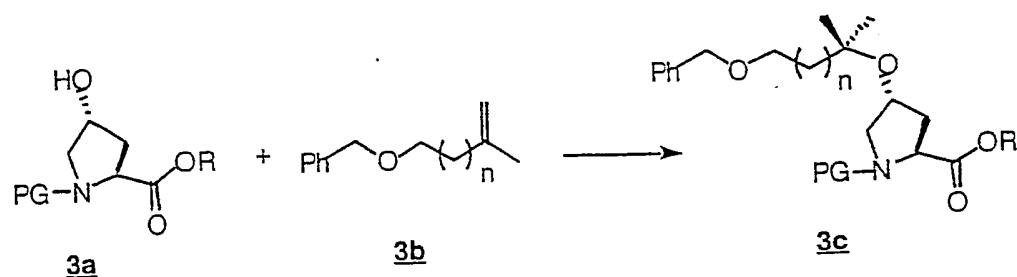
20

25

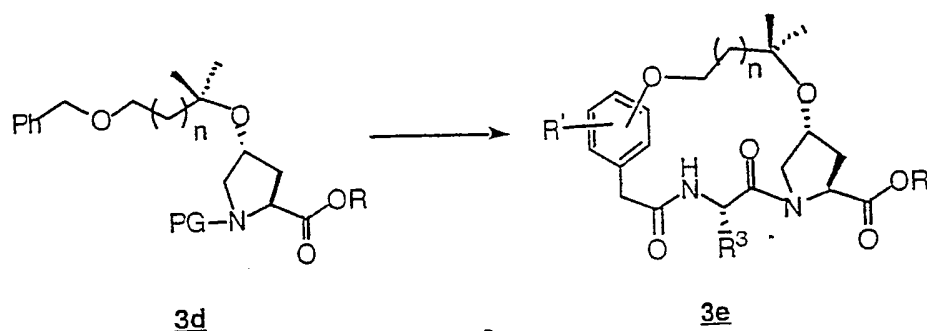
Příprava sloučeniny vzorce **3f**, kde R^1 , R^2 , R^3 , R , R' a n jsou jak definováno výše, je popsána ve schématu 3. Při zpracování diethyletherátem fluoridu boritého se převedou chráněný 4-hydroxyprolin **3a** a alken **3b** na prolinový ether **3c**, u kterého se provede stejný sled chemických přeměn jako je znázorněno ve schématu 1, za poskytnutí makrocyclického esteru **3e** a potom požadovaného konečného produktu **3f**.

Schéma 3

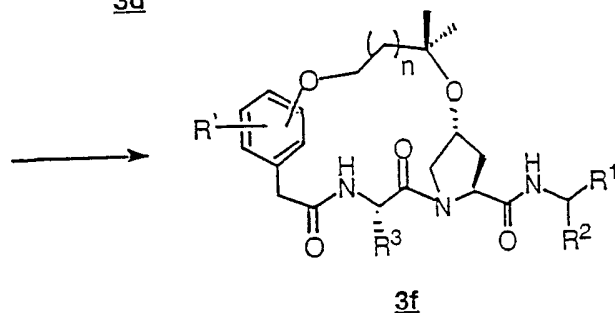
10



15



20

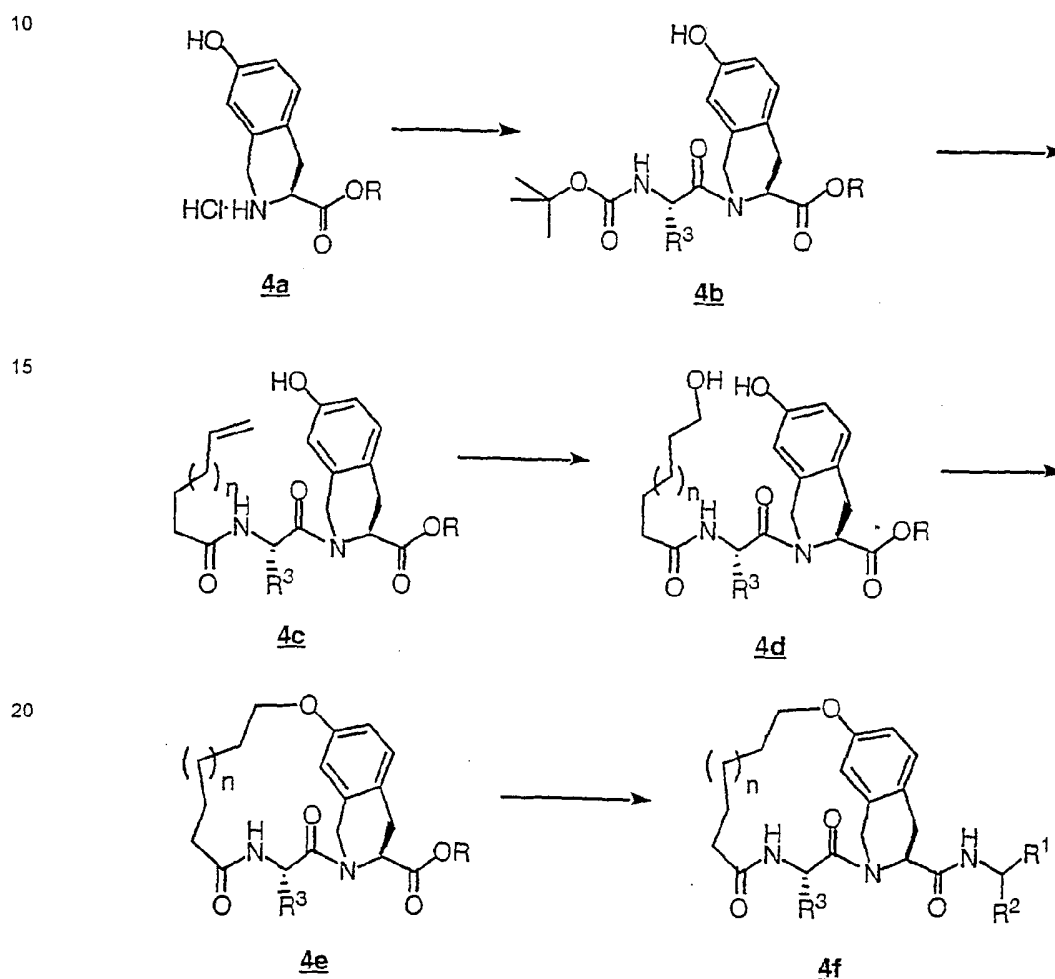


25

Příprava sloučeniny vzorce **4f**, kde R^1 , R^2 , R^3 , R , a n jsou jak definováno výše, je popsána ve schématu 4. Reakce mezi aminoesterem **4a** a Boc-chráněnou aminokyselinou byla prováděna

v přítomnosti NMM, HOObt, a EDCI.HCl. Po odstranění skupiny Boc ze sloučeniny **4b** se dipeptid naváže na koncovou alkenkarboxylovou kyselinu za poskytnutí sloučeniny **4c**. Dvojná vazba byla potom převedena na alkohol hydroborací. Makrocyclizace fenolalkoholu se provádí za Mitsunobuových podmínek použitím trifenylofosfinu a ADDP. Po hydrolýze esteru **4e** na kyselinu hydroxidem lithným se kyselina naváže na aminový meziprodukt za získání sloučeniny **4f**.

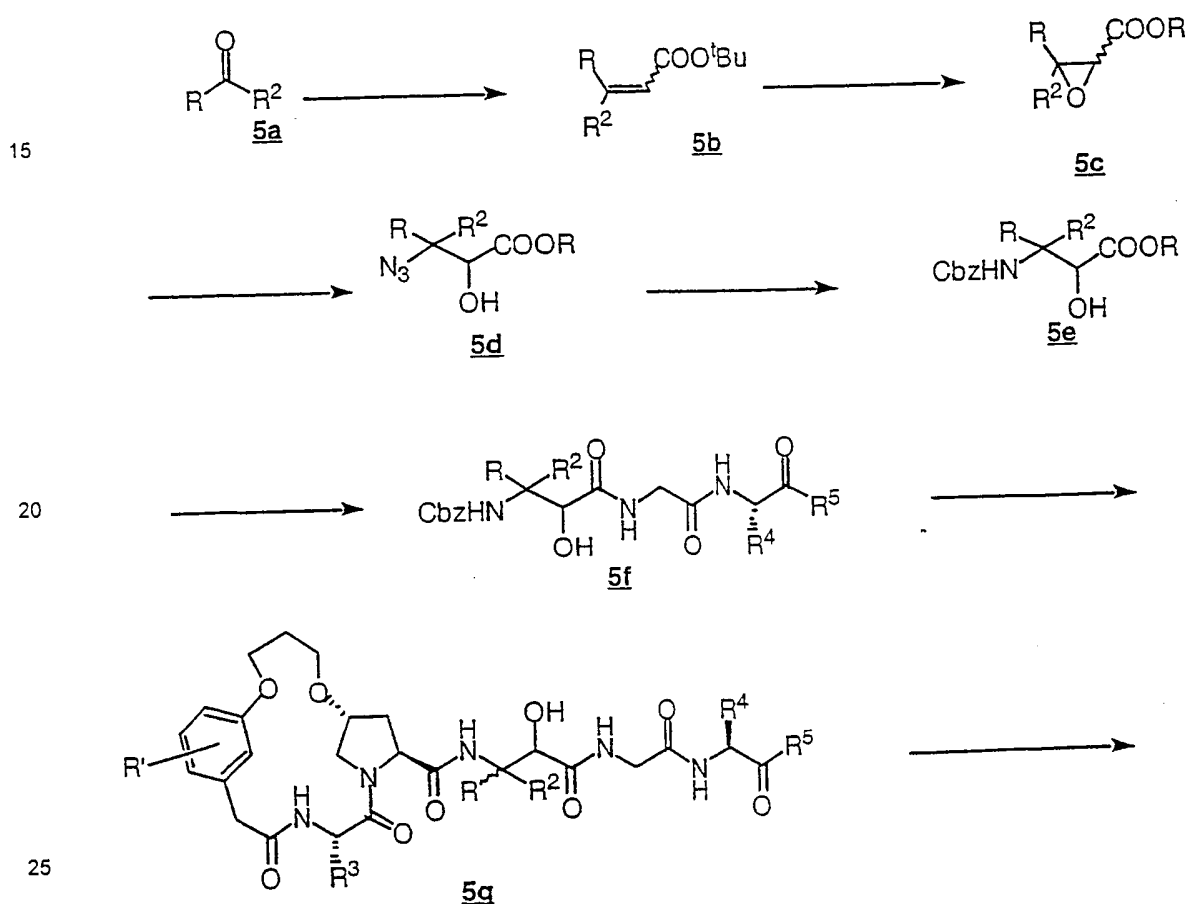
Schéma 4

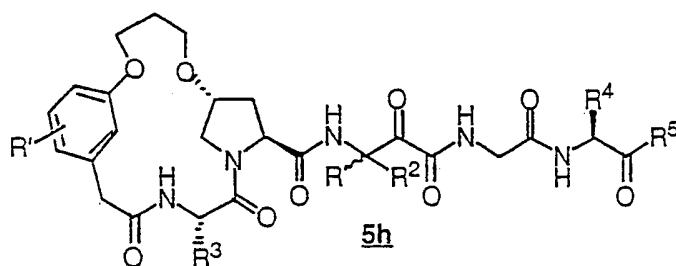


Příprava sloučeniny vzorce **5h** ve schématu 5, kde R, R², R³, R' jsou definovány ve schématu 1, R⁴ je alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl, a heteroalkyl a R⁵ je OR, NR², nebo OH. Sloučenina **5b** byla získána

Wittigovou reakcí sloučeniny **5a** s *tert*-butylfosfonoacetátem a NaH. Sloučenina **5b** byla převedena na sloučeninu **5c** působením MCPBA. Epoxid **5c** byl potom otevřen NaN₃ za poskytnutí sloučeniny **5d**, která byla redukována Pd/C/H₂ na amin a chráněna Cbz s použitím Cbz-Cl a Et₃N za získání sloučeniny vzorce **5e**. Sloučenina **5e** byla zbavena ochranné skupiny pomocí TFA a dále zpracována na **5f**. Skupina Cbz sloučeniny **5f** byla hydrolyzována a potom navázána na sloučeninu vzorce **1g** s použitím EDCI, HOObt, NMM za získání sloučeniny **5g**. Sloučenina typu **5g** se oxидуje Dess-Martinovým činidlem za vytvoření sloučenin vzorce **5h**.

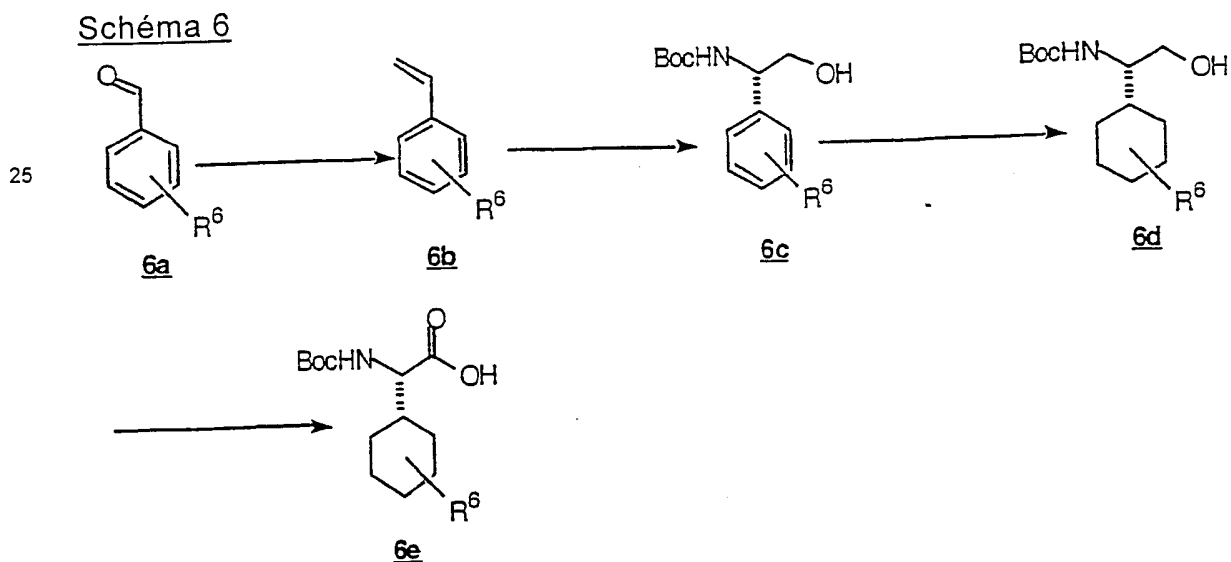
Schéma 5



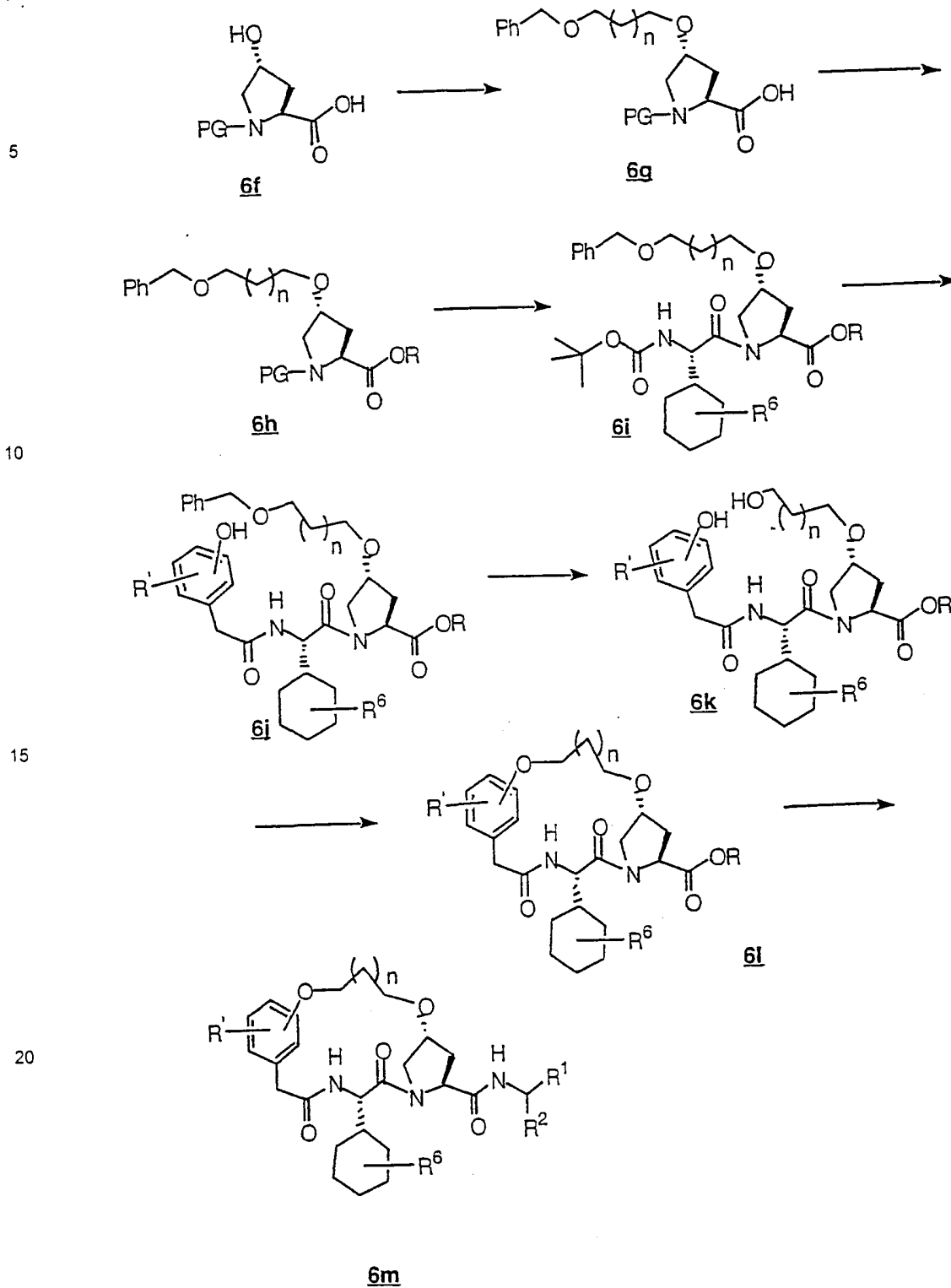


5

Sloučenina vzorce **6m** se syntetizuje jak je znázorněno ve schématu 6, kde R^1 , R^2 , R' a n jsou definovány ve schématu 1 a R^6 je alkyl, aryl, ester, karboxylová kyselina a karboxylamidy. Sloučenina typu **6b** je syntetizována ze sloučeniny **6a** Wittigovou olefinací s použitím Ph_3PCH_3I a BuLi. Sloučenina **6b** se dále aminohydroxyluje za získání sloučeniny typu **6c**, která byla zredukována použitím Rh/C, a H_2 za získání sloučeniny typu **6d**. Sloučenina **6d** byla oxidována na sloučeninu typu **6e** použitím $RuCl_3$ a H_5IO_6 . Sloučenina **6e** byla zpracována na sloučeninu **6i** reakcí se sloučeninou **6h** zbavenou ochranných skupin s použitím NMM, EDCI a HOObt. Prodloužení sloučeniny **6i** na **6j** bylo znovu dosaženo reakcí sloučeniny **6i** zbavené ochranných skupin a vhodně substituované fenylacetové kyseliny použitím EDCI, HOObt a NMM. Získaná sloučenina **6k** po hydrolýze benzylové skupiny ve sloučenině **6j** byla cyklizována na **6l** použitím Mitsunobuových podmínek. Sloučenina **6l** byla potom zpracována na sloučeniny typu **6m**, jak je znázorněno ve schématu 1.



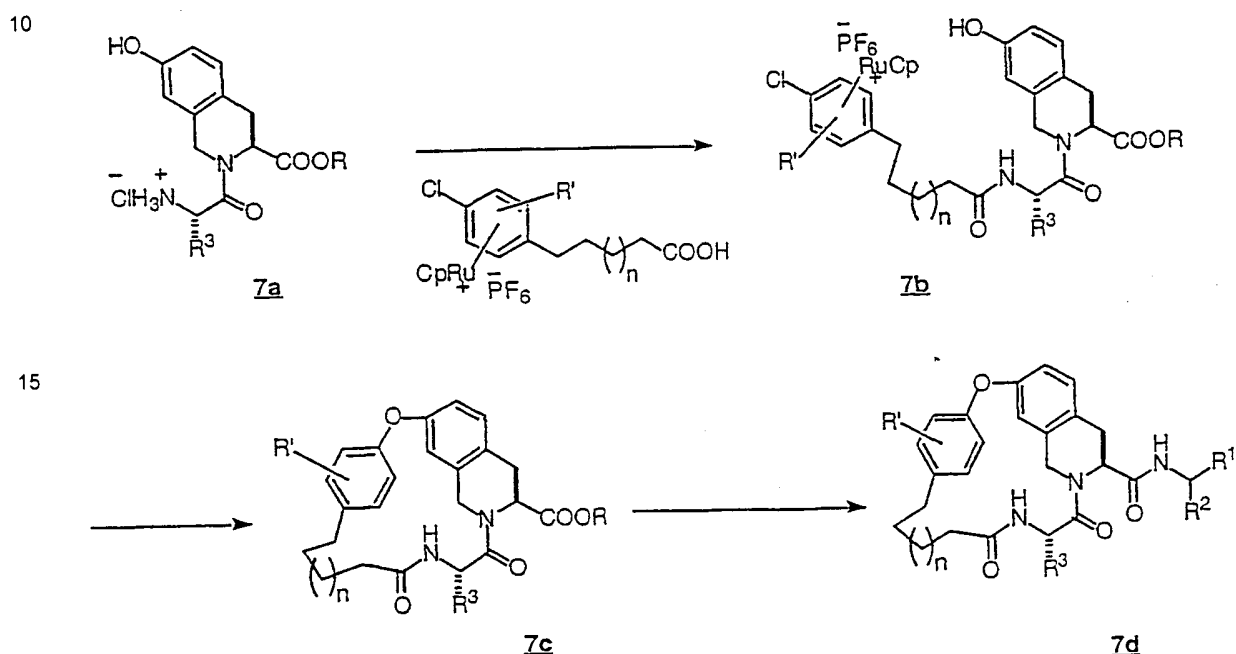
25



Sloučeniny typu **7d** se syntetizují pomocí chemických reakcí s využitím ruthenia, kde substituenty R^1 , R^2 , R^3 , R' jsou definovány ve schématu 1, a $n = 0$ až 3. Syntéza sloučeniny vzorce **7b** byla získána ze sloučeniny typu **7a** pomocí reakce s EDCI, HOBT, Hünigovou bází.

5 Zpracování sloučeniny **7b** pomocí Cs_2CO_3 a fotolytickým odstraněním ruthenia umožnilo převedení sloučeniny typu **7b** na typ **7c**, která byla dále zpracována na sloučeniny **7d**, jak je znázorněno ve schématu 1.

Schéma 7



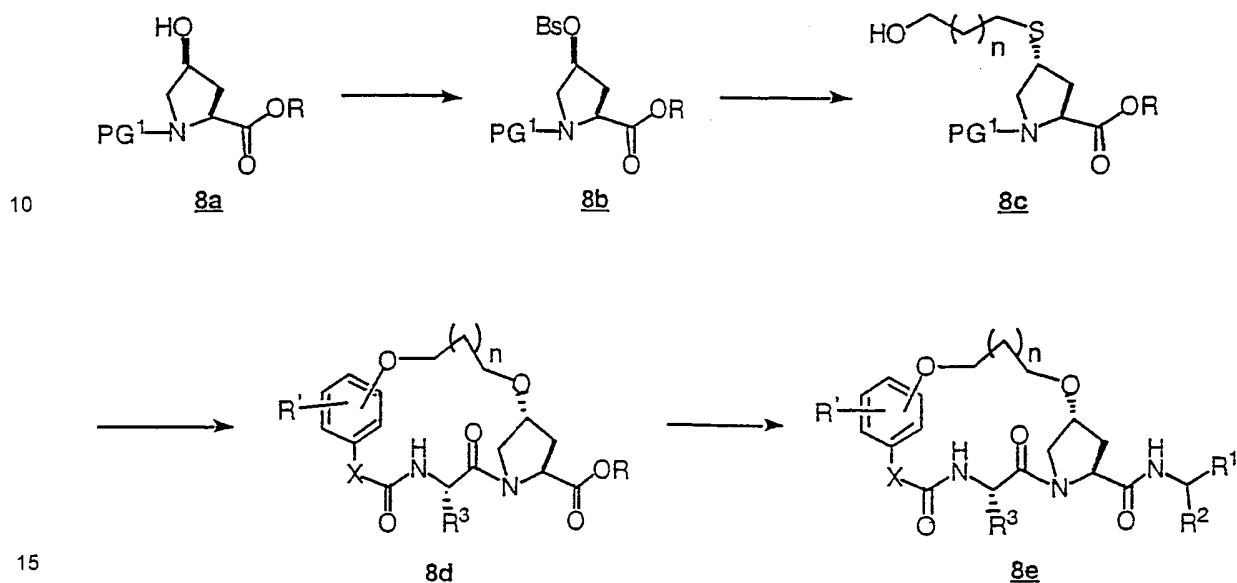
Příprava sloučeniny vzorce **8e**, kde R^1 , R^2 , R^3 jsou jak definováno výše, R' je alkyl, heteroalkyl (OR'' , SR''' , $\text{NR}''\text{R}'''$, kde R'' a R''' jsou alkylové skupiny), halogenový substituent v poloze *ortho*, *meta*, nebo *para* vzhledem k atomu kyslíku; R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; n je od nuly do pěti; a x je $(\text{CH}_2)_m$, kde m je jedna až pět, atom kyslíku, NY , kde Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl, je popsána ve schématu 8. Chráněný *cis*-4-hydroxyprolinový derivát **8a** se převede na brosylát ($\text{Bs} = 4\text{-brombenzensulfonyl}$) **8b**, který

25

reagoval s vhodným merkaptoalkoholem v přítomnosti hydridu sodného za poskytnutí sloučeniny **8c**. Konverze na makrocyclický ester **8d** a potom na požadovanou cílovou sloučeninu **8e** byla provedena jak je znázorněno ve schématu 1.

5

Schéma 8



Příprava sloučeniny vzorce **9d**, kde R^1 , R^2 , R^3 jsou jak definováno výše, R' je alkyl, heteroalkyl (OR'' , SR''' , $NR''R'''$, kde R'' a R''' jsou alkylové skupiny), halogenový substituent v poloze *ortho*, *meta*, nebo *para* vzhledem k atomu kyslíku; R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; n je od nuly do pěti; x je $(CH_2)_m$, kde m je jedna až pět, atom kyslíku, NY , kde Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl; a LG je odštěpitelná skupina (např. OTs, Br), je popsána ve schématu 9.

20

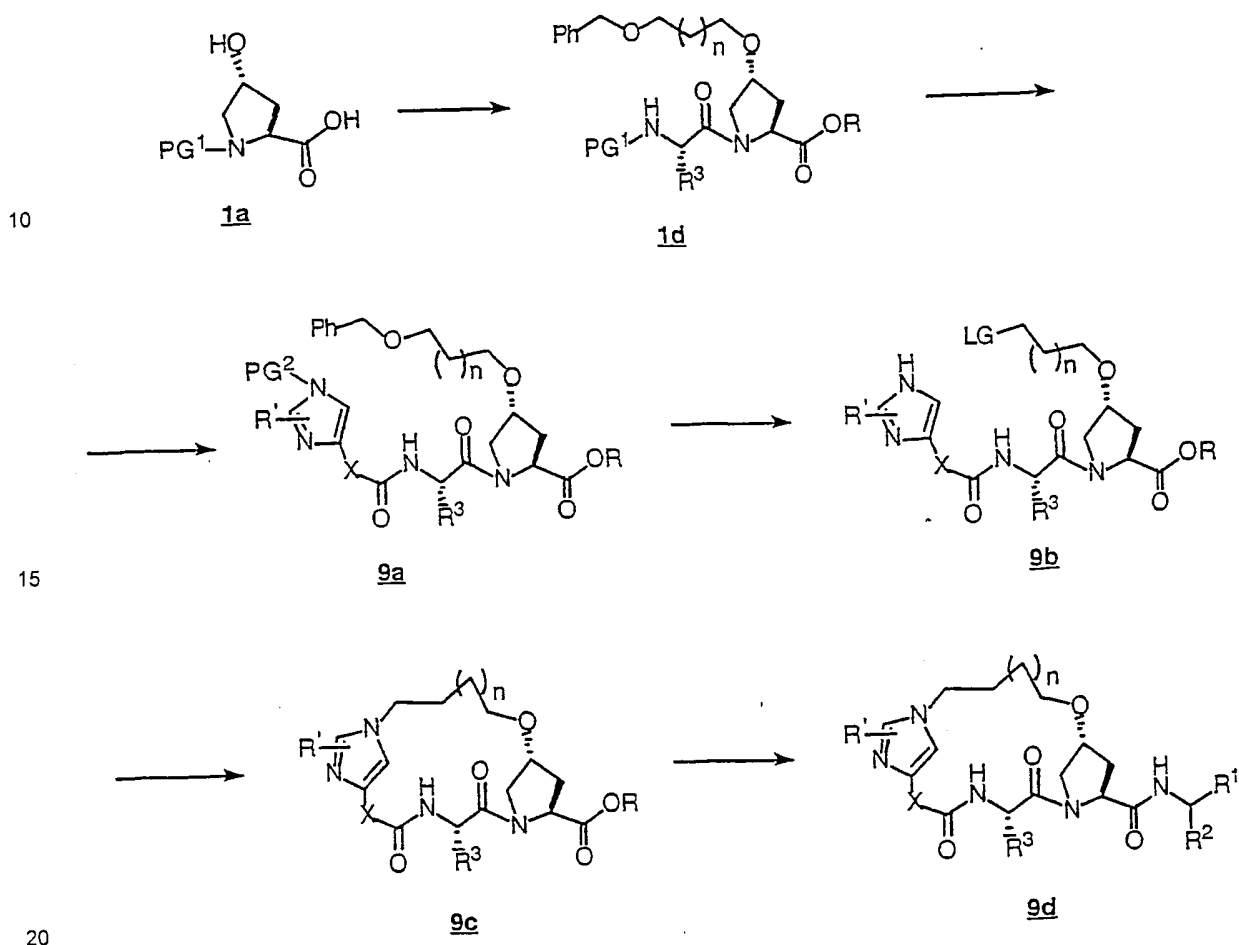
Chráněný 4-hydroxyprolinový derivát **1a** se převede na sloučeninu **9a** přes vytvoření sloučeniny **1d** (která je popsána ve schématu 1). Odstranění benzyletheru následované konverzí na vhodnou odštěpitelnou skupinu a uvolnění N-ochranné skupiny poskytly

25

sloučeninu **9b**. Konverze na makrocyclický ester **9c** byla provedena působením směsi uhličitán sodný/jodid sodný v acetonu vroucím pod zpětným chladičem. Následné zpracování na cílovou sloučeninu **9d** bylo provedeno jak je znázorněno ve schématu 1.

5

Schéma 9

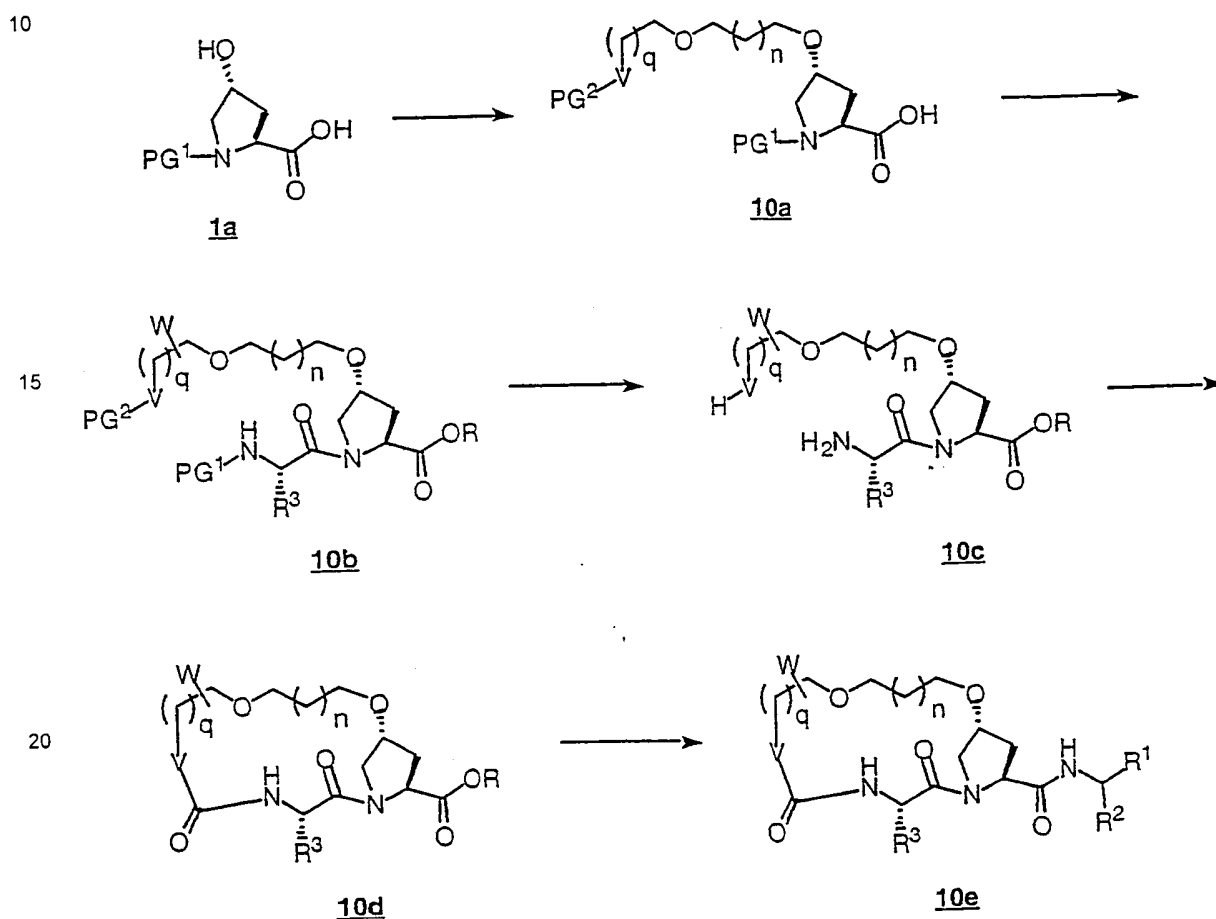


Příprava sloučeniny vzorce **10e**, kde R¹, R², R³ jsou jak definováno výše, R' je alkyl, heteroalkyl (OR'', SR''', NR''R''', kde R'' a R''' jsou alkylové skupiny), halogenový substituent v poloze *ortho*, *meta*, nebo *para* vzhledem k atomu kyslíku; R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; n a q je jakákoli kombinace od nuly do pěti; V je atom kyslíku, NY, kde Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl; W je alkyl,

25

aryl, alkylaryl, heteroaryl; PG^1 a PG^2 jsou vhodné ochranné skupiny (PG^1 = t-boc, cbz a PG^2 = H, Bn, atd.), je popsána ve schématu 10. Chráněný 4-hydroxyprolinový derivát **1a** se převede na sloučeninu **10b** postupem popsaným ve schématu 1. Odstranění ochranné skupiny (**10c**) a následné působení ekvivalentu fosgeny poskytne makrocyclický ester **10d**. Konverze na požadovanou cílovou sloučeninu **10e** byla provedena jak je znázorněno ve schématu 1.

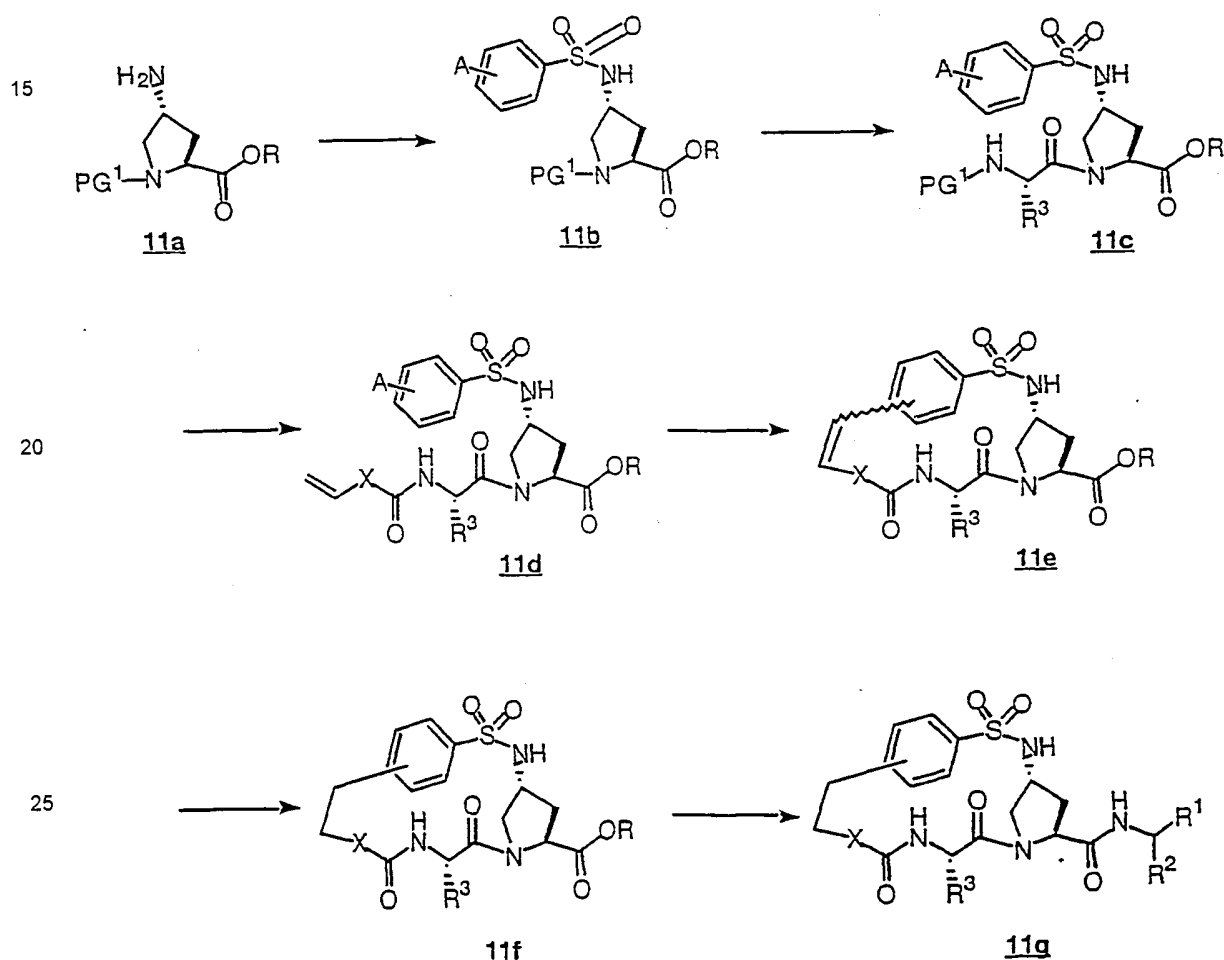
Schéma 10



Příprava sloučeniny vzorce **11g**, kde R^1 , R^2 , R^3 jsou jak definováno výše, R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; X je $(CH_2)_m$, $(CH_2)_mO$, $(CH_2)_mNY$, kde m je jedna až pět, a Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl; A je atom vodíku nebo atom halogenu ve

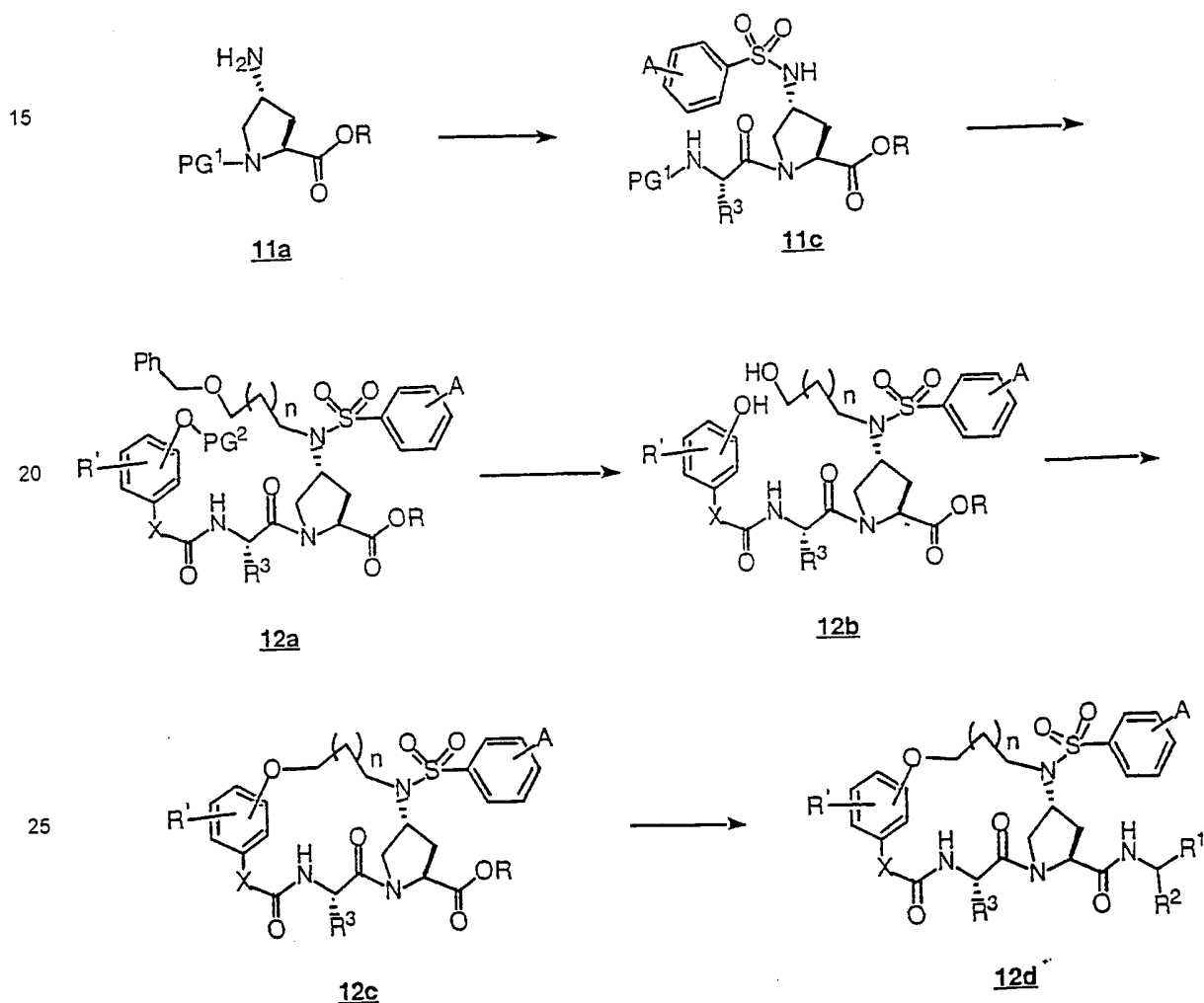
vhodné poloze; PG^1 je vhodná ochranná skupina ($\text{PG}^1 = \text{t-boc}$, cbz , atd.), je popsána ve schématu 11. Chráněný 4-aminoprolinový derivát **11a** se převede na sloučeninu **11b** působením vhodného benzensulfonylchloridu a báze. Odstranění ochranné skupiny a reakce s chráněným derivátem aminokyseliny poskytly sloučeninu **11c**. Ta byla převedena na sloučeninu **11d** použitím podobné strategie odstranění ochranné skupiny a reakce. Cyklizace katalyzovaná paladiem(0) poskytla sloučeninu **11e** jako směs isomerů, která byla hydrogenována za poskytnutí makrocyclického esteru **11f**. Následná konverze na požadovanou sloučeninu **11g** byla provedena jak je znázorněno ve schématu 1.

Schéma 11



Příprava sloučeniny vzorce **12d**, kde R^1 , R^2 , R^3 jsou jak definováno výše, R znamená skupiny alkyl, aryl, nebo alkylaryl; n je od nuly do pěti; X je $(CH_2)_m$ kde m je jedna až pět, atom kyslíku, NY, kde Y je atom vodíku, skupina alkyl, aryl; A je atom vodíku nebo atom halogenu ve vhodné poloze; a PG^1 a PG^2 jsou vhodné ochranné skupiny (PG^1 = t-boc, cbz a PG^2 = H, Bn atd.), je popsána ve schématu 12. Chráněný 4-aminoprolinový derivát **11a** se převede na sloučeninu **11c** postupem popsaným ve schématu 11. Konverze sloučeniny **11c** na makrocyclický ester **12c** a následné převedení na požadovanou sloučeninu **12d** byla provedena jak je znázorněno ve schématu 1.

Schéma 12

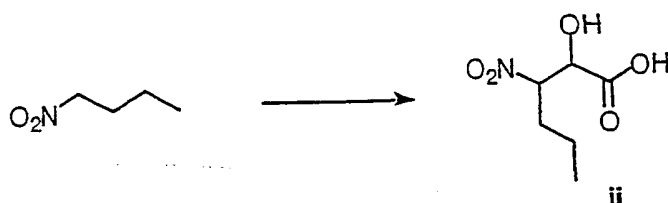


Příprava meziproduktů

Meziprodukt A

Krok 1

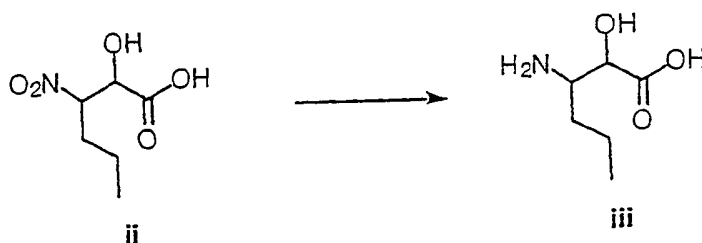
5



K míchanému roztoku 1-nitrobutanu (16,5 g, 0,16 mol) a
 10 glyoxylové kyseliny v H₂O (28,1 g, 0,305 mol) a MeOH (122 ml) při
 teplotě 0 °C až 5°C, byl po kapkách přidán triethylamin (93 ml,
 0,667 mol) v průběhu 2 hod. Roztok byl zahřát na teplotu laboratoře,
 míchán přes noc a zakoncentrován do sucha za poskytnutí oleje. Olej
 byl potom rozpuštěn v H₂O a okyselen na pH = 1 10% HCl, a potom
 15 byla provedena extrakce EtOAc. Spojený organický roztok byl promyt
 roztokem soli, sušen nad Na₂SO₄, zfiltrován a zakoncentrován do
 sucha za poskytnutí produktu ii (28,1 g, 99% výtěžek).

Krok 2

20



25

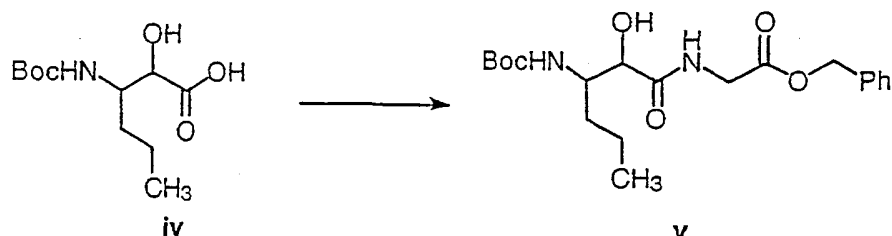
K míchanému roztoku výchozího materiálu ii (240 g, 1,35 mol)
 v kyselině octové (1,25 l) bylo přidáno 10% Pd/C (37 g). Získaný
 roztok byl hydrogenován při tlaku 59 psi (407 kPa) po dobu 3 hod a
 potom při tlaku 60 psi (414 kPa) přes noc. Kyselina octová byla potom

5

10



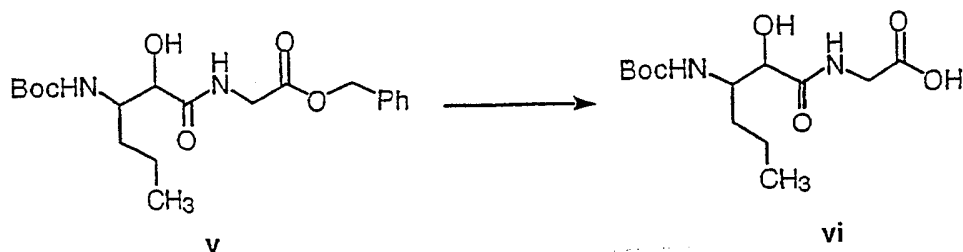
20

Krok 4

5

K míchanému roztoku výchozího materiálu (3,00 g, 12,0 mmol) v DMF (15 ml) a CH_2Cl_2 (15 ml) při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ byl přidán HOObt (1,97 g, 12,0 mmol), N-methylmorfolin (4,0 ml, 36,0 mmol) a EDCI (2,79 g, 14,5 mmol) a směs byla míchána po dobu 10 min, a potom byl přidán $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Gly-OBn}$ (2,56 g, 13,0 mmol). Získaný roztok byl míchán při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hod, potom byl uložen do chladicího boxu přes noc a zakoncentrován do sucha a následně zředěn EtOAc (150 ml). EtOAc roztok byl potom dvakrát promyt nasyceným NaHCO_3 , H_2O , 5% H_3PO_4 , roztokem soli, sušen nad Na_2SO_4 , zfiltrován a zakoncentrován do sucha za poskytnutí produktu (4,5 g, 94%). LRMS m/z $\text{MH}^+ = 395,1$.

15

Krok 5

20

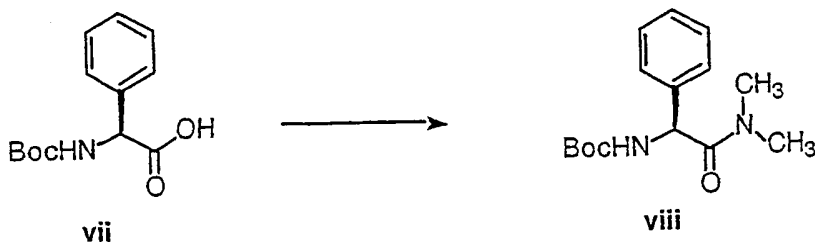
Roztok výchozího materiálu **v** (7,00 g, 17,8 mmol) v absolutním ethanolu (300 ml) byl míchán při teplotě laboratoře v atmosféře vodíku v přítomnosti Pd-C (300 mg, 10%). Postup reakce byl monitorován TLC. Po 2 hod byla směs zfiltrována přes lože celitu a získaný roztok byl zakoncentrován ve vakuu za poskytnutí produktu **vi** (5,40 g,

25

kvantitativní výtěžek). LRMS m/z $MH^+ = 305,1$.

Krok 6

5

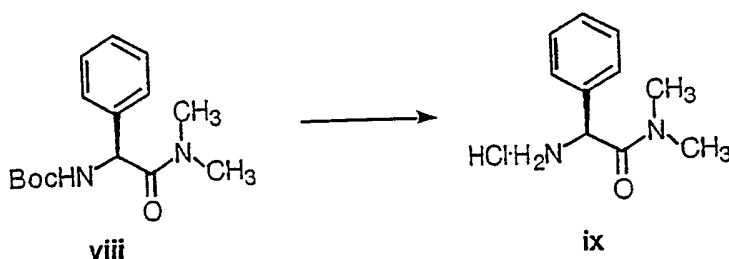


10 K roztoku dimethylaminhydrochloridu (1,61 g, 19,7 mmol), N-Boc-fenylglycinu (4,50 g, 17,9 mmol), HOObt (3,07 g, 18,8 mmol) a EDCI (4,12 g, 21,5 mmol) v bezvodém DMF (200 ml) a CH₂Cl₂ (150 ml) při -20 °C byl přidán NMM (5,90 ml, 53,7 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min, byla reakční směs udržována v mrazicím boxu přes noc (18 hod). Potom byla ponechána ohřát na laboratorní teplotu a byly přidány EtOAc (450 ml), roztok soli (100 ml) a 5% H₃PO₄ (100 ml). Po oddělení vrstev byl organický roztok promyt 5% H₃PO₄ (100 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 150 ml), vodou (150 ml) a roztokem soli (150 ml), sušen (MgSO₄), zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu za získání surového produktu **viii** (4,86 g) jako bílé pevné látky, která byla použita bez dalšího čištění.

20

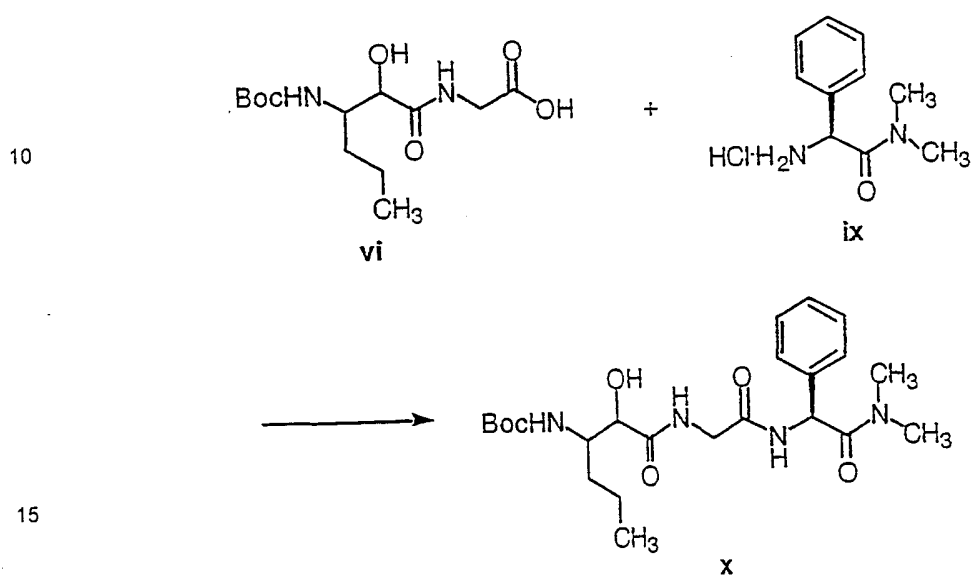
Krok 7

25



Dimethylamid N-Boc-fenylglycinu **viii** (4,70 g, surový) byl rozpuštěn v 4N HCl (60 ml, 240 mmol) a získaný roztok byl míchán při teplotě laboratoře. Postup reakce byl monitorován TLC. Po 4 hod byl roztok zakonzentrován ve vakuu za získání bílé pevné látky, která byla
5 použita v další reakci bez dalšího čištění. LRMS m/z $MH^+ = 179,0$.

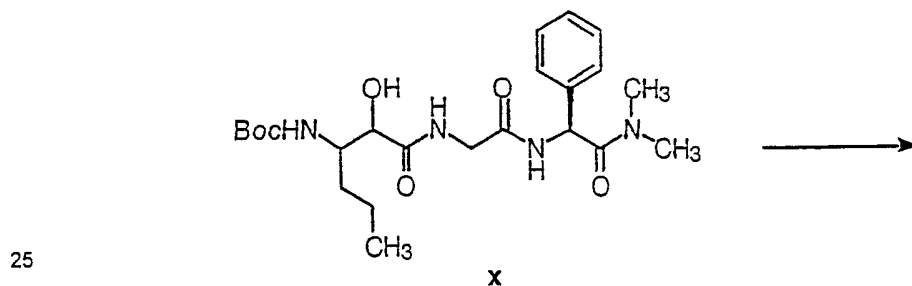
Krok 8

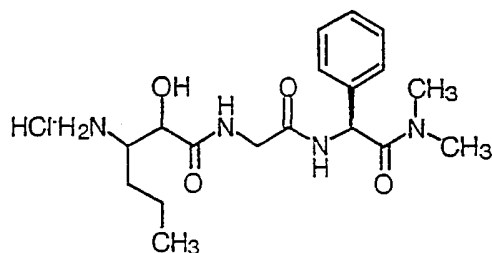


Požadovaná sloučenina **x** byla připravena postupem popsáním v kroku 4. LRMS m/z $MH^+ = 465,1$.

20

Krok 9



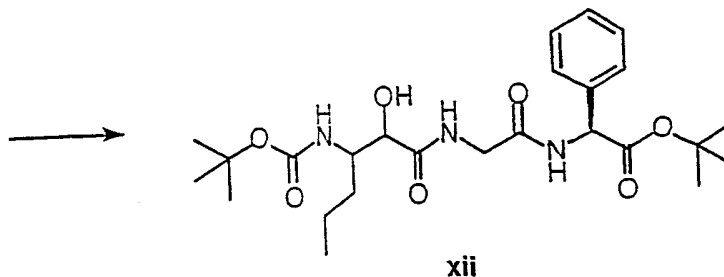
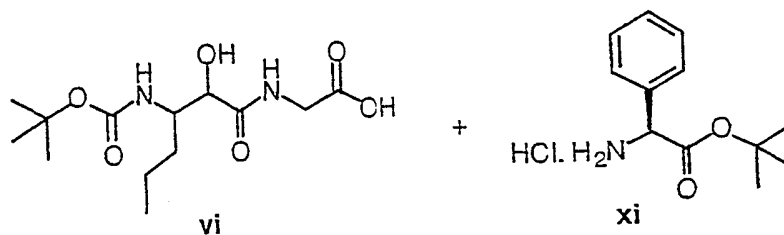


A

Požadovaný meziprodukt A byl připraven z tripeptidu x způsobem popsaným v kroku 7. LRMS m/z $MH^+ = 365,1$.

Meziprodukt B

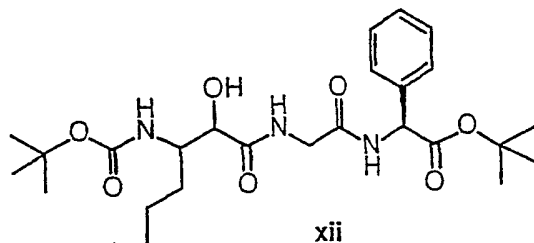
Krok 1



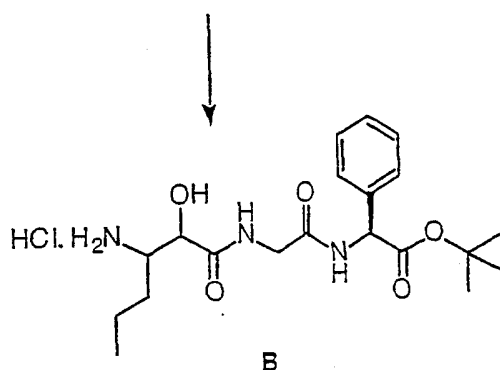
Požadovaný produkt xii byl získán způsobem popsaným pro meziprodukt A, krok 8 s použitím komerčně dostupné sloučeniny xi jako reakčního partnera. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie. Část produktu byla čištěna bleskovou chromatografií s použitím směsi 97/3 dichlormethan/MeOH. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{40}N_3O_7$: $494,2866 (M+H)^+$. Nalezeno: $494,2863$.

Krok 2

5



10

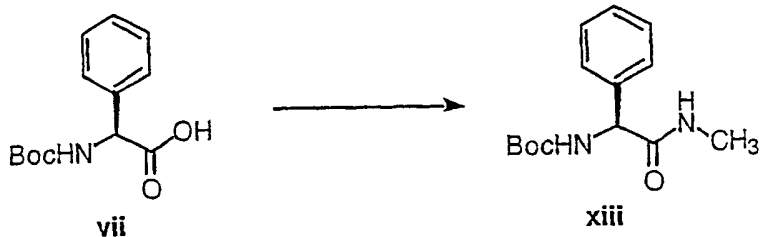


Požadovaný produkt **B** byl získán způsobem popsaným pro meziprodukt **A**, krok 7. Surový materiál byl použit bez dalšího čištění.

15

Meziprodukt CKrok 1

20



Požadovaná sloučenina **xiii** byla připravena podobným způsobem jako bylo popsáno v kroku 6 pro meziprodukt **A** s tím rozdílem, že byl použit methyamin namísto dimethylaminu.

25

5



15

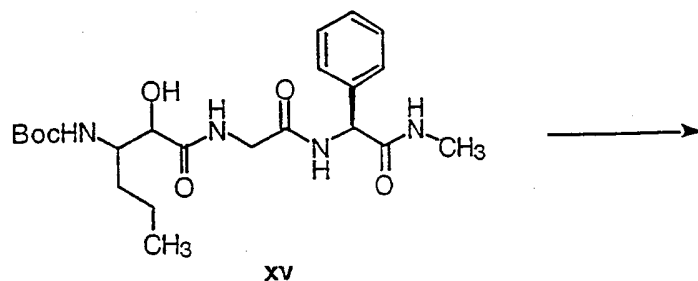
20



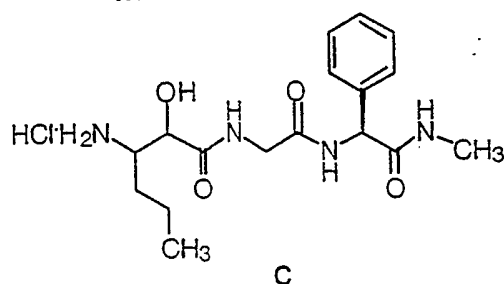
Požadovaná sloučenina **xv** byla připravena postupem popsaným v kroku 6 pro meziprodukt **A**, s tím rozdílem, že byl nahrazen amin **xiv** za amin **ix**. LRMS m/z $MH^+ = 451,1$.

Krok 4

5



10

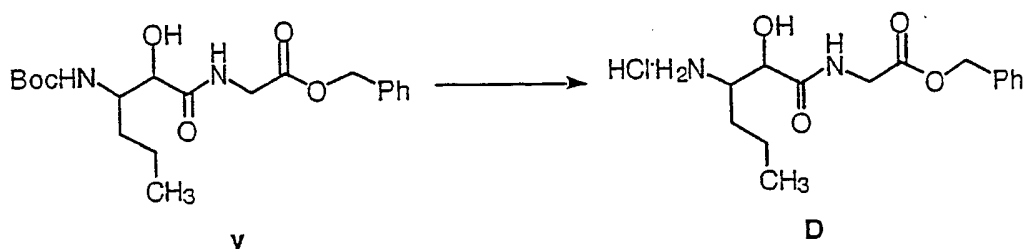


Požadovaný meziprodukt **C** byl připraven způsobem popsaným v kroku 7 pro meziprodukt **A**. LRMS m/z $MH^+ = 351,1$. Byl použit bez dalšího čištění.

15

Meziprodukt D

20



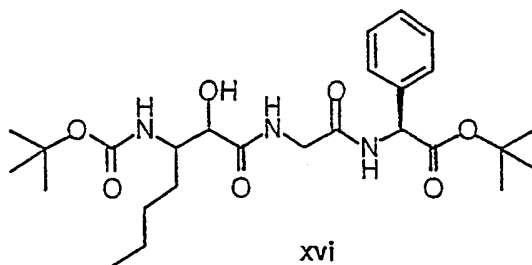
Požadovaný meziprodukt **D** byl připraven ze sloučeniny **v** způsobem popsaným v kroku 7 pro meziprodukt **A**. Byl použit bez dalšího čištění.

25

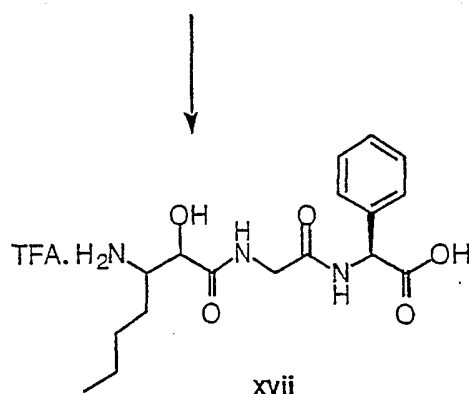
Meziprodukt E

Krok 1

5



10



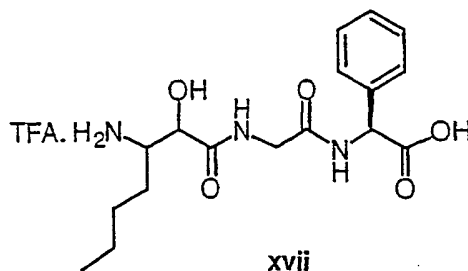
K roztoku **xvi** (5 g) v dichlormethanu (20 ml) byla přidána TFA (20 ml) a směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 4 hod. Byla přidána další část TFA (10 ml) a směs byla ponechána stát další 3 hod. Těkavé podíly byly odpařeny a zbytek byl sušen ve vakuu za získání kvantitativního výtěžku **xvii**. Tento materiál byl použit v dalších krocích (pozn.: výchozí materiál **xvi** byl získán podle podobného protokolu jako bylo popsáno pro **B**, s použitím nitropentanu jako

20

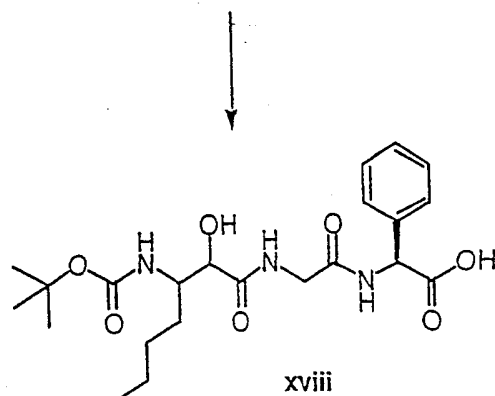
prekurzoru).

Krok 2

25



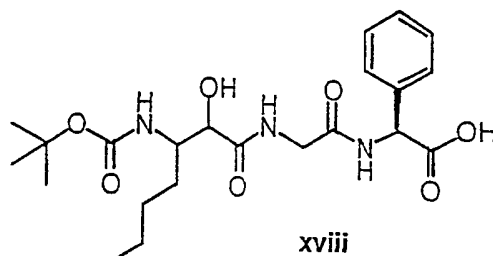
5



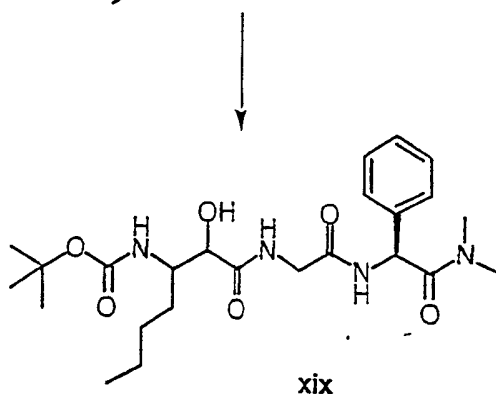
Požadovaná sloučenina **xviii** byla získána způsobem popsáním
10 pro meziprodukt **A**, krok 3. Jako báze byl použit uhličitan sodný
namísto NaOH . Surový materiál **xviii** byl použit dále bez čištění.

Krok 3

15



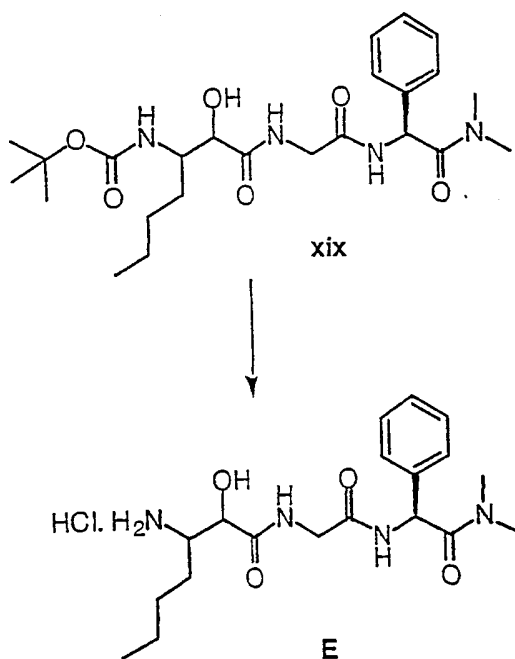
20



K chladnému ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) roztoku sloučeniny **xviii** (4,8 g,
25 10,7 mmol) ve směsi dichlormethan/DMF (4/1, 25 ml) byl přidán
dimethylaminhydrochlorid (959 mg, 11,77 mmol), diisopropylethylamin

(4,2 ml, 24,1 mmol) a BOP (6,14 g, 13,89 mmol). Směs byla ponechána stát při -8 °C přes noc. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem a promyta 10% roztokem kyseliny citronové, nasyceným roztokem NaHCO₃ a roztokem soli. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována. Zbytek byl čištěnbleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 97,5/2,5 dichlormethan/MeOH za získání 2,4 g sloučeniny **xix** (47% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₂₄H₃₉N₄O₆: 479,2870 (M+H)⁺. Nalezeno: 479,2862.

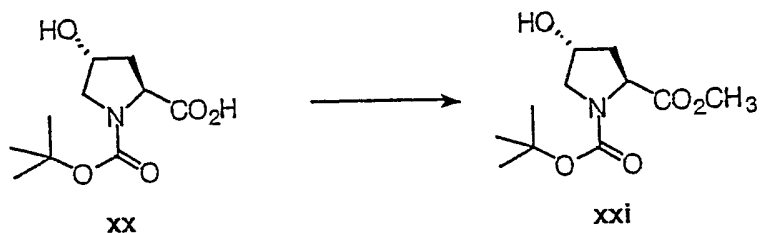
Krok 4



Požadovaný produkt **E** byl získán způsobem popsaným pro meziprodukt **A**, krok 7. Surový materiál byl použit bez dalšího čištění.

Meziprodukt F

Krok 1

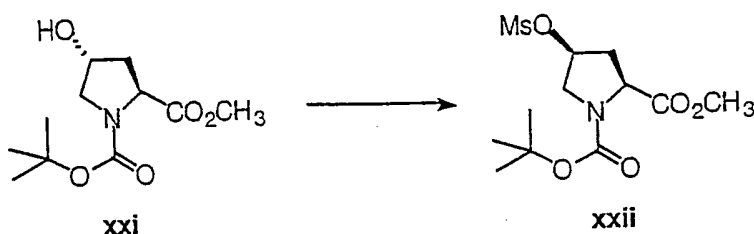


5

K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **xx** (20,0 g, 86,5 mmol) v benzenu (300 ml) a MeOH (50 ml) byl přidáván trimethylsilyl-diazomethan (2M, 56 ml, 112 mmol) po kapkách, dokud roztok zůstal žlutý. Reakční směs byla zakoncentrována za získání 21 g **xxi** (99% výtěžek), která měla dostatečnou čistotu pro další reakce. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₁₁H₂₀NO₅: 246,1341 (M+H)⁺. Nalezeno: 246,1347.

Krok 2

15



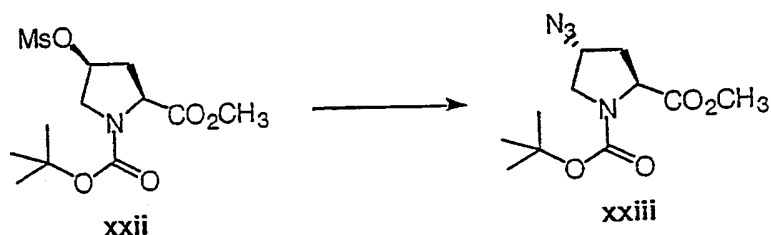
20

K chladné (~5 °C) mechanicky míchané směsi trifenylofosfinu (31,97 g, 121,9 mmol) a methansulfonové kyseliny (7,66 ml, 118,1 mmol) v toluenu byl pomalu přidán DEAD (26,47 g, 152 mmol) při udržování reakční směsi při teplotě nižší než 35 °C. Po ukončení přidávání byla reakční směs ochlazena na 20 °C a byl přidán roztok **xxi** (23,71 g, 96,8 mmol) v toluenu a potom byl přidán triethylamin (5,39 ml, 38,7 mmol). Směs byla zahřívána na 70 - 75 °C po dobu 6 hod a ochlazena na 5 - 10 °C v průběhu 1 hod. Po odfiltrování pevného materiálu byl filtrát promyt 5% roztokem KH₂PO₄ a roztokem

25

solí. Organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována. Blesková chromatografie zbytku na koloně s použitím směsi 95/5 dichlormethan/EtOAc poskytla 26 g **xxii** (83% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_7\text{S}$: 324,1117 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Nalezeno: 324,1115.

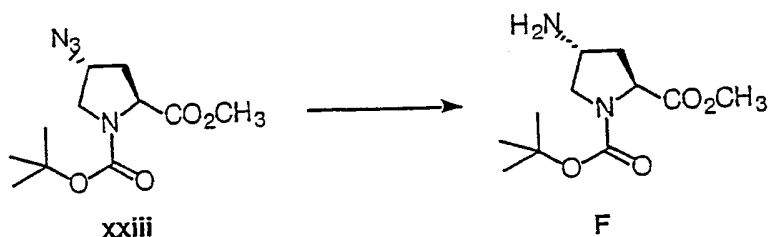
5 Krok 3



10

Mesylát **xxii** (26 g, 80,4 mmol) byl rozpuštěn v DMF a těkavé podíly byly odpařeny ve vakuu. (Pozor: s tímto procesem musí být odstraněna stopová množství dichlormethanu). Ke zbylému roztoku byl přidán azid sodný (5,75 g, 88,4 mmol) a směs byla zahřáta na 70 °C v průběhu 5 hod. Reakční směs byla ochlazená, zředěna EtOAc a promyta nasyceným NaHCO_3 . Organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována za získání 18 g (83% výtěžek) sloučeniny **xxiii**, která měla dostatečnou čistotu pro další studie.

20 Krok 4



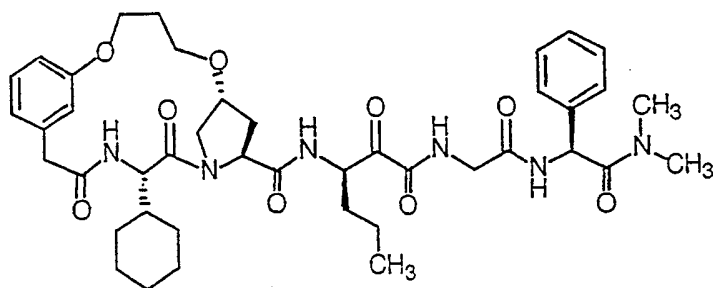
25

Požadovaný produkt **F** byl získán způsobem popsaným pro meziprodukt **A**, krok 5. Surový materiál byl použit bez dalšího čištění.

Příklady provedení vynálezu

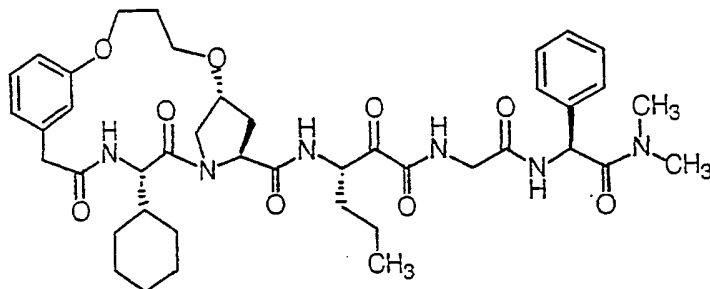
Příklad 1: Příprava sloučenin vzorců 1A a 1B

5



1A

10

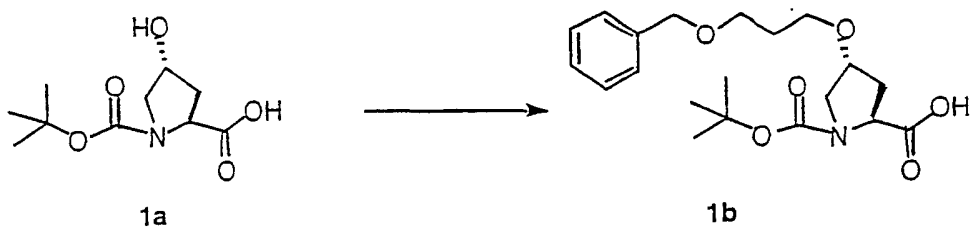


1B

15

Krok A

20



K roztoku Boc-Hyp-OH (7,0 g, 30,3 mmol) a benzyl-3-bromopropyletheru (7,8 g, 34,0 mmol) v bezvodém DMF (400 ml) při
25 teplotě laboratoře byl přidán hydrid sodný (3,5 g, 60% disperze

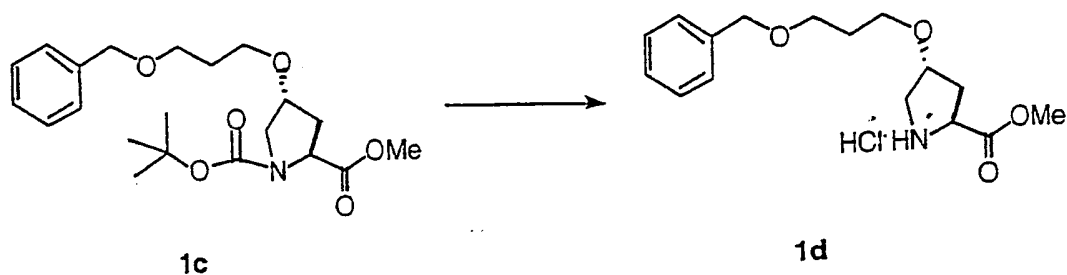
10

15



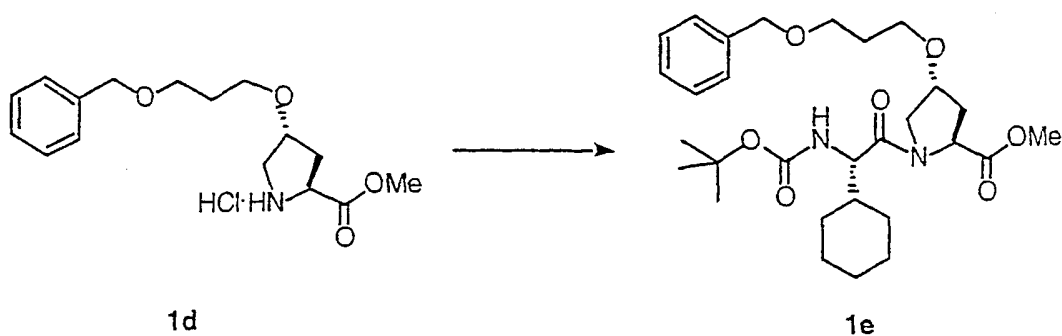
20

25



Boc-aminomethylester **1c** (5,83 g, 14,8 mmol) byl rozpuštěn ve 4N HCl v dioxanu (80 ml, 320 mmol) a získaný roztok byl míchán při teplotě laboratoře. Postup reakce byl monitorován TLC. Po 5 hod byl roztok zakoncentrován ve vakuu a zbytek byl udržován ve vakuu přes noc za získání bílé pevné látky, která byla použita při následující reakci bez dalšího čištění.

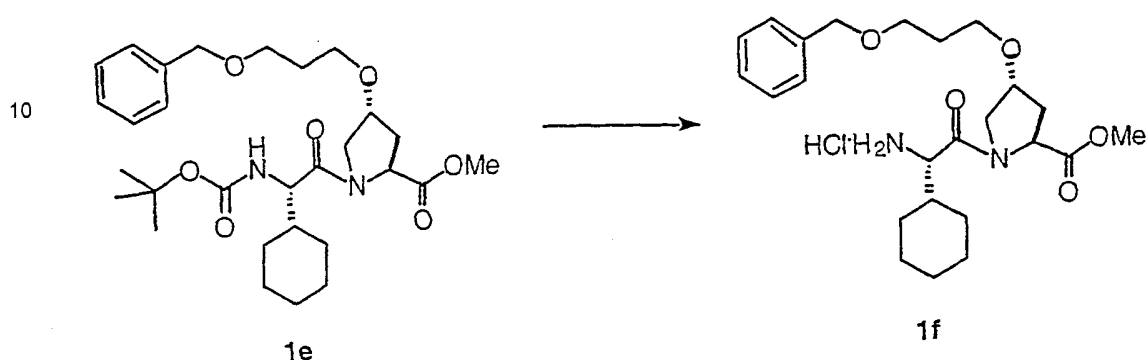
Krok D



K roztoku aminesteru **1d** (z kroku 1B), *N*-Boc-cyklohexylglycinu (4,10 g, 14,9 mmol), HOObt (2,60 g, 15,9 mmol) a EDCI (3,41 g, 17,8 mmol) v bezvodém DMF (150 ml) a CH₂Cl₂ byl při -20 °C přidán NMM (6,50 ml, 59,1 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována v mrazicím boxu přes noc (18 hod). Potom byla míchána na vzduchu a ponechána ohřát na teplotu laboratoře 1 hod. Byly přidány EtOAc (450 ml), roztok soli (100 ml) a 5% H₃PO₄ (100 ml). Oddělený organický roztok byl promyt 5% H₃PO₄ (100 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 150 ml), vodou (150 ml) a roztokem soli (150 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (10 až 20 % EtOAc-CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **1e** (6,60 g, 84%, 2 kroky) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7,36 - 7,25 (m, 5H), 6,87 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 4,46 - 4,40 (m,

2H), 4,25 (t, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,11 (s, 1H), 4,05 - 4,04 (m, 1H), 4,03 - 3,94 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,50 - 3,41 (m, 4H), 2,25 - 2,20 (m, 1H), 1,95 - 1,88 (m, 1H), 1,77 - 1,55 (m, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,19 - 0,90 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 172,0, 170,7, 155,6, 138,8, 128,2, 127,4, 127,3, 78,0, 77,1, 71,9, 66,6, 65,1, 57,4, 56,3, 51,8, 34,5, 29,6, 28,6, 28,2, 25,9, 25,6, 25,5.

Krok E

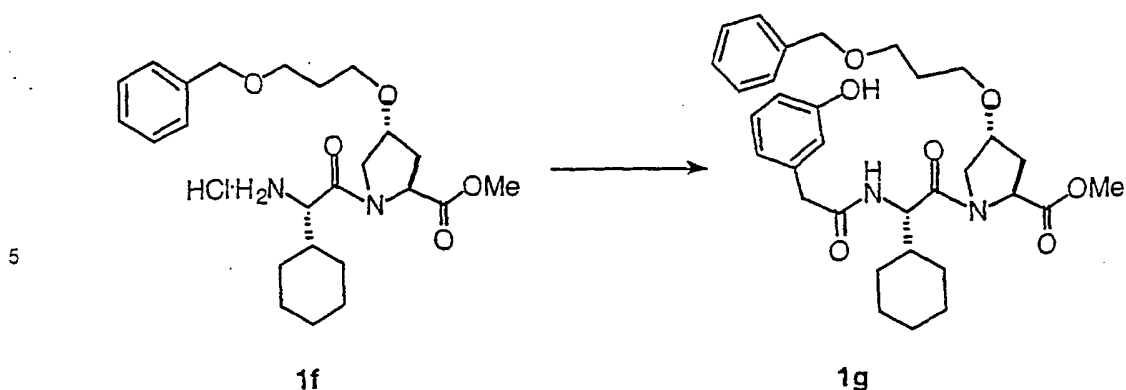


15 Boc-aminomethylester **1e** (6,53 g, 12,3 mmol) byl rozpuštěn ve 4N HCl (60 ml, 240 mmol) a získaný roztok byl míchán při teplotě laboratoře. Postup reakce byl monitorován TLC. Po 4 hod byl roztok zakoncentrován ve vakuu a zbytek byl udržován ve vakuu přes noc za poskytnutí bílé pevné látky, která byla použita při následující reakci bez dalšího čištění.

20 ^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 7,36 - 7,27 (m, 5H), 4,43 (s, 2H), 4,35 - 4,31 (m, 1H), 3,88 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,62 - 3,57 (m, 2H), 3,53 - 3,41 (m, 3H), 2,32 - 2,27 (m, 1H), 1,97 - 1,91 (m, 1H), 1,79 - 1,60 (m, 8H), 1,17 - 1,07 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 171,5, 167,4, 138,6, 133,3, 129,1, 128,8, 128,2, 127,4, 77,1, 71,9, 66,5, 65,3, 57,8, 54,9, 52,4, 52,0, 34,0, 29,6, 27,7, 27,0, 25,6, 25,5, 25,48; HRMS m/z 433,2702 [vypočteno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$, 433,2702].

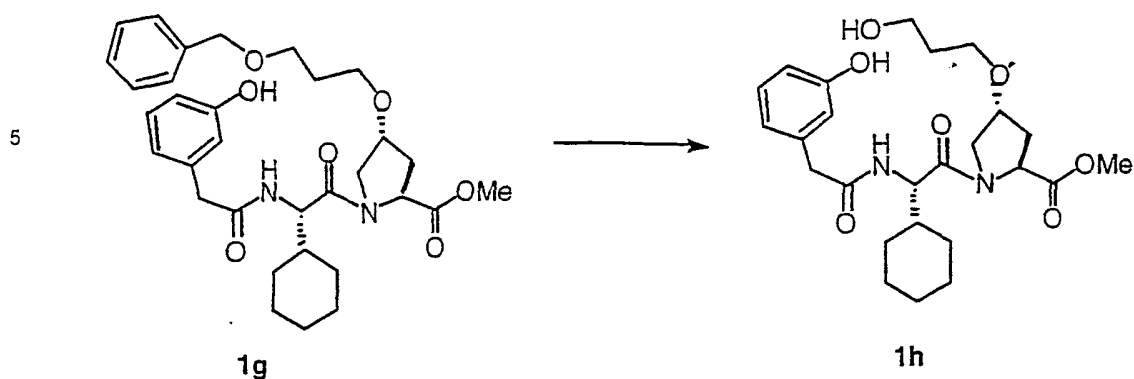
25

Krok F



K roztoku aminu **1f** (z kroku 1D), kyseliny 3-hydroxyfenyloctové (1,90 g, 12,5 mmol), HOObt (2,10 g, 12,9 mmol) a EDCI (2,85 g, 14,9 mmol) v bezvodém DMF (250 ml) a CH₂Cl₂ (100 ml) byl při -20 °C
 10 přidán NMM (4,20 ml, 38,2 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována v mrazicím boxu přes noc (18 hod). Potom byla míchána na vzduchu a ponechána ohřát na teplotu laboratoře 1 hod. Byly přidány EtOAc (500 ml), roztok soli (100 ml) a
 15 5% H₃PO₄ (100 ml). Oddělený organický roztok byl promyt 5% H₃PO₄ (100 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 150 ml), vodou (150 ml) a roztokem soli (150 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (10 až 20% EtOAc-CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **1g**
 20 (6,30 g, 11,1 mmol, 90 % (2 kroky)) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,26 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,36 - 7,25 (m, 5H), 7,05 - 7,01 (m, 1H), 6,66 - 6,64 (m, 1H), 6,60 - 6,57 (m, 1H), 4,46 - 4,39 (m, 2H), 4,34 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,29 - 4,25 (m, 1H), 4,09 - 4,08 (m, 1H), 3,91 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 3,66 - 3,58 (m, 1H),
 25 3,61 (s, 3H), 3,50 - 3,39 (m, 5H), 3,30 (d, *J* = 13,7 Hz, 1H), 2,24 - 2,18 (m, 1H), 1,95 - 1,89 (m, 1H), 1,74 - 1,57 (m, 8H), 1,18 - 0,89 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 172,0, 170,3, 170,0, 157,1, 138,6, 137,6, 128,9, 128,2, 127,4, 127,3, 119,6, 116,1, 113,2, 76,9, 71,8, 66,6, 65,2, 57,4, 54,7, 51,9, 51,8, 41,8, 34,4, 29,6, 28,5, 28,0, 25,5,
 30 25,5; HRMS *m/z* 567,3073 [vypočteno pro C₃₂H₄₂N₂O₇, 567,3070].

Krok G



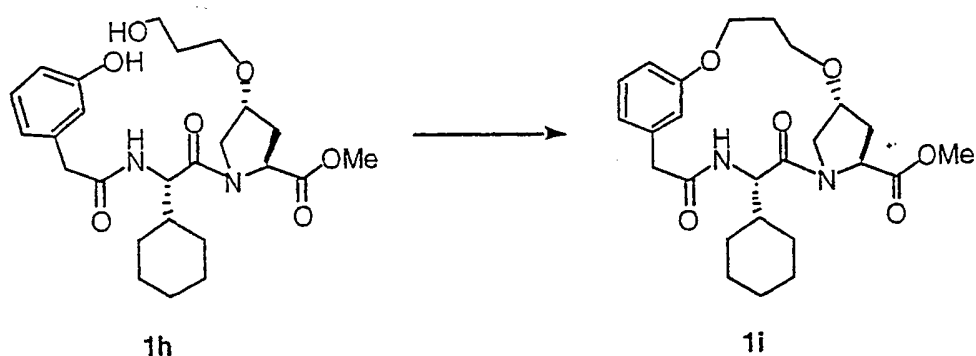
10 K roztoku benzyletheru **1g** (6,23 g, 11,0 mmol) v ethanolu (200 ml) v atmosféře dusíku při teplotě laboratoře bylo opatrně přidáno 10% Pd-C (1,5 g). Získaná suspenze byla důkladně míchána při teplotě laboratoře v atmosféře vodíku 23 hod. Po opatrném zfiltrování byl roztok zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (2 až

15 5% MeOH-CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **1h** (4,54 g, 9,52 mmol, 87 %) jako bezbarvý olej. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,26 (s, 1H), 8,22 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,06 - 7,02 (m, 1H), 6,66 - 6,58 (m, 3H), 4,42 - 4,40 (m, 1H), 4,35 - 4,31 (s, 1H), 4,27 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,10 - 4,09 (m, 1H), 3,92 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 3,64 (dd, *J* = 11,2, 4,3 Hz, 1H),

20 3,61 (s, 3H), 3,59 - 3,43 (m, 5H), 3,40 - 3,38 (m, 1H), 2,26 - 2,21 (m, 1H), 1,97 - 1,90 (m, 1H), 1,74 - 1,55 (m, 8H), 1,18 - 0,89 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 172,0, 170,3, 170,1, 157,1, 137,6, 129,0, 119,6, 116,0, 113,3, 76,9, 65,2, 57,6, 57,4, 54,8, 51,9, 51,8, 41,7, 34,4, 32,6, 28,5, 28,0, 25,9, 25,52, 25,49; HRMS *m/z* 477,2606

25 [vypočteno pro C₂₅H₃₆N₂O₇, 477,2601].

Krok H

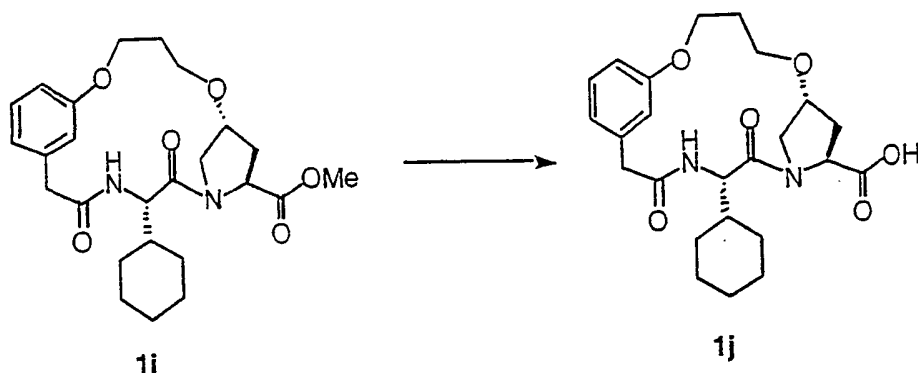


5

Roztok fenolalkoholu **1h** (4,50 g, 9,43 mmol) a ADDP (6,60 g, 26,2 mmol) v bezvodém CH₂Cl₂ byl skleněnou fritou probubláván argonem po dobu 20 min. K roztoku byl při 0 °C přidán trifenylyfosfin (4,10 g, 16,3 mmol). Po míchání při 0 °C po dobu 20 min byla přidána druhá část trifenylyfosfinu (3,40 g, 13,5 mmol). Roztok byl potom zahřát na teplotu laboratoře a míchán přes noc (24 hod) v atmosféře dusíku, dokud TLC neukázala úplné spotřebování výchozího materiálu. Po odstranění rozpouštědla ve vakuu byl zbytek částečně vyčištěn bleskovou chromatografií (1 až 2% MeOH v CH₂Cl₂) za získání směsi makrocyclické sloučeniny **1i** a trifenylyfosfinoxidu. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8,47 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 7,17 - 7,13 (m, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,73 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 6,71 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 4,50 - 4,45 (m, 1H), 4,24 (dd, *J* = 10,3, 7,6 Hz, 1H), 4,17 - 4,06 (m, 4H), 3,68 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,60 - 3,51 (m, 2H), 3,37 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 3,35 - 3,27 (m, 1H), 2,51 - 2,43 (m, 1H), 1,85 - 1,47 (m, 9H), 1,22 - 1,12 (m, 3H), 0,97 - 0,88 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 172,0, 170,0, 169,8, 158,4, 138,1, 129,1, 121,8, 115,4, 112,2, 77,0, 64,9, 63,6, 57,0, 54,3, 53,4, 51,8, 41,3, 33,2, 28,9, 28,5, 28,2, 26,0, 25,2; HRMS *m/z* 459,2495 [vypočteno pro C₂₅H₃₄N₂O₆, 459,2495].

25

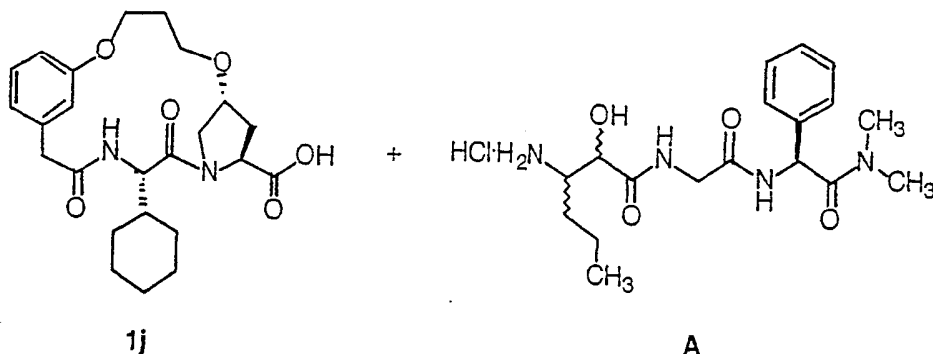
Krok I

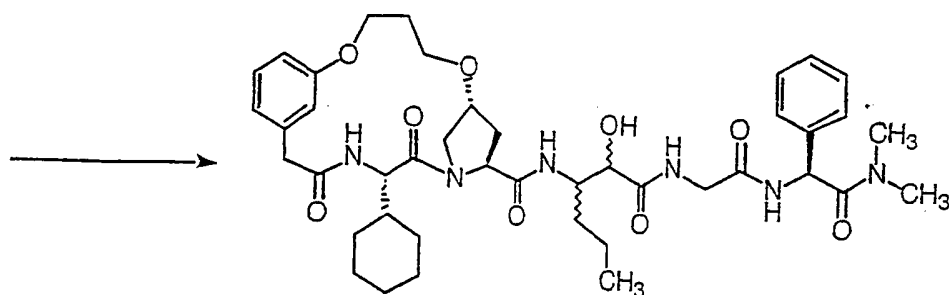


Vodný roztok hydroxidu lithného (0,45 g v 30 ml H₂O) byl přidán při teplotě 0 °C k roztoku methylesteru **1i** v THF (30 ml) a methanolu (30 ml). Směs byla míchána v ledové lázni a zahřáta na teplotu laboratoře a ponechána při této teplotě 4 hod. Postup reakce byl monitorován TLC. Po odstranění těkavých podílů ve vakuu, byly přidány EtOAc (150 ml) a voda (30 ml) a dvě vrstvy byly odděleny. Vodný roztok byl znovu extrahován CH₂Cl₂ (150 ml), potom byl okyselen na pH = 1. Potom byla přidána EtOAc (200 ml) a vodný roztok byl nasycen pevným chloridem sodným. Po oddělení vrstev byla vodná vrstva extrahována EtOAc (2 x 150 ml). Organické roztoky byla spojeny, sušeny síranem hořečnatým, zfiltrvány a zakoncentrovány ve vakuu za získání sloučeniny **1j** (1,45 g, 3,26 mmol, 35 %, 2 kroky) jako světle žluté pěny. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 12,32 (bs, 1H), 8,45 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,17 - 7,13 (m, 1H), 6,73 - 6,70 (m, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,73 - 6,70 (m, 2H), 4,47 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,17 - 4,00 (m, 5H), 3,68 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 3,58 - 3,45 (m, 2H), 3,39 - 3,21 (m, 2H), 2,47 - 2,41 (dd, *J* = 13,4, 7,6 Hz, 1H), 1,85 - 1,56 (m, 9H), 1,19 - 1,11 (m, 3H), 0,93 - 0,87 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 173,2, 170,2, 170,0, 158,4, 138,1, 129,3, 122,0, 115,5, 112,2, 77,3, 65,1, 63,8, 57,3, 54,2, 53,7, 41,5, 33,6, 29,0, 28,6, 28,4, 26,1, 25,4; HRMS *m/z* 445,2335 [vypočteno pro C₂₄H₃₂N₂O₆, 445,2339].

Krok J

25





1k

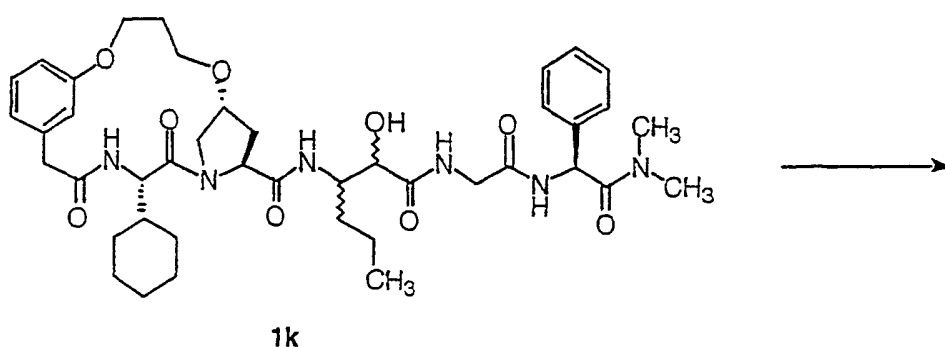
K roztoku kyseliny **1j** (0,59 g, 1,33 mmol), aminu **A** (H₂N-NVa-
-CH-(OH)-CO-Gly-Phg-NMe₂, 0,55 g, 1,37 mmol), HOObt (250 mg,
1,53 mmol) a EDCI (315 mg, 1,64 mmol) v bezvodém DMF (50 ml) a
10 CH₂Cl₂ (50 ml) byl při -20 °C přidán NMM (0,50 ml, 4,55 mmol). Po
míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována
v mrazicím boxu 40 hod. Potom byly přidány EtOAc (200 ml), roztok
soli (50 ml) a 5% H₃PO₄ (50 ml). Oddělený organický roztok byl promyt
postupně 5% H₃PO₄ (80 ml), nasyceným vodným roztokem
15 hydrogenuhličitanu sodného (2 x 80 ml), vodou (80 ml) a roztokem soli
(80 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve
vakuu. Blesková chromatografie (4 až 7,5 % MeOH-CH₂Cl₂) poskytla
sloučeninu **1k** jako směs čtyř diastereomerů (0,59 g, 0,75 mmol, 56%),
jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8,54 - 8,35
20 (m, 2H), 7,95 - 6,98 (m, 8H), 6,79 - 6,77 (m, 1H), 6,72 - 6,70 (m, 2H),
5,96 - 5,73 (m, 2H), 4,53 - 4,45 (m, 1H), 4,35 - 3,61 (m, 11 H), 3,54 -
3,41 (m, 1H), 3,40 - 3,22 (m, 1H), 2,93 - 2,92 (m, 3H), 2,84 (s, 3H),
2,42 - 2,17 (m, 1H), 1,87 - 1,55 (m, 10H), 1,49 - 1,06 (m, 7H), 0,98 -
0,75 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 172,1, 171,9, 171,8,
25 170,8, 170,7, 170,4, 170,4, 170,3, 170,0, 169,8, 169,7, 169,6, 169,2,
169,2, 167,9, 167,8, 167,8, 158,4, 158,3, 138,2, 138,15, 138,11,
138,07, 137,6, 137,50, 137,48, 129,1, 128,5, 128,3, 127,8, 127,7,
121,7, 121,6, 115,4, 115,3, 112,09, 112,07, 112,0, 111,9, 76,9, 76,8,
73,3, 72,1, 71,9, 64,9, 64,8, 63,2, 58,7, 58,5, 57,9, 57,8, 54,6, 54,5,
30 54,48, 53,8, 53,78, 53,7, 53,66, 53,0, 52,9, 51,0, 50,8, 50,7, 41,6,

41,5, 41,4, 41,3, 36,6, 35,3, 33,9, 33,86, 33,5, 32,9, 32,1, 29,9, 29,0,
28,9, 28,5, 28,4, 28,3, 26,0, 25,9, 25,3, 25,25, 25,2, 18,6, 18,56, 18,5,
13,8, 13,7; HRMS m/z 791,4339 [vypočteno pro $C_{42}H_{58}N_6O_9$,
791,4344, chyba = 1 ppm].

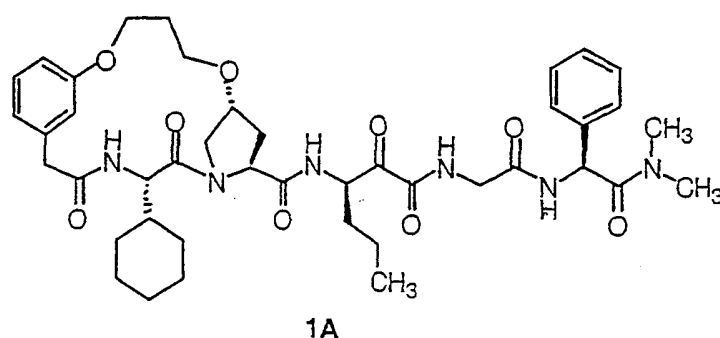
5

Krok K

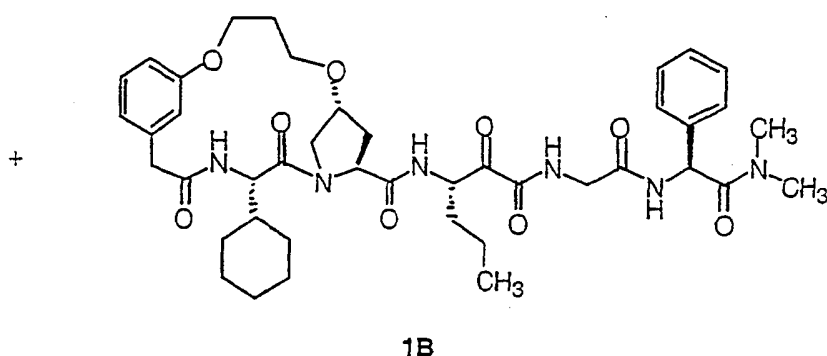
10



15



20

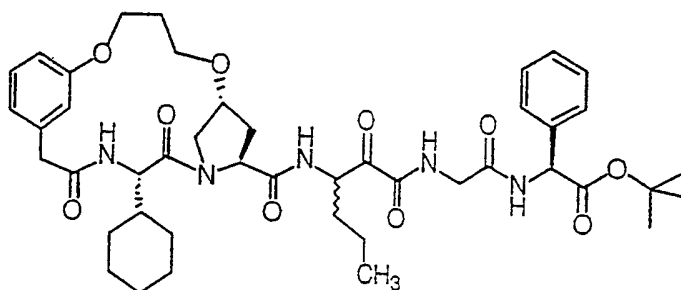


Ke směsi hydroxyamidu **1k** (0,57 g, 0,72 mmol) a Des-Martinova
činidla (0,76 g, 1,8 mmol) při 0 °C byl přidán bezvodý CH_2Cl_2 . Získaná
25 bílá suspenze byla důkladně míchána při 0 °C a zahřáta na teplotu
laboratoře spolu s ledovou lázní v průběhu 4 hod. Byl přidán nasycený
vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného a hydrogensířičitanu

sodného (vždy 50 ml) a směs byla důkladně míchána po dobu 10 min před oddělením vrstev. Vodný roztok byl extrahován (2 x 150 ml). Spojený organický roztok byl sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (2 až 4 % MeOH-
5 CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu dvou diastereomerů **1A** (250 mg, 0,32 mmol) a **1B** (217 mg, 0,28 mmol, 82% kombinovaný výtěžek) jako bílou pevnou látku.

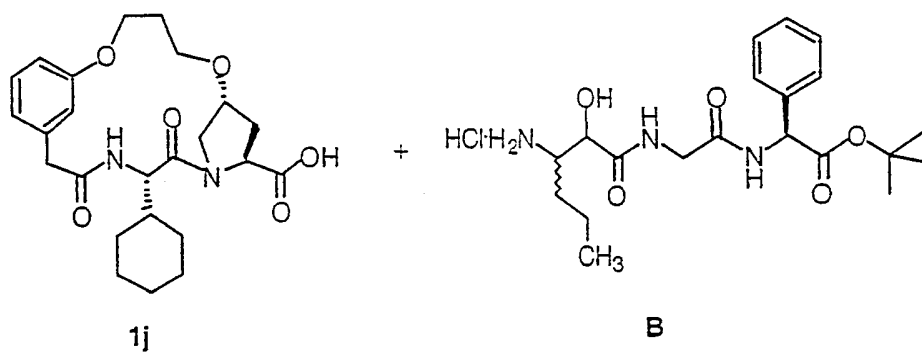
Příklad 2: Příprava sloučeniny 2

10

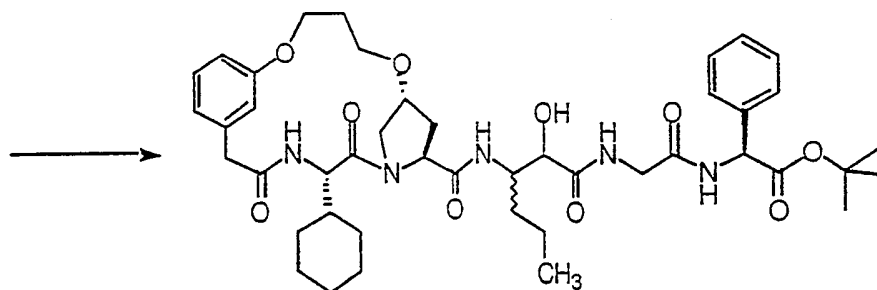


2

15 Krok A



20



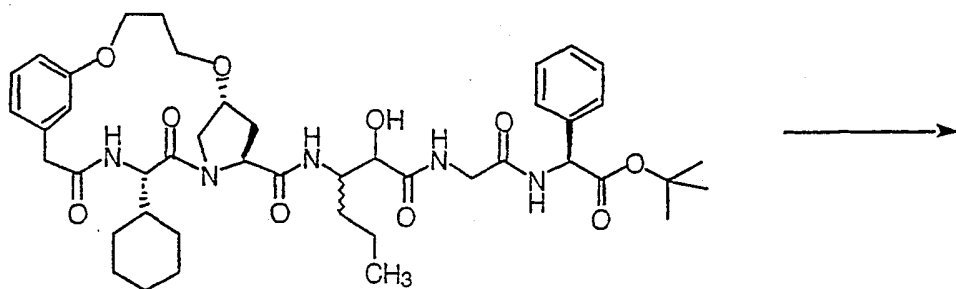
25

2a

Požadovaná sloučenina **2a** byla připravena způsobem popsaným v příkladu 1, krok J, s tím rozdílem, že byl nahrazen amin **B** za amin **A**. Hydroxyamid byl získán jako směs nerozdělitelných diastereomerů ve formě bílé pevné látky v 60% výtěžku.

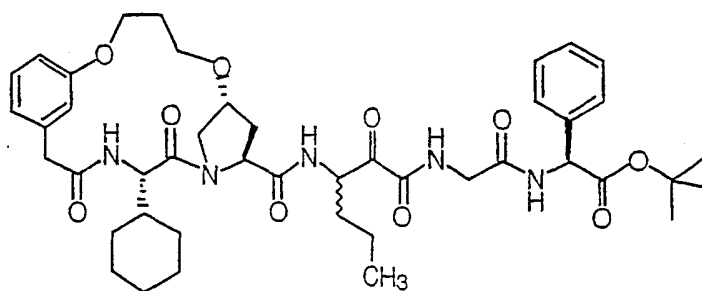
5

Krok B



2a

10



2

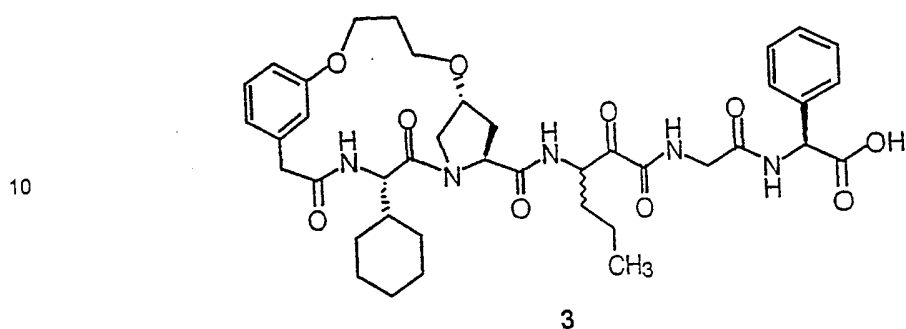
15

Požadovaný ketoamid byl připraven z hydroxyamidu **2a** způsobem popsaným v příkladu 1, krok K. Produkt byl získán jako směs nerozdělitelných diastereomerů ve formě bílé pevné látky v 78% výtěžku. ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 8,69 - 8,57 (m, 1H), 8,45 - 8,36 (m, 1H), 7,95 - 7,72 (m, 1H), 7,64 - 7,53 (m, 1H), 7,41 - 7,31 (m, 5H), 7,16 - 6,97 (m, 1H), 6,79 - 6,70 (m, 3H), 5,97 - 5,75 (m, 1H), 5,31 - 5,27 (m, 1H), 4,52 - 4,44 (m, 1H), 4,35 - 3,61 (m, 11H), 3,54 - 3,41 (m, 1H), 3,39 - 3,21 (m, 1H), 2,42 - 2,16 (m, 1H), 1,85 - 1,54 (m, 9H), 1,49 - 1,05 (m, 16H), 0,95 - 0,70 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 172,3, 172,2, 172,0, 171,9, 170,9, 170,7, 170,5, 170,5, 170,4, 170,1, 169,9, 169,7, 169,5, 168,6, 168,5, 158,5, 158,4, 138,2, 138,2, 138,1, 136,7, 132,1, 131,6, 131,5, 129,2, 129,1, 128,8, 128,7, 128,1, 127,7, 127,6, 127,6, 127,5, 127,4, 127,4, 121,7, 116,4, 115,4, 115,4, 113,3, 112,1, 112,1, 112,0, 81,3, 77,0, 76,9, 76,9, 73,4, 72,3,

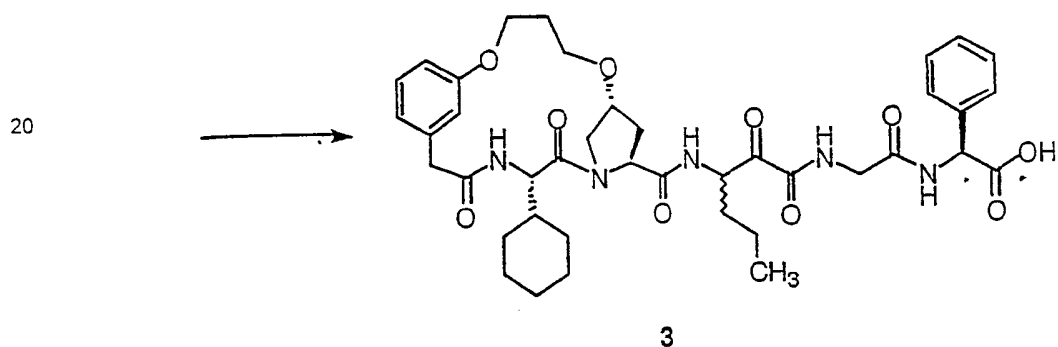
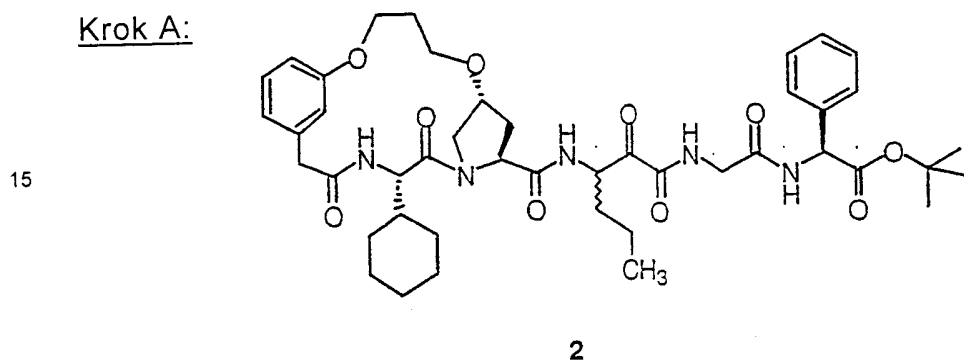
25

72,0, 64,9, 64,8, 63,3, 58,8, 56,9, 56,8, 54,7, 54,6, 54,6, 53,9, 53,9,
53,8, 51,1, 50,8, 41,6, 41,4, 41,3, 34,0, 33,9, 29,1, 29,0, 28,6, 28,5,
28,4, 28,4, 28,3, 27,5, 26,0, 26,0, 25,4, 25,3, 25,2, 18,7, 18,6, 18,5,
13,9, 13,8; HRMS m/z 820,4493 [vypočteno pro $C_{44}H_{61}N_5O_{10}$,
5 820,4497].

Příklad 3: Příprava sloučeniny vzorce 3 uvedené níže



Krok A:



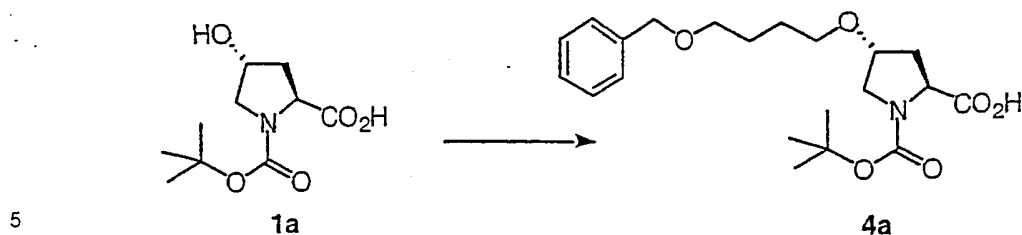
25 Roztok *t*-butylesteru **2** (26 mg, 0,032 mmol) v kyselině
trifluoroctové (2 ml) a CH_2Cl_2 (2 ml) byl míchán při teplotě laboratoře 3
hod. Po odstranění těkavých podílů ve vakuu byl zbytek rozpuštěn
v 50% MeOH- CH_2Cl_2 a zakonzentrován do sucha ve vakuu za získání

10

Příklad 4: Příprava sloučenin vzorců 4A a 4B



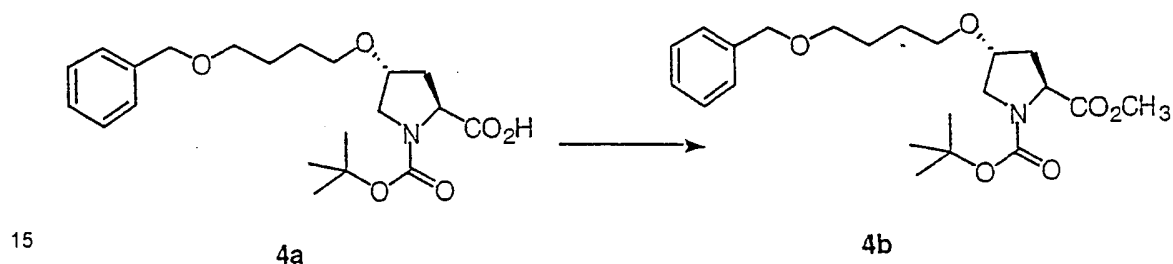
Krok A



Požadovaný produkt **4a** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok A. Surový materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

10

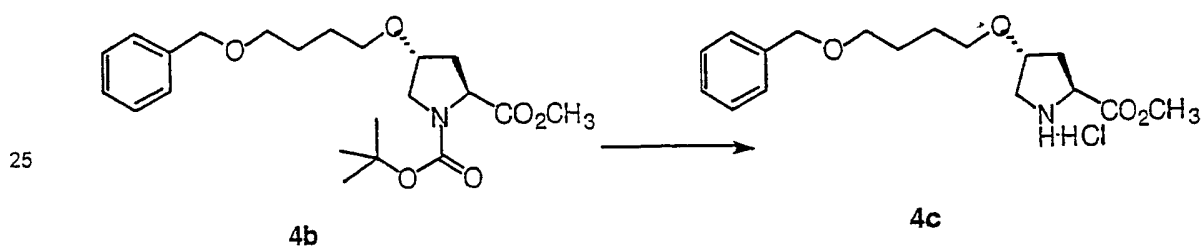
Krok B



Požadovaný produkt **4b** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok B. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 80/20 až 75/25 hexany/ethylacetát za získání **4b** v 50% výtěžku jako bezbarvý olej.

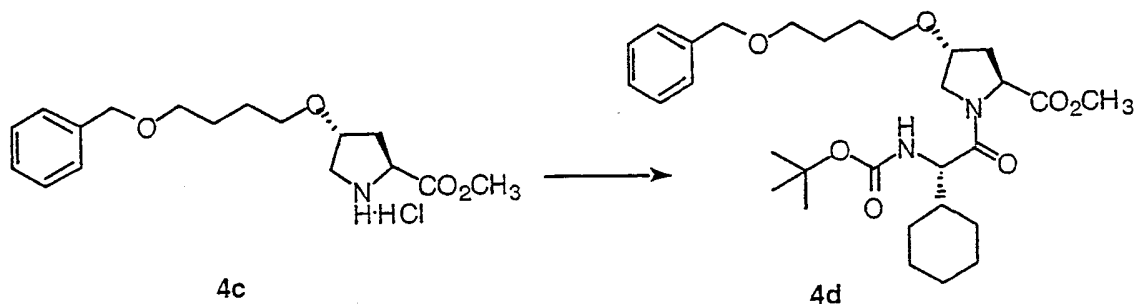
20

Krok C



Požadovaná sloučenina **4c** byla připravena podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok C. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

5 Krok D

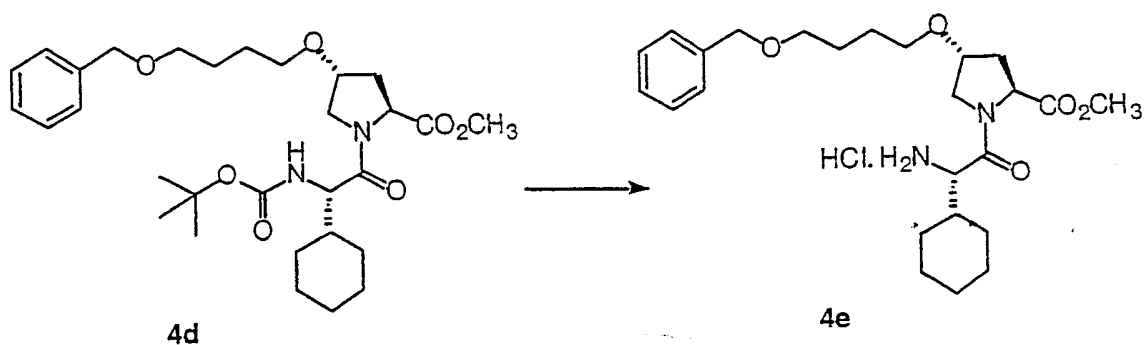


10

Požadovaný produkt **4d** byl získán způsobem popsaným v příkladu 1, krok D. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{30}H_{47}N_2O_7$: 547,3383 (M+H)⁺. Nalezeno: 547,3372.

15

Krok E

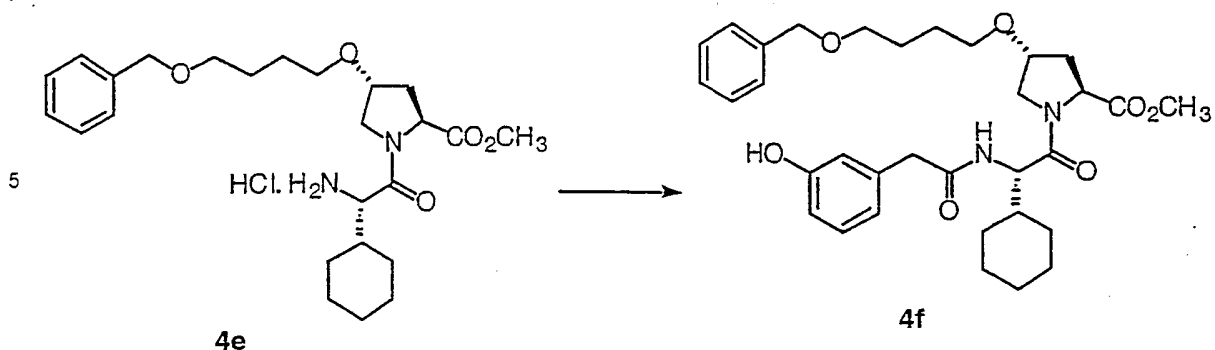


20

Požadovaný produkt **4e** byl získán způsobem popsaným v příkladu 1, krok E. Surový materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

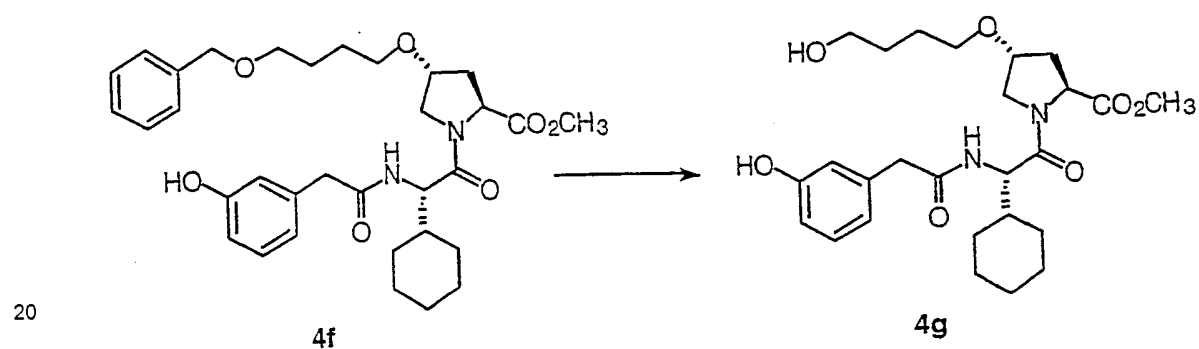
25

Krok F



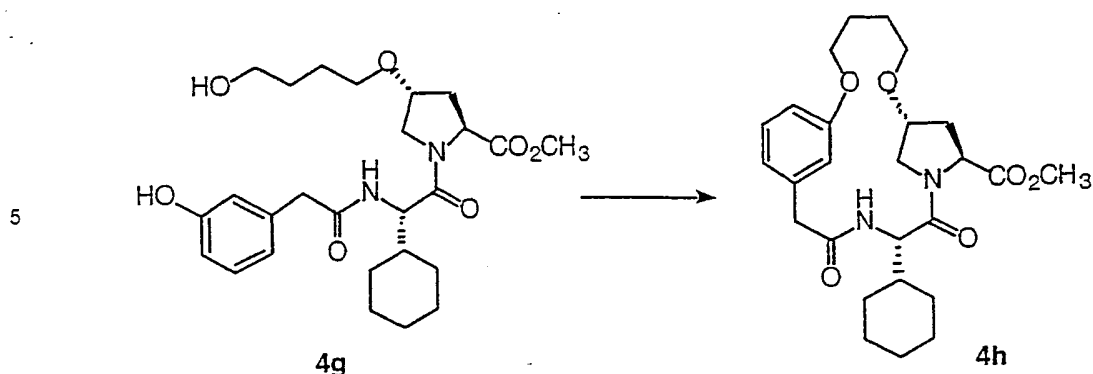
Požadovaný produkt **4f** byl získán způsobem popsaným
 10 v příkladu 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na
 koloně s použitím směsi 80/20 až 60/40 dichlormethan/ethylacetát, za
 získání **4f** v 85% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{33}H_{45}N_2O_7$:
 581,3227 (M+H)⁺. Nalezeno: 581,3222.

15 Krok G



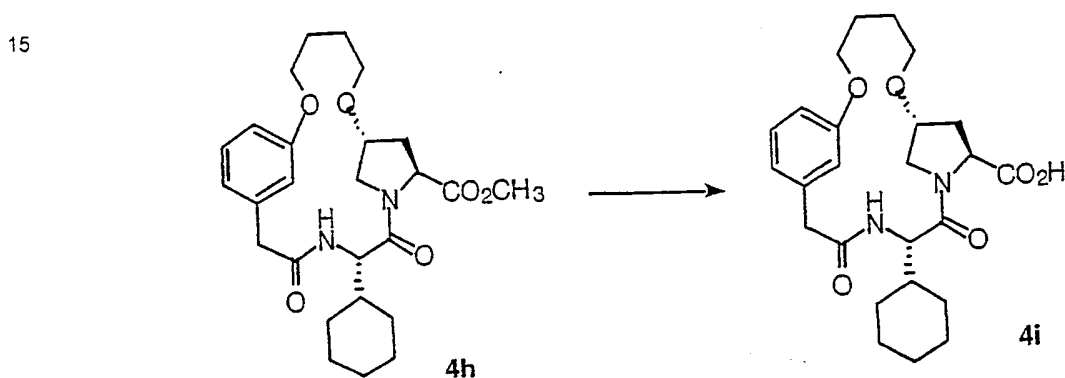
Požadovaný produkt **4g** byl získán způsobem popsaným
 v příkladu 1, krok G. Surový materiál byl převeden do dalšího kroku
 v surovém stavu. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{26}H_{39}N_2O_7$: 491,2757
 25 (M+H)⁺. Nalezeno: 491,2761.

Krok H



Požadovaný produkt **4h** byl získán způsobem popsaným
 10 v příkladu 1, krok H. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi
 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **4h** společně
 s trifenyfosfinoxidem. Tato směs byla převedena do dalšího kroku.

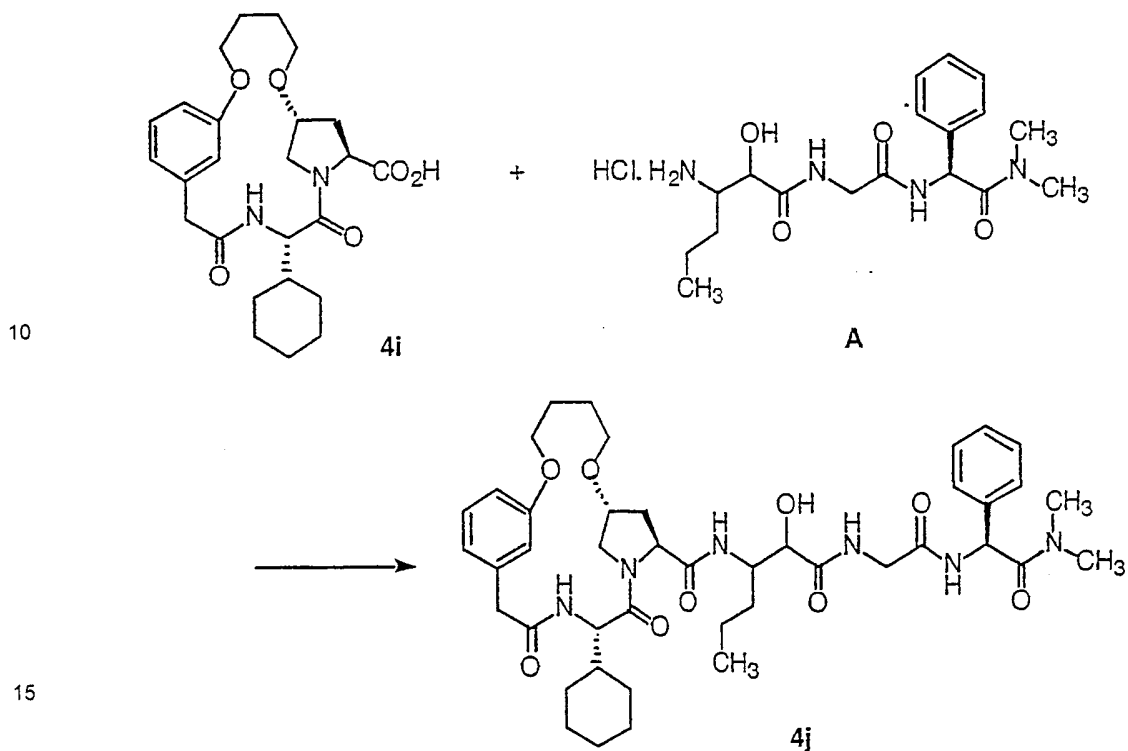
Krok I



Požadovaný produkt byl získán způsobem popsaným
 v příkladu 1, krok I. Výtěžek **4i** (2 kroky) = 24 %. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ
 0,90 - 0,95 (m, 2H), 1,10 - 1,16 (m, 3H), 1,51 - 1,79 (m, 11H), 2,43
 (dd, 1H), 3,29 - 3,32 m, 2H), 3,50 - 3,54 (m, 1H), 3,62 - 3,68 (m, 2H),
 25 3,91 - 3,99 (m, 3H), 4,04 - 4,08 (m, 2H), 4,46 (t, 1H), 6,67 - 6,72 (m,
 3H), 7,13 (zdánl. t, 1H), 8,36 (d, 1H), 12,40 (br. s, 1H); ¹³C NMR
 (DMSO-d₆) δ 25,26, 25,31, 25,97, 26,62, 28,42, 33,28, 39,75, 41,49,

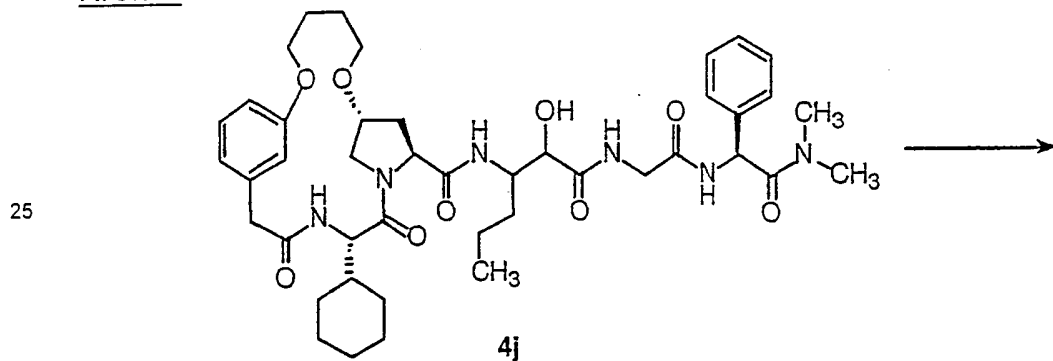
53,50, 54,28, 57,45, 67,57, 67,98, 77,25, 111,07, 115,23, 121,48,
129,11, 137,99, 158,33, 170,07, 172,92; HRMS (FAB) Vypočteno pro
 $C_{25}H_{35}N_2O_6$: 459,2495 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 459,2494.

5 Krok J

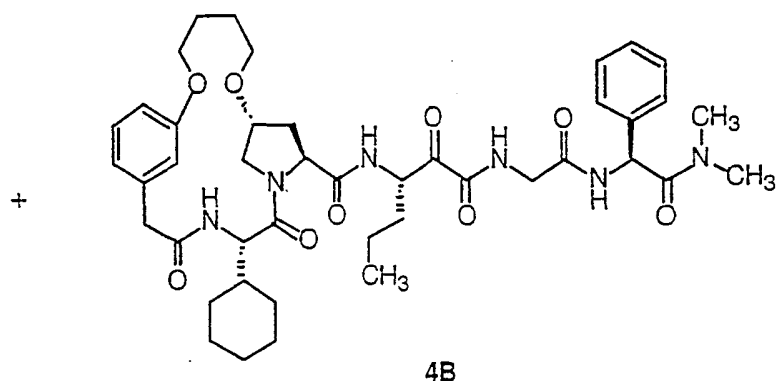
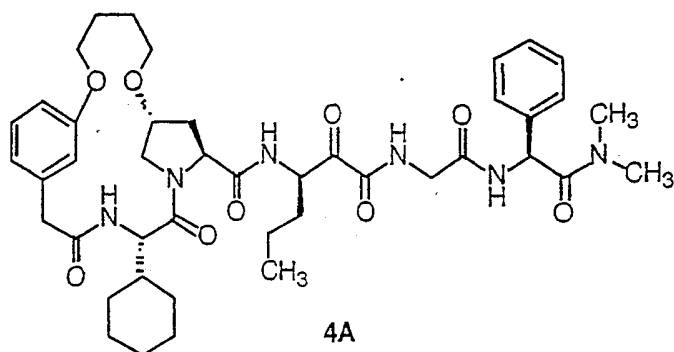


Očekávaný produkt **4j** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše
pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu
pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro
20 $C_{43}H_{61}N_6O_9$: 805,4500 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 805,4492.

Krok K

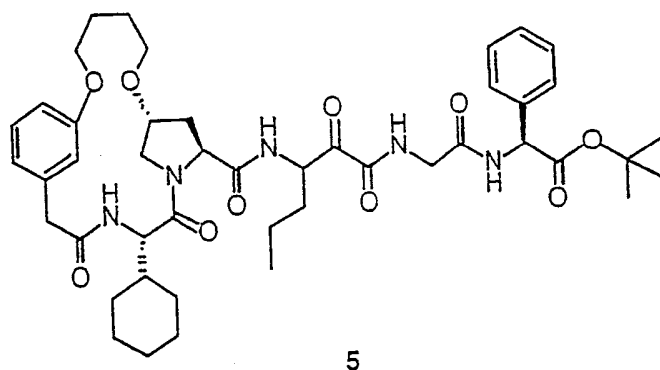


14.11.00

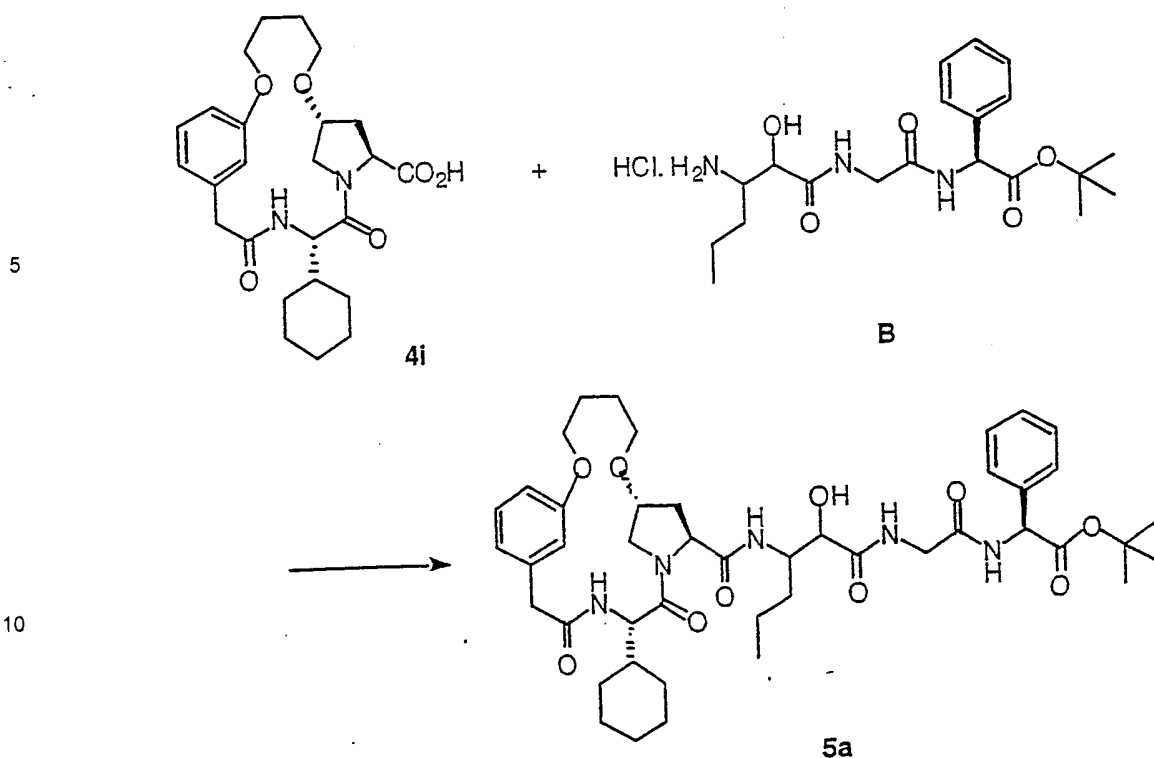


Požadované produkty **4A** a **4B** byly získány protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo odděleně isomery **4A** a **4B**, a směs. Kombinovaný výtěžek = 34% (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{43}H_{59}N_6O_9$: 803,4344 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 803,4339 (**4A**), 803,4347 (**4B**).

Příklad 5: Příprava sloučeniny 5



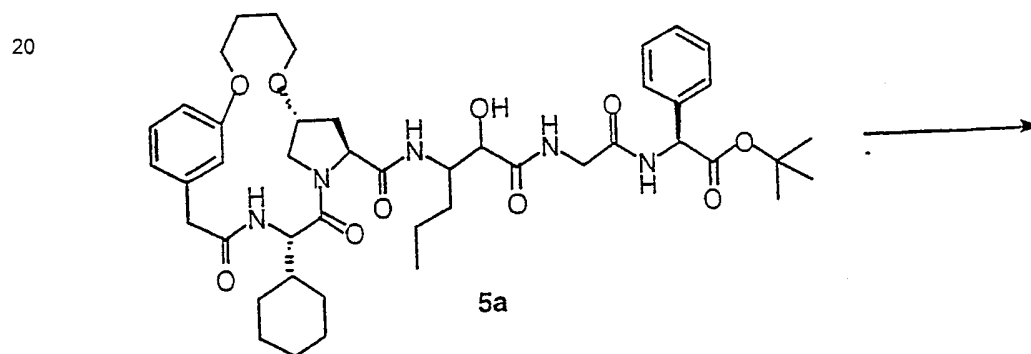
Krok A

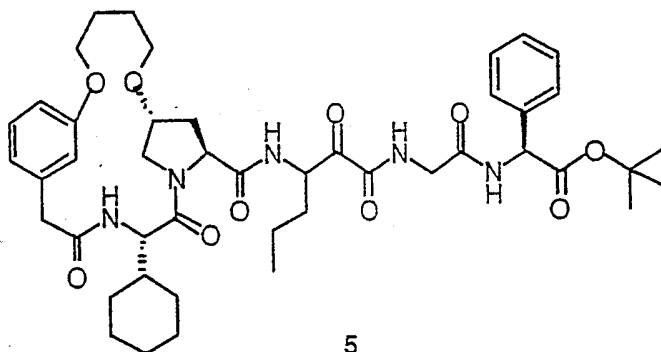


Očekávaný produkt **5a** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 2, krok A. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{45}H_{64}N_5O_{10}$: 834,4653 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 834,4648.

15

Krok B



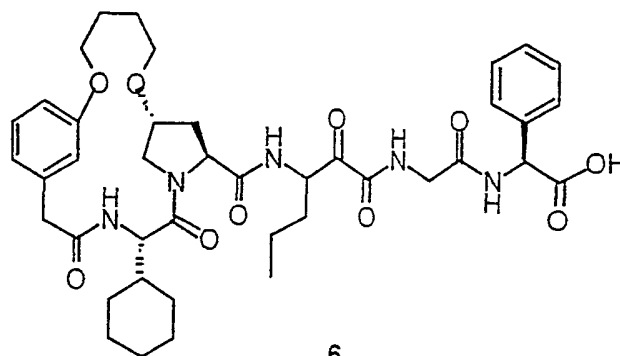


5

5

Požadovaný produkt **5** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **5** jako směs diastereomerů v 31% výtěžku (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{45}H_{62}N_5O_{10}$: 832,4497 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 832,4497.

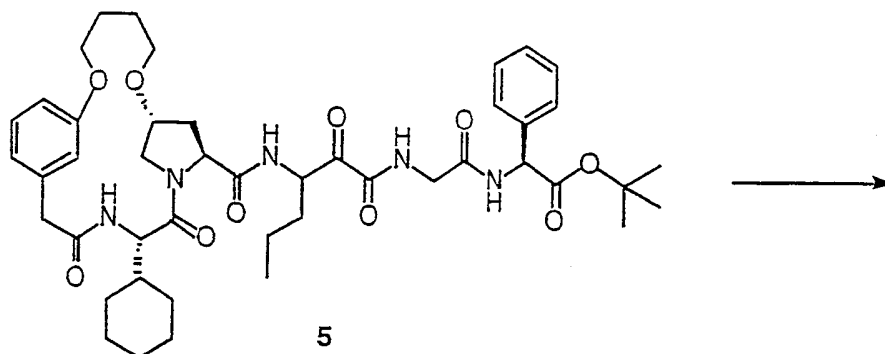
Příklad 6: Příprava sloučeniny 6



15

6

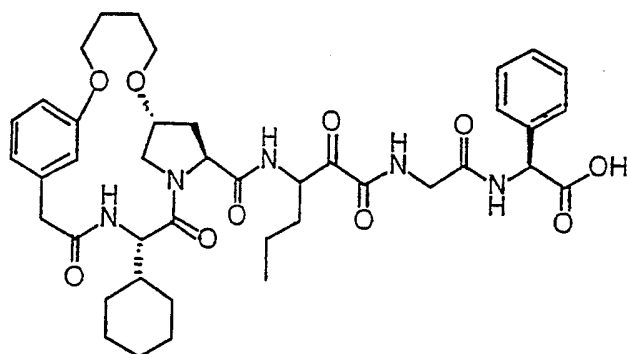
Krok A



20

25

5

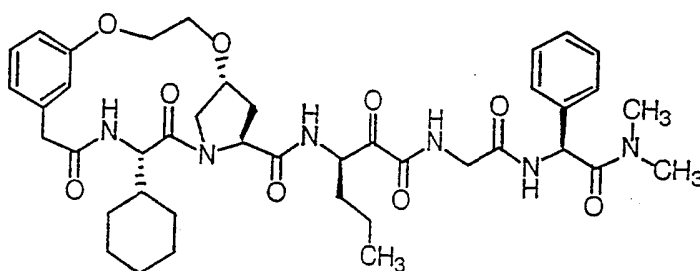


5

6

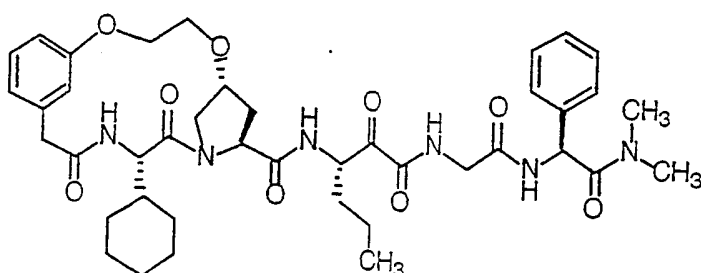
Očekávaný produkt **6** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 3, krok A v kvantitativním výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{41}H_{54}N_5O_{10}$: 776,3871 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 776,3865.

10 Příklad 7: Příprava sloučenin **7A** a **7B**



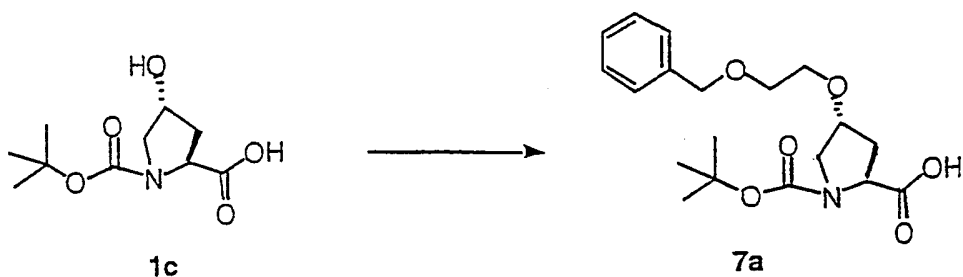
7A

15



7B

20 Krok A



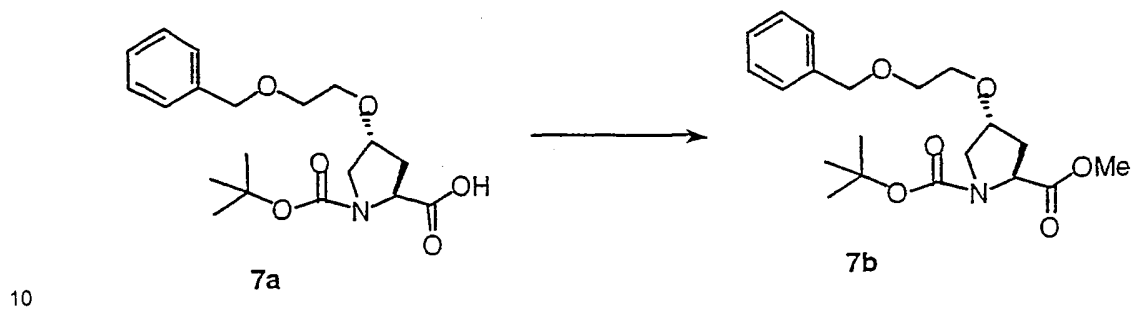
25

1c

7a

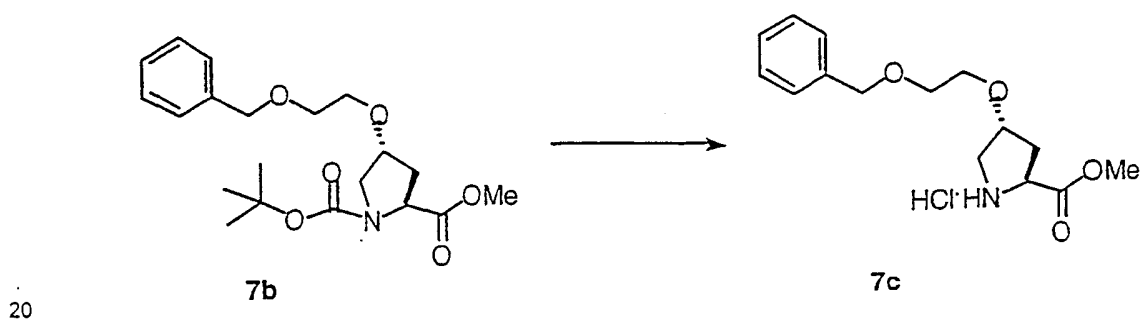
Požadovaná sloučenina **7a** byla připravena z **1c** způsobem popsaným v příkladu 1, krok A. Surový produkt byl použit v kroku B bez dalšího čištění.

5 Krok B

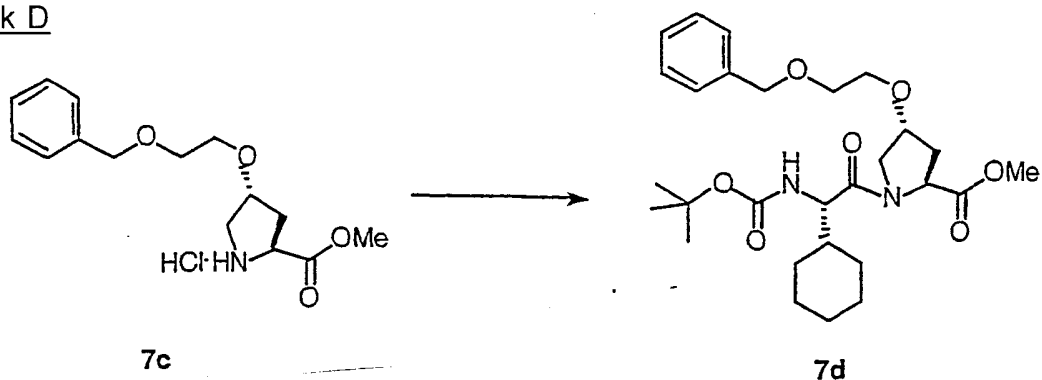


Požadovaná sloučenina **7b** byla připravena z **7a** způsobem popsaným v příkladu 1, krok B.

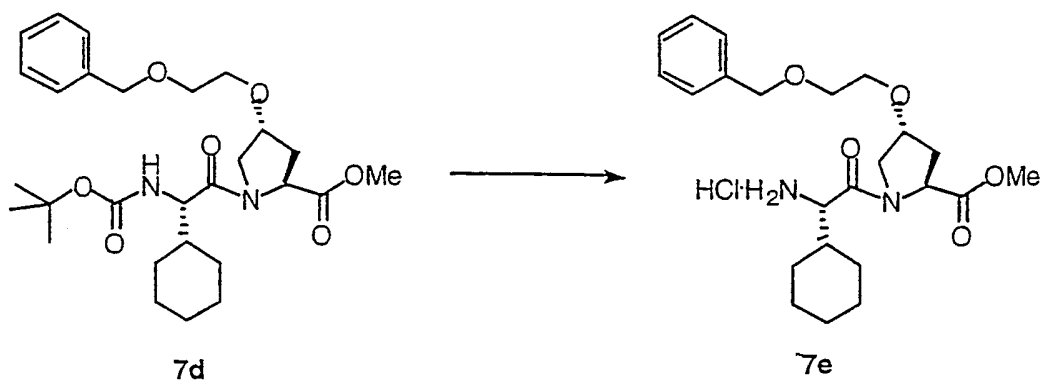
15 Krok C



Požadovaná sloučenina **7c** byla připravena z **7b** způsobem popsaným v příkladu 1, krok C. Produkt byl použit v kroku D bez dalšího čištění.

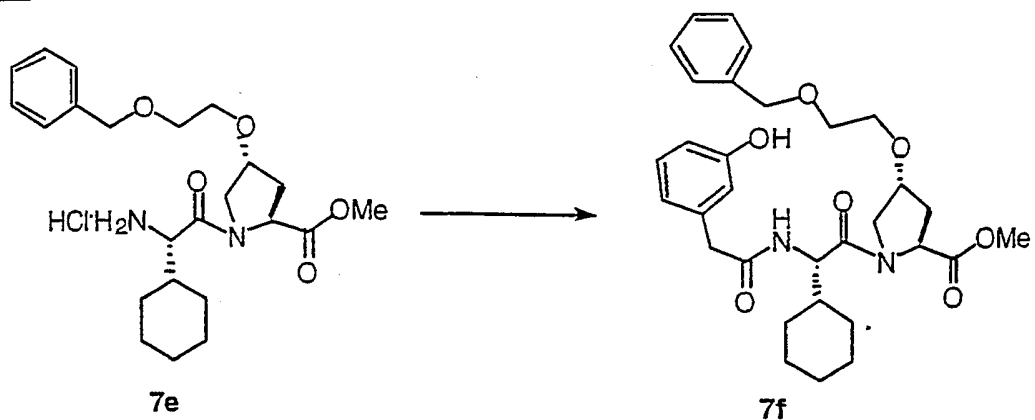
Krok D

Požadovaná sloučenina **7d** byla připravena ze sloučeniny **7c** způsobem popsaným v příkladu 1, krok D.

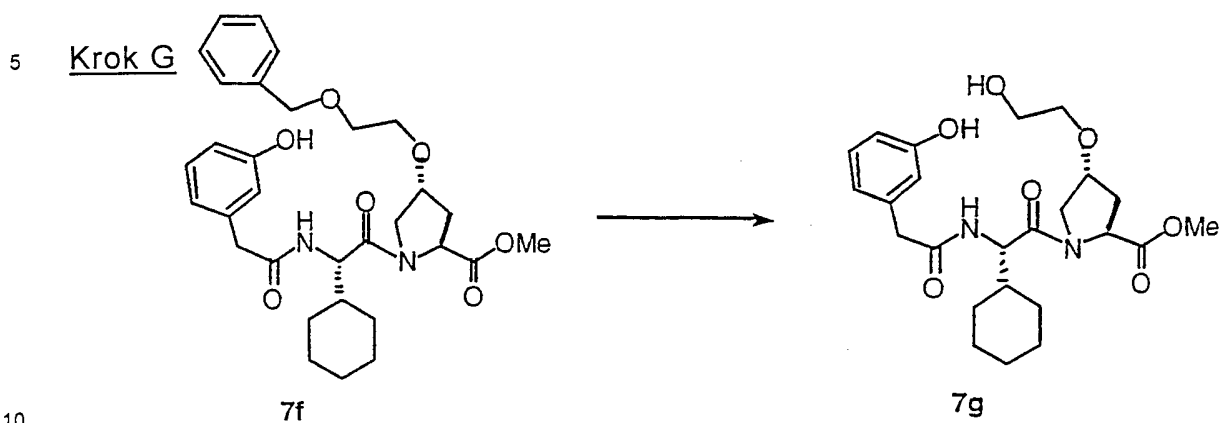
10 Krok E

Požadovaná sloučenina **7e** byla připravena ze sloučeniny **7d** způsobem popsaným v příkladu 1, krok E. Produkt byl použit v kroku F bez dalšího čištění.

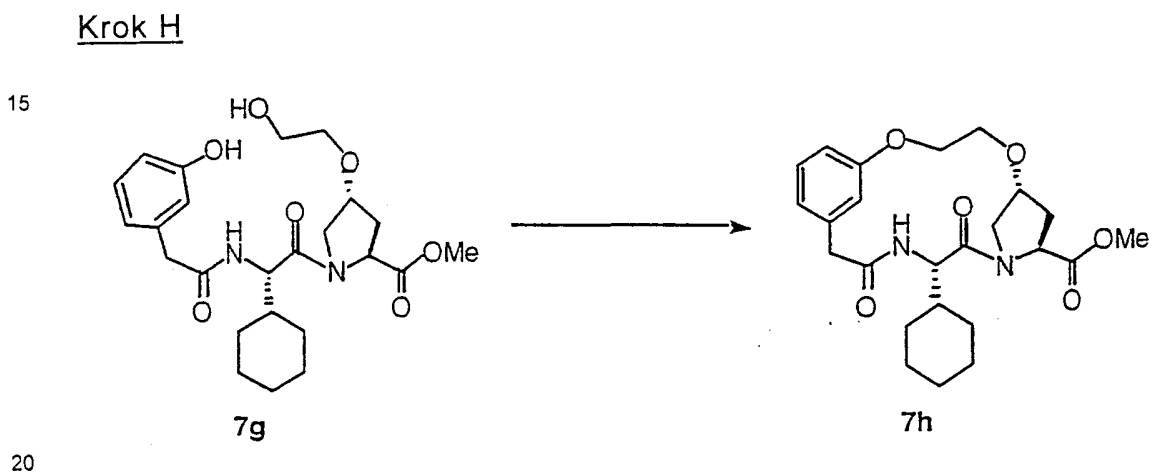
20

Krok F

Požadovaná sloučenina **7f** byla připravena ze sloučeniny **7e** způsobem popsáným v příkladu 1, krok F.



Požadovaná sloučenina **7g** byla připravena ze sloučeniny **7f** způsobem popsáným v příkladu 1, krok F.

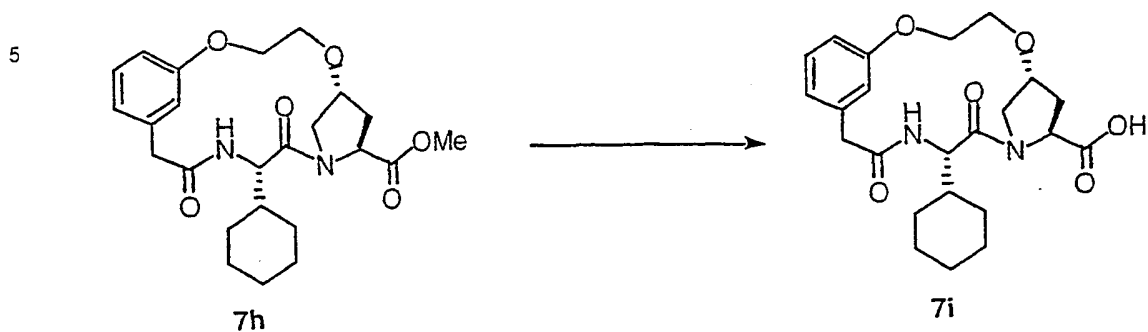


Roztok fenolalkoholu **7g** (830 mg, 1,79 mmol) a ADDP (1,36 g, 5,39 mmol) v bezvodém CH_2Cl_2 (200 ml) byl probubláván skleněnou fritou argonem po dobu 20 min. K roztoku byl při 0 °C přidán trifenylofosfin (1,41 g, 5,38 mmol). Po míchání při 0 °C po dobu 20 min byl roztok zahřát na teplotu laboratoře a míchán přes noc (20 hod) v atmosféře dusíku. Po odstranění rozpouštědla ve vakuu byl zbytek čištěn bleskovou chromatografií (1 až 3 % MeOH v CH_2Cl_2) za získání

25

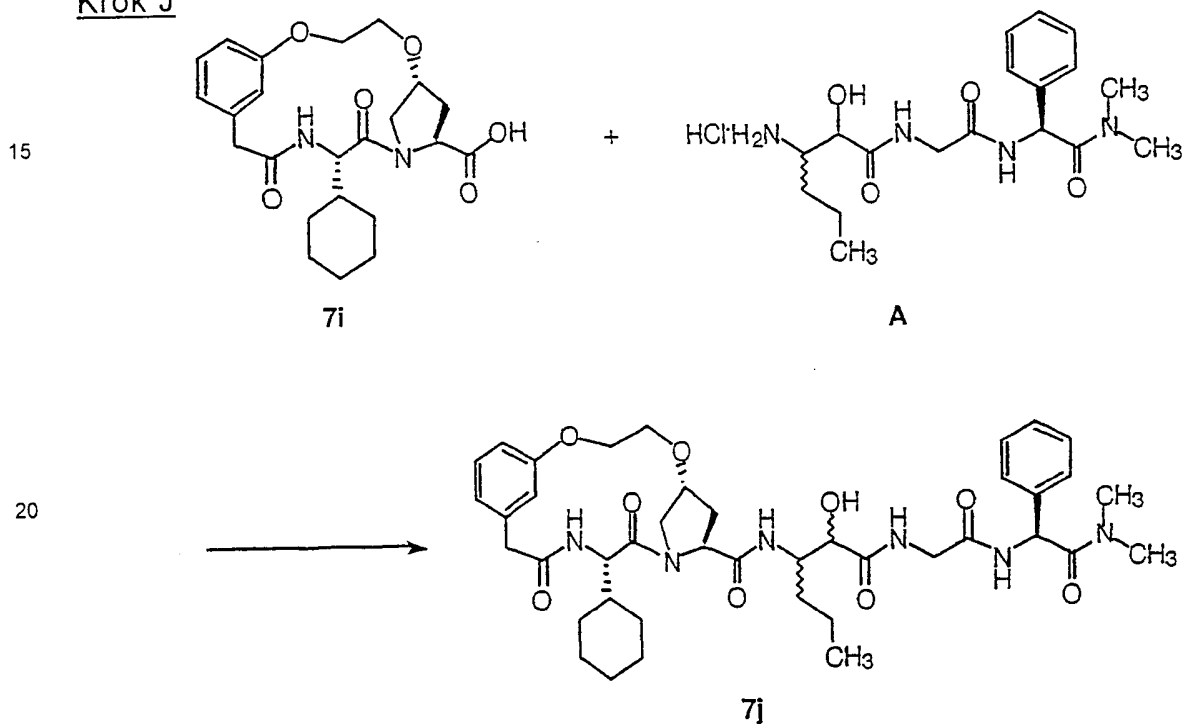
směsi požadovaného produktu **7h** a trifenyfosfinoxidu, který byl použit v kroku I bez dalšího čištění.

Krok I



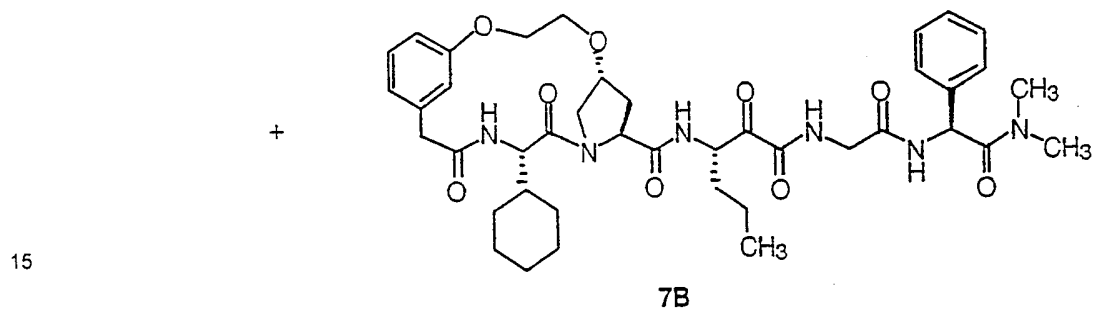
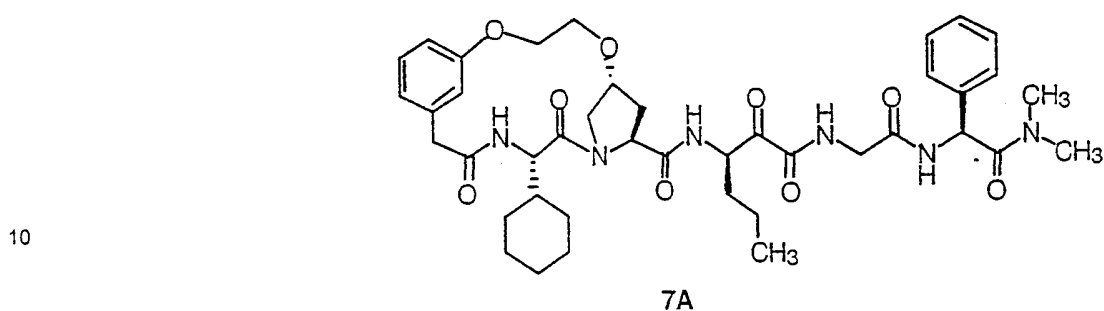
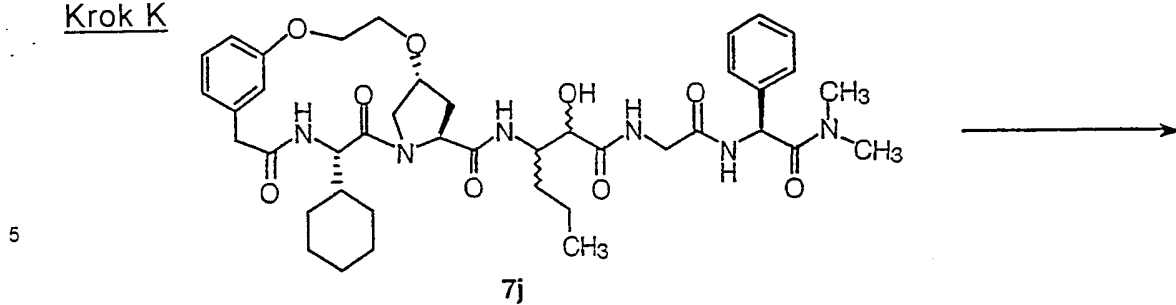
10 Požadovaná sloučenina **7i** byla připravena ze sloučeniny **7h** v 36% výtěžku (2 kroky) způsobem popsáním v příkladu 1, krok I.

Krok J



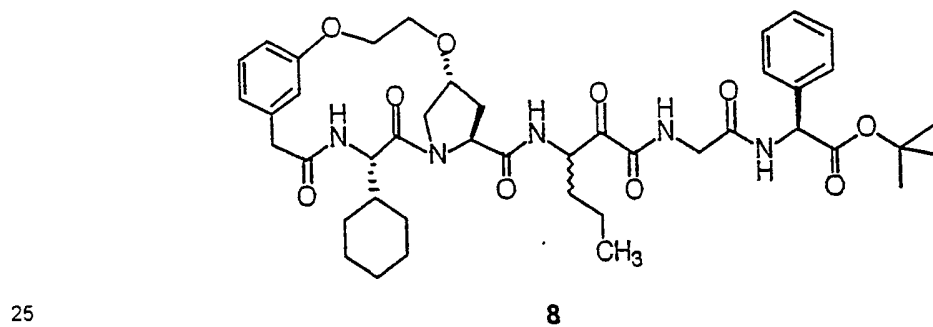
25 Požadovaná sloučenina **7j** byla připravena ze sloučeniny **7i** a **A** v 56% výtěžku způsobem popsáním v příkladu 1, krok J.

Krok K

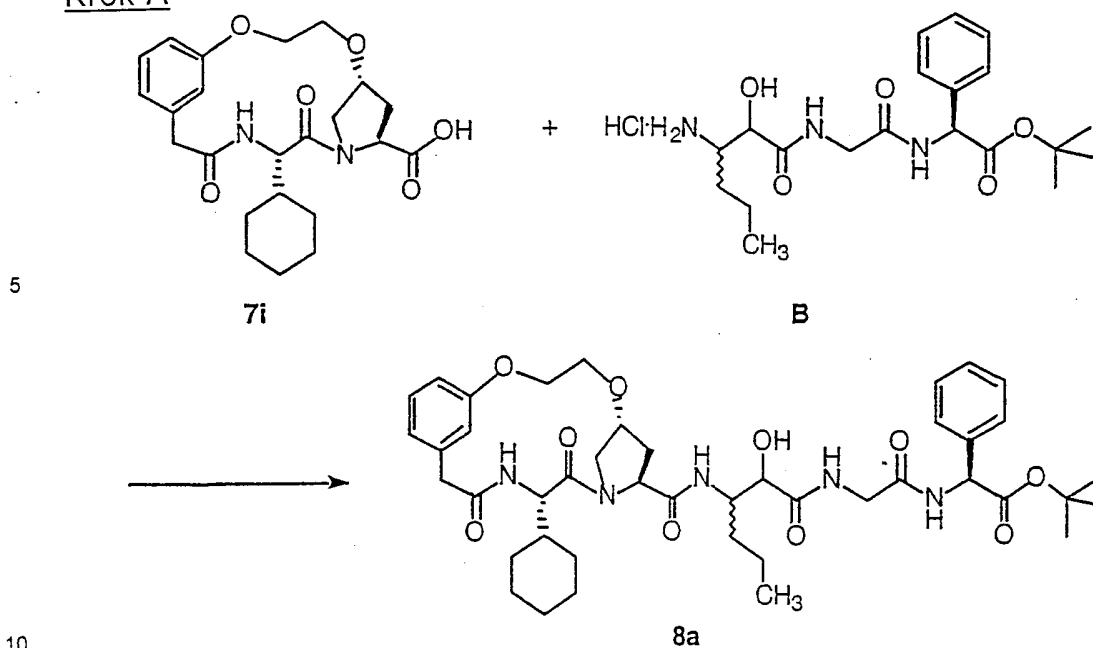


Požadované sloučeniny **7A** a **7B** byly připraveny ze sloučeniny **7j** způsobem popsaným v příkladu 1, krok K.

20 Příklad 8: Příprava sloučeniny vzorce 8



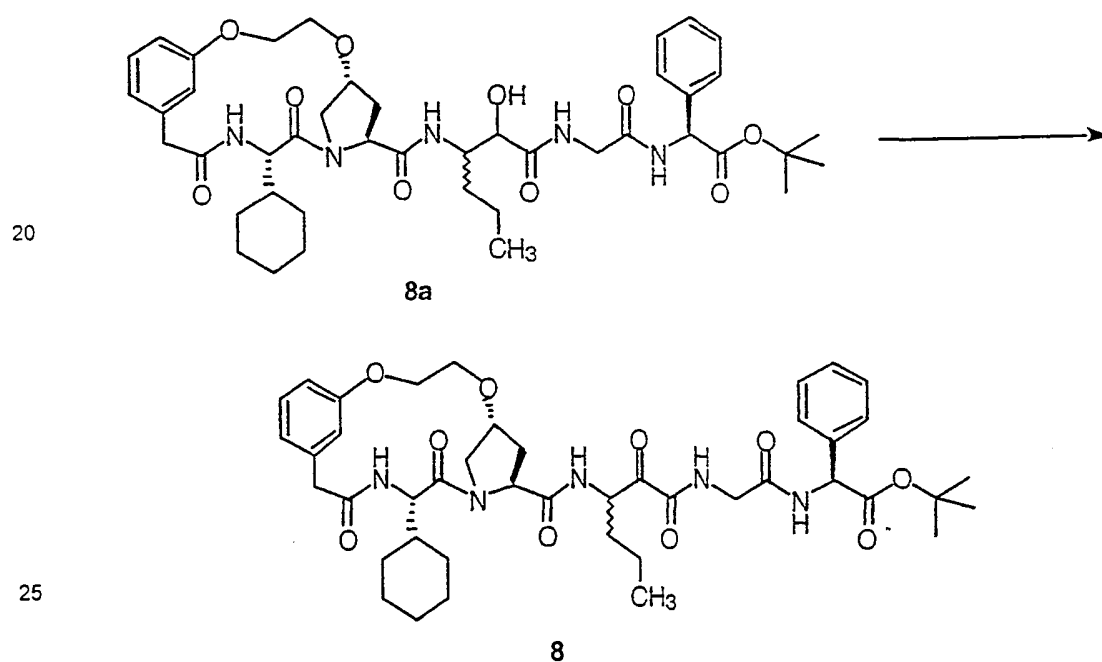
Krok A



Požadovaná sloučenina **8a** byla připravena způsobem popsaným v příkladu 1, krok J, s tím rozdílem, že bylo použito aminu **B** namísto aminu **A**. Produkt byl získán jako směs nerozdělitelných diastereomerů ve formě bílé pevné látky v 57% výtěžku.

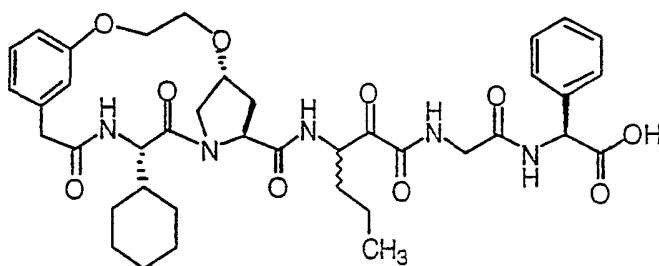
15

Krok B



Požadovaná sloučenina **8** byla připravena v 72% výtěžku z **8a** způsobem popsáním v příkladu 1, krok K.

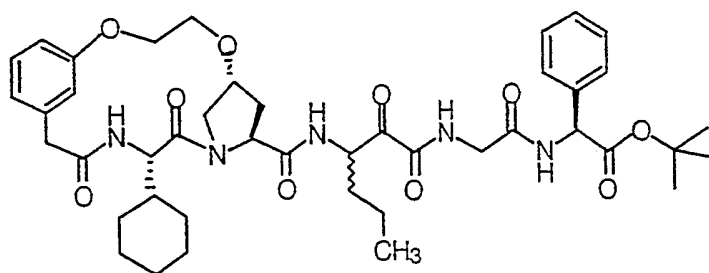
5 Příklad 9: Příprava sloučeniny vzorce 9



9

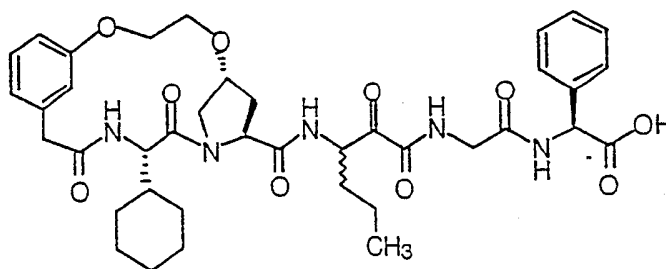
10

Krok A



8

15



9

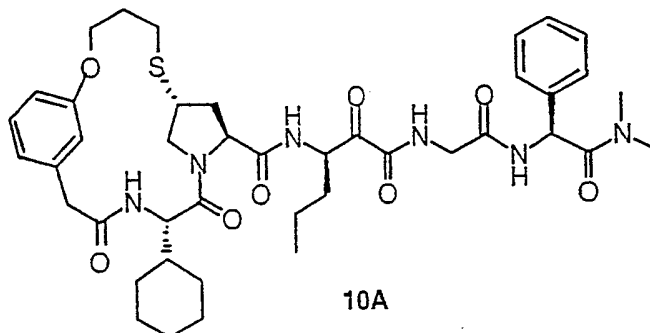
20

Požadovaná sloučenina **9** byla připravena v kvantitativním výtěžku ze sloučeniny **8** způsobem popsáním v příkladu 3, krok A.

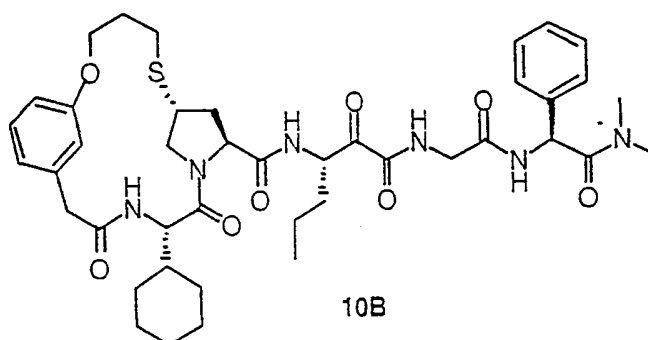
25

Příklad 10: Příprava sloučenin vzorce 10A a 10B

5

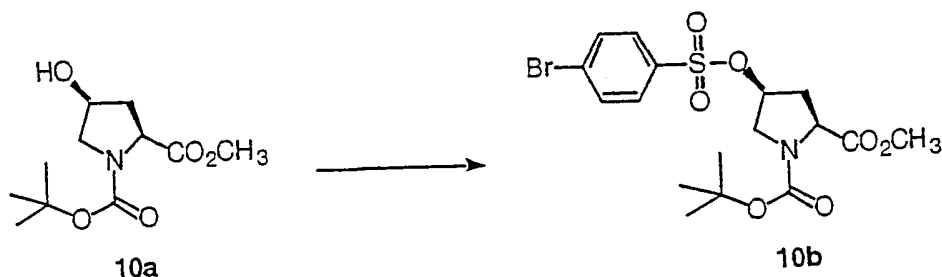


10



Krok A

15



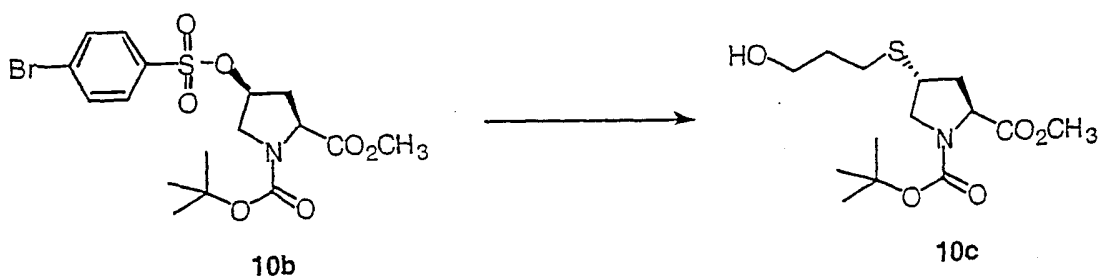
K roztoku **10a** při 0 °C (10 g, 41 mmol) v dichlormethanu (60 ml) byl pomalu přidán triethylamin (28,68 ml, 204 mmol). Potom byly přidány 4-brombenzensulfonylchlorid (20,91 g, 82 mmol) a DMAP (několik krystalů) a teplota byla udržována při 0 °C po dobu 30 min.

20 Reakční směs byla potom ponechána v mrazicím boxu (-5 °C) přes noc, následovalo pomalé zahřátí na laboratorní teplotu v průběhu 2 hod. V té době ukázala analýza TLC úplné spotřebování výchozího materiálu. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem, promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, a 10% vodným

25 roztokem kyseliny citronové. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 95/5 dichlormethan/ethylacetát,

za získání 18,4 g (97% výtěžek) brosylátu **10b** jako bílé pevné látky;
 ^1H NMR (směs rotamerů, CDCl_3) δ 1,41 a 1,45 (2s, 9H), 2,40 - 2,50
(m, 2H), 3,59 - 3,69 (m, 5H), 4,33 - 4,37 a 4,46 (2dd, 1H), 5,11 (m,
1H), 7,72 - 7,74 (m, 4H); ^{13}C NMR (směs rotamerů, CDCl_3) δ 28,18,
28,27, 36,01, 36,98, 51,59, 52,03, 52,20, 52,35, 56,95, 57,22, 57,28,
78,35, 79,53, 80,66, 129,10, 129,26, 132,66, 135,66, 135,81, 153,25,
153,64, 171,45, 171,78; HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{SBr}$:
464,0379 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 464,0375.

10 Krok B



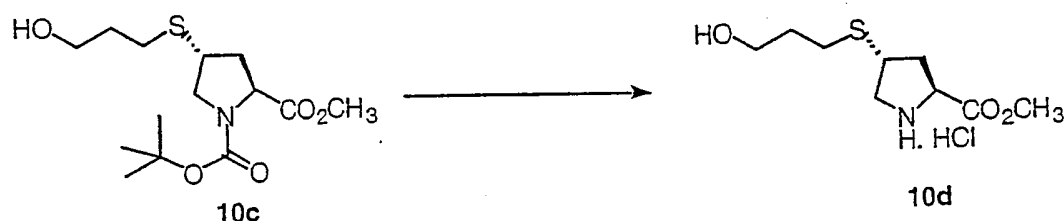
15

K suspenzi hydridu sodného (60% disperze v minerálním oleji,
187 mg, 4,68 mmol) v DMF při 0 °C byl přidán 3-merkaptopropanol
(0,42 ml, 4,85 mmol) v atmosféře argonu. Směs byla míchána po dobu
30 min za udržování teploty. Pomalu byl přidán roztok brosylátu **10b**
(1,5 g, 3,23 mmol) v DMF (celkový objem = 10 ml) a směs byla zahřáta
na teplotu laboratoře v průběhu 2 hod. Reakce byla ukončena vlitím do
chladného 10% roztoku kyseliny citronové. Vodná vrstva byla
extrahována ethylacetátem, organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a
zakoncentrována. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií
na koloně s použitím směsi 85/15 dichlormethan/ethylacetát za získání
800 mg (78% výtěžek) sulfidu **10c** jako oleje; ^1H NMR (směs rotamerů,
 CDCl_3) δ 1,41 a 1,47 (2s, 9H), 1,83 - 1,89 (m, 2H), 2,13 - 2,34 (m, 2H),
2,69 (t, 2H), 3,23 - 3,49 (m, 2H), 3,73 - 3,78 (m, 5H), 3,86 - 3,95 (m,
1H), 4,33 - 4,37 a 4,42 - 4,46 (2dd, 1H); ^{13}C NMR (směs rotamerů,
 CDCl_3) δ 28,21, 28,30, 32,15, 32,23, 36,65, 37,27, 40,45, 40,89,

30

52,16, 52,35, 52,50, 52,84, 58,32, 58,55, 61,22, 61,41, 80,35, 153,49, 153,99, 173,05, 173,23; HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{14}H_{26}NO_5S$: 320,1532 (M+H)⁺. Nalezeno: 320,1528.

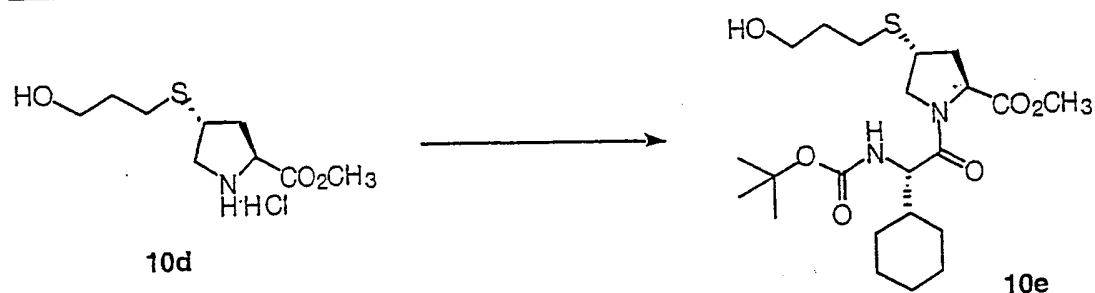
5 Krok C



10

Požadovaná sloučenina **10d** byla připravena podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok C. Reakce proběhla při 0 °C, 1 hod. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

15 Krok D

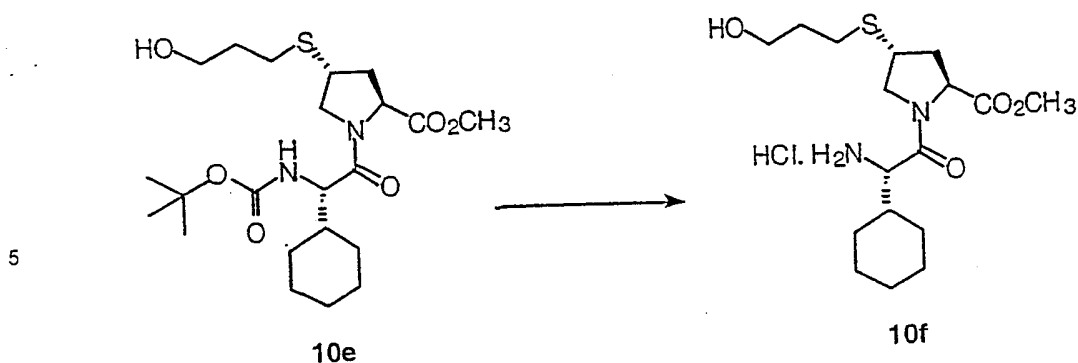


20

Požadovaná sloučenina **10e** byla připravena způsobem popsaným pro příklad 1, krok D. Reakce byla prováděna při -8 °C 2 dny. Po zpracování měl produkt **10e** dostatečnou čistotu při analýze TLC a byl získán v 80% výtěžku; HRMS (FAB) Vypočteno pro

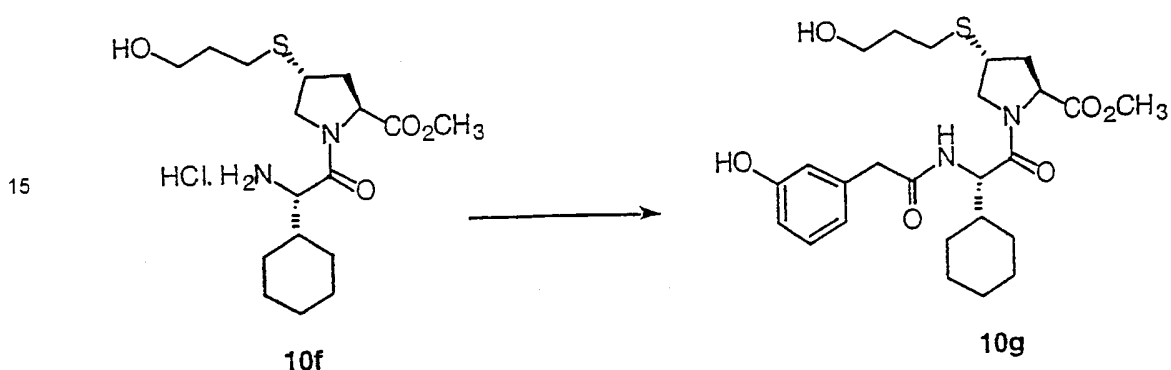
25 $C_{22}H_{39}N_2O_6S$: 459,2529 (M+H)⁺. Nalezeno: 459,2523.

Krok E



10 Požadovaná sloučenina **10f** byla připravena podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok E. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

Krok F



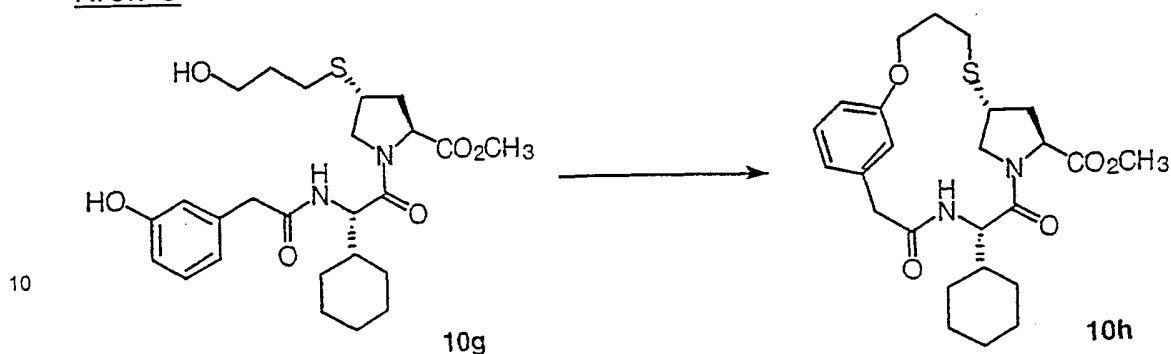
20 Požadovaná sloučenina **10g** byla připravena způsobem popsaným pro příklad 1, krok F. Surový produkt byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/methanol za získání **10g** ve 40% výtěžku jako bílé pevné látky; ^1H NMR (směs rotamerů, CDCl_3) δ 0,90 - 1,26 (m), 1,66 - 1,88 (m), 2,22 - 2,31 (m, 2H), 2,73 (t, 2H), 3,47 (s), 3,5 - 3,55 (m), 3,65 - 3,75 (m), 3,88 - 3,94 (dd, 1H), 4,07 - 4,12 (dd, 1H), 4,53 (t, 1H), 4,62 (t, 1H), 6,73 - 6,80 (m, 4H), 7,17 (t, 1H); ^{13}C NMR (směs rotamerů, CDCl_3) δ 25,80, 25,89, 26,14, 27,71, 28,55, 29,22, 31,88,

25

35,46, 40,58, 42,44, 43,16, 52,32, 52,90, 55,49, 58,46, 60,30, 114,59,
116,27, 121,01, 130,02, 135,90, 156,73, 171,25, 171,87, 171,96;
HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{37}N_2O_6S$: 493,2372 ($M+H$)⁺.
Nalezeno: 493,2364.

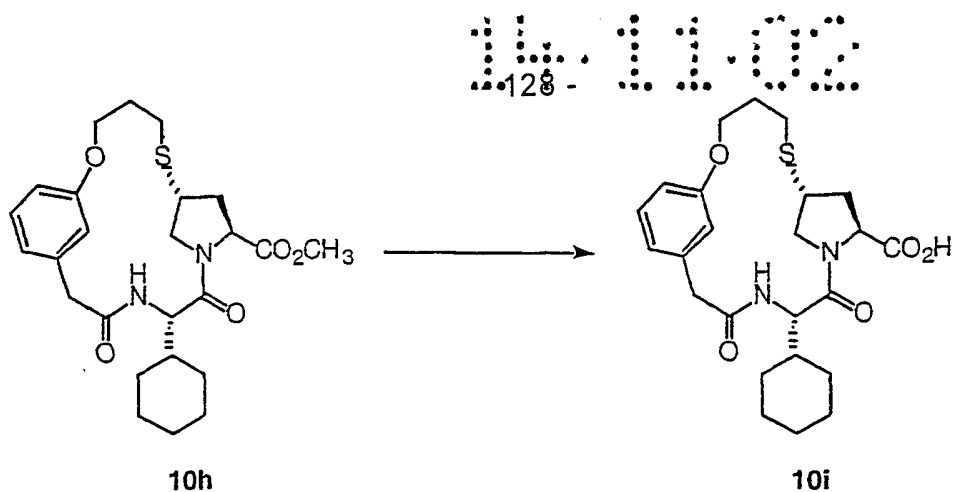
5

Krok G



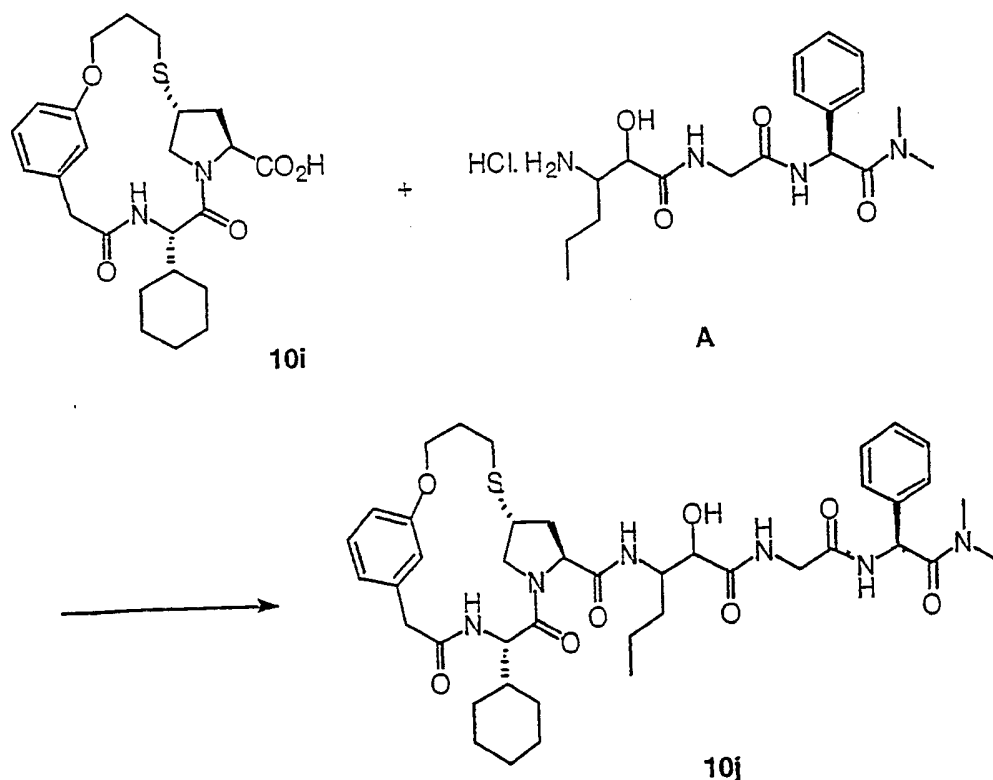
Požadovaná sloučenina **10h** byla připravena by podle protokolu
popsaného pro příklad 1, krok G. Surový produkt byl suspendován ve
směsi 80/20 ethylacetát/hexan a pevný materiál byl odfiltrován. Filtrát
byl zakoncentrován a čištěn bleskovou chromatografií na koloně
s použitím směsi 80/20 hexan/acetone za získání 22 % **10h** jako pevné
látky. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,98 - 1,30 (m), 1,64 - 1,90 (m), 2,06 - 2,14
(m, 1H), 2,16 - 2,21 (dd, 2H), 2,62 - 2,70 (m, 2H), 3,38 - 3,46 (m, 2H),
3,60 - 3,66 (m, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,88 - 3,94 (dd, 1H), 4,07 - 4,15 (m,
1H), 4,22 - 4,29 (m, 1H), 4,48 (t, 1H), 4,60 (t, 1H), 5,97 (br t, 1H), 6,76
- 6,81 (m, 2H), 6,99 (br s, 1H), 7,20 (dd, 1H); HRMS (FAB) Vypočteno
pro $C_{25}H_{35}N_2O_5S$: 475,2267 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 475,2260.

25 Krok H



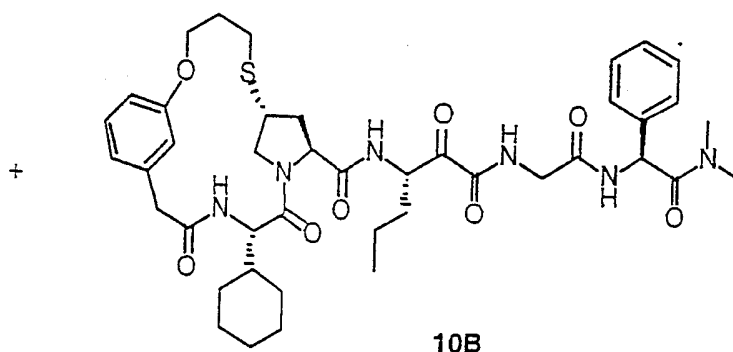
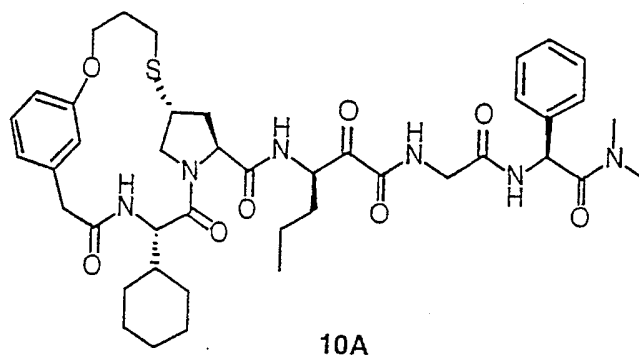
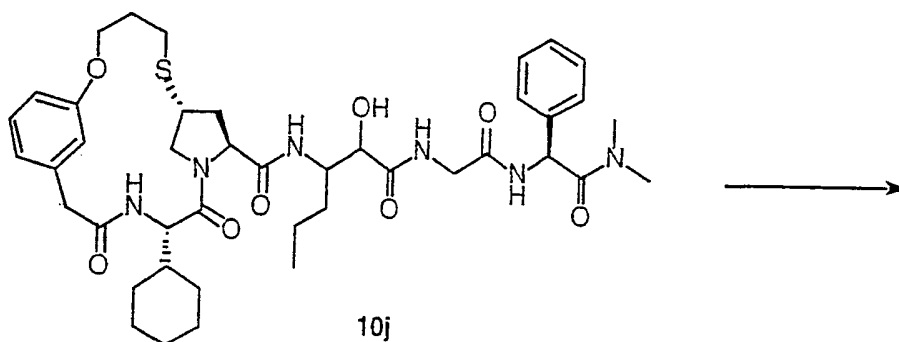
Další meziprodukt **10i** byl syntetizován jak je popsáno pro příklad 1, krok H, v kvantitativním výtěžku, jako bílá pevná látka; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0,88 - 0,96 (m, 2H), 1,10 - 1,14 (m, 3H), 1,59 - 1,76 (m, 7H), 1,88 - 1,94 (m, 1H), 2,09 (zdánl. t, 1H), 2,61 (dd, 1H), 3,32 (zdánl. d, 1H), 3,40 - 3,45 (m, 2H), 3,61 (zdánl. d, 1H), 3,83 (q, 1H), 4,13 (zdánl. t, 1H), 4,19 (t, $J = 7,32$ Hz, 1H), 4,40 (t, $J = 9,52$ Hz, 1H), 6,76 - 6,79 (m, 2H), 6,89 (s, 1H), 7,16 (zdánl. t, 1H), 8,39 (d, 1H), 12,5 (br. s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 25,33, 25,41, 26,01, 26,44, 28,09, 28,62, 29,24, 34,90, 39,50, 41,40, 42,30, 53,18, 54,44, 58,06, 66,94, 114,88, 115,25, 122,28, 129,20, 137,84, 157,90, 169,25, 170,29, 172,59; HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 461,2110 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 461,2104.

Krok I



Požadovaná sloučenina **10j** byla připravena jak bylo popsáno dříve pro příklad 1, krok I, v kvantitativním výtěžku, jako bleděžlutá pevná látka. Materiál získaný po zpracování měl dostatečnou čistotu zjištěnou TLC pro další zpracování; HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{42}H_{59}N_6O_8S$: 807,4115 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 807,4103.

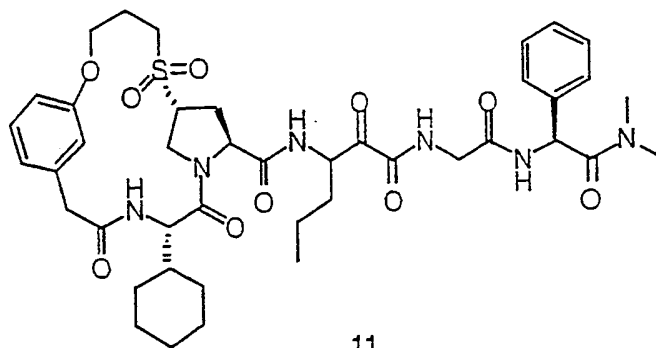
Krok J



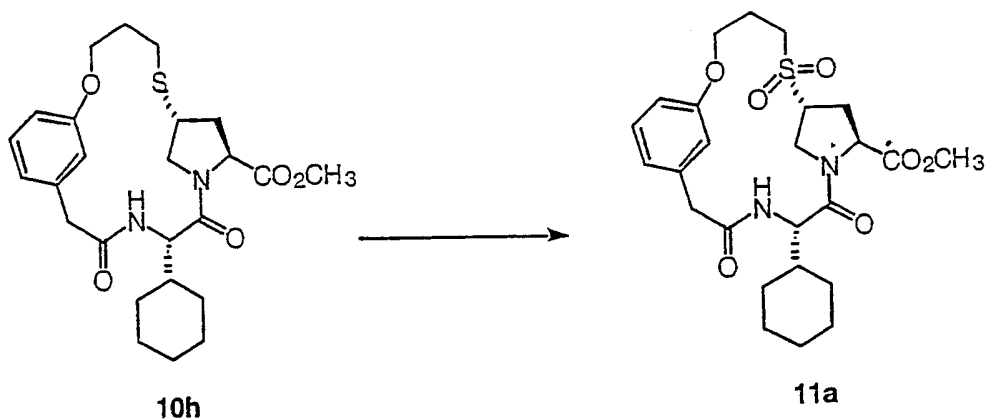
K roztoku **10j** (180 mg, 0,22 mmol) v dichlormethanu byly postupně přidány DMSO (0,313 ml, 4,4 mmol), DCC (908 mg, 4,4 mmol) a kyselina dichlorooctová (36,4 μ l, 0,44 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě laboratoře. Reakce byla

ukončena přidáním vodného 5% roztoku kyseliny citronové (5 ml) a MeOH (1 ml) a míchána po dobu 30 min. Pevný materiál byl odfiltrován a filtrát byl promyt nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a roztokem soli. Organická vrstva byla sušena nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 98/2 dichlormethan/methanol za získání 105 mg (60%) **10A** a **10B** jako směsi diastereomerů. Část směsi (36 mg) byla znovu čištěna chromatografií na koloně za získání čistého isomeru **10A** (polárnější, bílá pevná látka, 8 mg) a čistého isomeru **10B** (méně polární, bílá pevná látka, 6 mg), a zbytek byla směs. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₄₂H₅₇N₆O₈S: 805,3959 (M+H)⁺. Nalezeno: 805,3958 (**10A**), 805,3950 (**10B**).

Příklad 11: Příprava sloučeniny vzorce 11



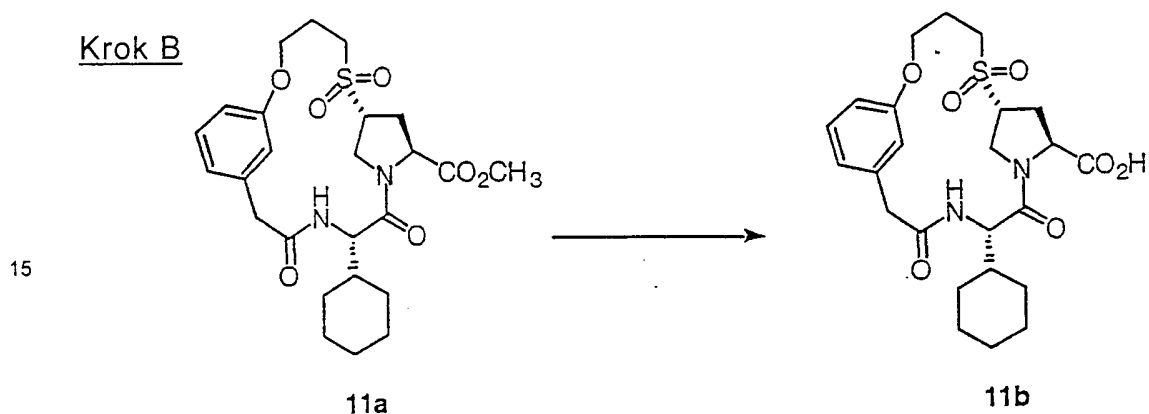
Krok A



K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **10h** (200 mg,

0,42 mmol) v dichlormethanu (10 ml) byl přidán MCPBA (60%, 364 mg, 1,26 mmol). Reakční směs byla pomalu zahřata na teplotu laboratoře v průběhu 16 hod. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem a promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a roztokem hydrogensířičitanu sodného. Organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/methanol poskytlo **11a** (138 mg, 65% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: 507,2165 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Nalezeno: 507,2158.

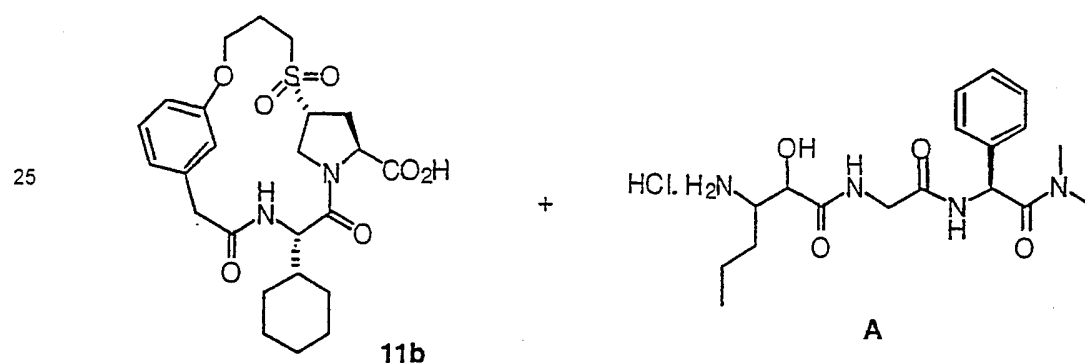
Krok B



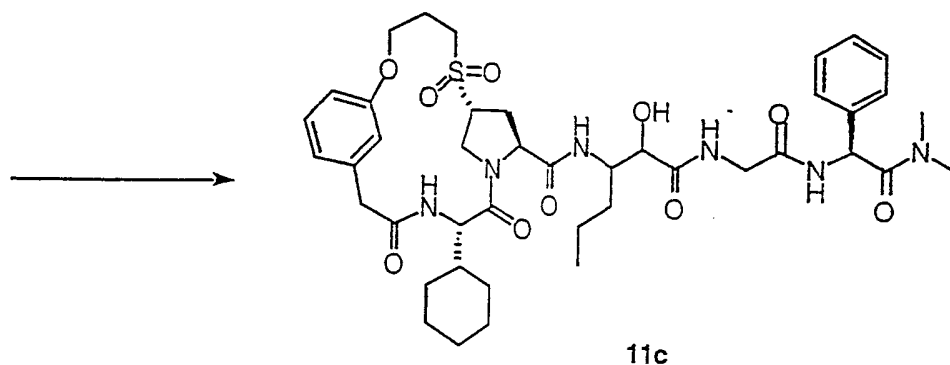
Očekávaný produkt **11b** byl syntetizován jak je popsáno pro příklad 1, krok I v 90% výtěžku jako bílá pevná látka; HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: 493,2008 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Nalezeno: 493,2012.

20

Krok C



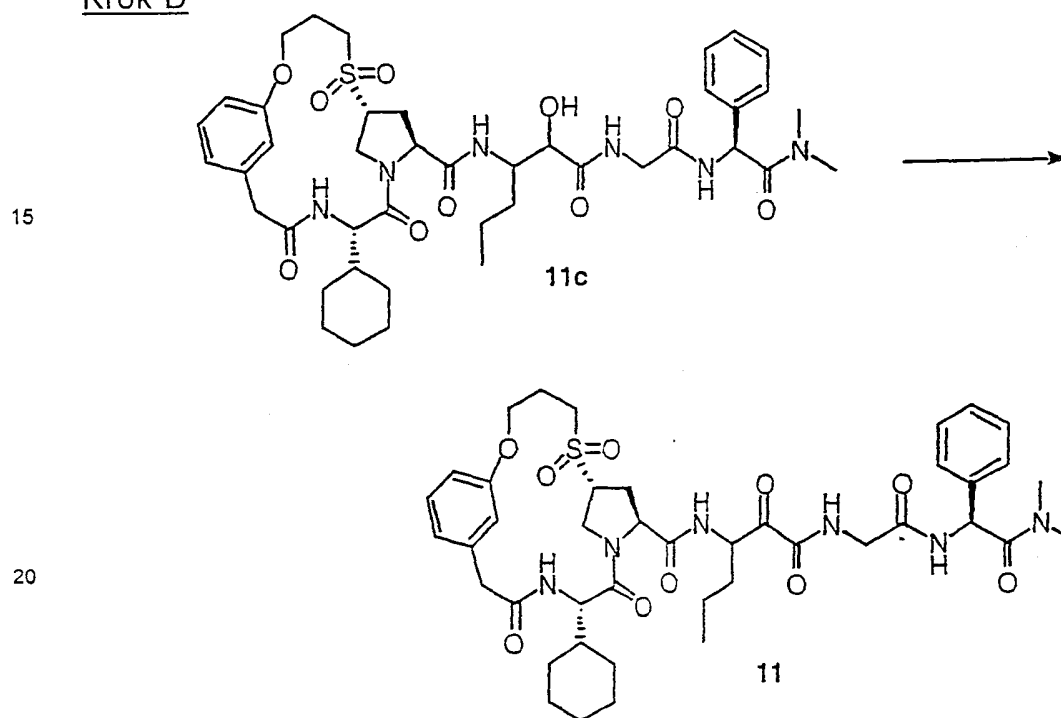
14.11.02



Požadovaná sloučenina **11c** byla připravena jak bylo popsáno dříve pro příklad 1, krok J, v kvantitativním výtěžku. Materiál získaný po zpracování měl dostatečnou čistotu zjištěnou TLC pro další zpracování. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{42}H_{59}N_6O_{10}S$: 839,4013 (M+H)⁺. Nalezeno: 839,4019.

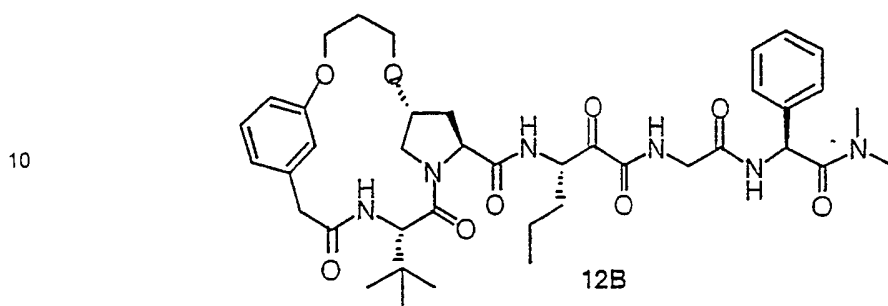
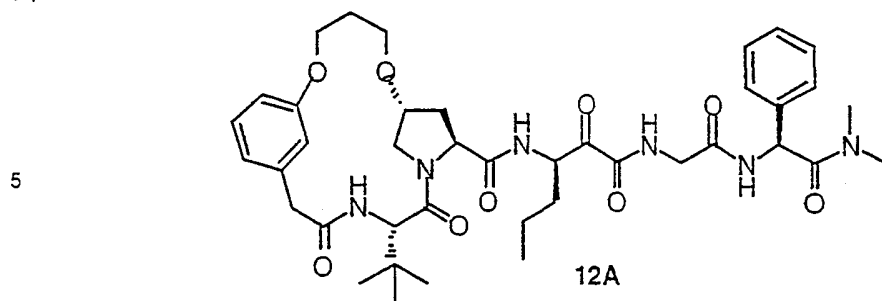
10

Krok D

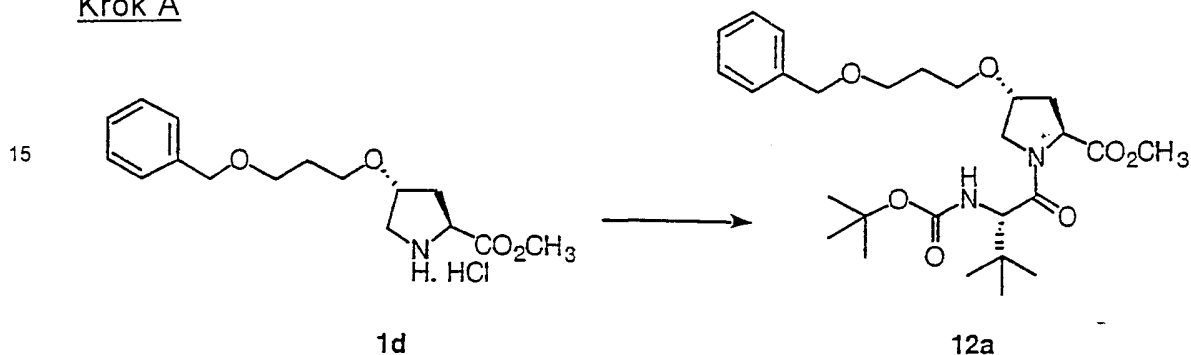


Požadovaný produkt **11** byl získán oxidací, postupem popsaným dříve pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **11** ve 4% výtěžku (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{42}H_{57}N_6O_{10}S$: 837,3857 (M+H)⁺. Nalezeno: 837,3865.

25

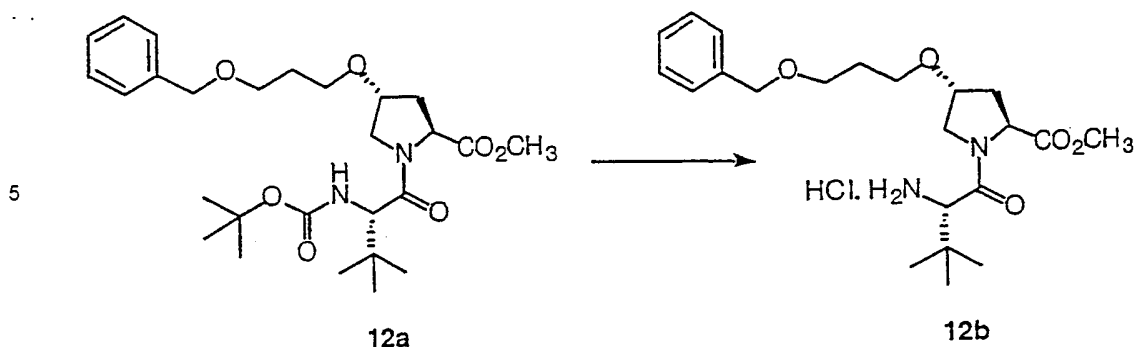
Příklad 12: Příprava sloučenin vzorců **12A** a **12B**

Krok A



Požadovaný produkt **12a** byl získán způsobem popsáním pro
 20 příklad 1, krok D s použitím N-boc-terc-butylglycinu jako reakčního
 partnera. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně
 s použitím směsi 90/10 dichlormethan/ethylacetát za získání **12a**
 v 73% výtěžku. ^{13}C NMR (směs rotamerů, CDCl_3) δ 26,20, 28,31,
 29,07, 30,06, 34,94, 35,86, 37,06, 51,21, 52,16, 52,84, 57,78, 58,33,
 25 65,95, 66,92, 72,97, 75,48, 79,45, 127,55, 127,66, 128,35, 138,45,
 155,62, 165,06, 171,13, 172,54; HRMS (FAB) Vypočteno pro
 $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7$: 507,3070 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 507,3077.

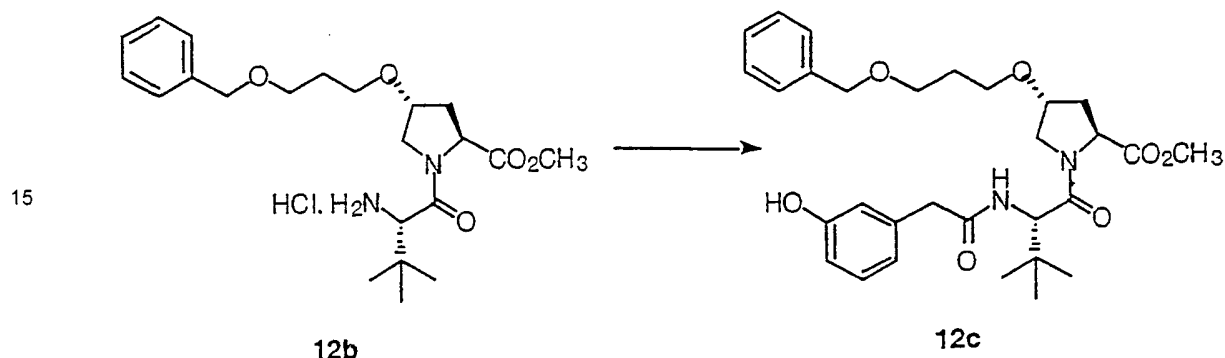
Krok B



Požadovaná sloučenina **12b** byla připravena by podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok E. Tento materiál byl převeden do dalšího kroku.

10

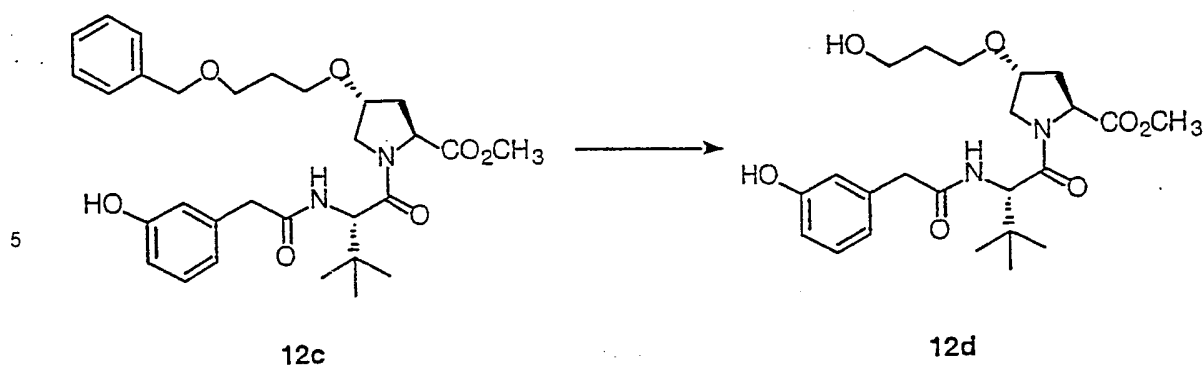
Krok C



Požadovaný produkt **12c** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 dichlormethan/methanol, za získání **12c** v 91%. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 26,24, 29,93, 34,95, 35,96, 43,48, 52,18, 53,09, 57,06, 58,06, 66,10, 66,92, 72,93, 77,43, 114,59, 116,14, 120,87, 127,58, 127,64, 127,74, 128,37, 130,02, 135,95, 138,39, 156,90, 170,65, 171,06, 172,38; HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_7$: 541,2914 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 541,2921.

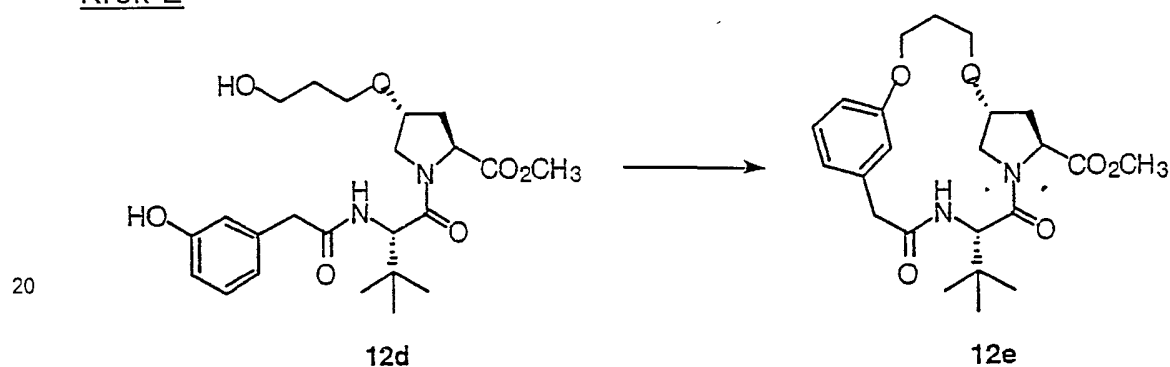
20

25

Krok D

Požadovaný produkt **12d** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok G. Produkt získaný po odfiltrování katalyzátoru byl dostatečně čistý pro další zpracování. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 26,27, 32,09, 35,44, 35,67, 43,19, 52,21, 52,74, 57,60, 58,21, 58,75, 65,78, 77,74, 114,74, 116,02, 120,68, 130,07, 135,66, 157,11, 170,59, 172,05, 172,51; HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_7$: 451,2444 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 451,2436.

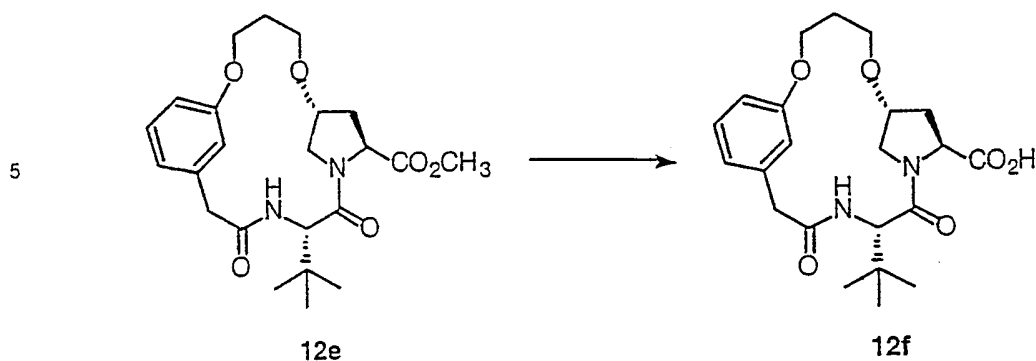
15

Krok E

Požadovaný produkt **12e** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok H. Surový materiál byl suspendován ve směsi ethylacetát/hexan (přibližně 1/1) a nerozpuštěný pevný materiál byl odfiltrován. Opakováním tohoto postupu byl filtrát zakoncentrován a nanesen na kolonu jako roztok v dichlormethanu. Kolona byla eluována směsí 75/25 hexan/aceton za získání 29% **12e**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6$: 433,2339 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Nalezeno: 433,2339.

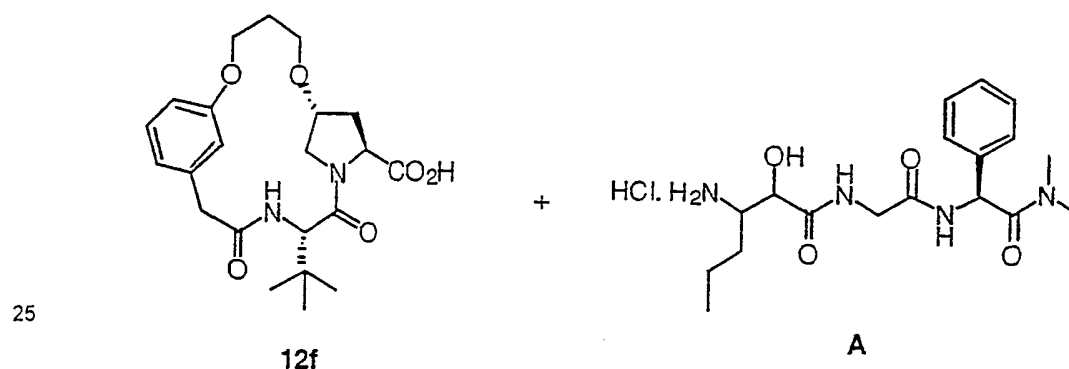
25

Krok F

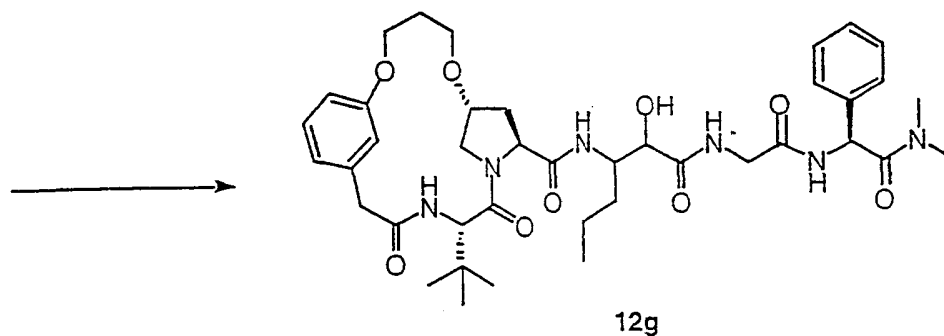


Požadovaný meziprodukt **12f** byl syntetizován jak je popsáno
 10 pro příklad 1, krok I, v kvantitativním výtěžku; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0,96 (s, 9H), 1,66 - 1,70 (m, 1H), 1,75 - 1,82 (m, 2H), 2,43 (dd, 1H),
 3,32 - 3,36 (m, 2H), 3,48 - 3,52 (m, 1H), 3,55 (dd, 1H), 3,84 (zdánl. d,
 1H), 3,99 (zdánl. d, 1H), 4,06 - 4,10 (m, 3H), 4,16 (dd, 1H), 4,69 (d,
 1H), 6,70 - 6,72 (m, 3H), 7,15 (zdánl. t, 1H), 8,42 (d, 1H), 12,43 (br. s,
 15 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 26,25, 28,54, 33,31, 34,97, 41,22, 53,96,
 56,11, 56,97, 63,36, 64,96, 76,84, 111,94, 115,25, 121,73, 129,13,
 138,36, 158,27, 169,85, 170,15, 173,04; HRMS (FAB) Vypočteno pro
 $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$: 419,2182 (M+H) $^+$. Nalezeno: 419,2180.

Krok G



14:11:00
137

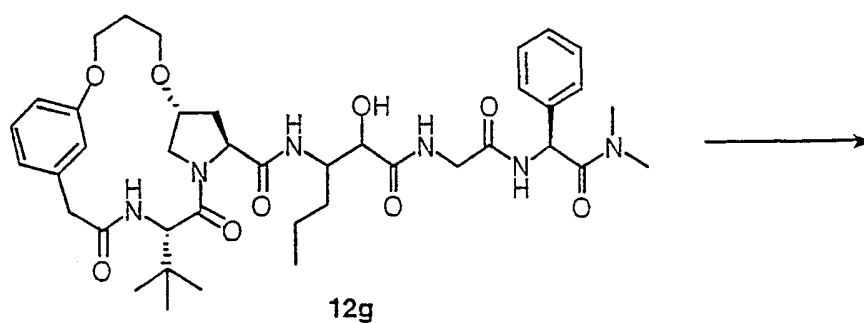


5

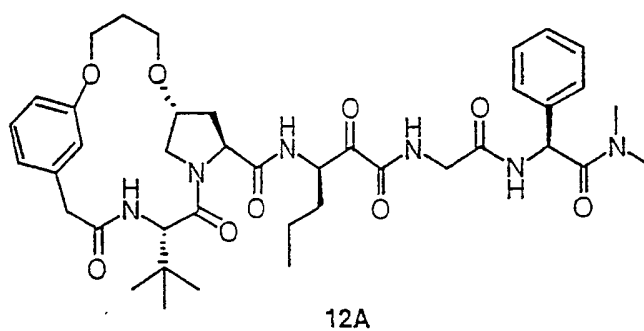
Očekávaný produkt **12g** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{57}N_6O_9$: 765,4187 (M+H)⁺. Nalezeno: 765,4175.

10

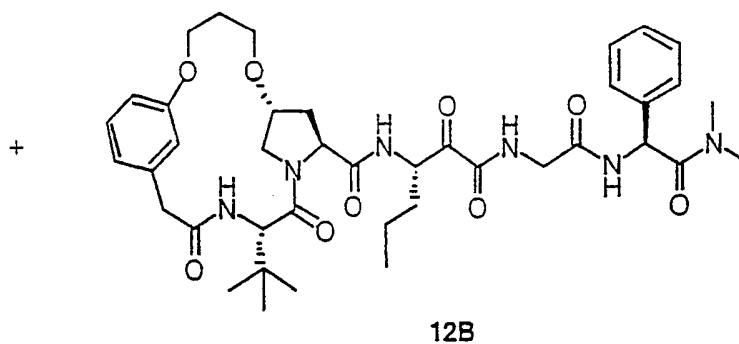
Krok H



15



20

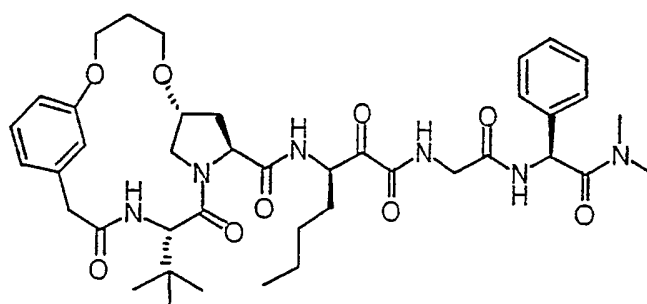


25

Požadované produkty **12A** a **12B** byly získány protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 až 96/4 dichlormethan/methanol poskytlo oddělené isomery **12A** a **12B**, a směs. Kombinovaný výtěžek = 57 % (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{55}N_6O_9$: 763,4031 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 763,4040 (**12A**), 763,4047 (**12B**).

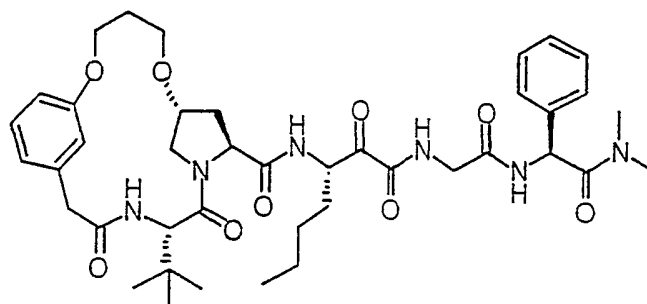
Příklad 13: Příprava sloučenin vzorců **13A** a **13B**

10



13A

15

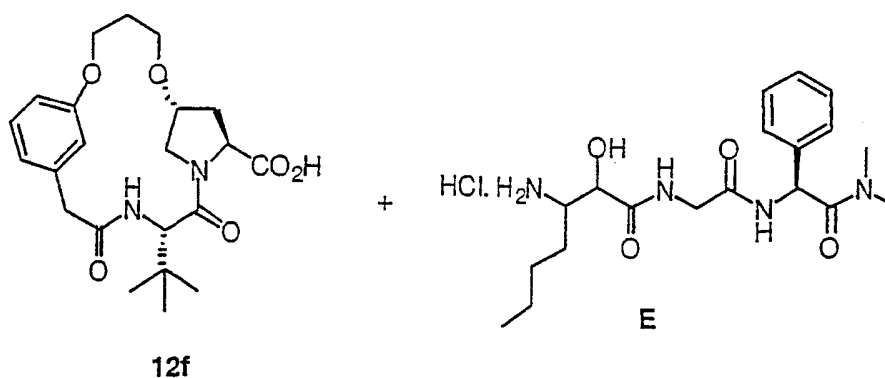


13B

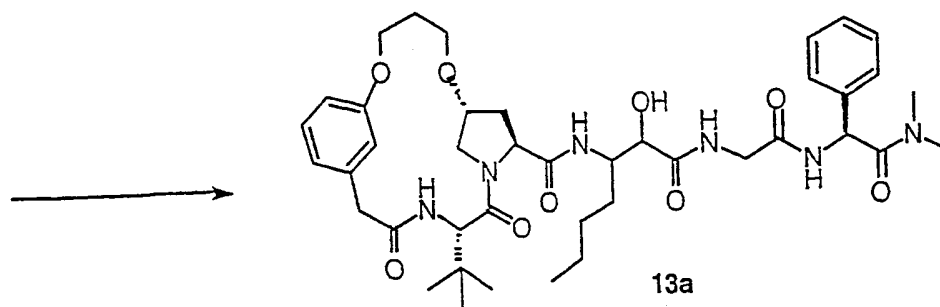
20

Krok A

25



5

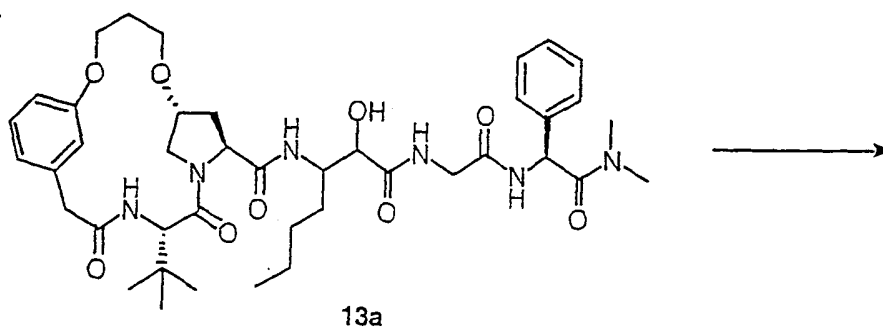


Očekávaný produkt **13a** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{41}H_{59}N_6O_9$: 779,4344 (M+H)⁺. Nalezeno: 779,4350.

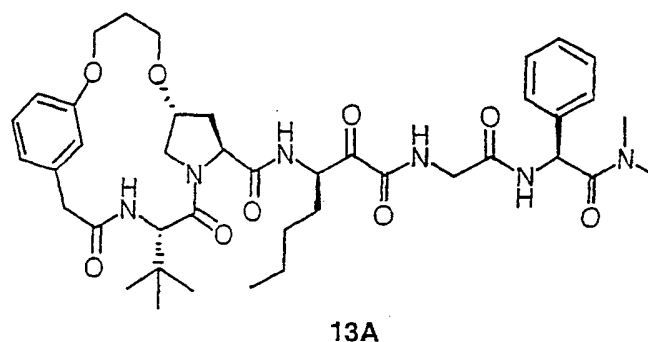
10

Krok B

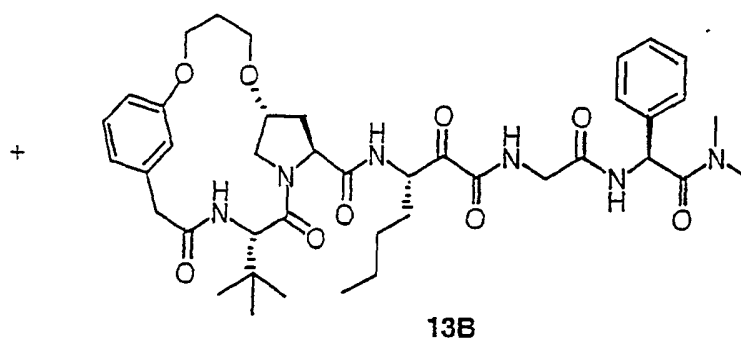
15



20

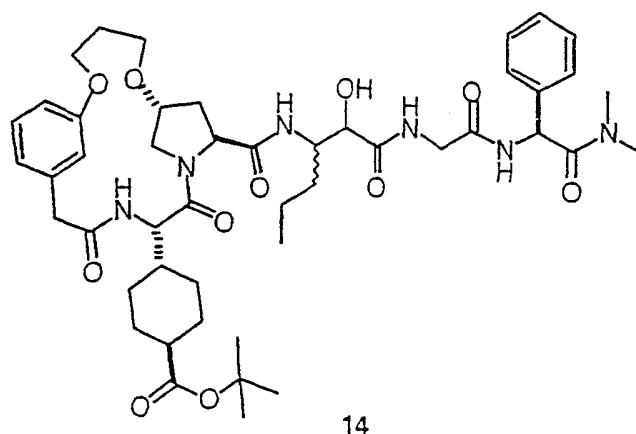


25

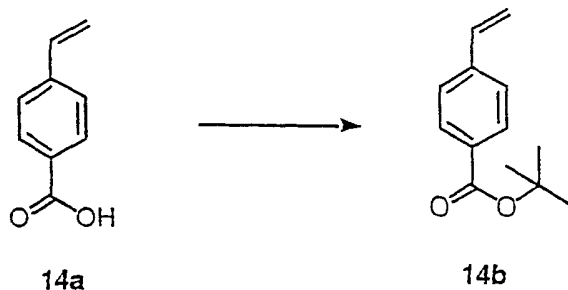


Požadované produkty **13A** a **13B** byly získány protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 96/4 dichlormethan/methanol poskytlo oddělené isomery **13A** a **13B**, a směs. Kombinovaný výtěžek = 50 % (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{41}H_{57}N_6O_9$: 777,4187 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 777,4177 (**13A**), 777,4185 (**13B**).

10 Příklad 14: Příprava sloučeniny 14



Krok A

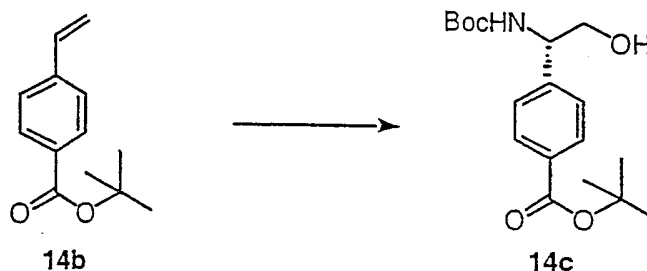


Roztok kyseliny vinylbenzoové **14a** (10 g, 68 mmol) v suchém benzenu (150 ml) byl smísen s di-*tert*-butylacetalem DMF (69 g, 340 mmol, 5,0 ekv.) a vařen pod zpětným chladičem 4 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zředěna vodným NaOH (1M, 300 ml). Reakční směs byla extrahována v diethyletheru (3 x 100 ml). Spojená organická vrstva byla extrahována vodným NaOH (1M, 100 ml), H_2O (2 x 100 ml), roztokem soli (1 x 100 ml), sušena

25

(Na₂SO₄), zfiltrována a zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl destilován za sníženého tlaku, za získání 9,2 g **14b** (66,2 %) jako bezbarvého oleje.

5 Krok B



10

Roztok terc-butylkarbamátu (5,96 g, 50,9 mmol) v 1-PrOH (68 ml) byl smísen s vodným NaOH (128 ml, 0,41M) a terc-butylhypochloritem (5,5 g, 50,9 mmol). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a byl přidán (DHQ)₂Phal (780 mg, 1,00 mmol) v 1-PrOH (64 ml). Byl přidán roztok terc-butyl-4-vinylbenzoátu **14b** v 1-PrOH (119 ml), potom K₂OsO₄·H₂O (248 mg, 0,7 mmol), a reakční směs byla míchána při 0 °C 4 až 5 hod. Reakční směs při vytvoření nového produktu zezelená a vymizí veškerý výchozí materiál. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl zředěn H₂O (300 ml) a extrahován EtOAc (3 x 100 ml). Spojená organická vrstva byla extrahována vodným HCl (200 ml), roztokem soli (100 ml), sušena (Na₂SO₄), zfiltrována a zakoncentrována ve vakuu a čištěna chromatografií (SiO₂, EtOAc/hexany 1 : 2) za získání **14c** jako bezbarvé pevné látky (4,6 g, 82 %). ¹H NMR (CD₃OD, δ) 7,90 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 7,40 (d, 2H, J = 6,3 Hz), 7,22 (bd, 1H, J = 5,7 Hz), 4,69 (bs, 1H), 3,71 - 3,62 (m, 2H) 1,58 (s, 9H), 1,39 (s, 9 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) 169,7, 160,5, 149,8, 134,5, 132,9, 130,4, 84,7, 82,9, 68,7, 60,7, 31,25, 30,9 MS (FAB) 675,2 ([2M+1]⁺, 15), 338 ([M+1]⁺, 15), 282 (65), 225 (50), 165 (100); HRMS Vypočteno pro C₁₈H₂₈NO₅ (M+1): 338,1887; nalezeno 338,1967.

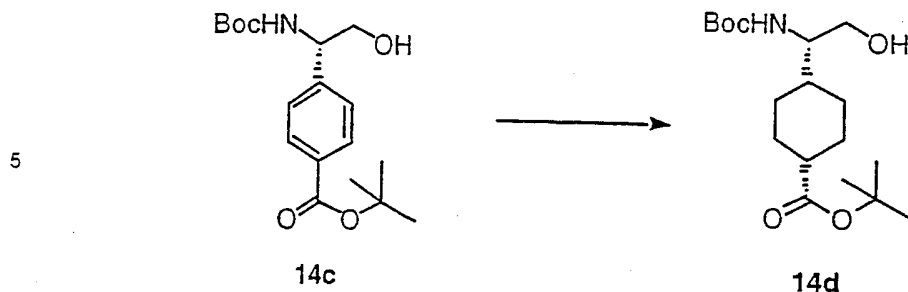
15

20

25

30

Krok C

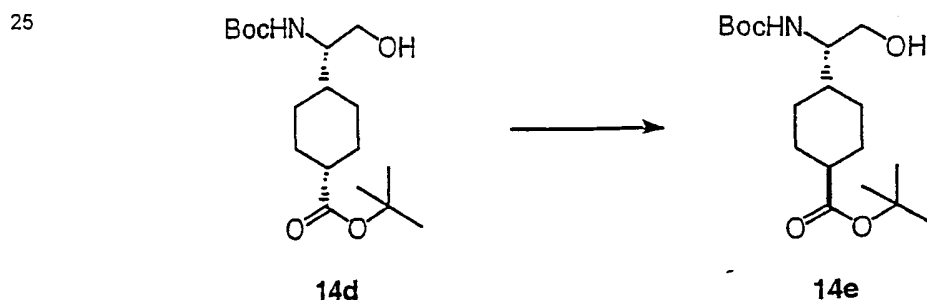


Roztok aromatické sloučeniny **14c** (1,0 g, 2,96 mmol) v CH₃OH (20 ml) byl smísen s Rh/C (10% hmotn./hmotn. 100 mg) a hydrogenován (60 psi, 414 kPa) 2 dny. Reakční směs byla zfiltrována přes lože celitu a zbytek byl zakoncentrován ve vakuu, za získání **14d**. Surový produkt byl čištěn chromatografií (SiO₂, EtOAc/hex 2 : 3), za získání *cis* sloučeniny **14d** (830 mg, 83%), která byla dále čištěna krystalizací z hexanů. ¹H NMR (CD₃OD, δ) 6,31 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz), 3,58 - 3,49 (s, 2H), 3,40 (bd, 1H, *J* = 4,8 Hz), 2,48 - 2,46 (m, 1H), 2,1 - 1,98 (m, 2H), 1,61 - 1,2 (m, 7H), 1,45 (s, 9H), 1,42 (s, 9H); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) 176,2, 158,5, 81,2, 79,8, 63,1, 57,2, 41,8, 38,8, 28,8, 28,3, 27,7, 27,5, 25,9. MS (FAB) 687,2 ([2M+1]⁺, 5), 344 ([M+1]⁺, 20), 232 (40), 188 (100), 107 (13); HRMS vypočteno pro C₁₈H₃₄NO₅ (M+1): 344,2437; Nalezeno: 344,2444. CHN vypočteno pro C₁₈H₃₃NO₅ C = 64,07 %, H = 8,07 %, N = 4,15 % Nalezeno C = 64,32 %, H = 8,21 %, N = 4,32 %.

15

20

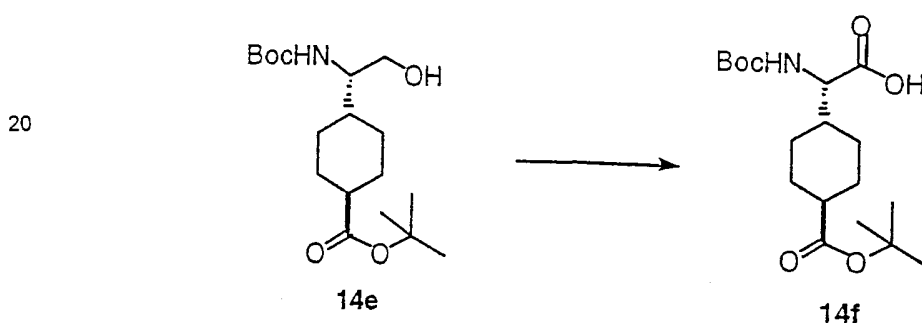
Krok E



Roztok aminoalkoholu **14d** (3,3 g, 11,08 mmol) v suchém THF (200 ml) byl ochlazen na -78 °C (suchý led/acetón, vnitřní teplota -68 °C) a byl smísen s LDA (44 ml, 2M roztok v heptanech, 88 mmol, 8,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při -78 °C 2 hod a reakce byla ukončena CH₃OH (20 ml). Reakční směs byla smísena s vodným HCl (150 ml, 1M) a extrahována etherem (3 x 100 ml). Spojená etherová vrstva byla extrahována roztokem soli (50 ml), sušena (MgSO₄), zakoncentrována ve vakuu a čištěna krystalizací z vroucích hexanů.

Pevná látka, která se oddělila z matečného louhu, byla převážně *cis*-stereoisomer, zatímco zakoncentrování matečného louhu poskytlo čistý *trans*-isomer. Výše uvedená sekvence byla dvakrát opakována za získání 2,7 g sloučeniny *trans* a 600 mg směsi *cis/trans*. ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) 175,3, 156,6, 79,8, 63,6, 57,0, 44,1, 38,3, 37,7, 28,9, 28,6, 28,4, 28,1, 26,6, 26,1. MS (elektrozprášení) 344 (M⁺, 50), 288 (50) 232 (90), 188 (100).

Krok F

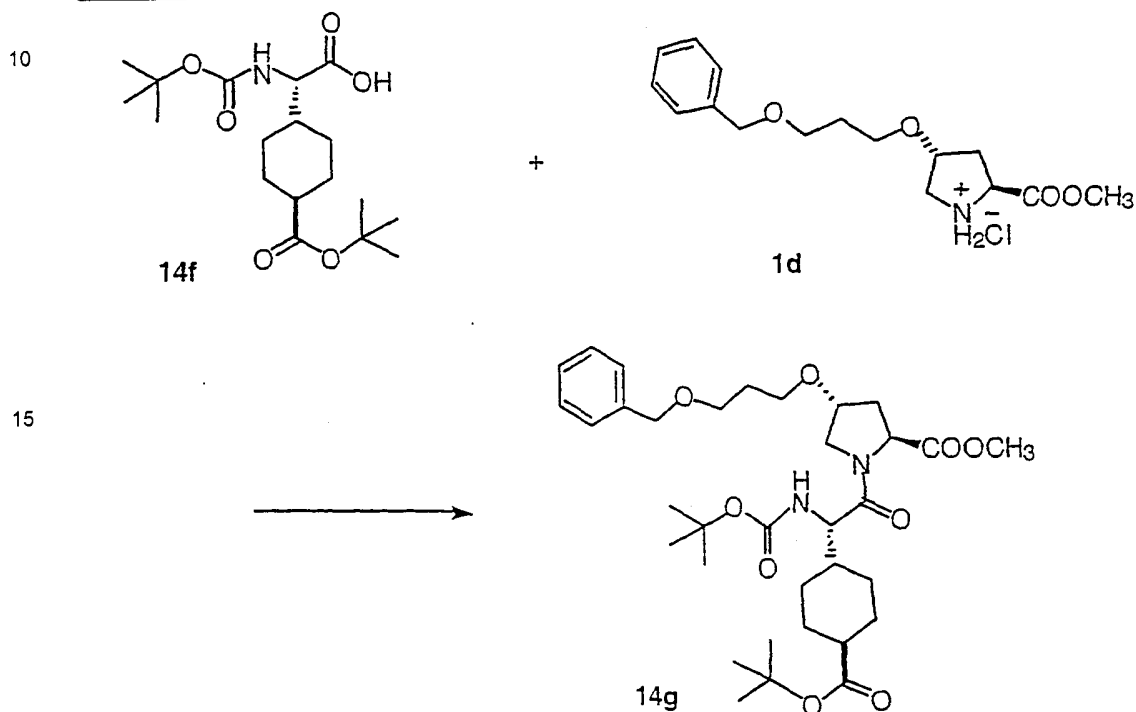


Roztok alkoholu **14e** (2,6 g, 7,6 mmol) v CH₃CN (150 ml) a CCl₄ (150 ml) byl smísen s H₂O (22 ml), ochlazen na 0 °C, smísen s kyselinou jodistou (7,05 g, 30,92 mmol, 4,0 ekv.) a RuCl₃·3H₂O (60 mg, 0,3 mmol, 4 mol%). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 3 hod a zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl zředěn vodou (150 ml) a extrahován EtOAc (3 x 100 ml). Spojená organická vrstva byla extrahována H₂O (100 ml) a vodným NaOH (1M, 3 x

30

100 ml). Spojené vodné vrstvy byly okyseleny HCl (6M, pH ~1) a extrahovány EtOAc (3 x 100 ml). Ethylacetátové vrstvy byly spojeny, extrahovány roztokem soli (100 ml), sušeny (Na₂SO₄), zfiltrány a zakoncentrovány ve vakuu, za získání kyseliny **14f** (1,8 g, 66 %) použité pro další reakce bez dalšího čištění. MS (FAB) 380,2 ([M+Na]⁺, 30) 358 ([M+1]⁺, 5), 302 (20), 258 (20), 246 (100), 202 (70), 200 (20).

Krok G

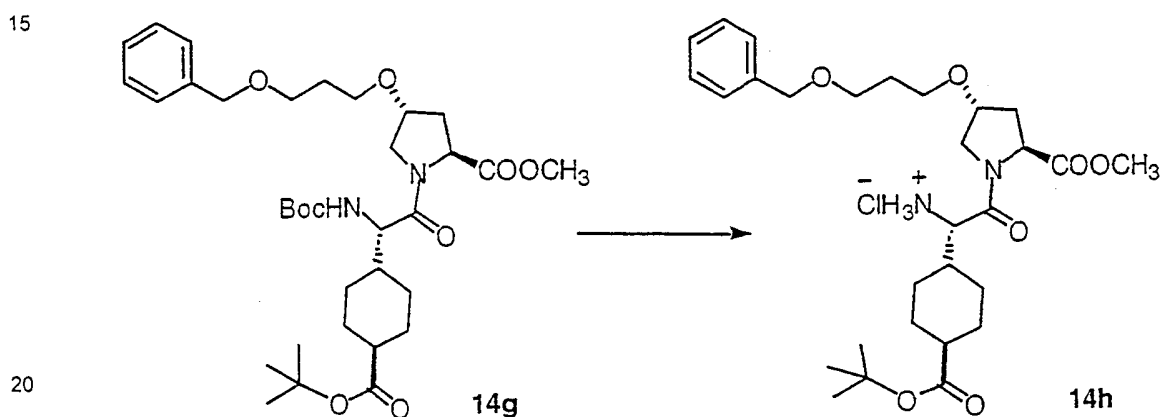


20 Roztok Boc-*trans*-4-tercbutylkarboxylcyklohexylglycinu **14f**, (1,9 g, 5,3 mmol) v CH₂Cl₂ (30 ml) byl smísen s prolinovou sloučeninou **1d** (1,92 g, 5,85 mmol, 1,1 ekv.) a ochlazen na 0 °C. Reakční směs byla smísena s Hünigovou bází (1,51 g, 11,7 mmol, 2,2 ekv., 2,15 ml), potom bylo přidáno BOP (2,6 g, 5,85 mmol, 1,1 ekv.).

25 Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 12 hod, zředěna vodným HCl (1M, 100 ml) a extrahována EtOAc (3 x 100 ml). Spojené ethylacetátové vrstvy byly extrahovány vodným NaOH (1M, 100 ml), roztokem soli (100 ml), sušeny (Na₂SO₄), zfiltrány a

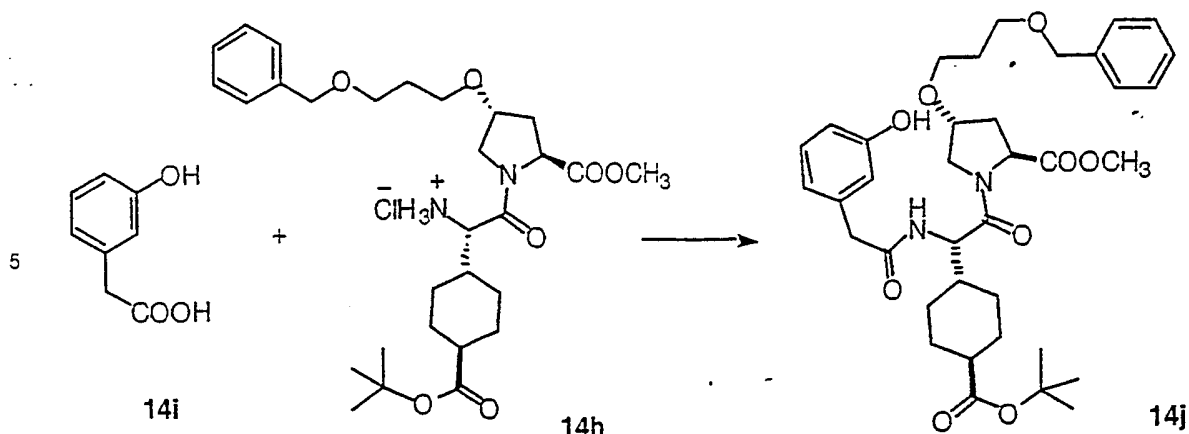
zakoncentrovány ve vakuu, a čištěny chromatografií (SiO₂, EtOAc/hexany 2 : 3), za získání **14g** jako bezbarvé pěny (1,8 g, 54 %);
¹H NMR (CD₃OD, δ, směs rotamerů) 7,32 - 7,23 (m, 5H), 6,64 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 4,47 - 4,39 (m, 3H), 4,19 - 4,04 (m, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,66 -
 3,56 (m, 4H), 2,55 - 2,10 (m, 2H), 1,99 - 1,00 (m, 12H), 1,42 (s, 9H),
 1,40 (s, 9H). ¹³C NMR (CD₃OD, δ, směs rotamerů), 175,6, 174,6,
 172,4, 172,0, 156,4, 138,5, 128,1, 127,5, 127,4, 127,3, 79,8, 79,7,
 79,0, 77,5, 72,5, 66,7, 65,4, 58,1, 56,6, 52,1, 51,3, 43,9, 40,4, 39,4,
 38,6, 34,6, 29,8, 28,4, 27,9, 27,3, 26,1, 25,4, 24,5; MS (FAB) 633
 ([M+1]⁺, 11), 533 (55), 477 (24), 428 (5), 294 (100), 234 (12) 156 (40),
 128 (39); CHN Vypočteno pro C₃₄H₅₂NO₉: C 64,53 % H 8,28 % N 4,43
 %; nalezeno C 64,41 % H 8,00 % N 4,19 %.

Krok H



Roztok Boc-trans-4-tercbutylkarboxycyklohexylglycinu **14g**
 (1,8 g) v HCl (4M roztok v dioxanu, 60 ml) byl míchán při teplotě
 laboratoře 4 až 5 hod. Průběh reakce byl sledován TLC (EtOAc/hex 3 :
 7), přičemž bylo zjišťováno vymizení výchozího materiálu a objevení
 se základní čáry produktu. Reakční směs byla zakoncentrována ve
 vakuu a zbytek byl sušen pod vývěvou přes noc. Pevná látka **14h** byla
 použita pro reakce bez dalšího čištění.

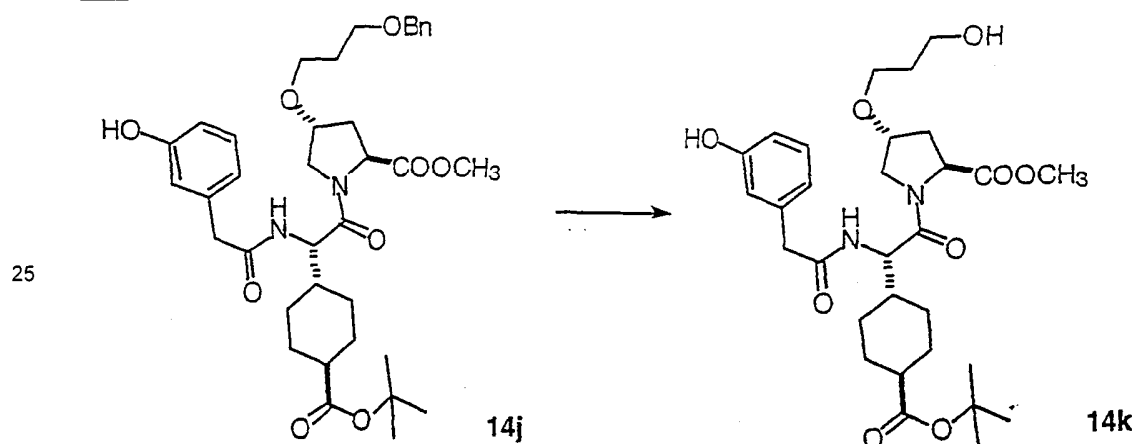
Krok I



Roztok 3-hydroxyfenyloctové kyseliny **14i** (501 mg, 3,29 mmol, 1,8 ekv.) a aminhydrochloridu **14h** (1,79g, 2,99 mmol) v suchém CH₂Cl₂ (30 ml) byl smísen s Hünigovou bází (850 mg, 6,59 mmol, 2,20 ekv, 1,2 ml) a činidlem BOP (1,5g, 3,29 mmol, 1,1 ekv.) při 0 °C a míchán při laboratorní teplotě 24 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zředěna vodným HCl (1M, 250 ml). Vodná vrstva byla extrahována EtOAc (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným NaOH (1 x 100 ml), roztokem soli (1 x 100 ml), sušeny (Na₂SO₄), zfiltrovány a zakoncentrovány ve vakuu, a čištěny chromatografií (EtOAc/hexany 1 : 1), za získání **14j** jako bezbarvé pevné látky (710 mg, 36 %).

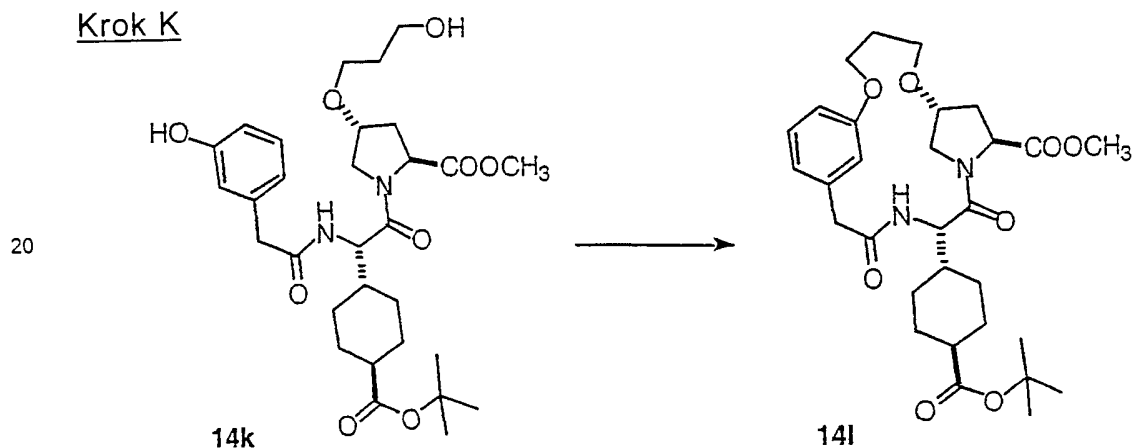
20

Krok J



Roztok sloučeniny **14j** (710 mg, 1,1 mmol) v CH₃OH (50 ml) byl smísen s Pearlmanovým katalyzátorem (10% Pd(OH)₂/C) a hydrogenován (H₂, 40 psi, 276 kPa) 12 hod. Pd/C bylo odfiltrováno přes lože celitu a filtrát byl zakoncentrován a použit pro další cyklizaci bez dalšího čištění. R_f 0,12 (aceton/hexany 3 : 7); ¹H NMR (CD₃OD, δ, směs rotamerů) 8,25 (bs, 1H), 7,01 (bt, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,72 (bs, 1H), 6,65 (d, 2 H, *J* = 7,8 Hz), 4,79 - 4,70 (bs, 3H), 4,55 - 4,41 (bs, 2H), 4,20 - 4,12 (bs, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,66 - 3,44 (bm, 6H) 2,43 - 1,04 (bm, 14 H) 1,40 (s, 9H); ¹³C NMR (CD₃OD, δ, směs rotamerů): 175,5, 174,6, 172,6, 172,4, 171,3, 161,1, 157,3, 136,8, 136,7, 129,3, 120,0, 115,7, 113,6, 100,0, 94,8, 79,9, 79,8, 77,5, 65,1, 58,5, 58,2, 55,6, 55,5, 54,3, 52,2, 51,5, 43,9, 42,1, 39,4, 35,0, 32,4, 28,6, 28,4, 27,5, 27,2, 27,1, 26,1, 25,2, 25,0; MS (FAB): 577 ([M+1]⁺, 70), 521 (10), 443 (10), 387 (10), 374 (10), 318 (15), 290 (100), 248 (30); HRMS vypočteno pro C₃₀H₄₅N₂O₉ (M+H)⁺: 577,3125; nalezeno 577,3133.

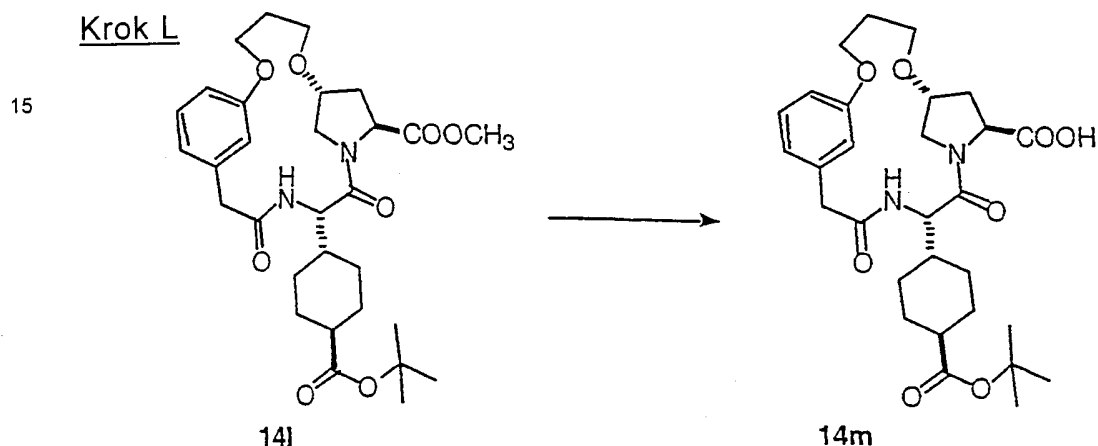
Krok K



Roztok aloholu **14k** (600 mg, 1,05 mmol) a ADDP (787 mg, 3,12 mmol, 3,0 ekv.) v CH₂Cl₂ (30 ml) byl smísen s Ph₃P (818 mg, 3,12 mmol, 3,0 ekv.) v přetlaku suchého N₂ při 0 °C. Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 24 hod, zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl čištěn chromatografií (SiO₂, aceton/hexany 2 : 3), za získání bezbarvé pevné látky **14l** (120 mg, 22%) jako cyklického

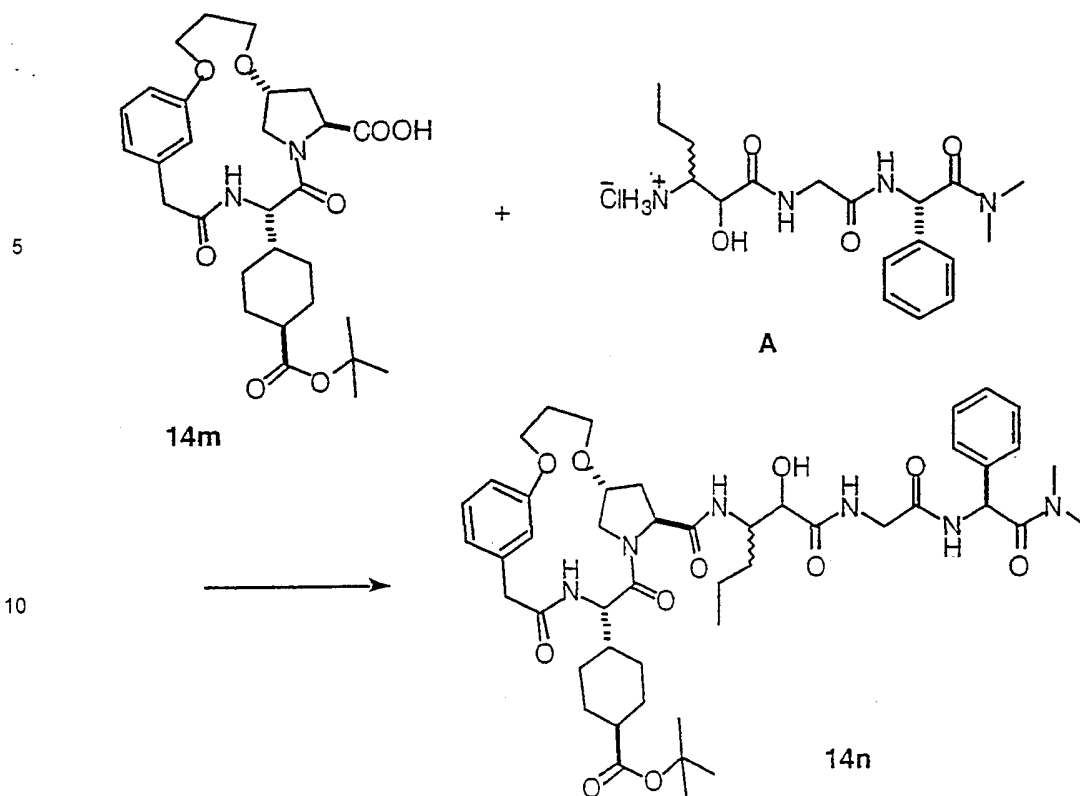
produktu; R_f 0,73 (aceton/hexany 1 : 1); ^1H NMR (CD_3OD , δ) 7,13 (t, 1H J = 7,8 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,71 (t, 2 H, J = 8,1 Hz), 4,58 (d, 1H, J = 9,9 Hz), 4,37 (dd, 1 H, J = 7,8, 2,7 Hz), 4,23 - 4,11 (m, 4H), 3,74 - 3,61 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,59 - 3,40 (m, 2H), 2,54 - 2,41 (m, 1H), 2,19 - 2,10 (m, 1H), 1,98 - 1,42 (m, 10H), 1,43 (s, 9H); ^{13}C NMR (CD_3OD , δ) 175,6, 172,4, 172,1, 170,8, 159,0, 137,0, 129,1, 121,7, 115,7, 112,2, 94,8, 79,8, 77,4, 65,2, 64,0, 57,6, 55,2, 53,8, 51,3, 44,0, 41,5, 39,1, 33,3, 28,7, 28,1, 26,9; MS (elektrozprášení) 559 ($[\text{M}+1]^+$, 100) 327 (10), 189 (20); HRMS Vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+1$) $^+$: 559,3019; nalezeno: 559,3025; CHN vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ C = 63,47 %, H = 7,63 %, N = 4,93 %; nalezeno C = 63,57 %, H = 7,46 %, N = 4,93 %.

Krok L



Roztok methylesteru **14l** (120 mg, 0,22 mmol) v THF (5,0 ml) a H_2O (1,0 ml) byl smísen s LiOH (20 mg, 0,5 mmol, 2,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 3 hod a byl přidán CH_3OH (1,0 ml) a směs byla míchána další 1 hod. Reakční směs byla míchána s HCl (4,0M v dioxanu, 1 ml) a zakonzentrována ve vakuu, a voda byla lyofilizována za získání bezbarvé pevné látky **14m**, která byla použita v další reakci.

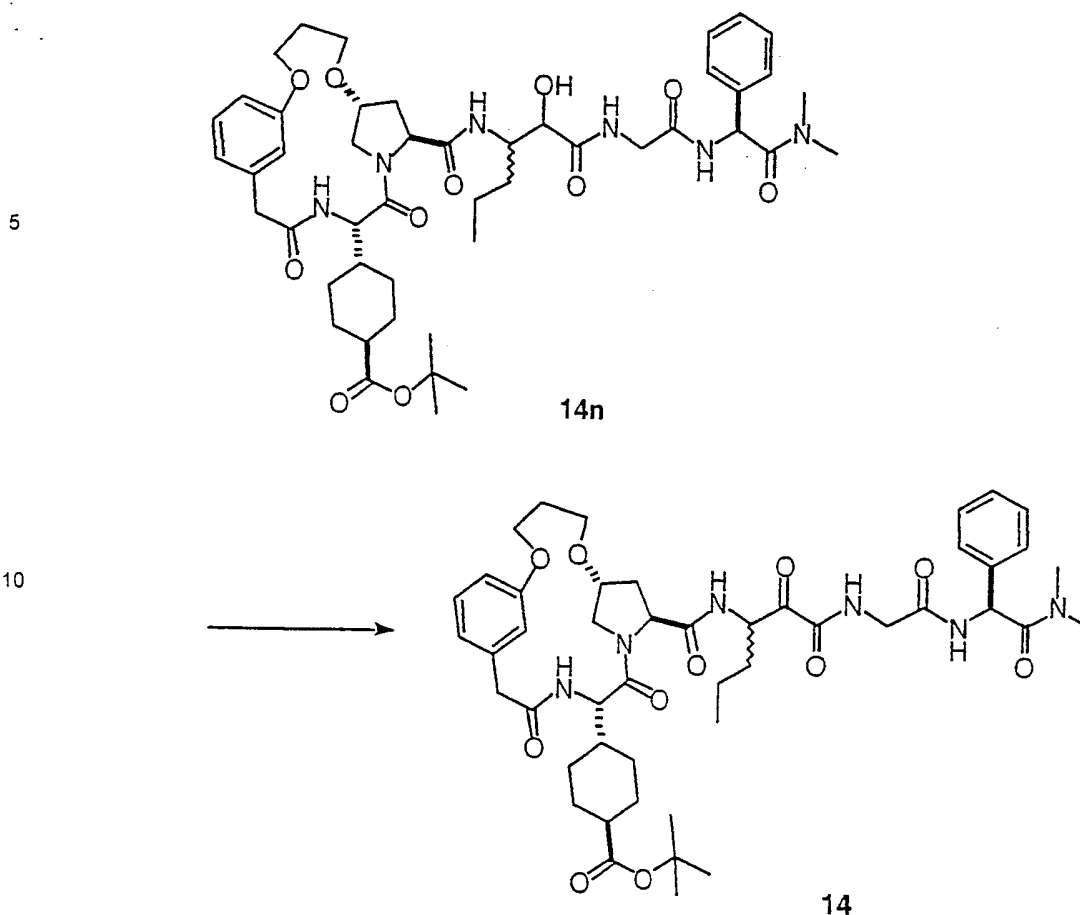
Krok M



15 Roztok karboxylové kyseliny **14m** (110 mg, 0,21 mmol) v DMF (3,0 ml) a CH₂Cl₂ (5,0 ml) byl smísen s Hünigovou bází (109 mg, 0,84 mmol, 4,0 ekv. 155,0 µl) a HOObt (52 mg, 0,315 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla ochlazená na 0 °C a smísená s EDCI (61 mg, 0,31 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána při 0 °C a smísená s aminhydrochloridem **A** po 30 min. Reakční směs byla míchána při

20 laboratorní teplotě 24 hod a zakoncentrována ve vakuu pro odstranění DMF a CH₂Cl₂. Zbytek byl zředěn vodným HCl (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3 x 75 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným NaOH (1M, 3 x 50 ml), roztokem soli (100 ml), a zakoncentrovány ve vakuu. Zbytek **14n** (79 mg) byl oxidován bez dalšího čištění.

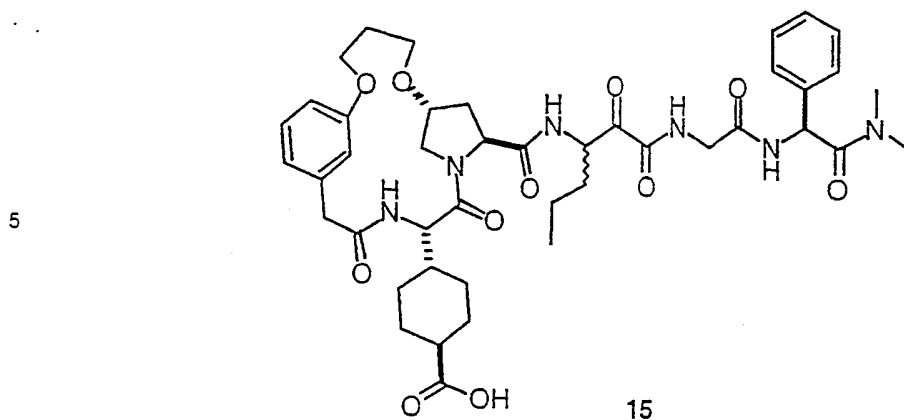
Krok N



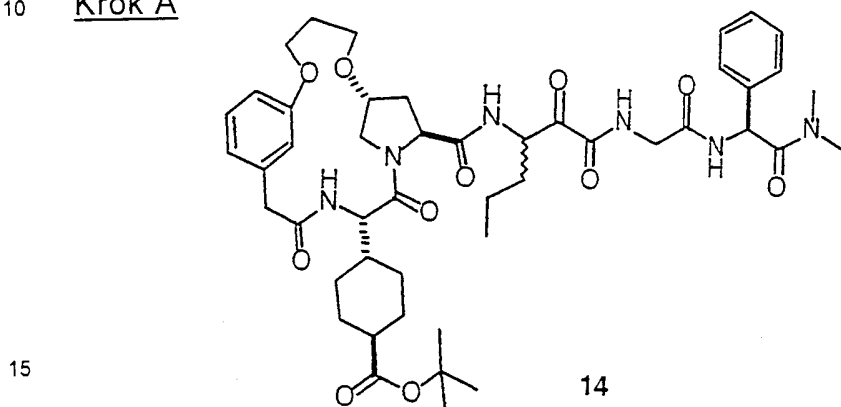
Roztok alkoholu **14n** (79 mg, 888/μmol) v CH₂Cl₂ (4,0 ml) byl smísen s Dess-Martinovým činidlem (110 mg, 0,25 mmol, 2,5 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 3 hod a směs byla zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl čištěn chromatografií (SiO₂, aceton/hexany 1 : 1) za získání oxidovaného produktu **14** (29 mg, 38 %) jako bezbarvé pevné látky; MS (FAB) 889 [(M+1)⁺, 100], 844 (20), 833 (60), 788 (30), 760 (10), 655 (10), 527 (20); HRMS Vypočteno pro C₄₇H₆₅N₆O₁₁: 889,4711; nalezeno: 889,4732.

20

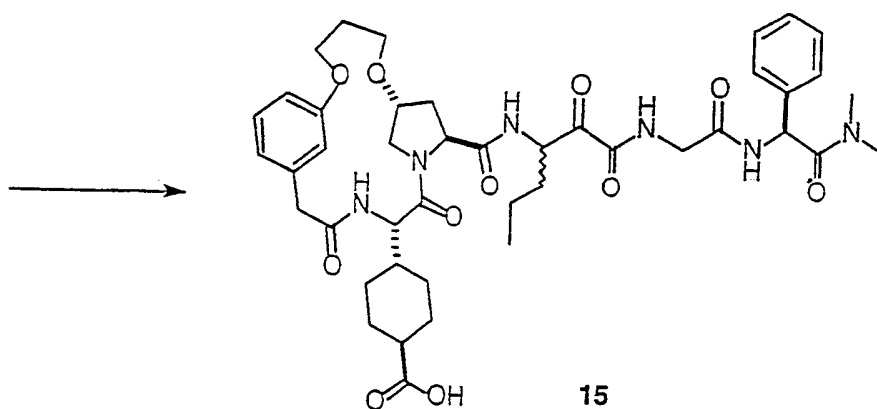
Příklad 15: Příprava sloučeniny 15



10 Krok A



20



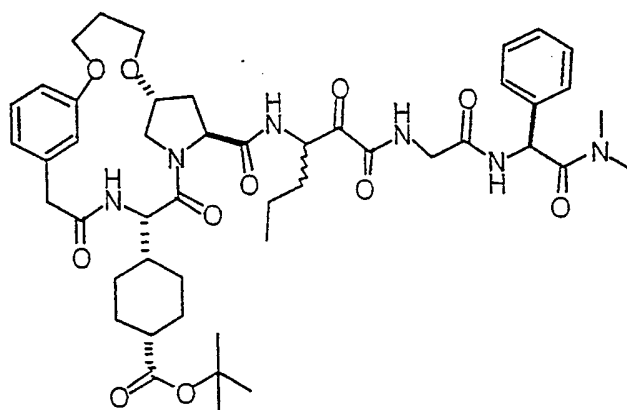
Roztok *tert*-butylesteru **14** (20,0 mg, 22,0/μmol) byl smísen
s TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1, 4 ml) a míchán při laboratorní teplotě 4 hod.
25 Vymizení esteru až na výchozí úroveň bylo sledováno TLC
(CH₃OH/CH₂Cl₂ 1 : 24). Po úplném odstranění ochranných skupin byla

reakční směs zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl opakovaně smísen se směsí CH_2Cl_2 /hexany a zakoncentrován za získání bílé pevné látky **15** (19 mg, 100 %); MS (elektorozprašování) 833 ($[\text{M}+1]^+$, 60), 661 (10), 530 (40), 391 (75), 279 (100).

5

Příklad 16: Příprava sloučeniny 16

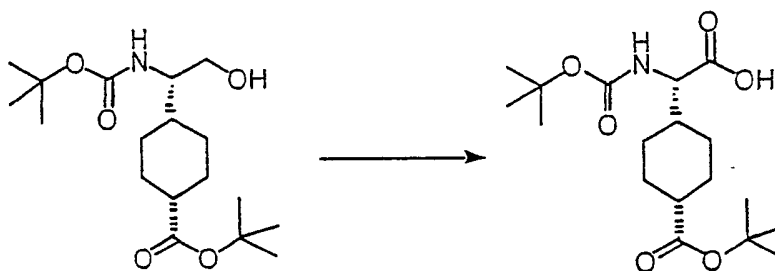
10



16

Krok A

15



20

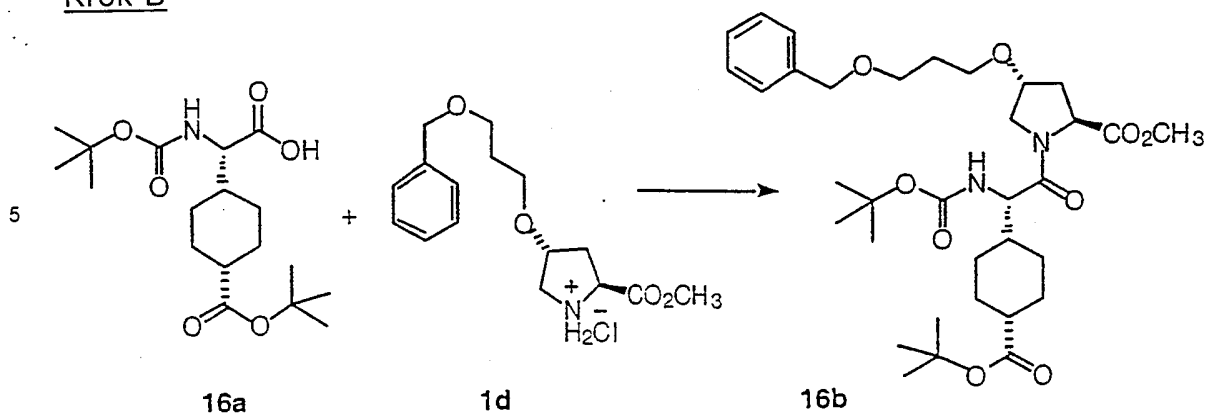
14d

16a

Požadovaná sloučenina **16a** byla připravena ze sloučeniny **14d** v 70% výtěžku způsobem popsáním v příkladu 14, krok F. Tato sloučenina byla použita bez dalšího čištění; MS (FAB): 380,2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 30) 358 ($[\text{M}+1]^+$, 5), 302 (20), 258 (20), 246 (100), 202 (70), 200 (20); HRMS Vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{NO}_6$ ($\text{M}+1$)⁺: 358,2230; Nalezeno: 358,2237.

25

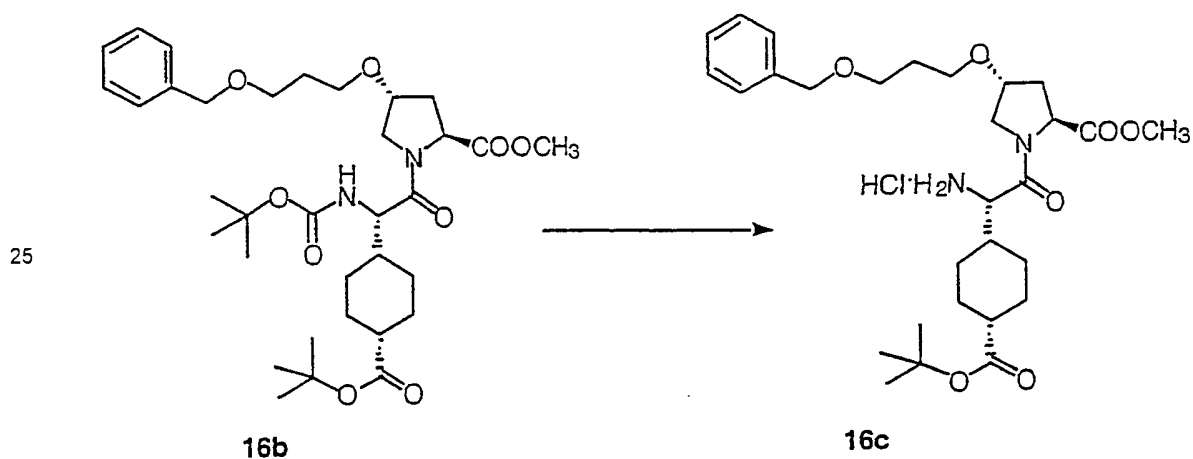
Krok B



Požadovaná sloučenina **16b** byla připravena ze sloučeniny **16a** v
 10 41% výtěžku způsobem popsáním v příkladu 14, krok G; $[\alpha]_D -52,7$ (c
 0,3 CHCl_3 , 25); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ) 7,35 - 7,21 (m, 5H), 6,63 (d, 1 H, J
 = 9,3 Hz), 4,46 (d, 2 H, J = 4,3 Hz), 4,41 (t, 1 H, J = 9,3 Hz), 4,38 -
 4,07 (m, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,66 - 3,43 (m, 5H), 2,45 (p, 1H, J = 4,2
 Hz), 2,32 (dd, 1 H, J = 7,8, 5,7 Hz), 2,02 - 1,90 (m, 3H), 1,90 - 1,56
 15 (m, 3H), 1,56 - 1,24 (m, 24 H); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , δ) 174,7, 172,4,
 172,0, 156,4, 138,4, 128,0, 127,5, 127,4, 79,8, 79,0, 77,5, 72,5, 66,6,
 65,3, 58,0, 55,3, 52,1, 51,3, 40,4, 38,6, 34,7, 29,7, 27,4, 27,03, 26,1,
 24,5. MS (FAB) 633,2 $[(M+1)^+]$, 100; HRMS vypočteno pro $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_9$
 $(M+1)^+$: 633,3751; nalezeno 633,3759.

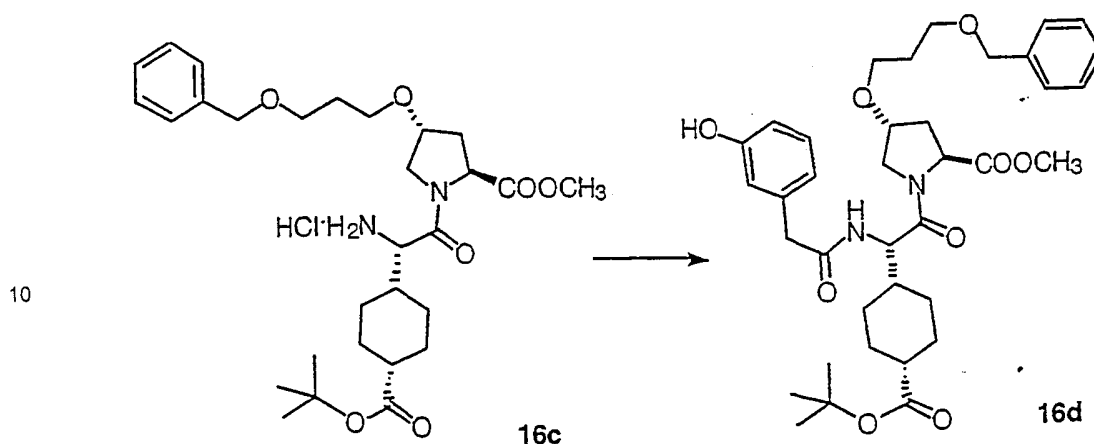
20

Krok C



Požadovaná sloučenina **16c** byla připravena ze sloučeniny **16b** způsobem popsaným v příkladu 14, krok H. Produkt byl použit bez dalšího čištění.

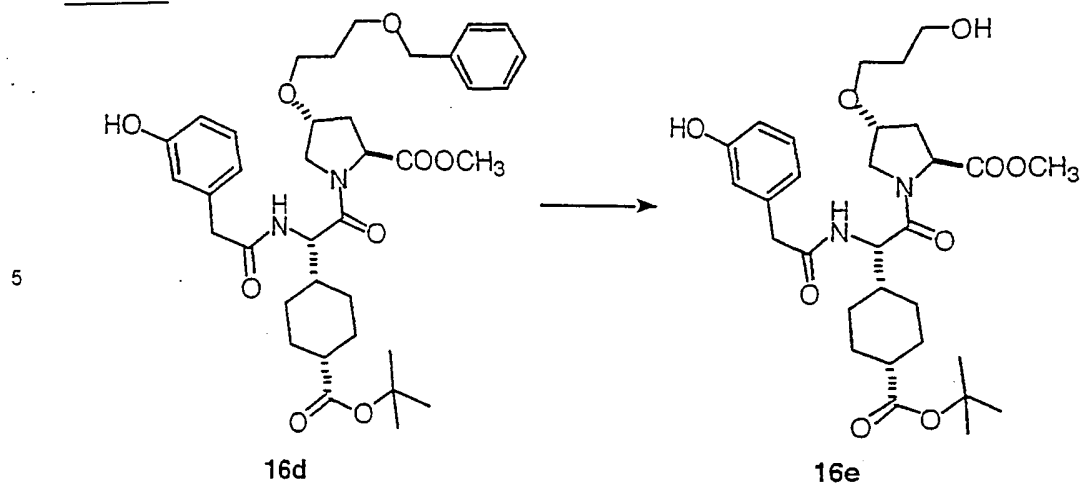
5 Krok D



Požadovaná sloučenina **16d** byla připravena ze sloučeniny **16c** v 41% výtěžku způsobem popsaným v příkladu 14, krok I. ^1H NMR (CHCl_3 , δ) 7,34 - 7,26 (m, 5H), 7,12 (t, 1 H, $J = 7,5$ Hz), 6,72 - 6,67 (m, 3H), 4,76 - 4,64 (m, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,51 - 4,42 (m, 1H), 4,11 - 4,02 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,70 - 3,65 (m, 1H), 3,55 - 3,43 (m, 6H), 2,54 - 2,42 (m, 1H), 2,28 - 2,39 (m, 1H), 2,1 - 1,9 (m, 3H), 1,86 - 1,64 (4H), 1,50 - 1,38 (m, 14H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ) 175,0, 172,4, 171,5, 171,1, 157,1, 138,5, 136,0, 130,1, 128,5, 127,9, 127,7, 121,0, 116,0, 114,8, 80,5, 77,6, 73,0, 66,9, 66,2, 58,2, 54,3, 52,5, 52,3, 43,4, 39,4, 39,9, 34,9, 30,0, 28,2, 26,8, 26,6, 26,0, 24,0; MS (FAB) 689 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, 35), 667 $[(\text{M}+\text{H})^+]$, 23), 633 (5), 294 (100), 204 (39), 156 (63).

20

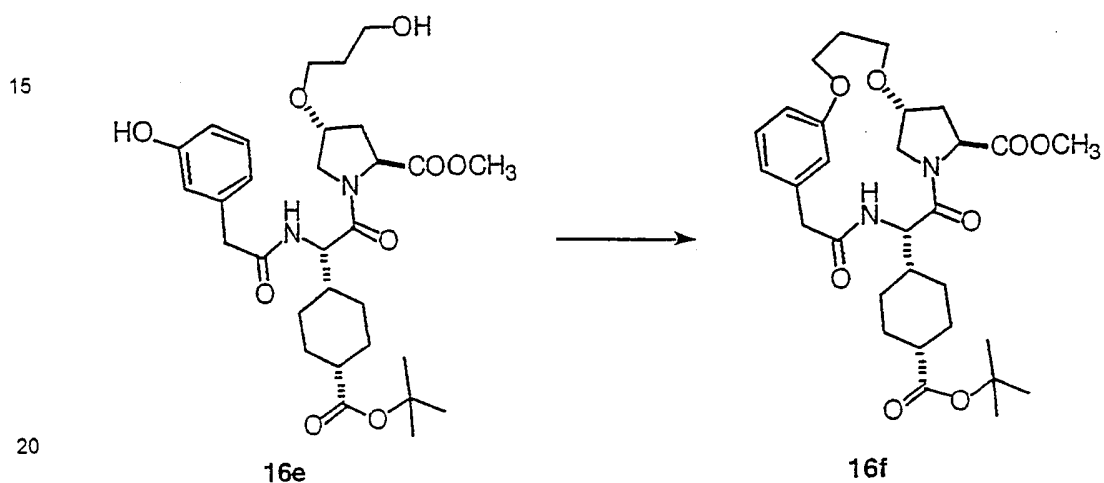
Krok E



Požadovaná sloučenina **16e** byla připravena ze sloučeniny **16d** způsobem popsaným v příkladu 14, krok J. Produkt byl použit bez dalšího čištění.

10

Krok F

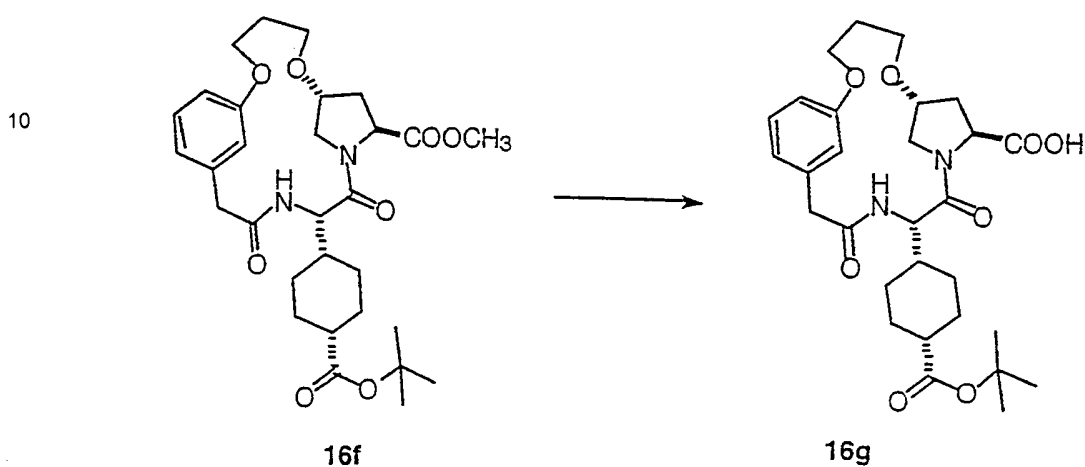


Požadovaná sloučenina **16f** byla připravena ze sloučeniny **16e** ve 20% výtěžku způsobem popsaným v příkladu 14, krok K. ^1H NMR (CDCl_3 , δ) 8,56 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 7,14 (t, 1H, $J = 6$ Hz), 6,86 (s, 1H), 6,66 (d, 1H, $J = 6$ Hz), 6,73 (dd, 1H, $J = 6,3, 15$ Hz), 4,86 - 4,77 (m, 1H), 4,40 (dd, 1H, $J = 3,0, 2,7$ Hz), 4,24 - 4,13 (m, 4H), 3,70 (s,

25

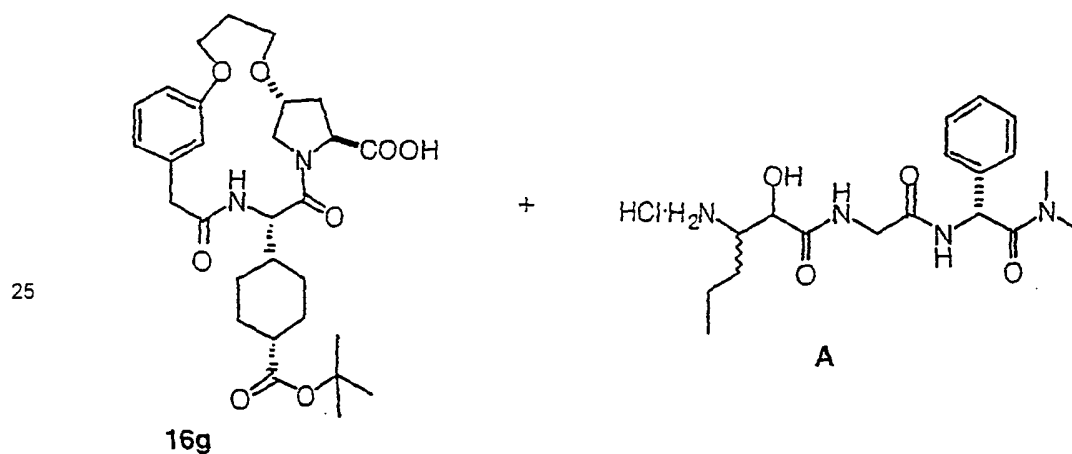
3H), 3,70 - 3,66 (m, 2H), 3,66 - 3,32 (m, 3H), 2,53 (dd, 1 H, $J = 5,7$, 3,9 Hz), 2,45 - 2,42 (m, 1H), 1,99 - 1,80 (m, 6H), 1,60 - 1,57 (m, 4H), 1,45 - 1,43 (m, 11H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ) 175,8, 173,3, 173,0, 171,7, 160,0, 138,0, 130,1, 122,7, 116,8, 113,3, 81,0, 78,6, 66,3, 65,2, 58,8, 55,1, 52,5, 42,6, 42,4, 38,9, 34,6, 30,0, 28,2, 28,0, 27,0, 26,9, 26,8, 26,2; MS (FAB) 559 (M^+ , 33), 327 (33), 225 (100).

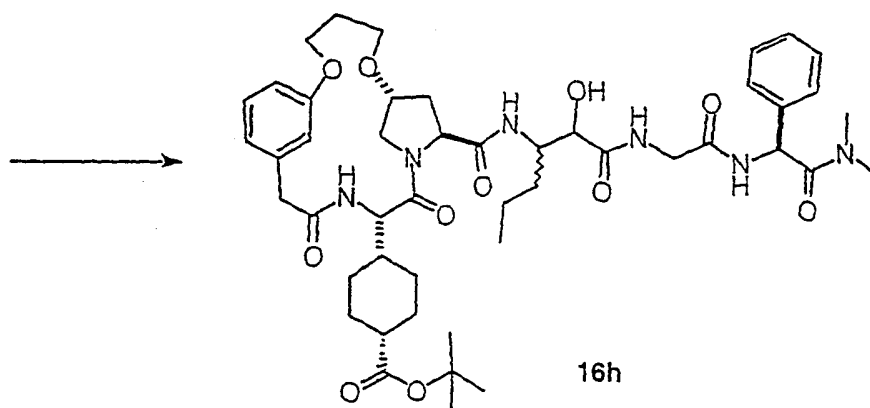
Krok G



Požadovaná sloučenina **16g** byla připravena ze sloučeniny **16f** způsobem popsáným v příkladu 14, krok H. Produkt byl použit bez dalšího čištění.

20 Krok H

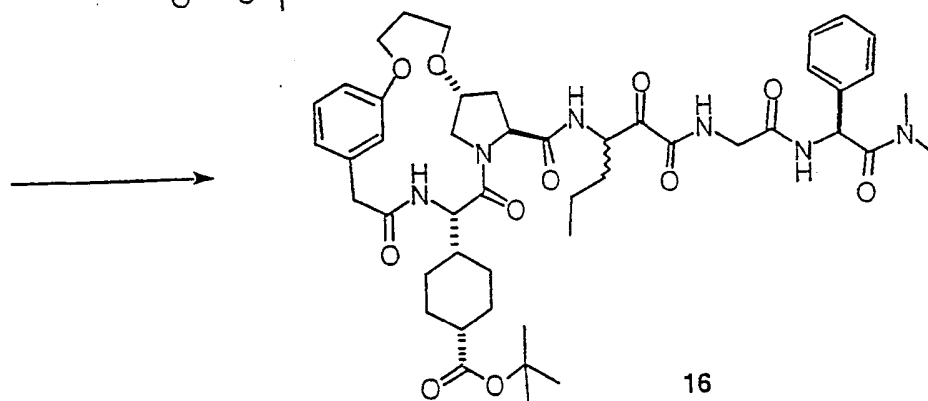
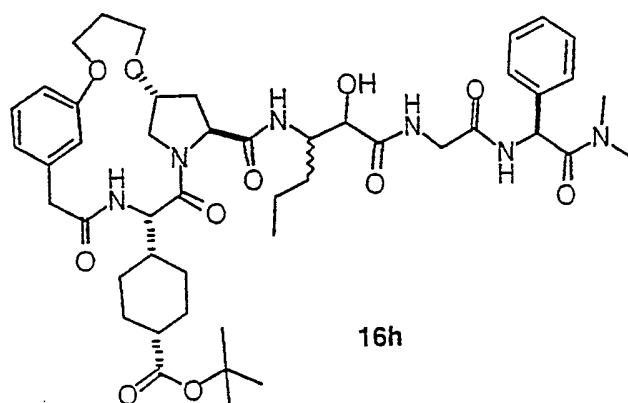




Požadovaná sloučenina **16h** byla připravena ze sloučeniny **16g** a **A** způsobem popsáným v příkladu 14, krok L. Produkt byl použit bez dalšího čištění.

10

Krok I

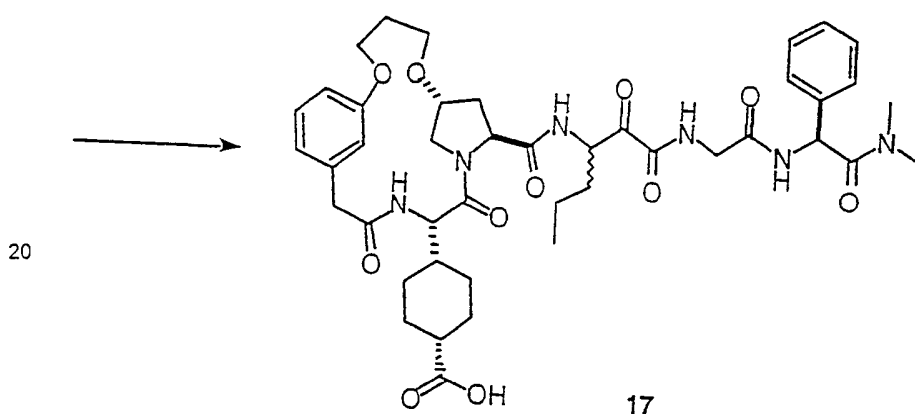
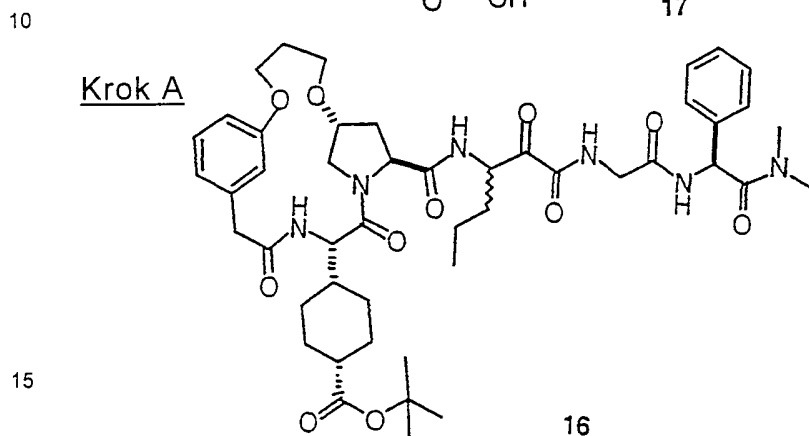
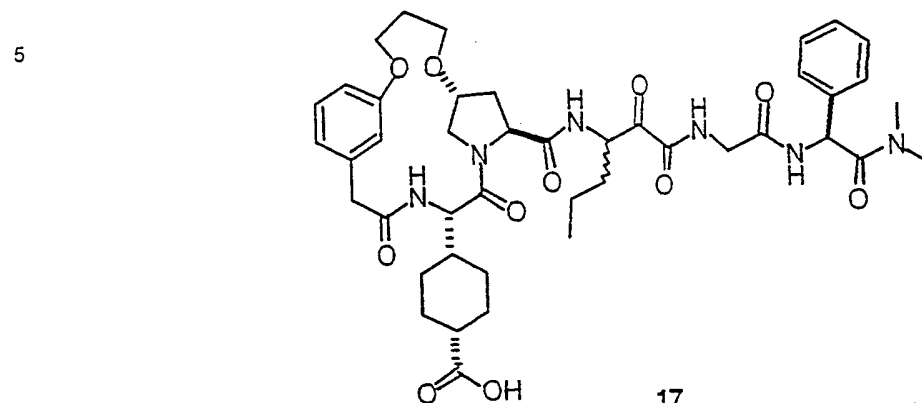


Požadovaná sloučenina **16** byla připravena jako bezbarvá pevná látka ze sloučeniny **16h** ve 40% výtěžku způsobem popsáným v příkladu 14, krok N. MS (elektrorozprašování) 889 [(M+1)⁺, 85], 637

25

(20), 530 (75), 265 (100); HRMS Vypočteno pro $C_{47}H_{65}N_6O_{11}$: 889,4711; nalezeno 889,4699.

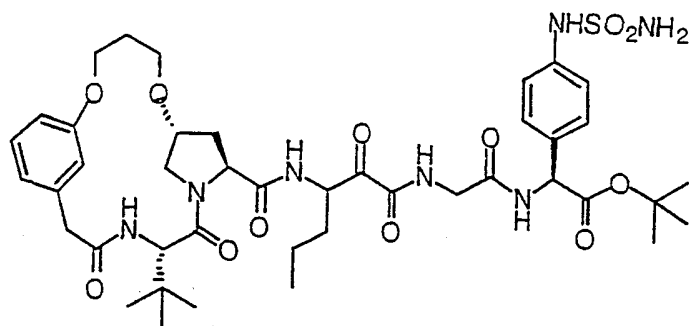
Příklad 17: Příprava sloučeniny 17



Požadovaná sloučenina 17 byla připravena ze sloučeniny 16 v kvantitativním výtěžku způsobem popsáním v příkladu 15, krok A.

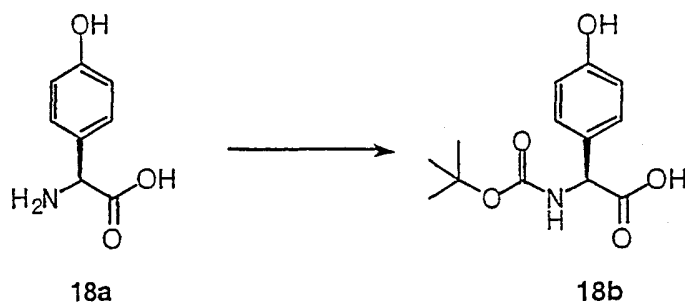
25 MS (FAB) 833 $[(M+1)^+$, 100], 788 (10), 723 (5), 308 (100).

Příklad 18: Příprava sloučeniny vzorce 18



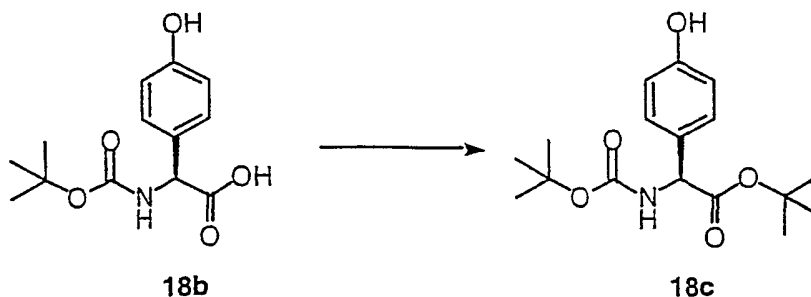
18

Krok A



- 15 K chladné (0 °C) kaši sloučeniny **18a** (15,0 g, 90 mmol) v dioxanu (100 ml), vodě (100 ml) a nasyceného hydrogenuhličitanu sodného (100 ml) byl přidán roztok terc-butoxykarbonylanhydridu (7,2 g, 33 mmol) v dioxanu (100 ml). Reakční směs byla pomalu zahřáta na teplotu laboratoře v průběhu 6 hod. Reakční směs byla
- 20 zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl zředěn vodou a extrahován diethyletherem (2 x 150 ml). Etherová vrstva byla vylita. Vodná vrstva byla pomalu okyselena pevnou kyselinou citronovou (pH ~4) a extrahována ethylacetátem (3 x 150 ml). Organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována ve vakuu za získání sloučeniny **18b** (14,6 g, 61% výtěžek) jako bílé pěny.
- 25

Krok B

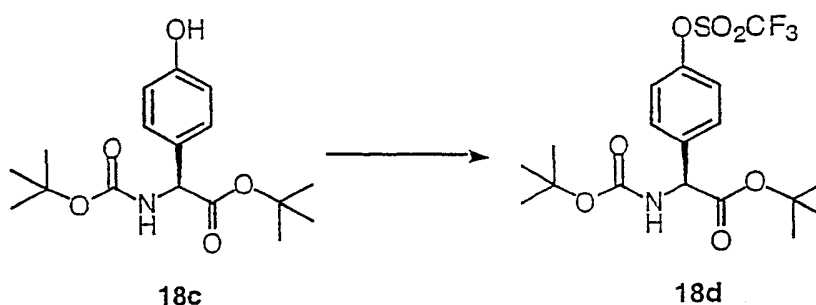


K 80 °C teplému roztoku **18b** (14,6 g, 54,68 mmol) v toluenu (230 ml) byl přidán DMF-di-terc-butylacetal (53 ml, 218,72 mmol) po kapkách v průběhu 2 hod. Po ukončení přidávání byla reakční směs byla udržována na stejné teplotě 1 hod. Potom byla ochlazená ochlazená na teplotu laboratoře a zakonzentrována. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 96/4 až 90/10 dichlormethan/ethylacetát, za získání požadované sloučeniny **18c** (7,53 g, 43% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{17}H_{26}NO_5$: 324,1811 (M+H)⁺. Nalezeno: 324,1807.

10

15

Krok C

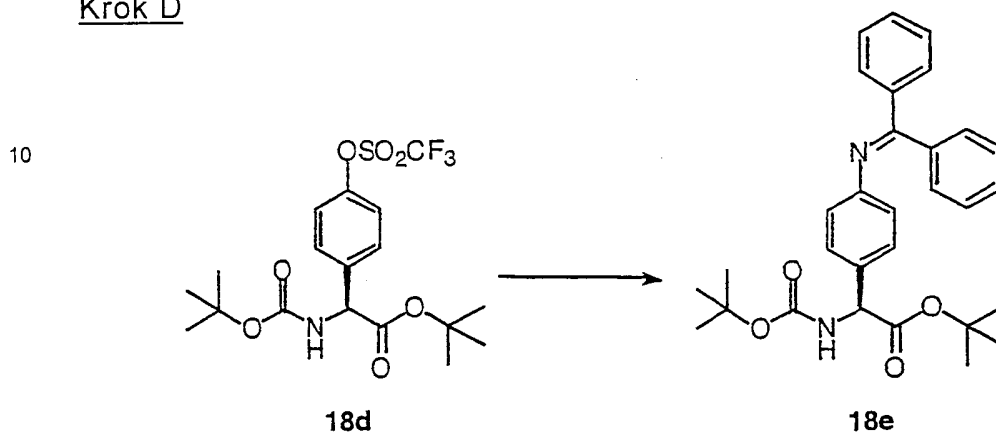


K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **18c** (7,5 g, 23,22 mmol) v dichlormethanu (100 ml) byl přidán triethylamin (7,12 ml, 51,08 mmol) a potom po kapkách anhydrid kyseliny trifluorooctové (4,30 ml, 25,54 mmol). Reakční směs byla pomalu zahřáta na teplotu laboratoře v průběhu 4 hod. Reakce byla ukončena nasyceným

25

roztokem hydrogenuhlčitanu sodného a extrahována do dichlormethanu. Spojená organická vrstva byla promyta nasyceným hydrogenuhlčitanem sodným a roztokem soli, sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována. Hnědý zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií
5 na koloně s použitím dichlormethanu, za získání 7,74 g **18d** (73% výtěžek).

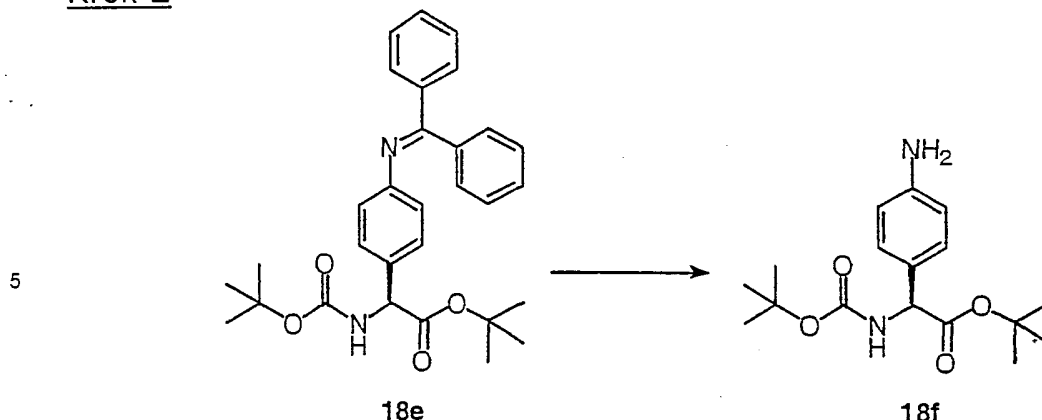
Krok D



15

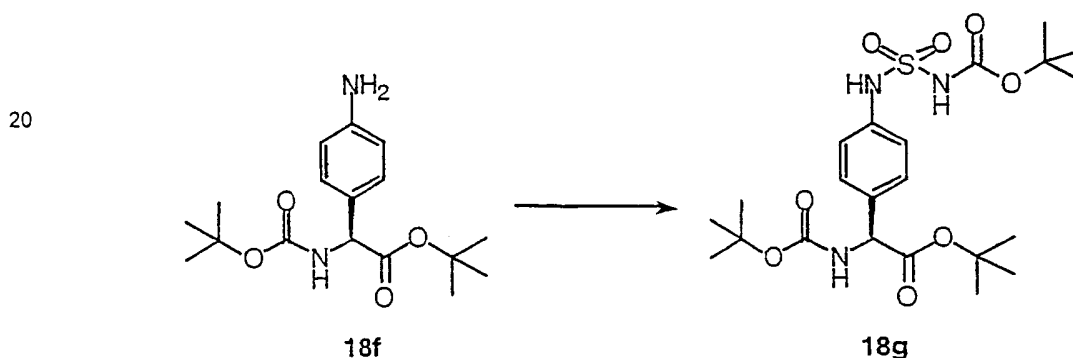
Do baňky vysušené v sušárně byl přidán THF (75 ml, předem zbavený kyslíku probubláváním argonem), octan paladnatý (74 mg, 0,33 mmol), R-(+)-BINAP (311 mg, 0,495 mmol), a uhličitán cesný (5,38 g, 16,5 mmol) v atmosféře argonu. K této směsi byla přidána **18d**
20 (5,0 g, 11 mmol), potom difenylketimin (2,77 ml, 16,5 mmol). Baňka byla propláchnuta argonem a zahřívána pod zpětným chladičem 12 hod (přes noc). Reakční směs byla ochlazená na teplotu laboratoře a zředěna etherem (500 ml). Organická vrstva se promyje nasyceným roztokem chloridu amonného (2 x 300 ml), suší (Na_2SO_4) a zakoncentruje. Čištění bleskovou chromatografií s použitím směsi
25 100/0 až 90/10 dichlormethan/ethylacetát poskytlo požadovaný produkt **18e** (3,58 g) v 67% výtěžku.

Krok E



K roztoku **18e** (3,0 g, 6,17 mmol) v methanolu (62 ml) byl přidán octan sodný (1,218 g, 14,8 mmol) a hydroxylaminhydrochlorid (0,774 g, 11,11 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hod. Reakční směs byla zakoncentrována, zředěna dichlormethanem a promyta 0,1N roztokem NaOH. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 95/5 až 92/8 dichlormethan/ethylacetát poskytlo sloučeninu **18f** (1,31 g) v 66% výtěžku.

Krok F

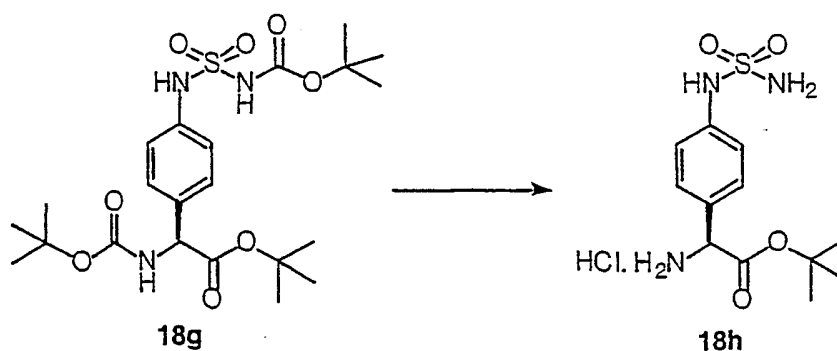


25 K chladnému (-20 °C) roztoku dichlormethanu (2 ml) byl přidán chlorsulfonylisokyanát (0,16 ml, 1,87 mmol). Ke směsi byl přidán terc-butanol (0,18 ml, 1,87 mmol) v dichlormethanu (2 ml) a pomalu zahřát na 0 °C v průběhu 2,5 hod. V tomto čase byl po kapkách přidán roztok

18f (0,6 g, 1,87 mmol) v dichlormethanu (6 ml) s obsahem triethylaminu (0,52 ml, 3,73 mmol). Reakční směs byla zahřáta na laboratorní teplotu v průběhu 12 hod (přes noc). Byl přidán nasycený hydrogenuhličitan sodný a dichlormethan a organická vrstva byla
 5 oddělena, sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována. Čištění bleskovou chromatografií s použitím směsi 95/5 až 90/10 dichlormethan/ethylacetát poskytlo **18g** (0,59 g) v 63% výtěžku.

Krok G

10

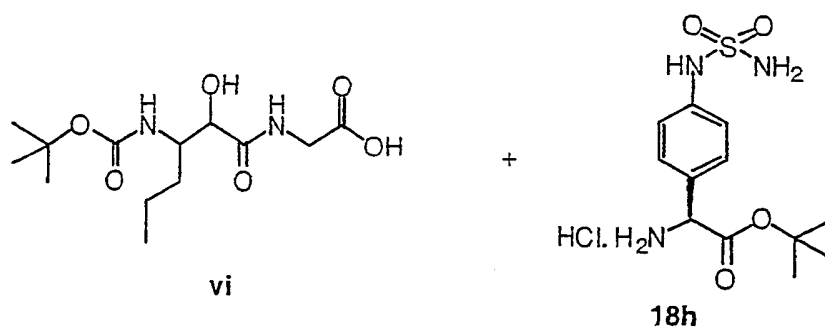


15

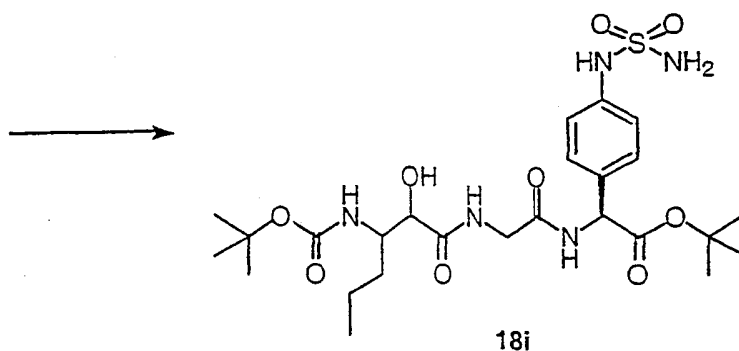
Očekávaný produkt **18h** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok C. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

Krok H

20

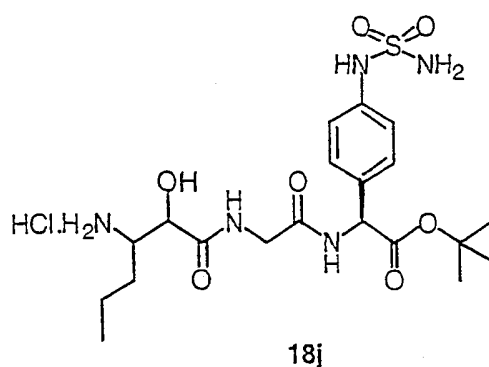
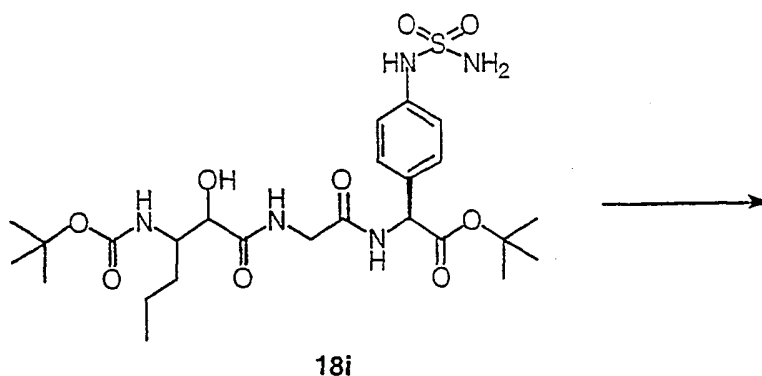


25



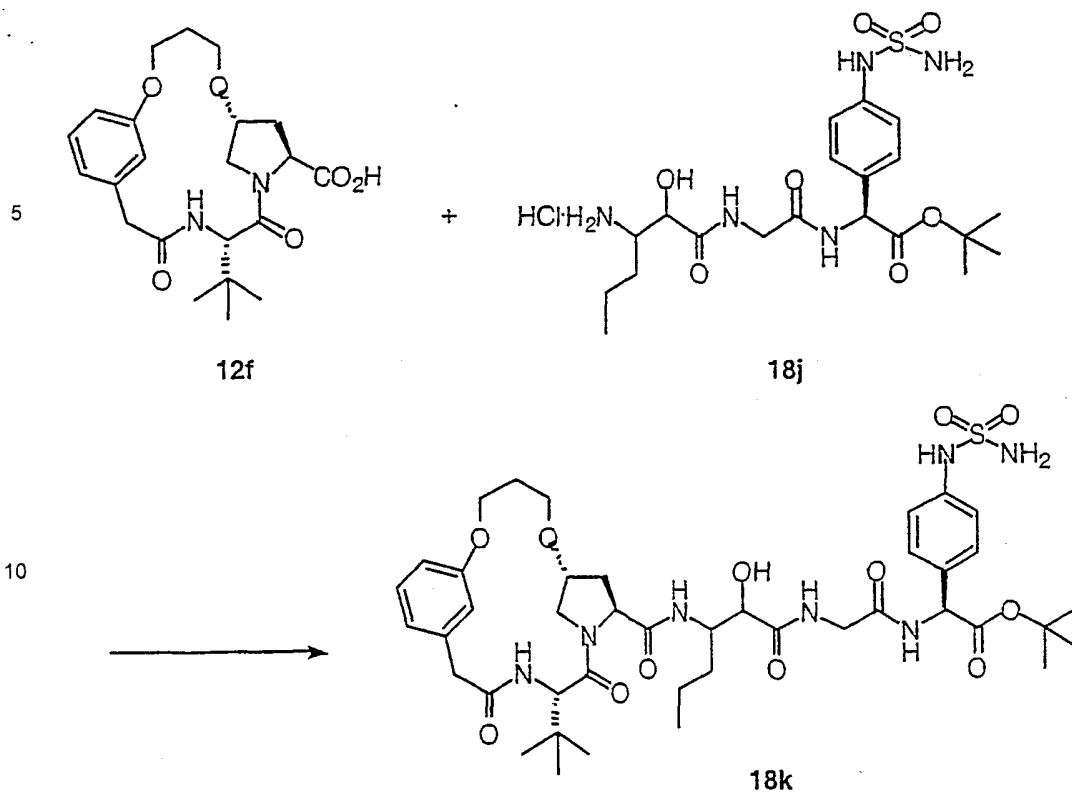
Očekávaný produkt **18i** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok D. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 98/2 až 90/10 dichlormethan/methanol za získání sloučeniny **18i** v 34% výtěžku.

Krok I



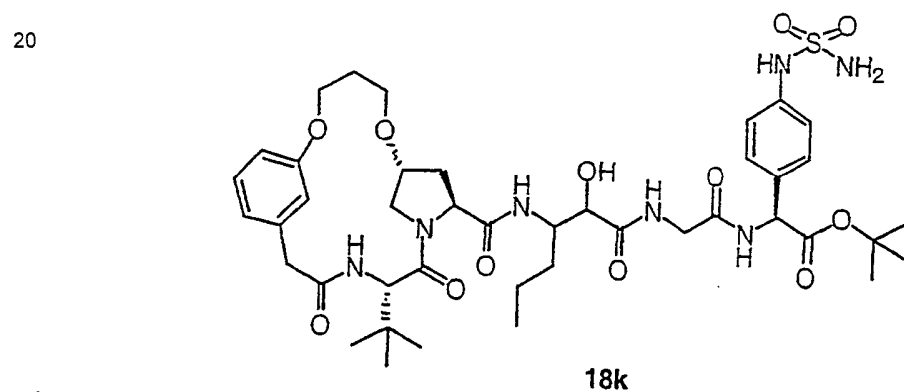
Očekávaný produkt **18j** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok C. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

Krok J

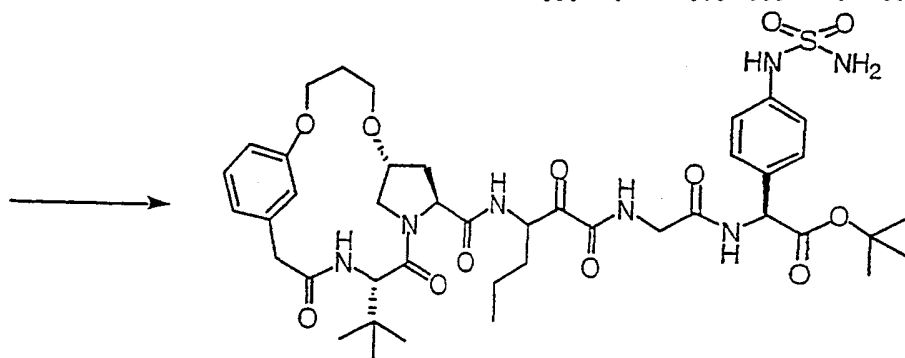


15 Očekávaný produkt **18k** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku.

Krok K



14 · 1102
- 166



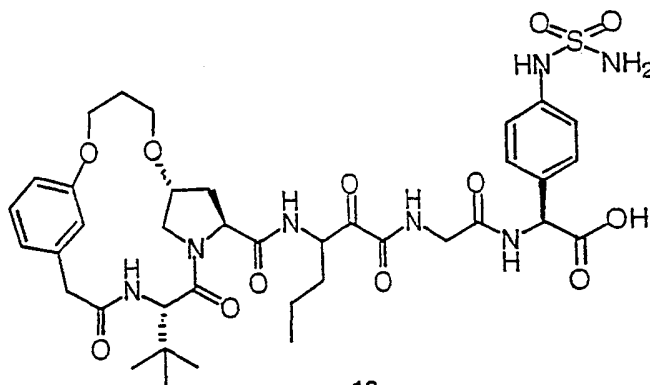
5

18

Požadovaný produkt **18** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 až 92/8 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **11** jako směs diastereomerů ve 13% výtěžku (2 kroky).

10

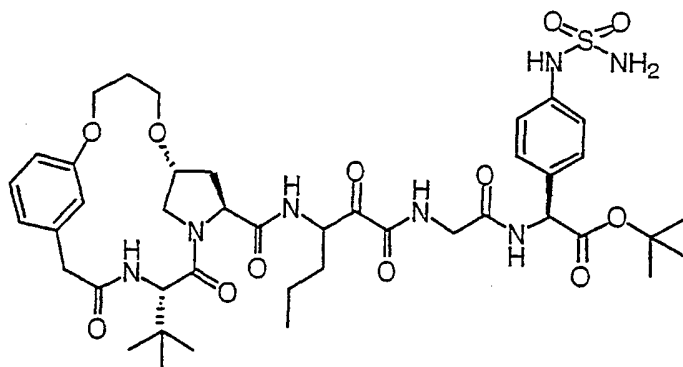
Příklad 19: Příprava sloučeniny vzorce 19



15

19

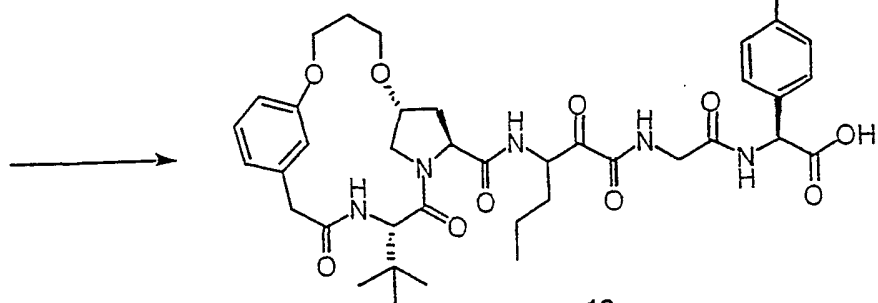
Krok A



25

18

34 · 1102
- 167.7



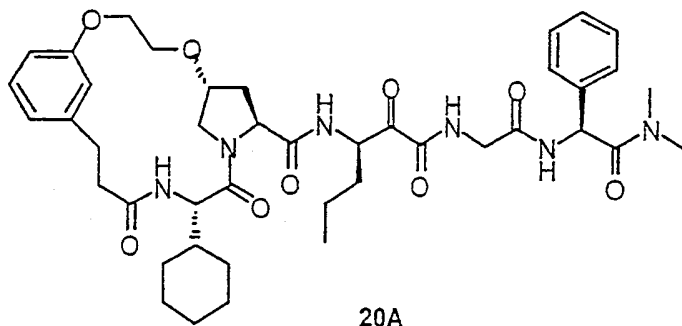
5

19

Očekávaný produkt **19** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 3, krok A, v kvantitativním výtěžku.

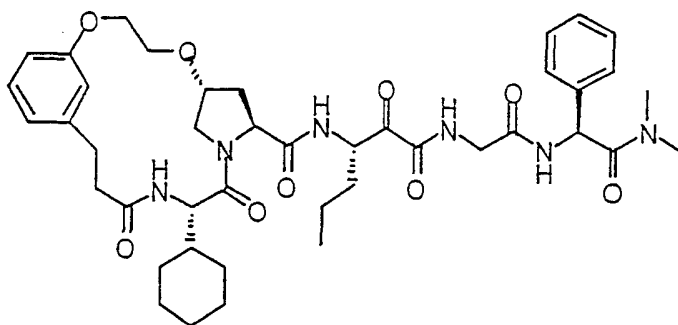
Příklad 20: Příprava sloučenin vzorců **20A** a **20B**

10



20A

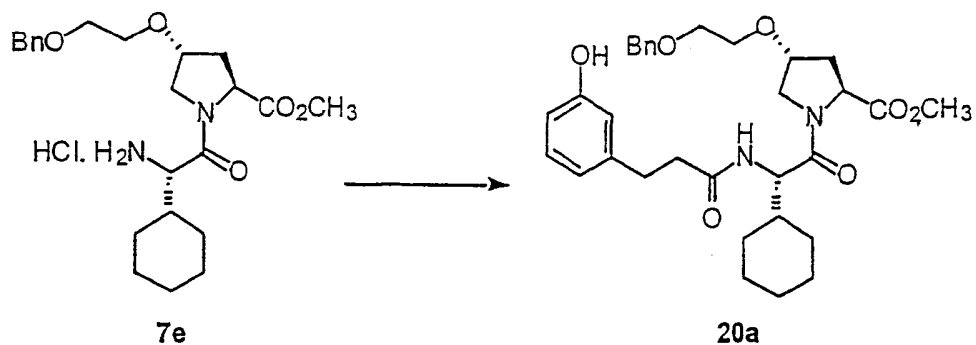
15



20B

20

Krok A



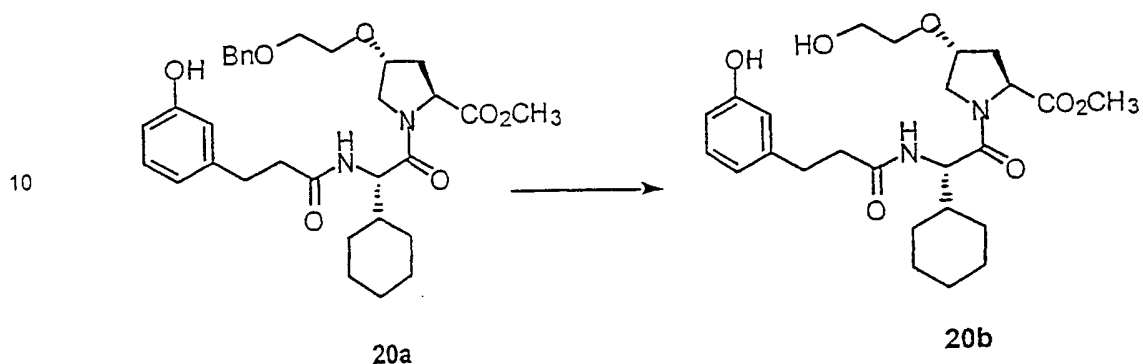
25

7e

20a

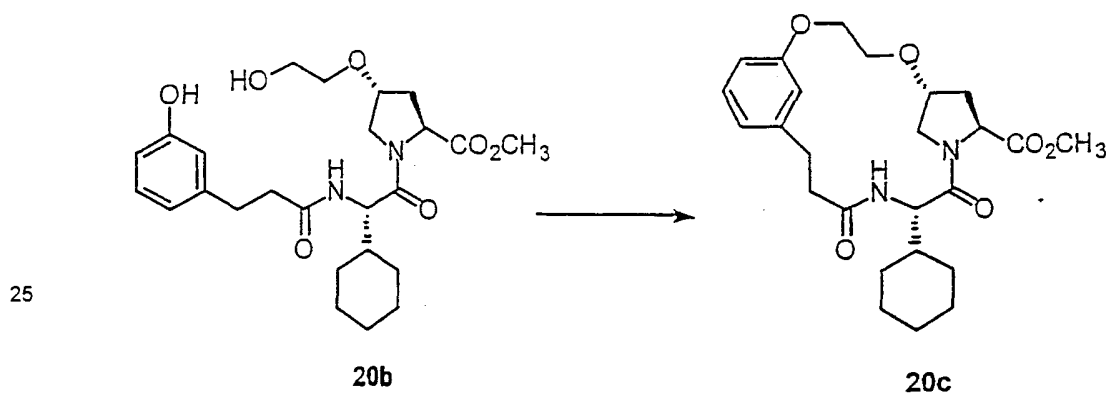
Požadovaný produkt **20a** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/methanol za získání **20a** v 97% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{32}H_{43}N_2O_7$: 567,3070 (M+H)⁺. Nalezeno: 567,3073.

Krok B



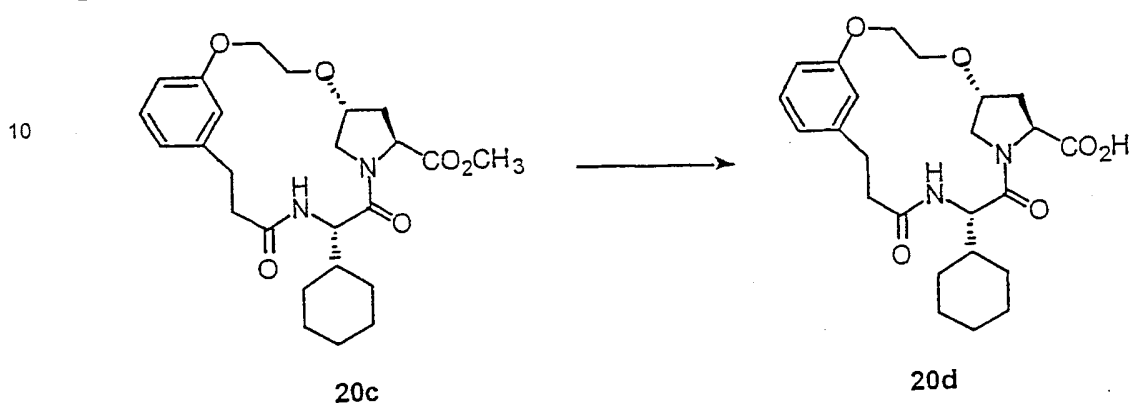
15 Požadovaný produkt **20b** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok G. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 až 96/4 dichlormethan/methanol za získání **20b** v 81 % výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{37}N_2O_7$: 477,2601 (M+H)⁺. Nalezeno: 477,2606.

20 Krok C



Požadovaný produkt **20c** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok H. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **20c** společně s trifenylfosfinoxidem. Tato směs byla převedena do dalšího kroku.
 5 HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{35}N_2O_6$: 459,2495 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 459,2490.

Krok D



15 Požadovaný produkt **20d** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok I. Výtěžek **20d** (2 kroky) = 23 %. ¹H NMR (DMSO-d₆) 0,84 (m, 2H), 1,10 (m, 3H), 1,56 - 1,67 (m, 6H), 1,75 - 1,81 (m, 1H), 2,32 - 2,49 (m, 3H), 2,55 - 2,59 (m, 1H), 2,94 (dt, 1H), 3,50 (dd, 1H), 3,56 - 3,65 (m, 2H), 3,99 (dd, 1H), 4,06 - 4,23 (m, 4H), 4,37 (t, 1H),
 20 6,64 - 6,74 (m, 3H), 7,08 (zdánl. t, 1H), 7,95 (d, 1H), 12,30 (br. s, 1H); ¹³C NMR δ (DMSO-d₆) 25,25, 25,97, 28,30, 28,55, 30,61, 33,77, 36,04, 39,41, 52,52, 54,02, 57,22, 66,38, 68,03, 77,49, 114,75, 115,37, 121,14, 128,86, 142,66, 158,92, 169,87, 170,83, 172,99; HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{24}H_{33}N_2O_6$: 445,2339 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 445,2343.

Krok E



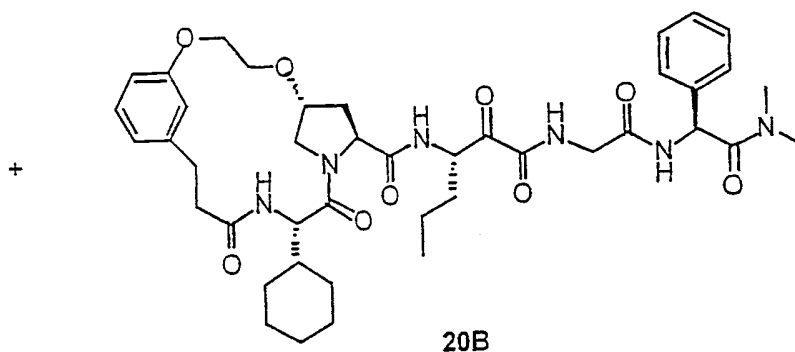
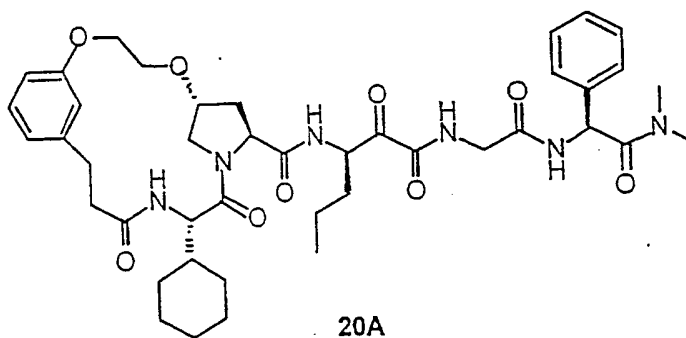
10

15

Krok F



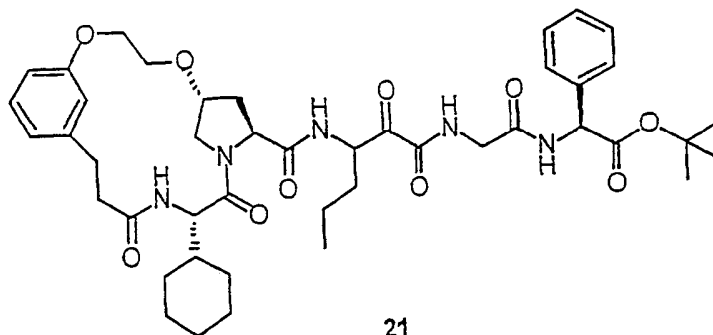
25



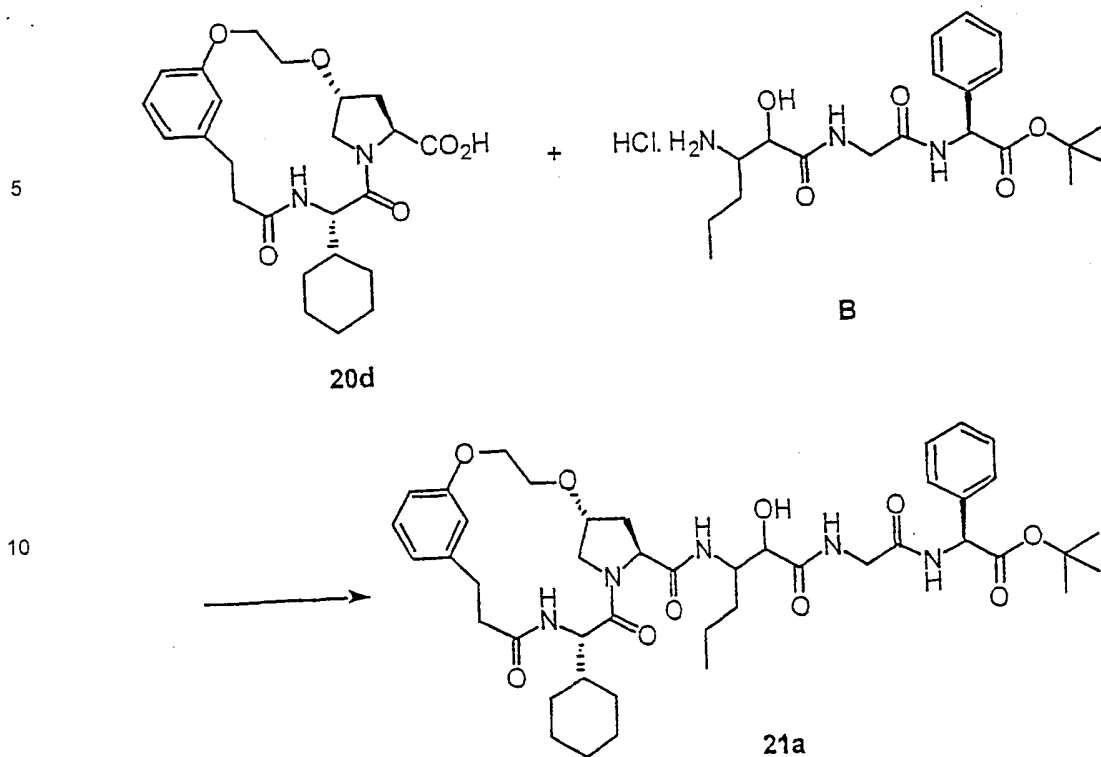
Požadované produkty **20A** a **20B** byly získány protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 98/2 dichlormethan/methanol poskytlo oddělené isomery **20A** a **20B**, a směs. Kombinovaný výtěžek = 50 % (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{42}H_{57}N_6O_9$: 789,4187 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 789,4179 (**20A**) a 789,4187 (**20B**).

15

20 Příklad 21: Příprava sloučeniny vzorce **21**

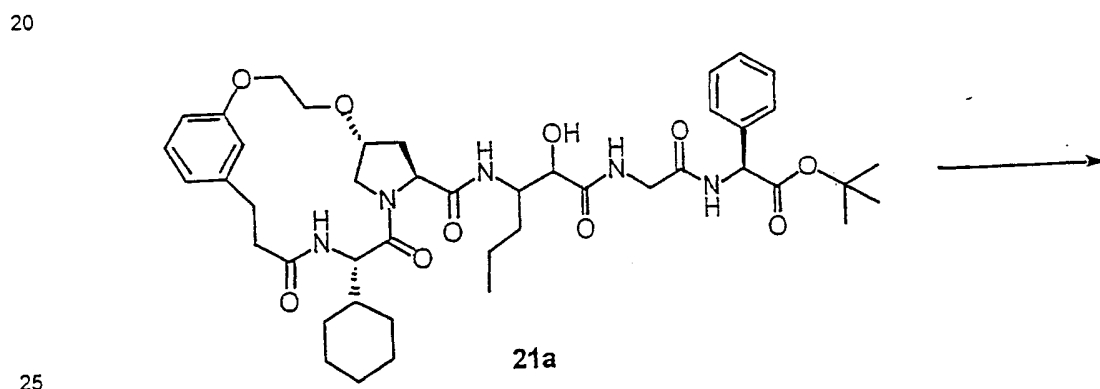


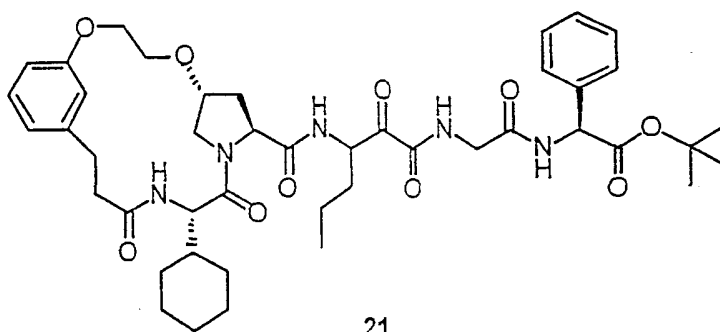
Krok A



15 Očekávaný produkt **21a** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 2, krok A. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku.

Krok B

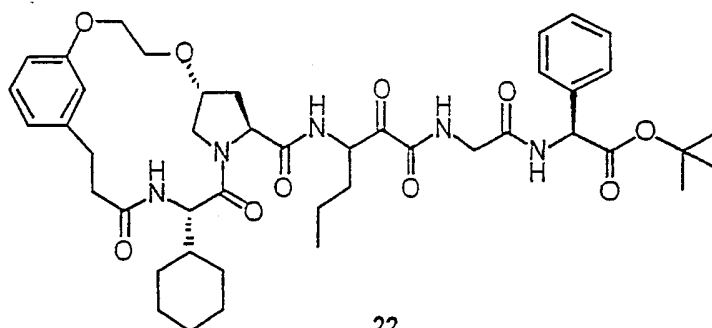




21

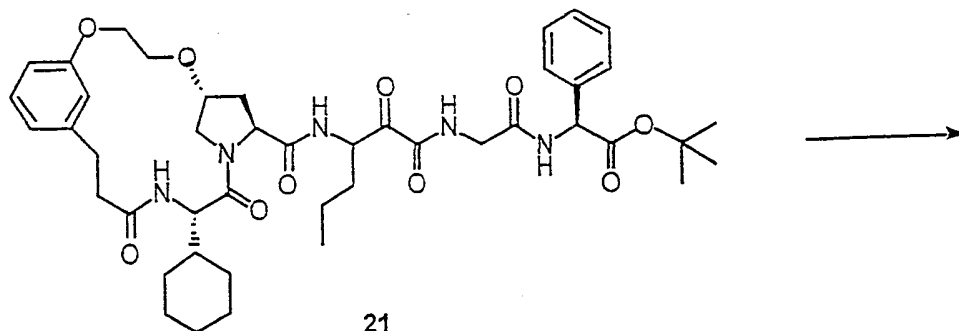
Požadovaný produkt **21** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 2, krok B. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 98/2 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **21** v 38% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{44}H_{60}N_5O_{10}$: 818,4340 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 818,4329.

Příklad 22: Příprava sloučeniny vzorce 22



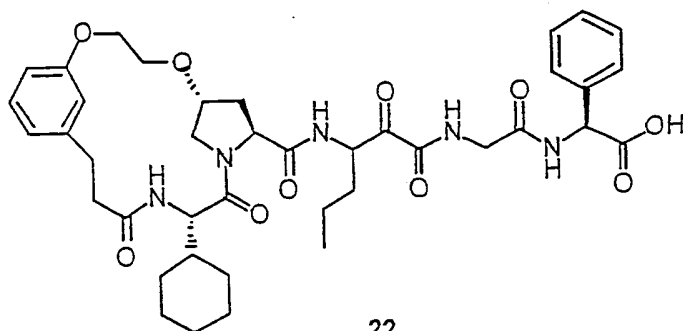
22

Krok A



21

- 174 · 1102

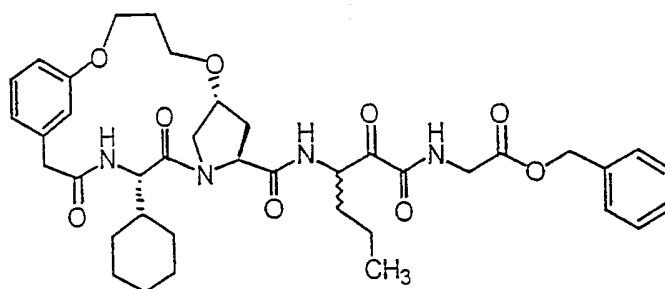


22

5

Očekávaný produkt **22** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 3, krok A, v kvantitativním výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{52}N_5O_{10}$: 762,3714 (M+H)⁺. Nalezeno: 762,3722.

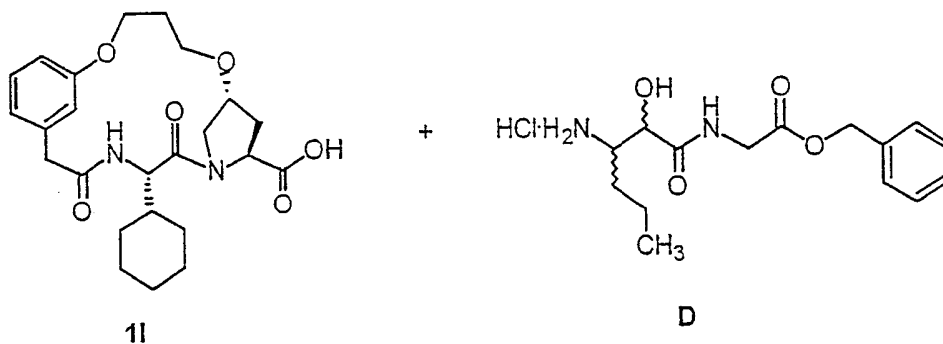
10 Příklad 23: Příprava sloučeniny vzorce 23



23

15

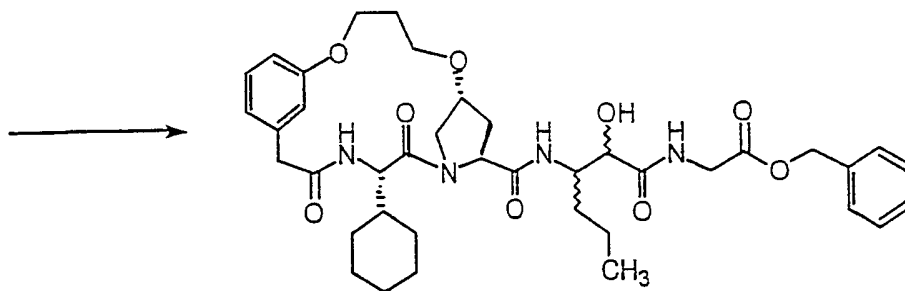
Krok A



11

D

20

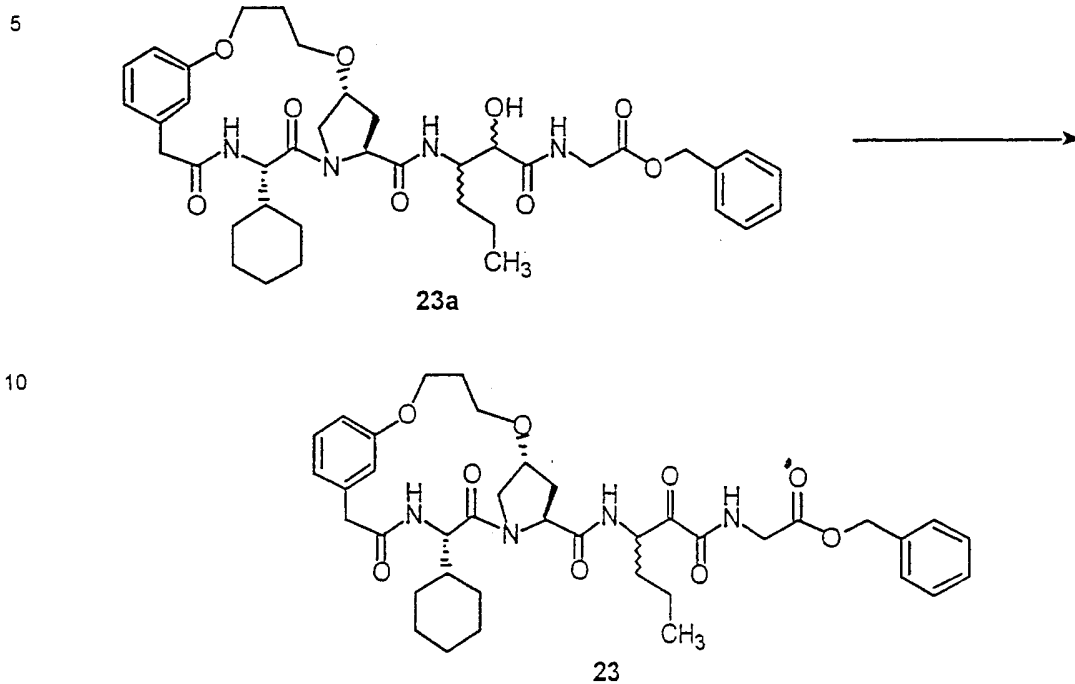


23a

25

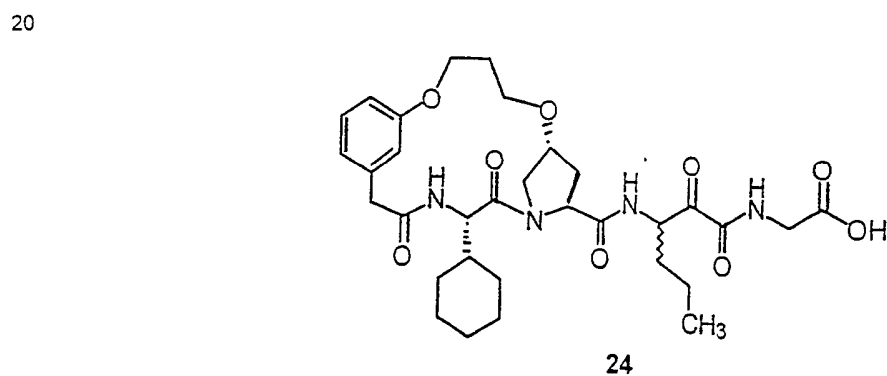
Požadovaná sloučenina **23a** byla připravena v 58% výtěžku ze sloučeniny **11** a **D** způsobem popsáným v příkladu 1, krok J.

Krok B



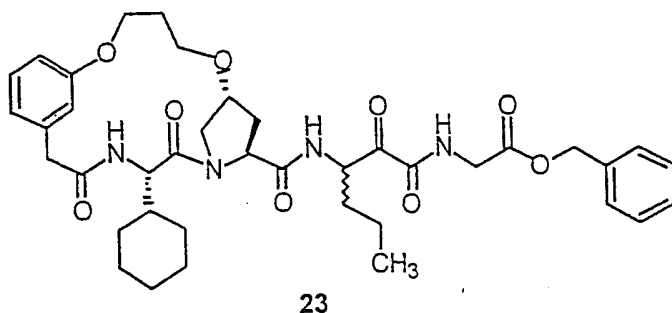
Požadovaná sloučenina **23** byla připravena v 79% výtěžku ze sloučeniny **23a** způsobem popsáným v příkladu 1, krok K.

Příklad 24: Příprava sloučeniny vzorce **24**

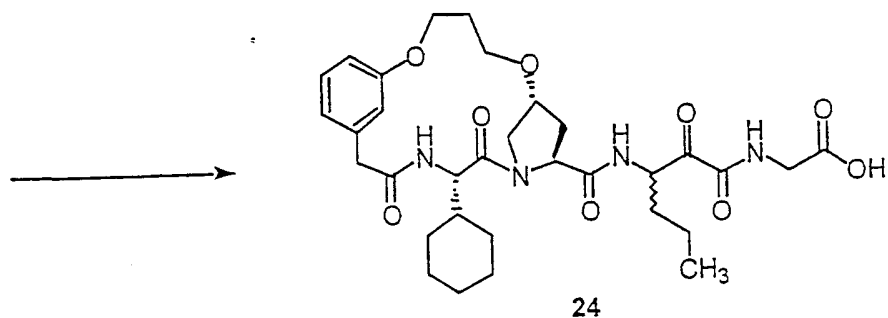


Krok A

5



10



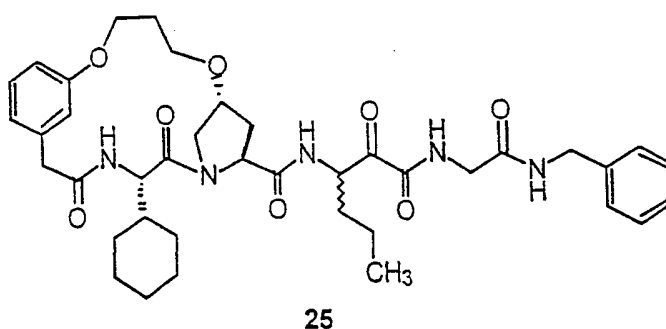
15

Roztok benzylesteru **23** (80 mg, 0,11 mmol) v ethanolu (30 ml) a methanolu (15 ml) byl míchán při laboratorní teplotě 3 hod v atmosféře vodíku v přítomnosti paladia na uhlí (50 mg). Postup reakce byl monitorován TLC. Po opatrném zfiltrování přes lože celitu byla rozpouštědla odstraněna ve vakuu za poskytnutí bílé pevné látky (67 mg, kvant.).

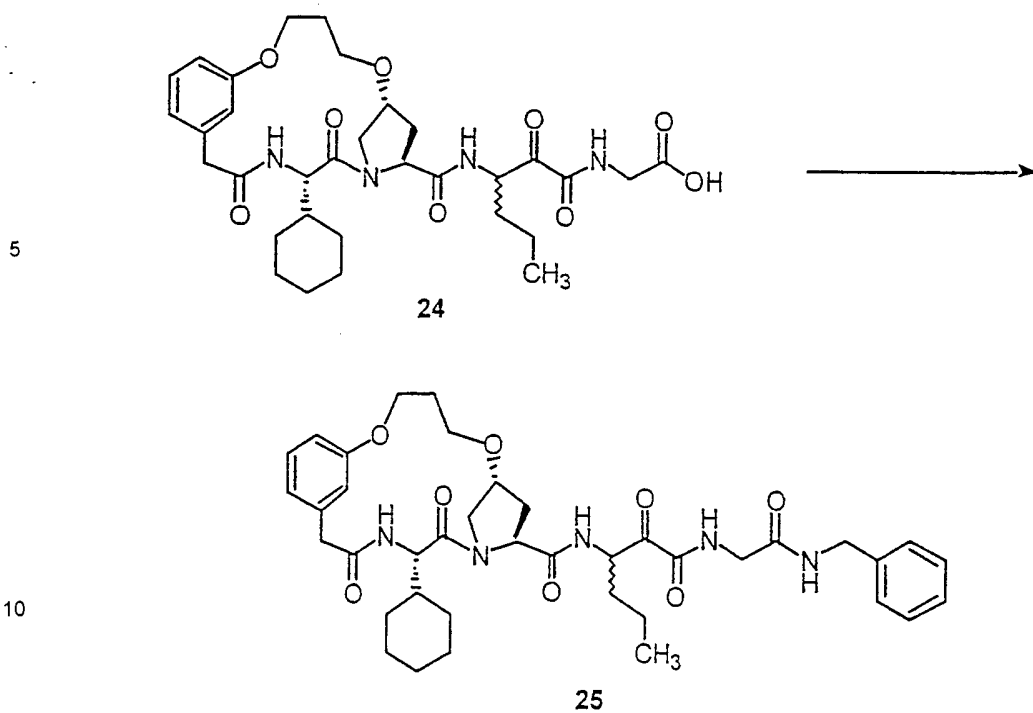
20

Příklad 25: Příprava sloučeniny vzorce 25

25



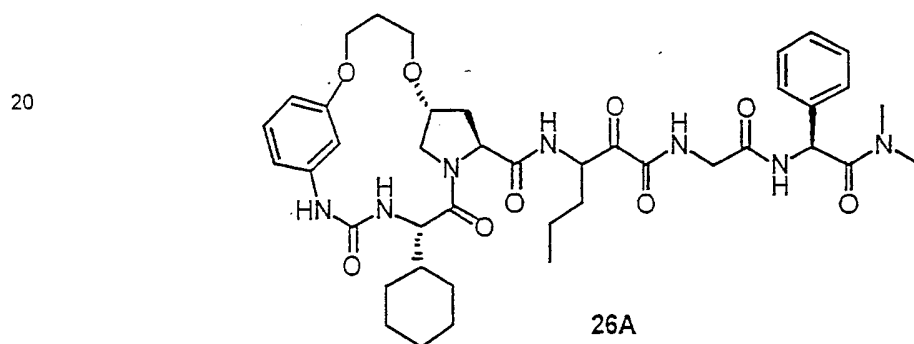
Krok A

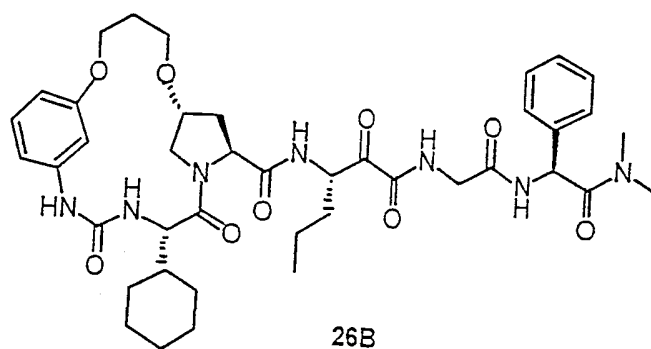


Požadovaná sloučenina **25** byla připravena v 53% výtěžku ze sloučeniny **24** způsobem popsaným v příkladu 1, krok J, přičemž

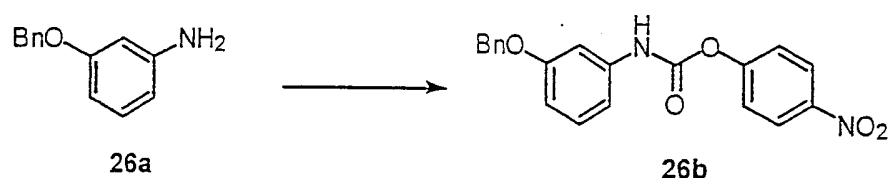
15 benzylamin byl použit místo aminu **A**.

Příklad 26: Příprava sloučenin vzorců **26A** a **26B**



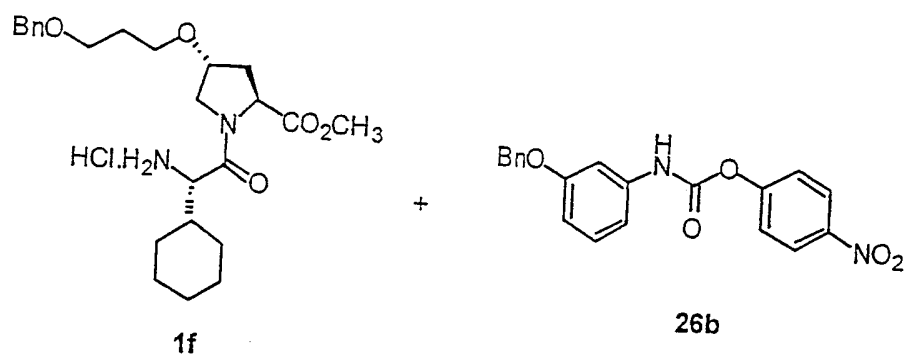


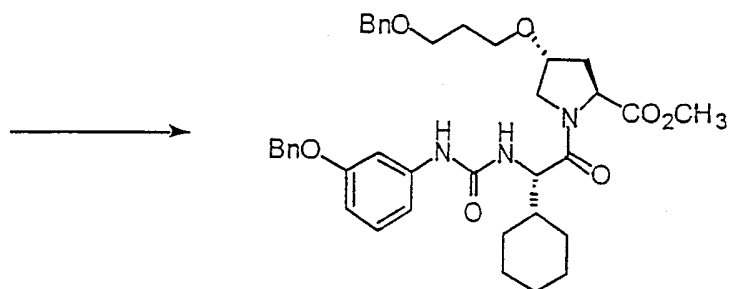
Krok A



K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **26a** (4,0 g, 20 mmol) v THF/MeCN (35/5 ml) byl přidán 4-nitrofenylchlorformát (4,86 g, 24 mmol) a potom pyridin (1,9 ml, 24 mmol). Reakční směs byla zahřata na teplotu laboratoře v průběhu 4,5 hod. Reakce byla monitorována až do spotřebování sloučeniny **26a** (bylo zapotřebí přidávat další množství druhých dvou činidel). Reakce byla ukončena přidáním vody, organické vrstvy byly odděleny, promyty roztokem soli, sušeny (Na₂SO₄), a odpařeny ve vakuu za získání produktu **26b**. Tento material měl dostatečnou čistotu pro další studie.

Krok B

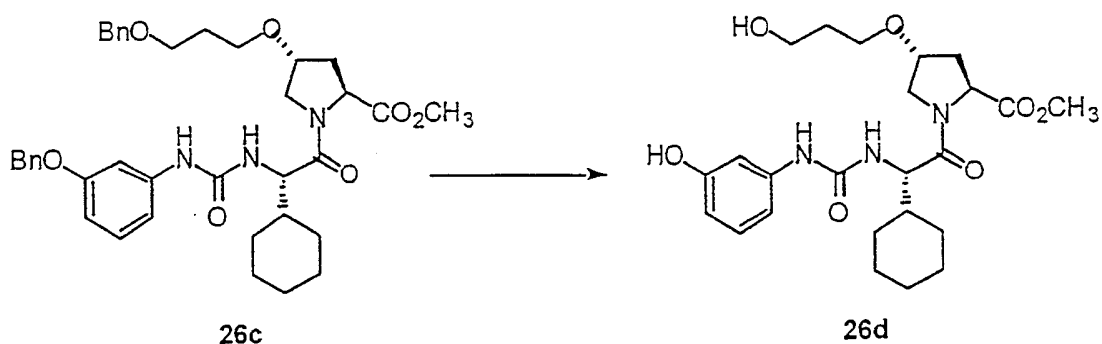




26c

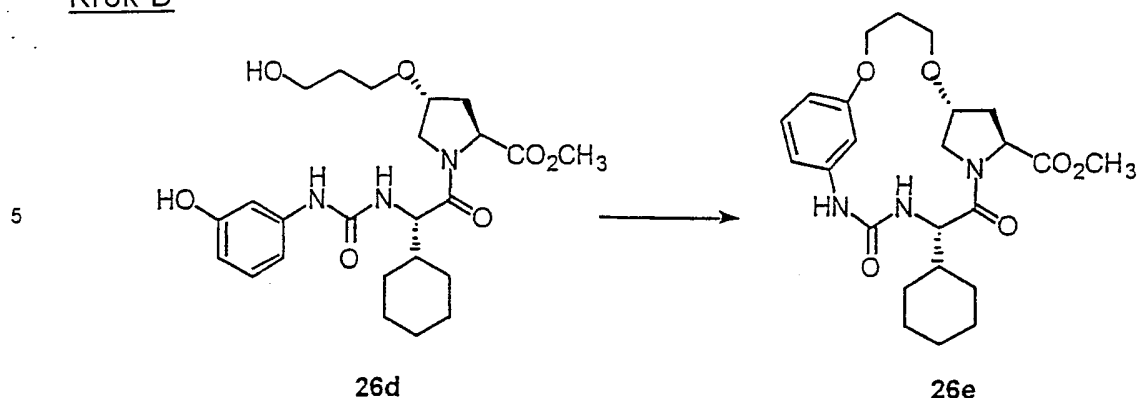
K roztoku **1f** (2,3 g, 5,1 mmol) ve směsi dichlormethan/DMF (25/5 ml) při 0 °C byla přidána **26b** (2,24 g, 6,1 mmol), potom triethylamin (0,86 ml, 6,1 mmol). Bylo přidáno několik krystalů imidazolu a reakční směs byla uchována při -8 °C 16 hod. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem, promyta nasyceným hydrogenuhličitánem sodným, 10% vodným roztokem kyseliny citronové, sušena (Na₂SO₄) a odpařena ve vakuu. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 70/30 dichlormethan/ethylacetát za získání **26c** (1,2 g, 38% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₃₈H₄₈N₃O₇: 658,3492 (M+H)⁺. Nalezeno: 658,3483.

Krok C



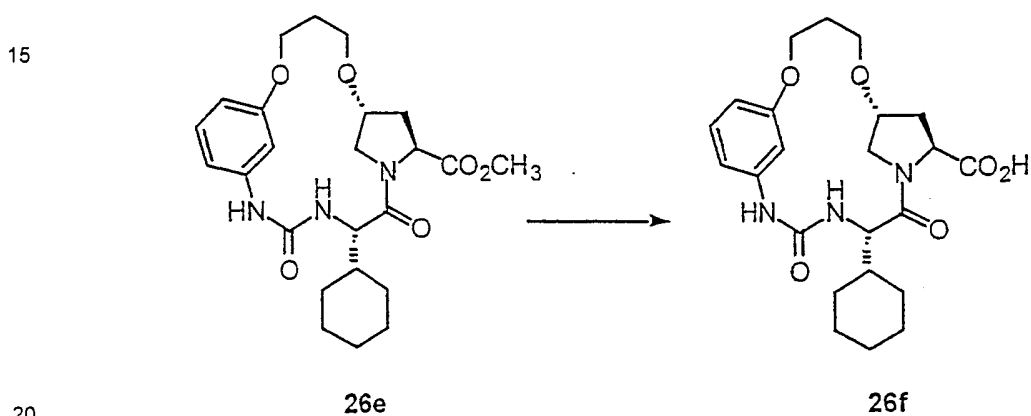
Požadovaný produkt **26d** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok G. Surový materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₂₄H₃₆N₃O₇: 478,2553 (M+H)⁺. Nalezeno: 478,2547.

Krok D



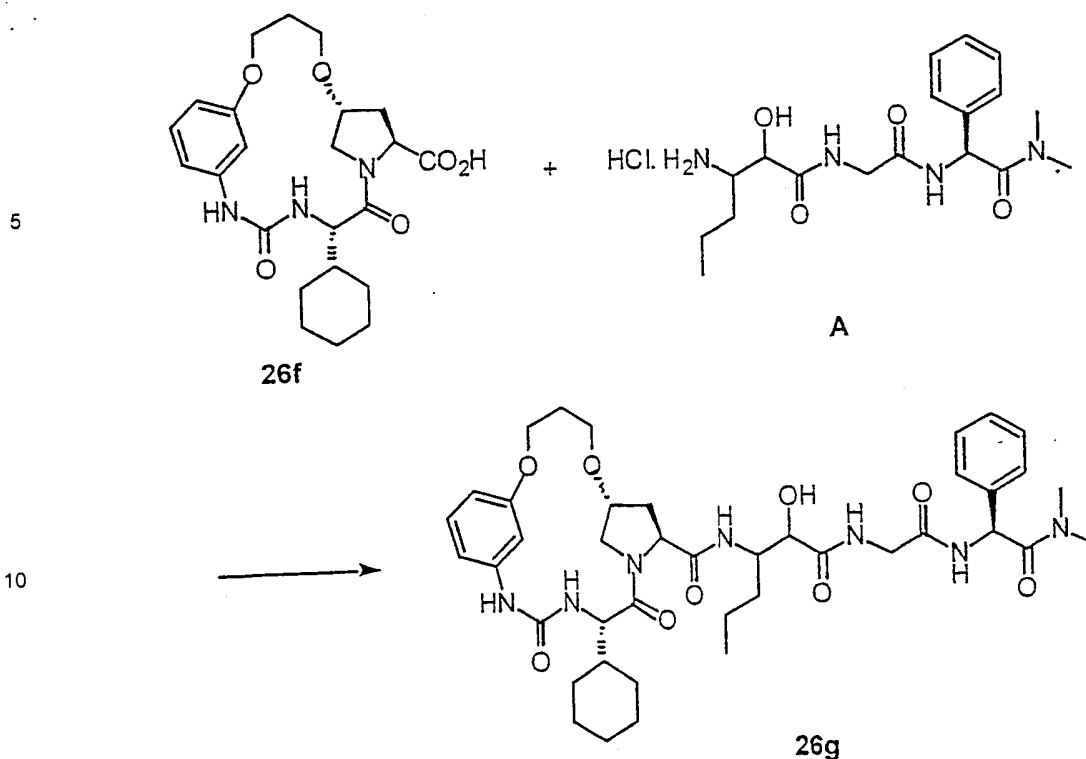
10 Požadovaný produkt **26e** byl získán způsobem popsáním pro
příklad 1, krok H. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi
99/1 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **26e** spolu
s trifenyfosfinoxidem. Tato směs byla převedena do dalšího kroku.

Krok E



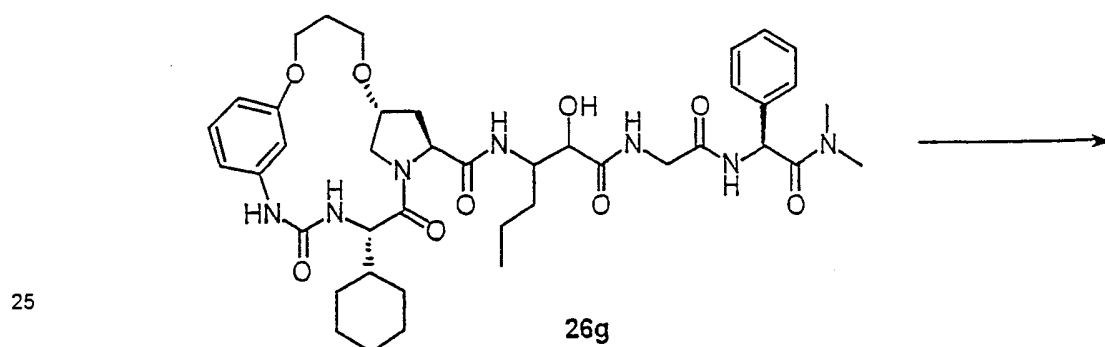
Požadovaný produkt **26f** byl získán způsobem popsáním pro
příklad 1, krok I. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{23}H_{32}N_3O_6$: 446,2291
($M+H$)⁺. Nalezeno: 446,2290.

Krok F

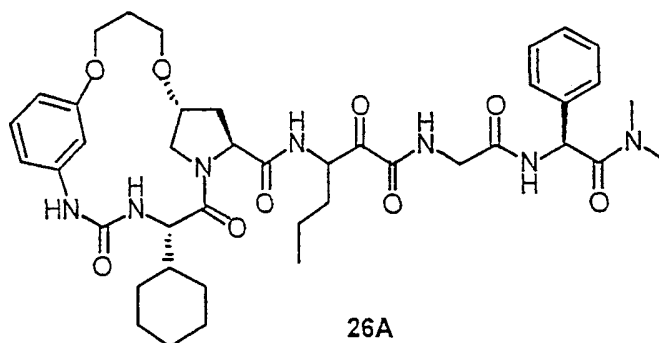


Požadovaný produkt **26g** byl získán způsobem popsáním pro
 15 příklad 1, krok J. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií
 na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/methanol za získání
26g v 31% výtěžku (3 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₄₁H₅₈N₇O₉:
 792,4296 (M+H)⁺. Nalezeno: 792,4284.

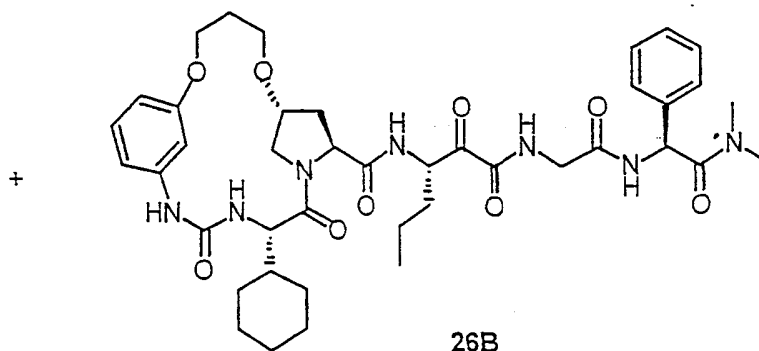
Krok G



5



10

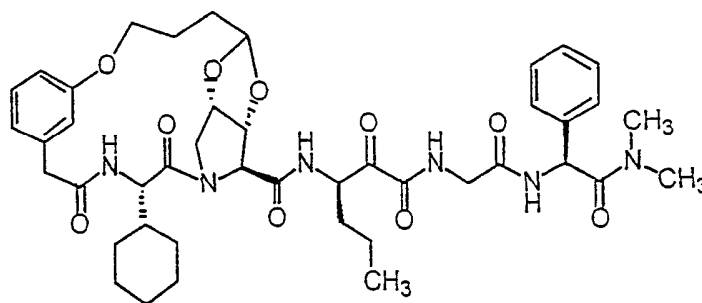


15

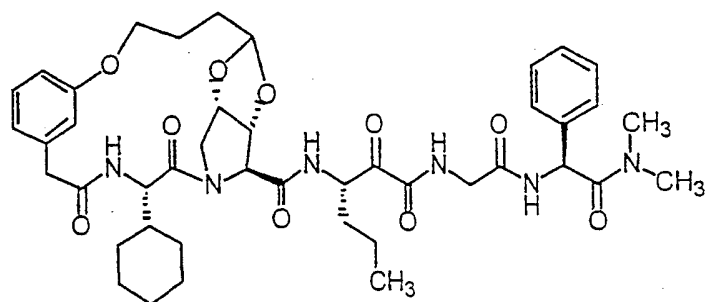
Požadované produkty **26A** a **26B** byly získány způsobem popsaným pro příklad 1, krok K. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 až 95/5 dichlormethan/methanol poskytlo **26A** (jako směs) a **26B** (čistý isomer s nižší hodnotou R_f). Kombinovaný výtěžek = 25 %.

Příklad 27: Příprava sloučeniny 27

20

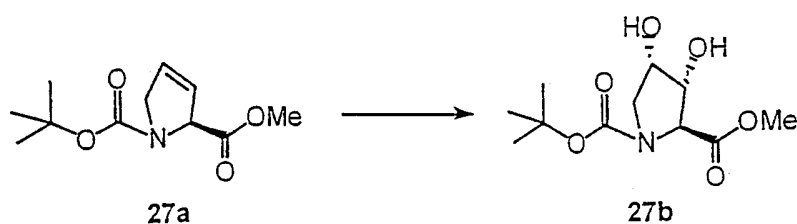


25



27B

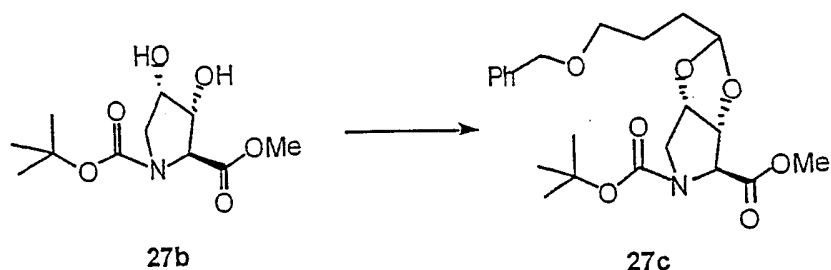
Krok A



Ke směsi Boc-3,4-didehydropyrrolin-OMe (**27a**, 5,30 g, 23,4 mmol), *N*-methylnmorpholin-*N*-oxidu (4,75 g, 35,1 mmol) v acetonu (10 ml) a vody (15 ml) byl při teplotě laboratoře přidán oxid osmičelý (10 ml) a vody (15 ml) byl při teplotě laboratoře přidán oxid osmičelý v terc-butanolu (2,5% hmotn./hmotn., 3,5 ml, 0,344 mmol). K tomuto kalnému roztoku byl přidáván THF, až byla směs téměř homogenní. Po míchání při laboratorní teplotě přes noc byl přidán nasycený roztok vodného thiosíranu sodného (30 ml) byl přidán a o 10 min později EtOAc (300 ml) a roztok soli (80 ml). Po oddělení vrstev byl roztok extrahován EtOAc (2 x 100 ml). Organické roztoky byla spojeny, sušeny (MgSO₄), zfiltrvány a zakoncentrovány ve vakuu za poskytnutí tmavé kapaliny. Blesková chromatografie (4 až 8 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27b** (4,73 g, 18,1 mmol, 77 %) jako olej.

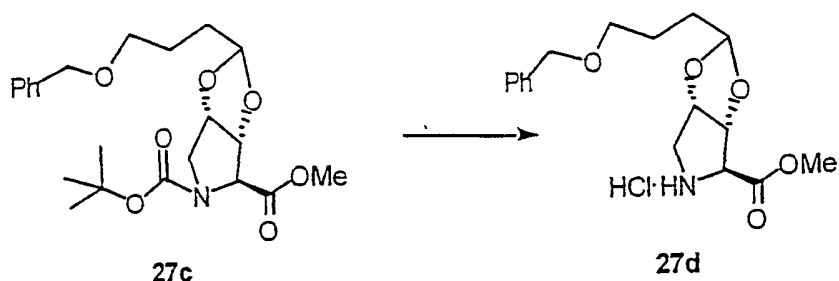
Krok B

5



K suspenzi diolu **27b** (1,6 g, 6,12 mmol), síranu hořečnatého (4,0 g, 33,2 mmol) a 3-benzyloxypropionaldehydu (2,32 g, 13,0 mmol) v bezvodém CH_2Cl_2 (60 ml) byla při 0 °C přidána kyselina p-toluensulfonová (150 mg, 1,01 mmol). Získaná směs byla důkladně
10 míchána a ponechána ohřát na laboratorní teplotu spolu s vodní lázní přes noc (18 hod). Byly přidány nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného (60 ml), voda (30 ml) a CH_2Cl_2 (100 ml) a vrstvy byly odděleny. Vodný roztok byl extrahován CH_2Cl_2 (2 x 100 ml) a spojený
15 organický roztok byl sušen (MgSO_4), zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu za poskytnutí bezbarvého oleje. Blesková chromatografie (5 až 15 % $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) poskytla sloučeninu **27c** (2,35 g, 5,57 mmol, 91 %) jako olej.

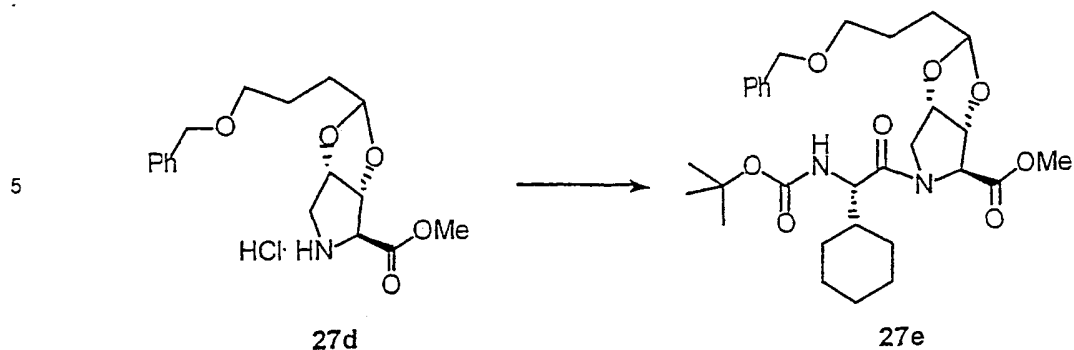
20 Krok C



25

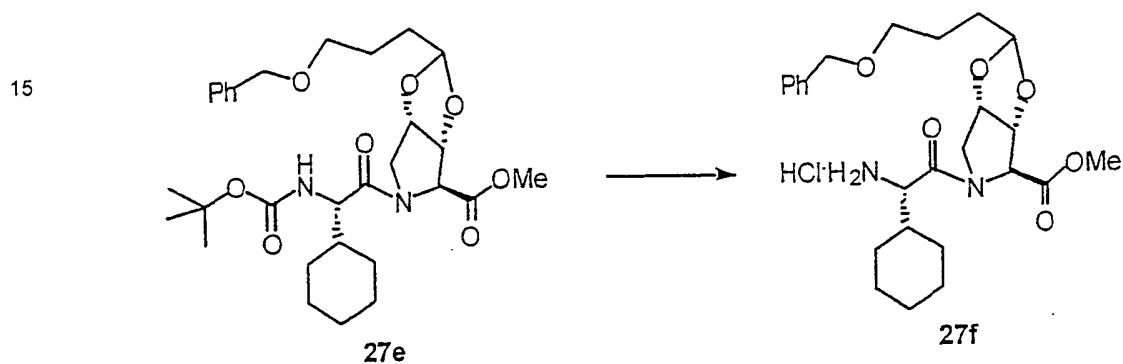
Požadovaná sloučenina **27d** byla připravena ze sloučeniny **27c** způsobem popsáným v příkladu 1, krok C. Byla použita v následující reakci bez dalšího čištění.

Krok D



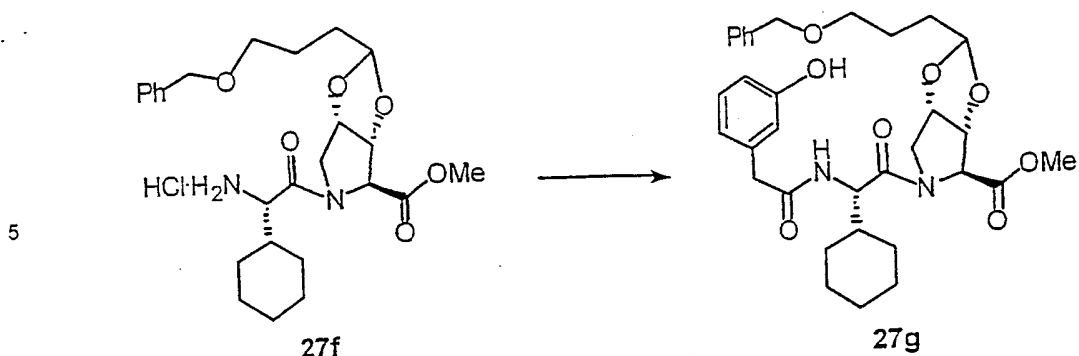
10 Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27d** způsobem popsáným v příkladu 1, krok D. Blesková chromatografie (8 až 20 % EtOAc/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27e**.

Krok E



20 Požadovaná sloučenina **27f** byla připravena ze sloučeniny **27e** způsobem popsáným v příkladu 1, krok E. Byla použita v následující reakci bez dalšího čištění.

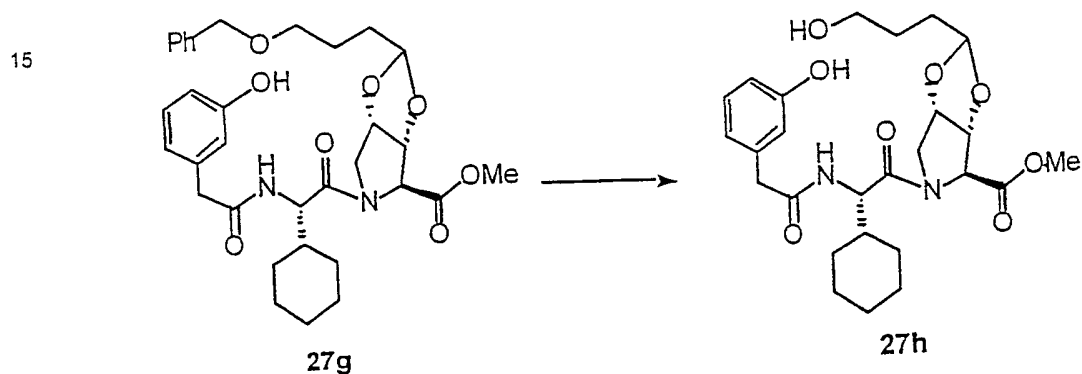
Krok F



Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27f** způsobem popsáným v příkladu 1, krok F. Blesková chromatografie (8 až 20 % EtOAc/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27g** (36 %, 4 kroky). HRMS *m/z* 595,3014 [vypočteno pro C₃₃H₄₂N₂O₈, 595,3019].

10

Krok G

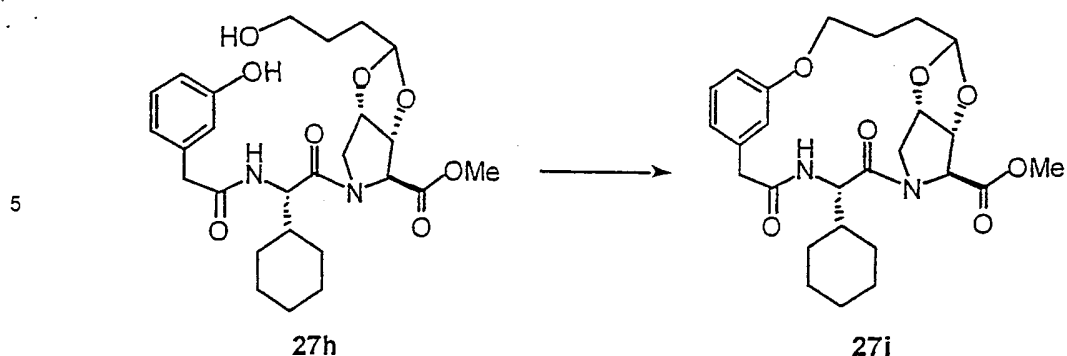


20

Požadovaná sloučenina byla připravena v kvantitativním výtěžku ze sloučeniny **27g** způsobem popsáným v příkladu 1, krok G. Blesková chromatografie (3 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27h** jako bílou pevnou látku. HRMS *m/z* 595,2553 [vypočteno pro C₂₆H₃₆N₂O₈, 595,2550].

25

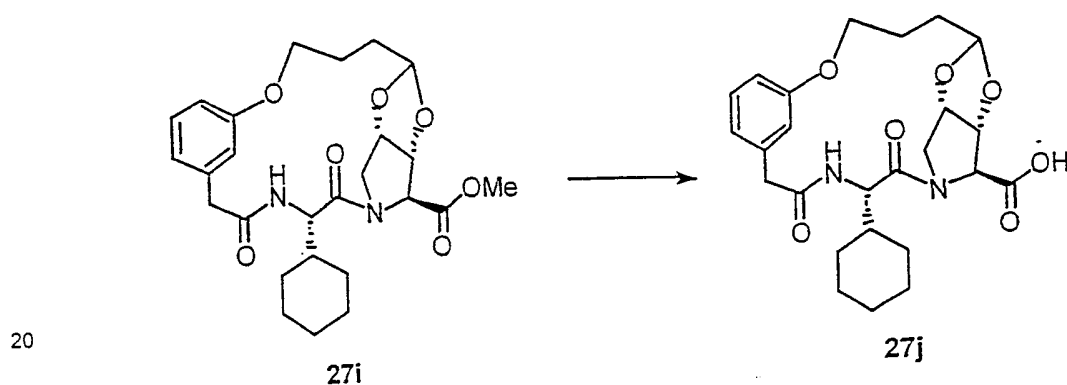
Krok H



10 Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27h** způsobem popsáným v příkladu 1, krok H. Blesková chromatografie (3 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27i** jako směs s trifenyfosfinoxidem, která byla hydrolyzována.

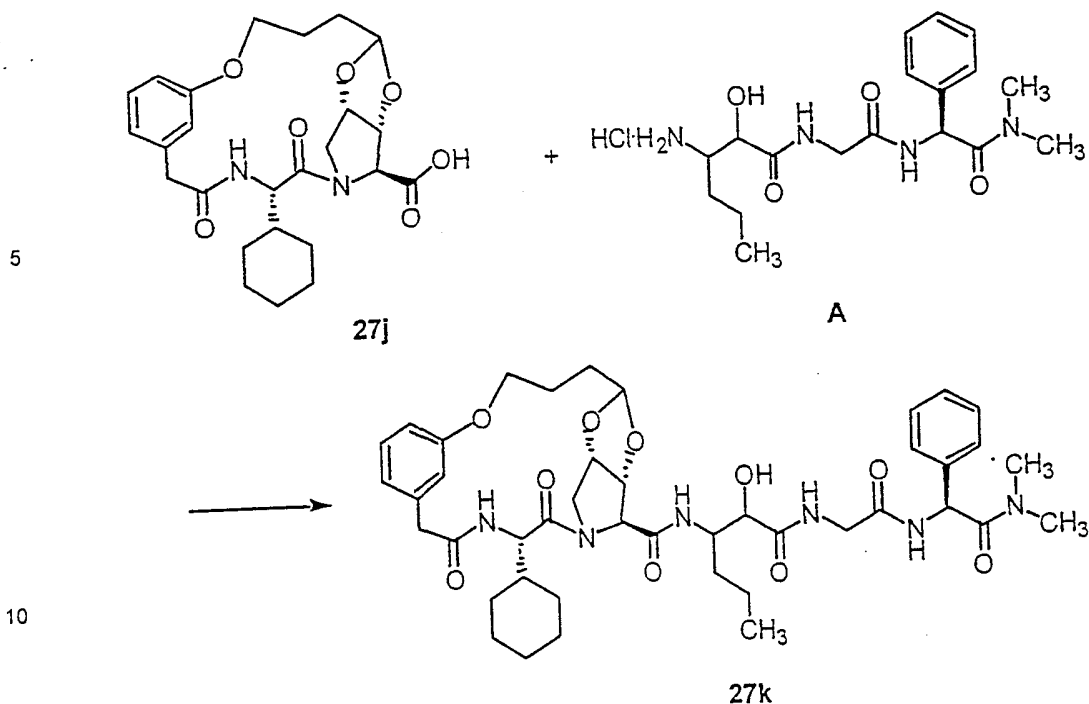
Krok I

15



Požadovaná sloučenina byla připravena (72%, 2 kroky) ze sloučeniny **27i** způsobem popsáným v příkladu 1, krok I.

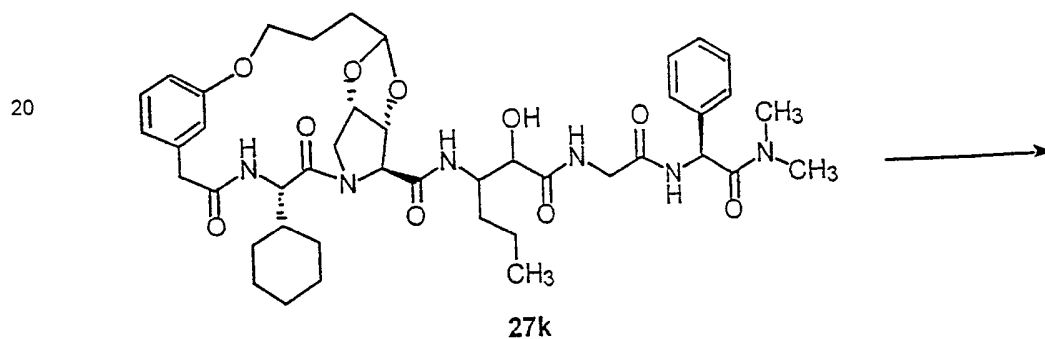
Krok J

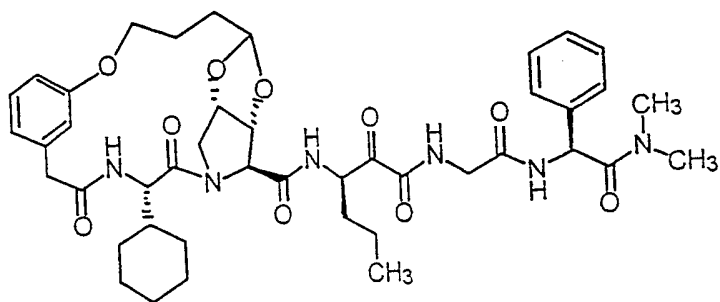


Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27j** způsobem popsaným v příkladu 1, krok J. Blesková chromatografie (3 až 6 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **27k** (69 %) jako směs diastereomerů.

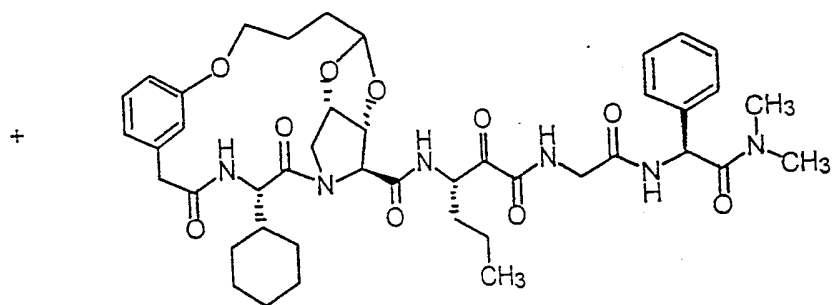
15

Krok K





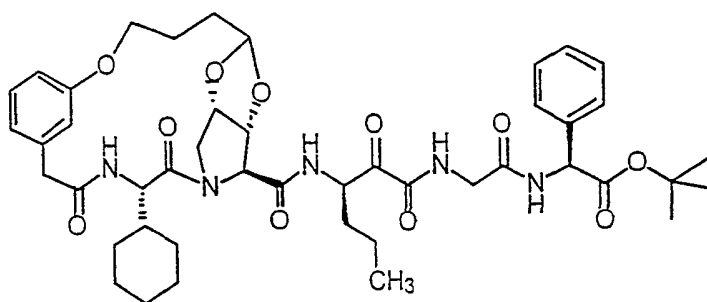
27A



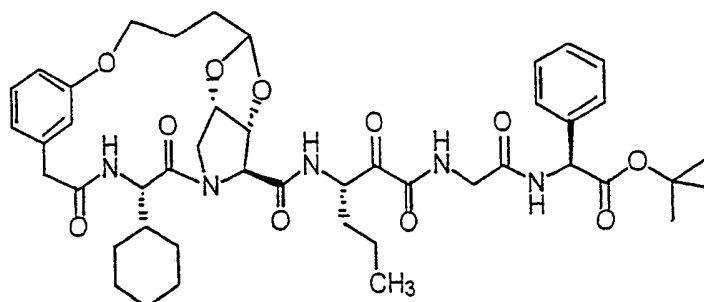
27B

Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27k** způsobem popsáným v příkladu 1, **krok K**. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla čisté sloučeniny **27A** a **27B**.

Příklad 28: Příprava sloučeniny 28

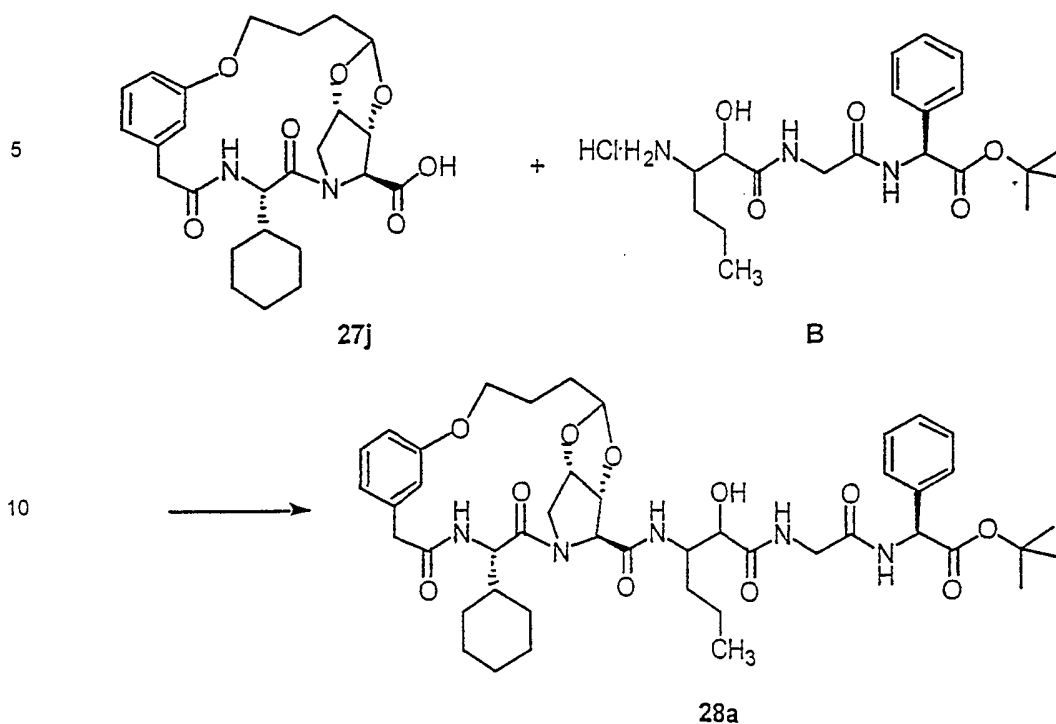


28A



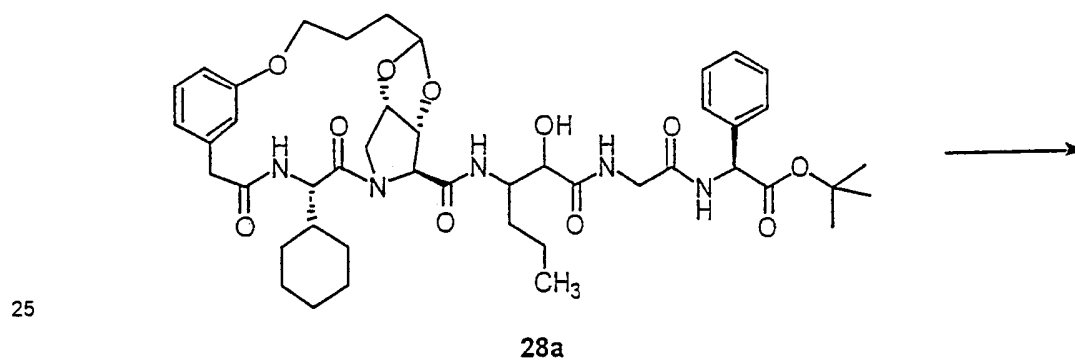
28B

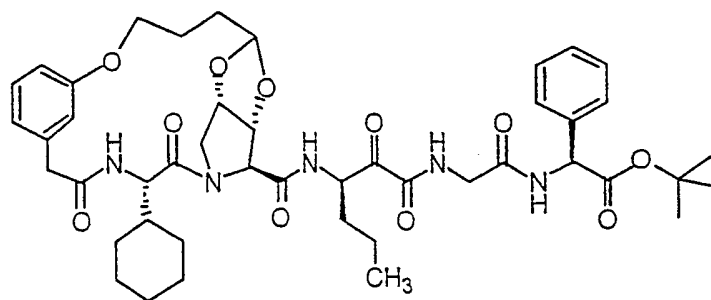
Krok A



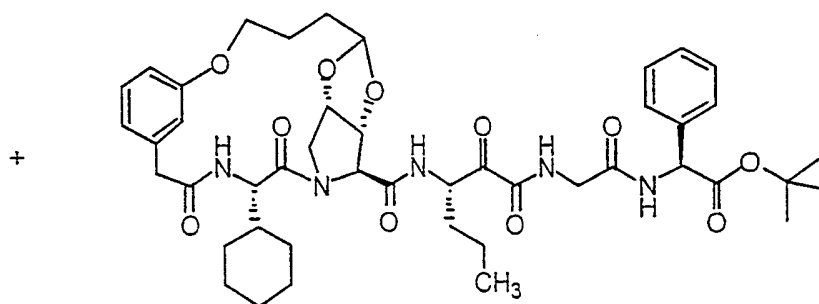
15 Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **27j** způsobem popsáným v příkladu 2, krok A. Blesková chromatografie (3 až 6 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **28a** (50 %) jako směs nerozdělitelných diastereomerů.

20 Krok B





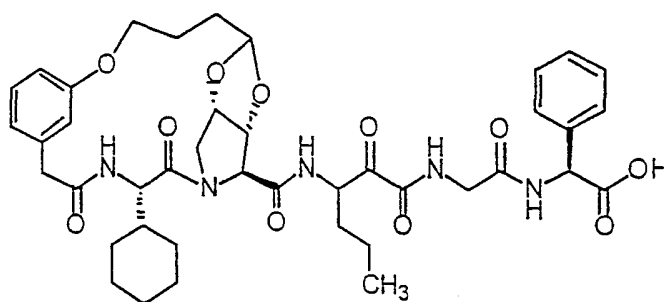
28A



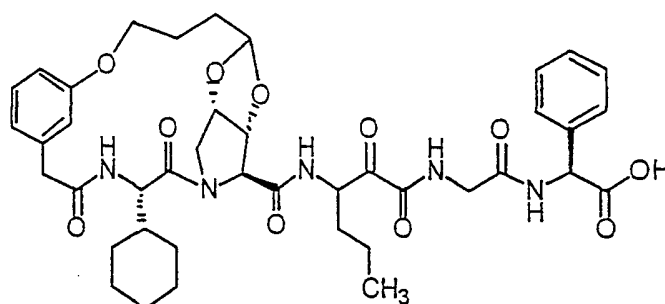
28B

Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **28a** způsobem popsáným v příkladu 2, **krok B**. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeniny **28A** a **28B**.

Příklad 29: Příprava sloučeniny 29

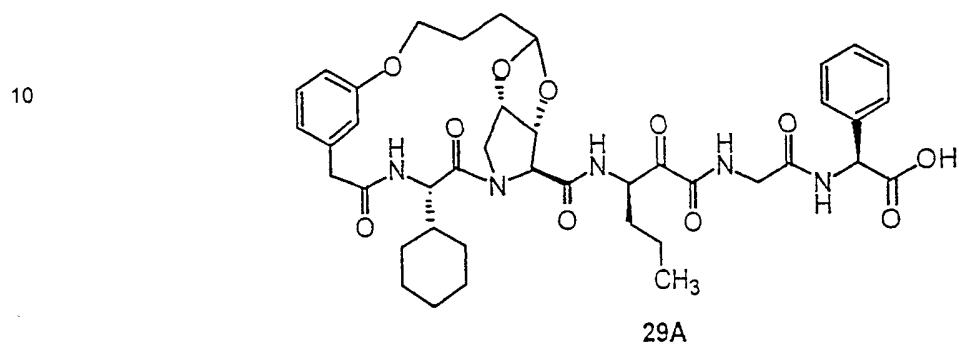
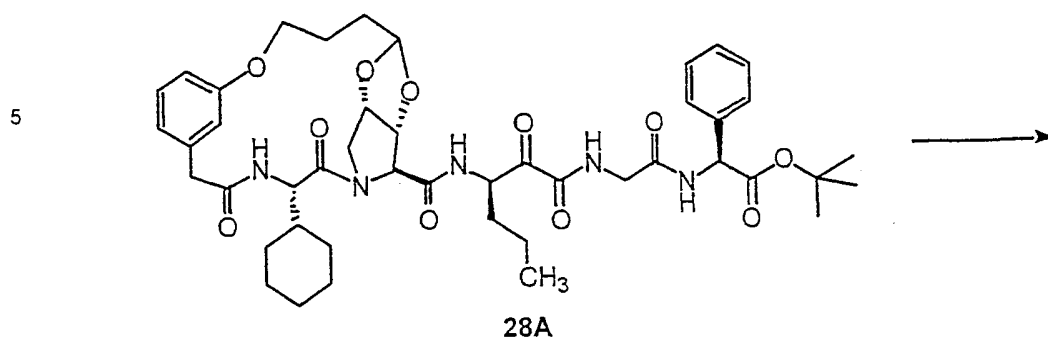


29A



29B

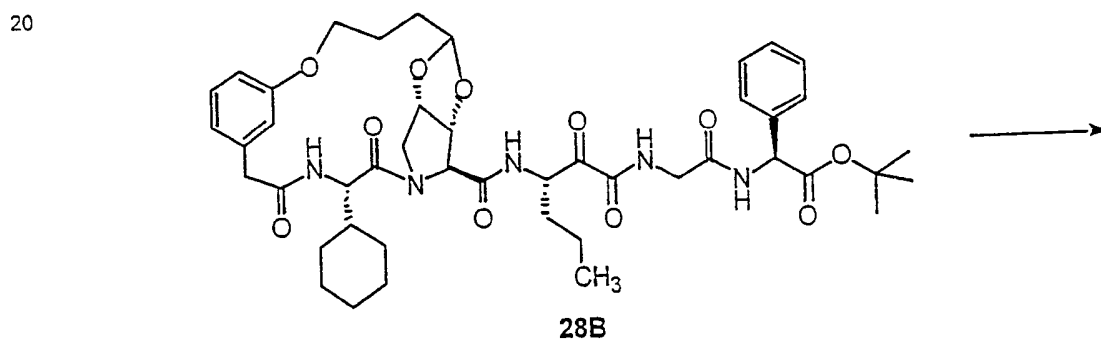
Krok A



15

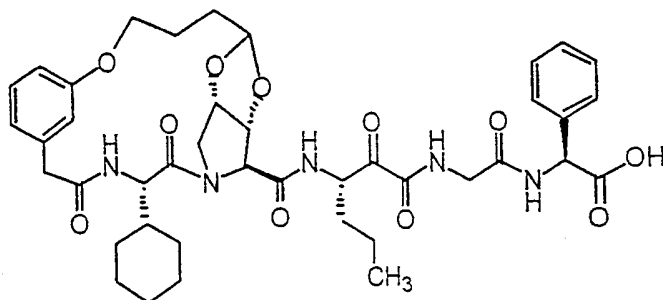
Požadovaná sloučenina **29A** byla připravena ze sloučeniny **28A** způsobem popsáním v příkladu 3, krok A.

Krok B



25

5



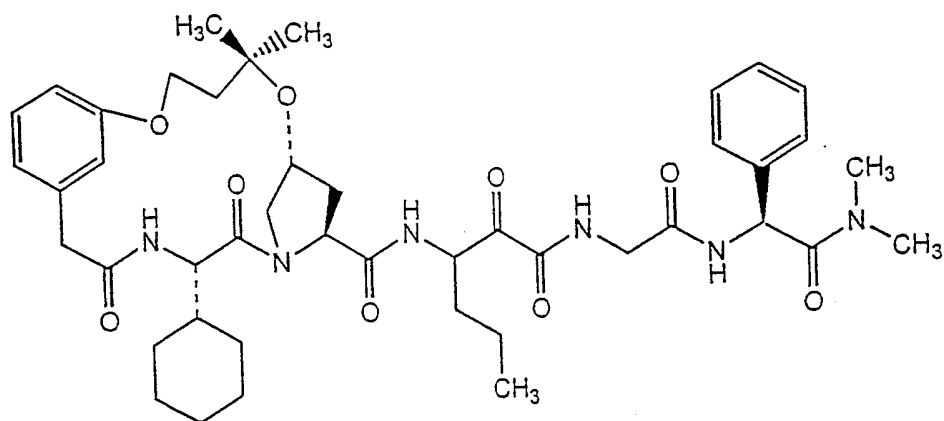
29B

Požadovaná sloučenina **29B** byla připravena ze sloučeniny **28B** způsobem popsáným v příkladu 3, krok A.

10

Příklad 30: Příprava sloučeniny 30

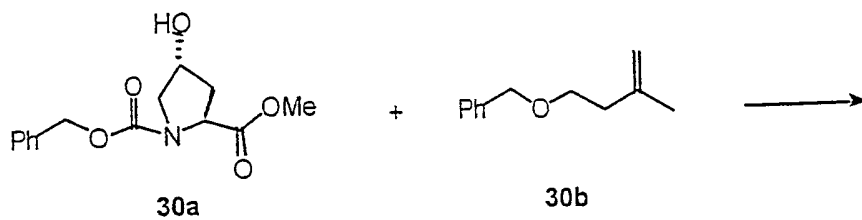
15



Krok A

30

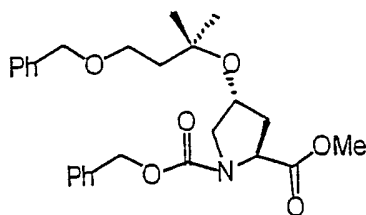
20



30a

30b

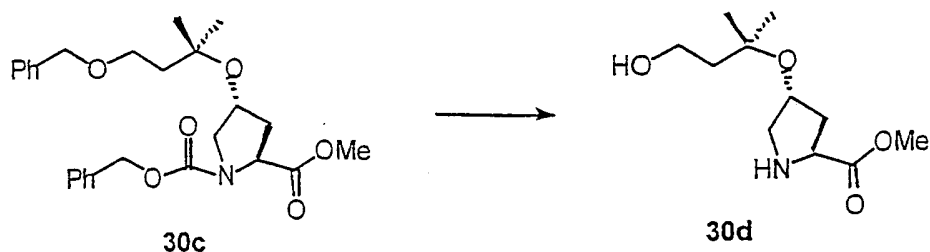
25



30c

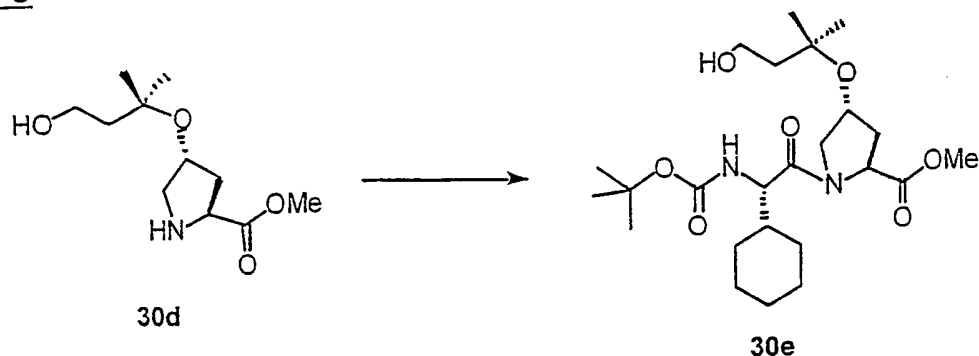
K roztoku Cbz-HYP-OMe (**30a**) (3,0 g, 10,7 mmol) a 4-benzyloxy-2-methyl-1-butenu **30b** (5,30 g, 30,0 mmol) v bezvodém CH₂Cl₂ (80 ml) při 0 °C byl přidán diethyletherát fluoridu boritého (0,25 ml, 1,97 mmol). Získaná směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc (18 hod). Byly přidány nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného (30 ml), roztok soli (50 ml) a EtOAc (300 ml) a vrstvy byly odděleny. Vodný roztok byl extrahován EtOAc (2 x 100 ml) a spojený organický roztok byl sušen (MgSO₄), zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu za poskytnutí žlutého oleje. Blesková chromatografie (5 až 20 % EtOAc/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **30c** (2,00 g, 4,39 mmol, 41 %) jako olej.

Krok B



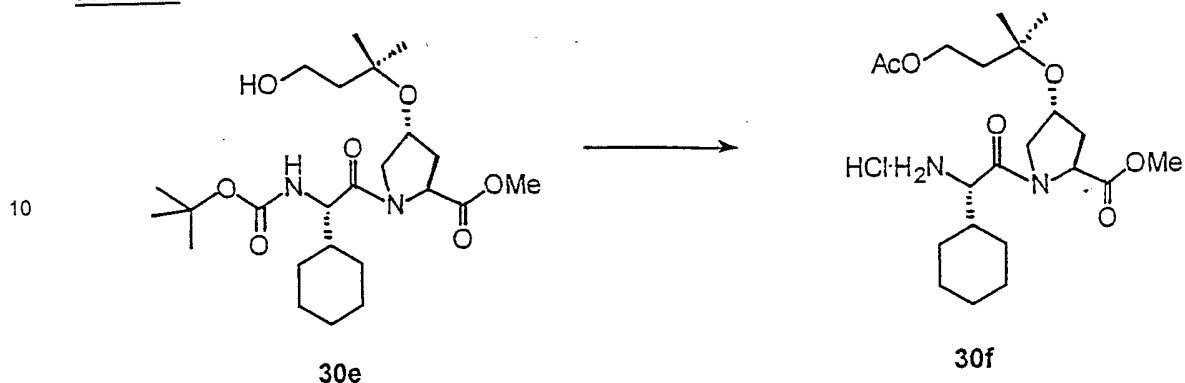
Požadovaná sloučenina **30d** byla připravena ze sloučeniny **30c** v kvantitativním výtěžku způsobem popsáním v příkladu 1, krok G.

Krok C



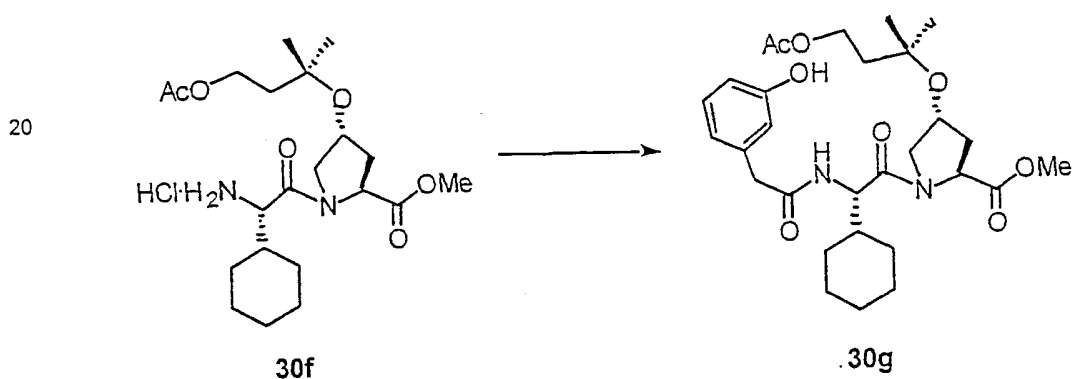
Požadovaná sloučenina **30e** byla připravena ze sloučeniny **30d** a Boc-cyklohexylglycin-OH způsobem popsáným v příkladu 1, krok D. Blesková chromatografie (3 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **30e** (61 %).

Krok D



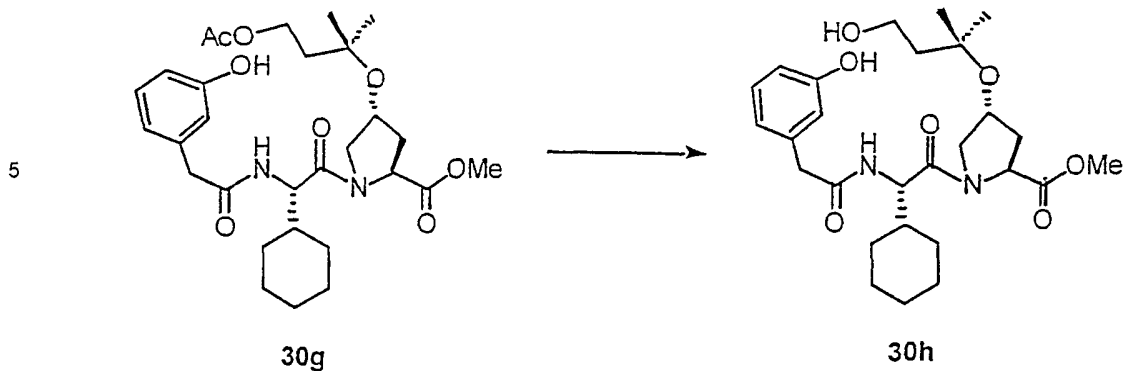
15 Roztok **30e** a 2N HCl v dioxanu a EtOAc (1 : 1) byl míchán při teplotě laboratoře 3 hod, potom byl zakoncentrován ve vakuu. Produkt byl použit v následující reakci bez dalšího čištění.

Krok E



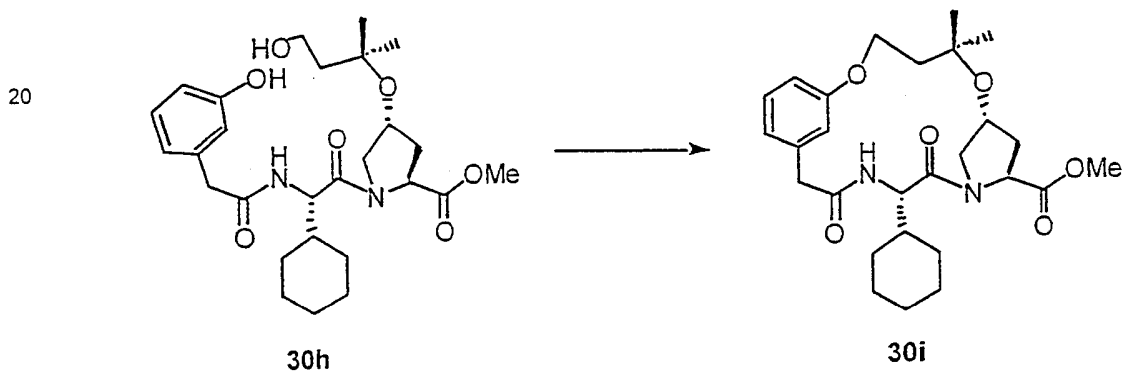
25 Požadovaná sloučenina **30g** byla připravena ze sloučeniny **30f** způsobem popsáným v příkladu 1, krok E. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **30g** (48 %, 2 kroky).

Krok F



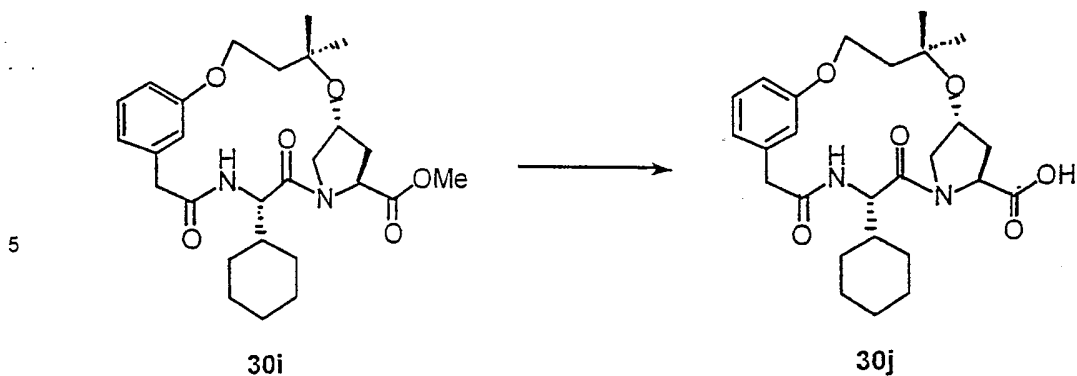
Směs **30g** (700 mg, 1,28 mmol) a uhličitanu draselného
 10 (530 mg, 3,84 mmol) v bezvodém methanolu (80 ml) byla důkladně
 míchána při teplotě laboratoře. Postup reakce byl monitorován TLC.
 Po 3 hod byla reakční směs zakonzentrována ve vakuu, před přidáním
 EtOAc (200 ml) a vody (100 ml) a oddělením vrstev. Vodný roztok byl
 extrahován EtOAc (2 x 100 ml). Organické roztoky byly spojeny,
 15 sušeny (MgSO₄), zfiltrovány a zakonzentrovány ve vakuu. Produkt byl
 použit v následující reakci bez dalšího čištění.

Krok G



25 Požadovaná sloučenina **30i** byla připravena ze sloučeniny **30h**
 způsobem popsáním v příkladu 1, krok H.

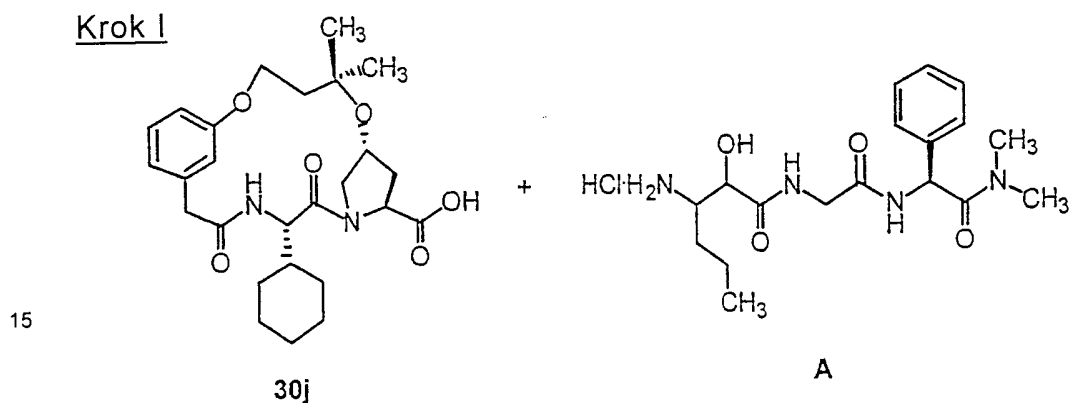
Krok H



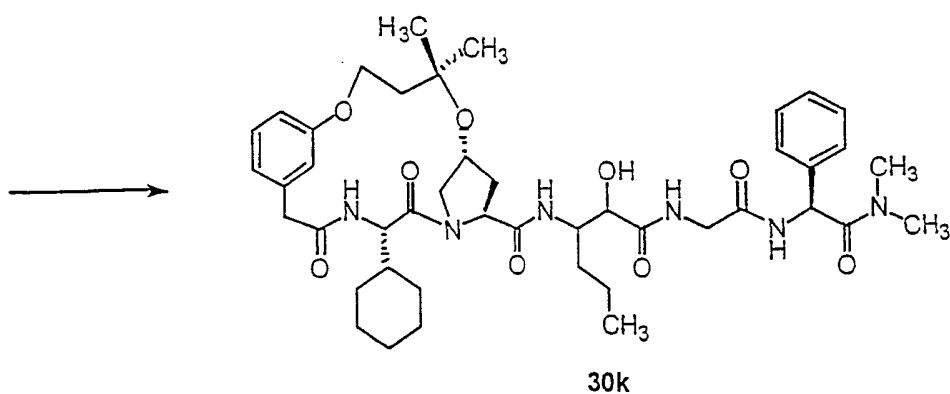
Požadovaná sloučenina **30j** byla připravena ze sloučeniny **30i** způsobem popsáným v příkladu 1, krok I (23 %, 3 kroky).

10

Krok I



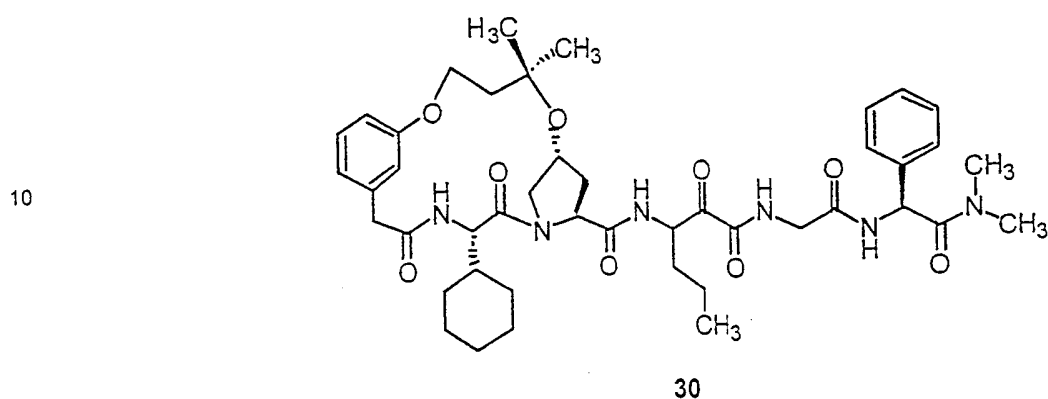
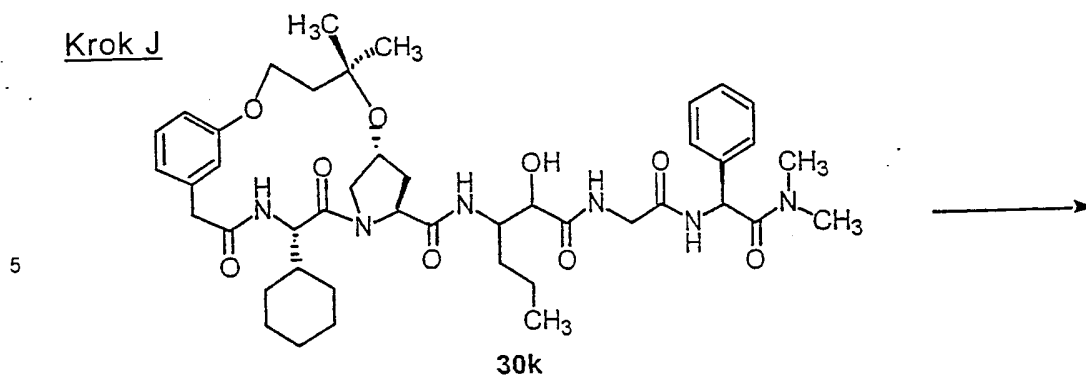
20



Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **30j** způsobem popsáným v příkladu 1, krok J. Blesková chromatografie (3 až 6 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **30k** (58 %).

25

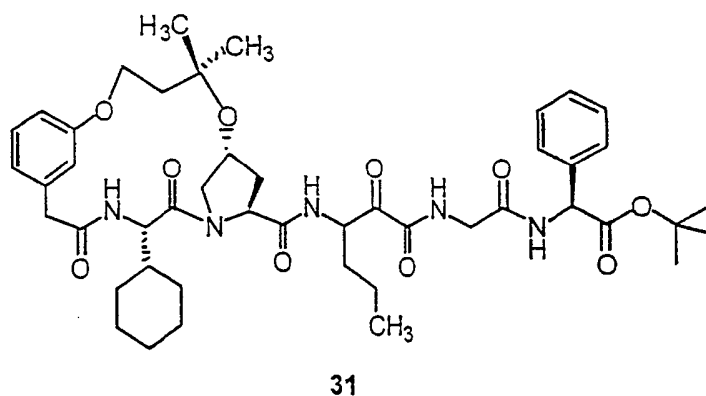
Krok J



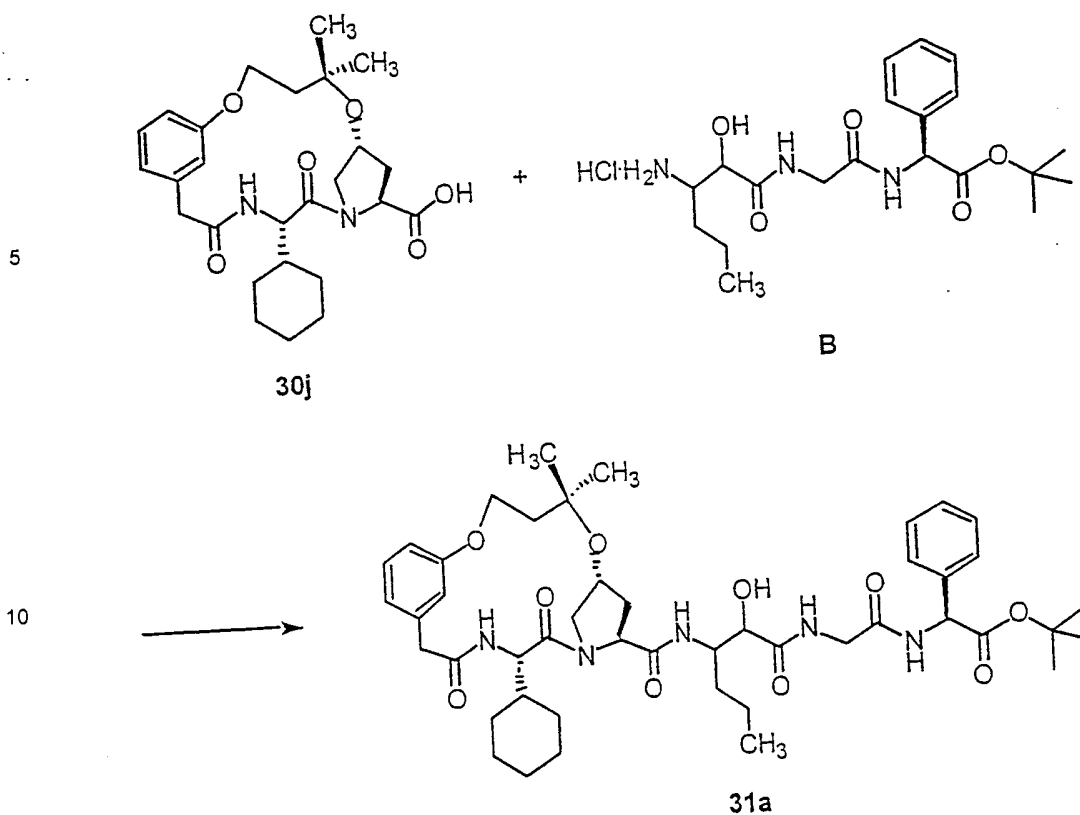
Požadovaná sloučenina **30** byla připravena ze sloučeniny **30k** způsobem popsáním v příkladu 1, krok K. Blesková chromatografie (3 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **30** jako směs nerozdělitelných diastereomerů.

Příklad 31: Příprava sloučeniny 31

20

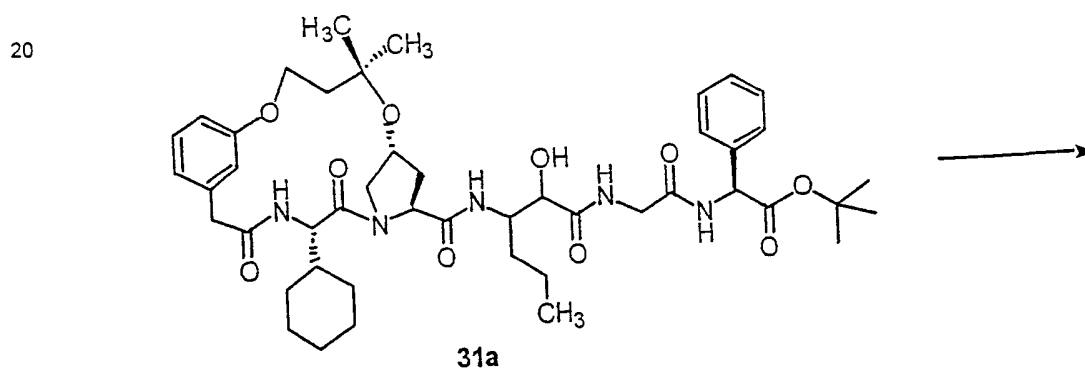


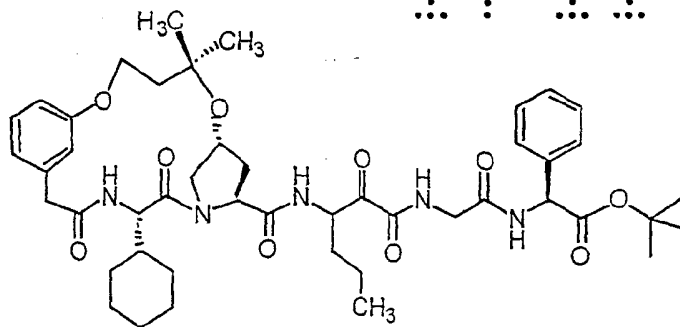
Krok A



15 Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **30j** a **B** způsobem popsaným v příkladu 1, krok J. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **31a** (73 %).

Krok B





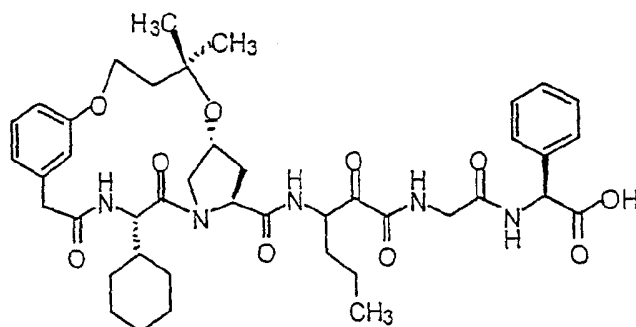
5

31

Požadovaná sloučenina byla připravena ze sloučeniny **31a** způsobem popsaným v příkladu 1, krok K. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **31** jako směs nerozdělitelných diastereomerů.

10

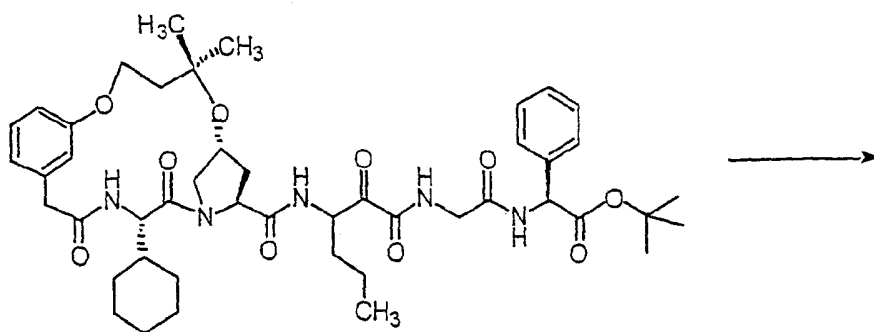
Příklad 32: Příprava sloučeniny 32



15

32

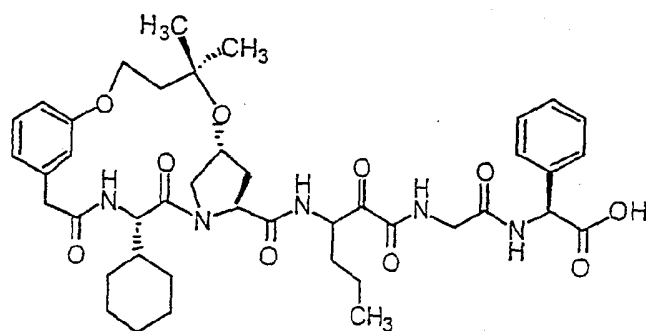
Krok A



20

25

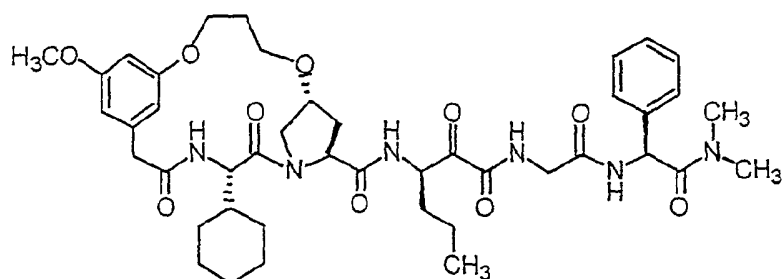
31



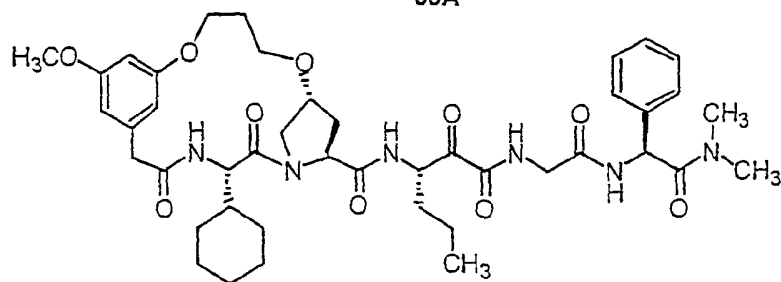
32

Požadovaná sloučenina 32 může být připravena ze sloučeniny 31 způsobem popsaným v příkladu 3, krok A.

10 Příklad 33: Příprava sloučeniny 33



33A



33B

Krok A

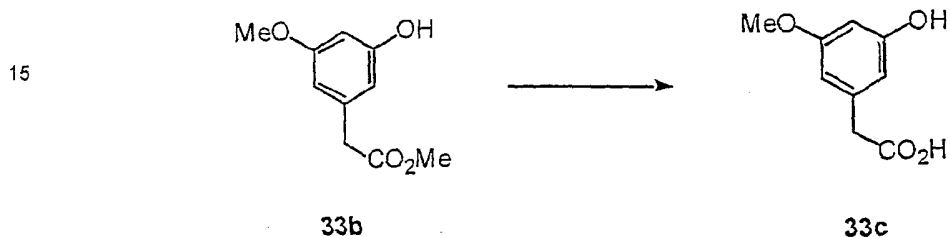


33a

33b

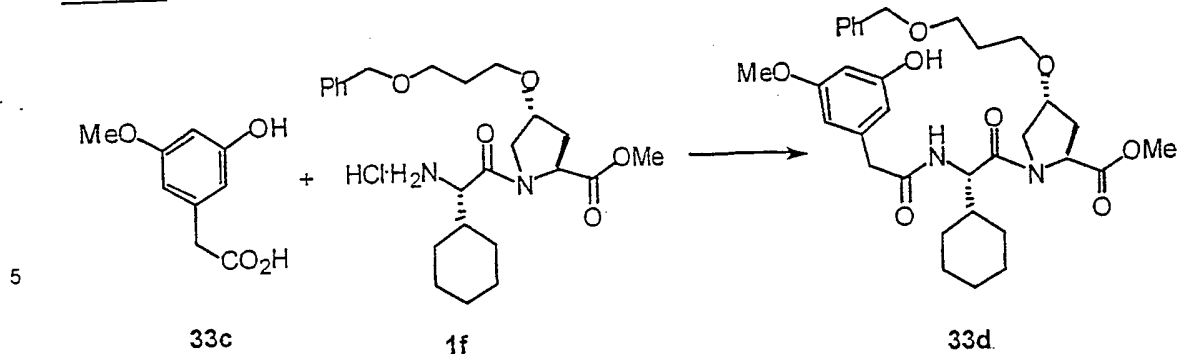
Suspenze methyl-3,5-dihydroxyfenylacetátu (**33a**) (5,0 g, 27,4 mmol) methyljodidu (4,6 g, 32,9 mmol), uhličitanu draselného (5,69 g, 41,2 mmol) v DMF (30 ml) byla zahřívána při 55 °C a míchána přes noc. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly přidány nasycený vodný roztok hydrogenuhlčitanu sodného (100 ml) a EtOAc (200 ml) a vrstvy byly odděleny. Vodný roztok byl extrahován EtOAc (2 x 100 ml). Spojený organický roztok byl sušen (MgSO₄), zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **33b** (1,11 g, 29 %) jako bílou kapalinu.

Krok B



Vodný roztok hydroxidu lithného (0,342 g v 10 ml H₂O) byl přidán k roztoku methylesteru **33b** v THF (10 ml) a methanolu (10 ml) při laboratorní teplotě. Postup reakce byl monitorován TLC. Po 4 hod byly těkavé podíly odstraněny ve vakuu, byly přidány EtOAc (150 ml) a voda (30 ml) a vodný roztok byl okyselen na pH = 1 a nasycen pevným chloridem sodným. Po oddělení vrstev byla vodná vrstva extrahována EtOAc (2 x 150 ml). Organické roztoky byly spojeny, sušeny síranem sodným, zfiltrovány a zakoncentrovány ve vakuu za získání sloučeniny **33c** (1,6 g).

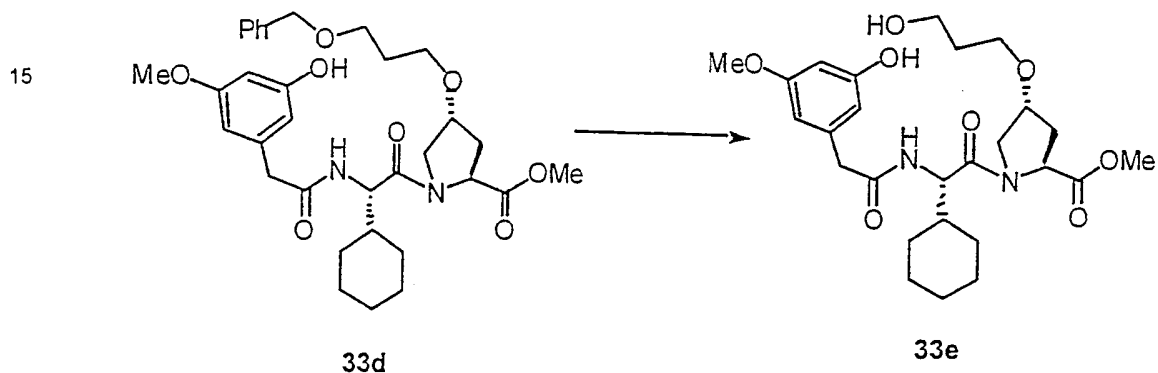
Krok C



Požadovaná sloučenina **33d** byla připravena ze sloučeniny **33c** a **1f** způsobem popsáným v příkladu 1, krok F. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **33d** v 90% výtěžku.

10

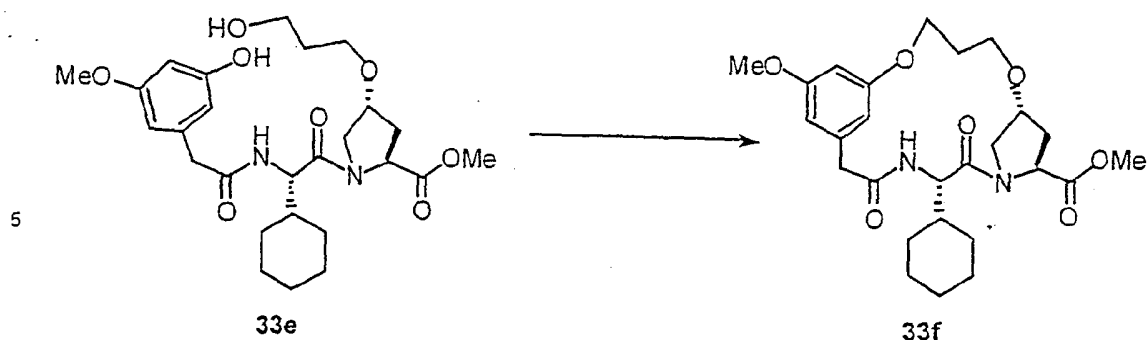
Krok D



20

Požadovaná sloučenina **33e** byla připravena ze sloučeniny **33d** způsobem popsáným v příkladu 1, krok G. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **33e** v 56% výtěžku.

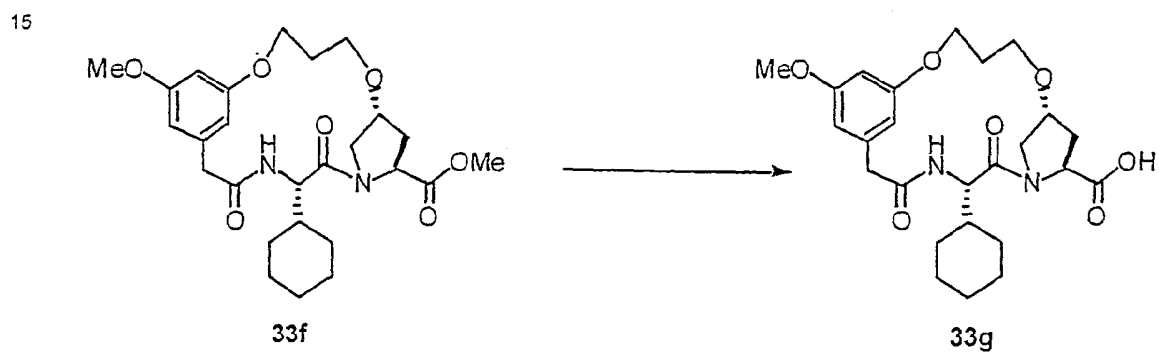
Krok E



Požadovaná sloučenina **33f** byla připravena ze sloučeniny **33e** způsobem popsaným v příkladu 1, krok H. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH/CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **33e** jako směs s trifenylofosfinoxidem, která byla použita v další reakci bez dalšího čištění.

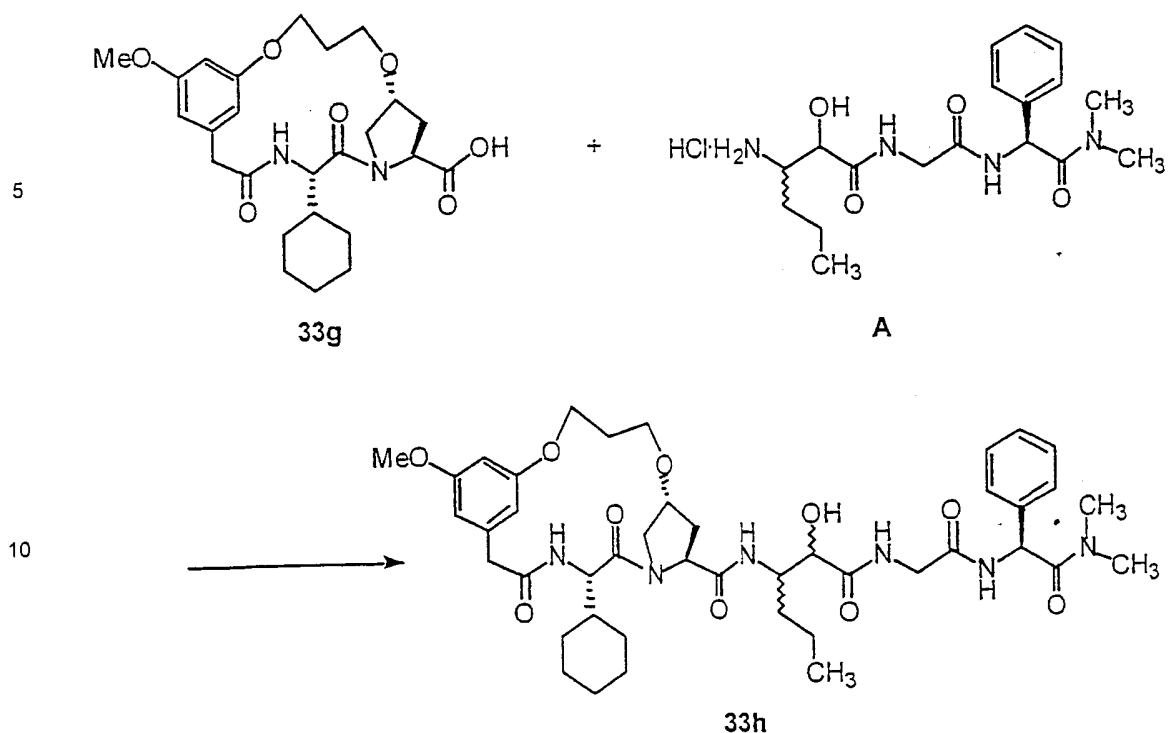
10

Krok F



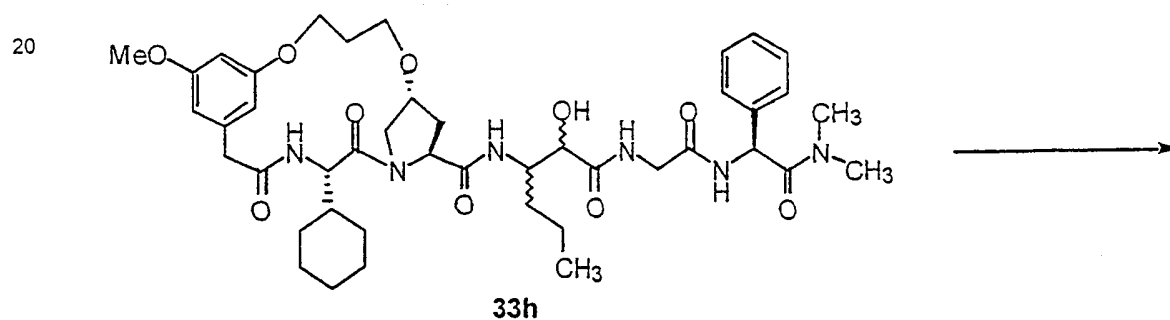
Požadovaná sloučenina **33g** byla připravena ze sloučeniny **33f** ve 45% výtěžku (2 kroky) způsobem popsaným v příkladu 1, krok I.

Krok G

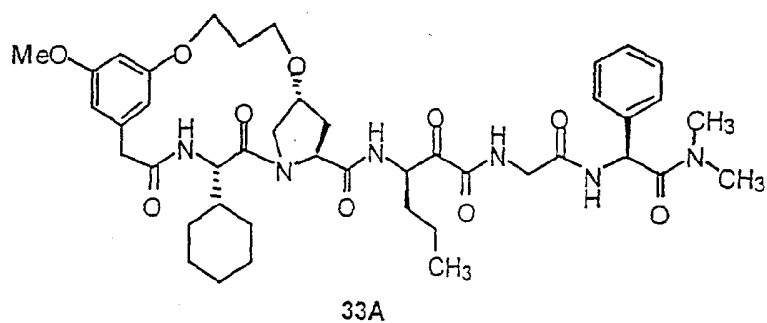


15 Požadovaná sloučenina 33h se připraví ze sloučeniny 33g a A způsobem popsaným v příkladu 1, krok J.

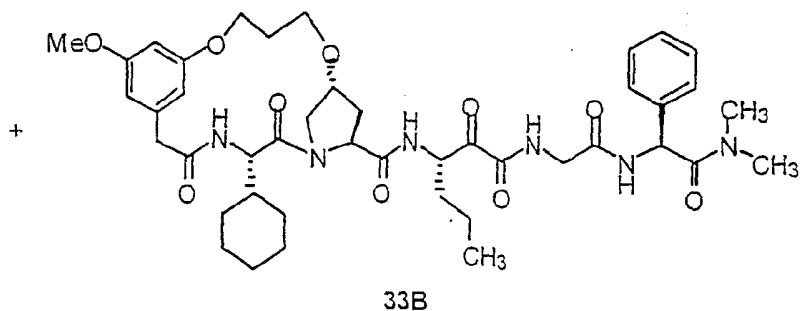
Krok H



5



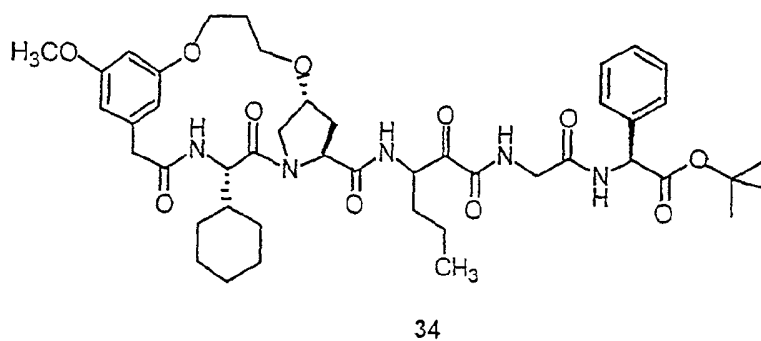
10



Požadované sloučeniny se připraví z **33h** způsobem popsaným v příkladu 1, krok K.

Příklad 34: Příprava sloučeniny 34

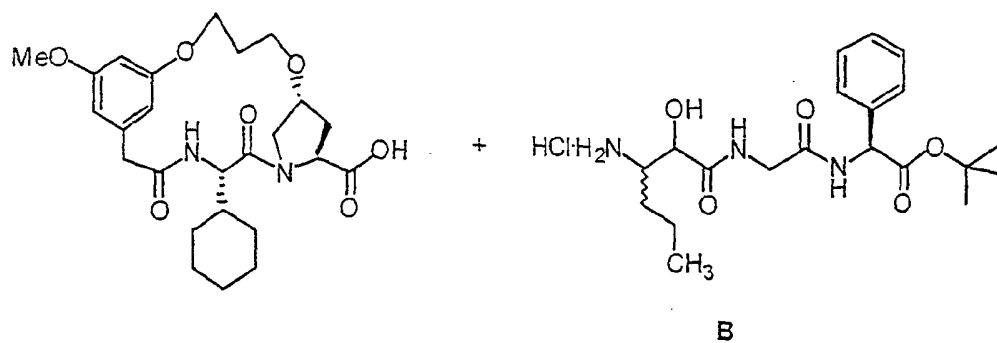
15

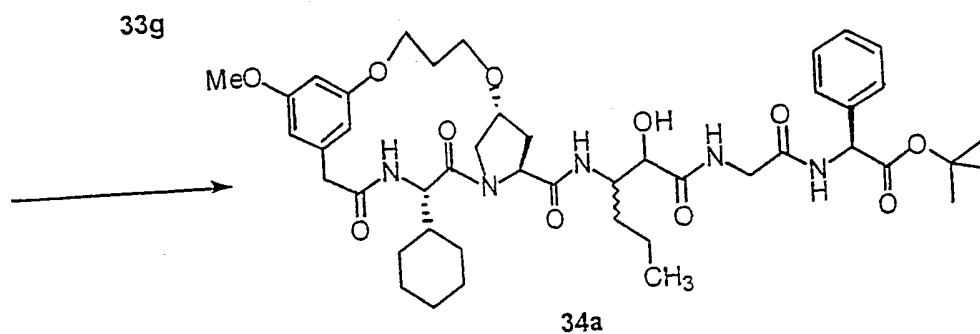


20

Krok A

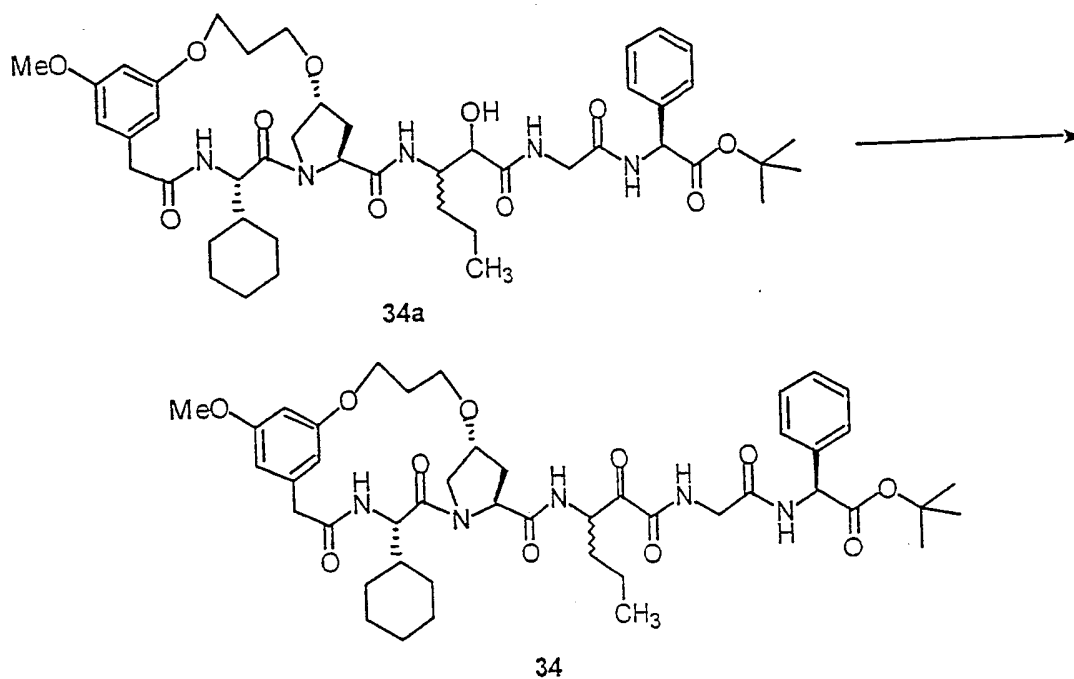
25





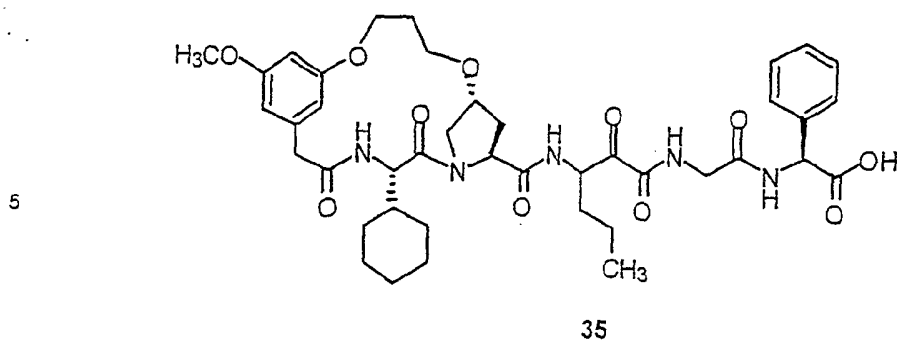
Požadovaná sloučenina **34a** se připraví způsobem popsáným v příkladu 1, krok J, kromě náhrady aminu **A** aminem **B**. Produkt je získán jako směs nerozdělitelných diastereomerů.

Krok B

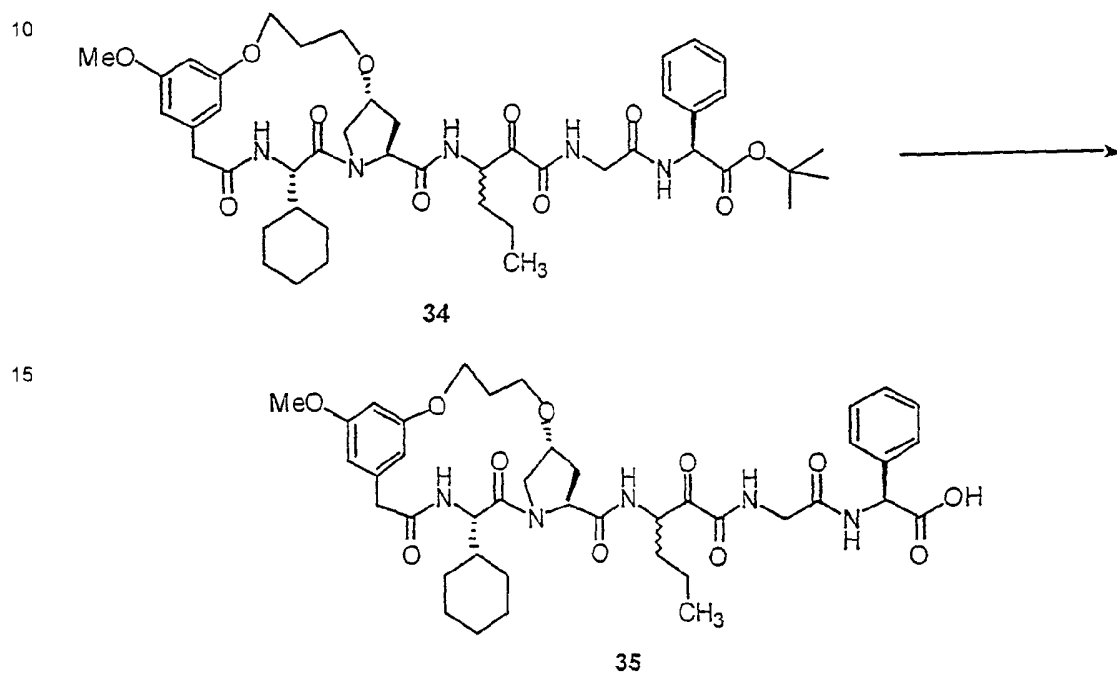


Požadovaná sloučenina je připravena ze sloučeniny **34a** způsobem popsáným v příkladu 1, krok K.

Příklad 35: Příprava sloučeniny 35

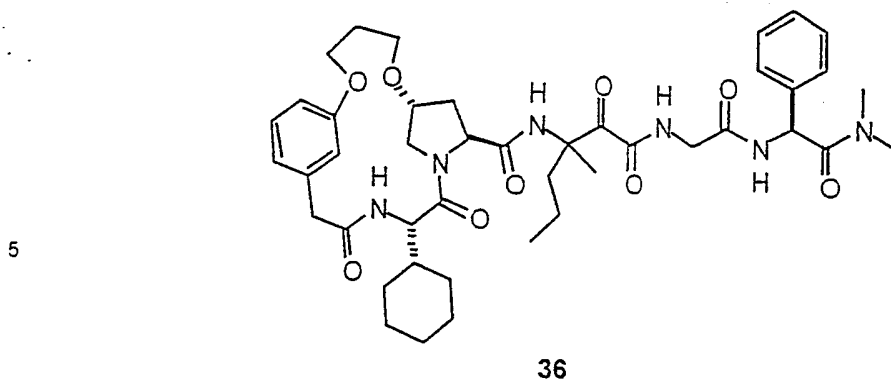


Krok A

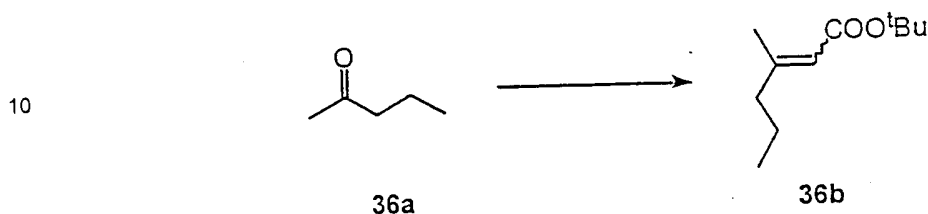


Požadovaná sloučenina 35 je připravena ze sloučeniny 34 způsobem popsaným v příkladu 3, krok A.

Příklad 36: Příprava sloučeniny 36



Krok A

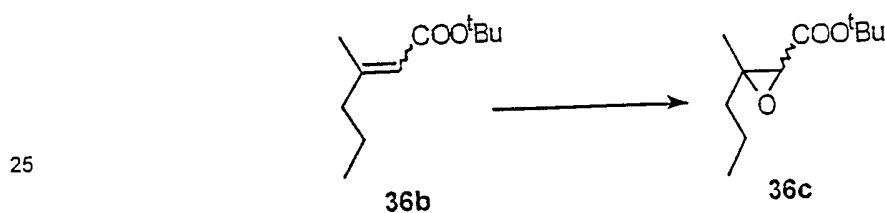


Roztok *tert*-butylfosfonoacetátu (15,1 g, 50,0 mmol) v suchém THF byla ochlazena na 0 °C a smísena s NaH (60%, 2,5 g, 62,5 mmol, 1,25 ekv.), a míchána po dobu 20 min. Reakční směs byla smísena s 2-pentanonem (4,3 g, 50 mmol) a míchána při laboratorní teplotě 24 hod. Reakční směs byla zředěna vodným NaHCO₃ a extrahována etherem (3 x 100 ml). Spojená etherová vrstva byla extrahována roztokem soli, sušena (MgSO₄), zakoncentrována ve vakuu a destilována, za získání 8,2 g (88 %) **36b** (stereochemický poměr 2 : 1).

15

20

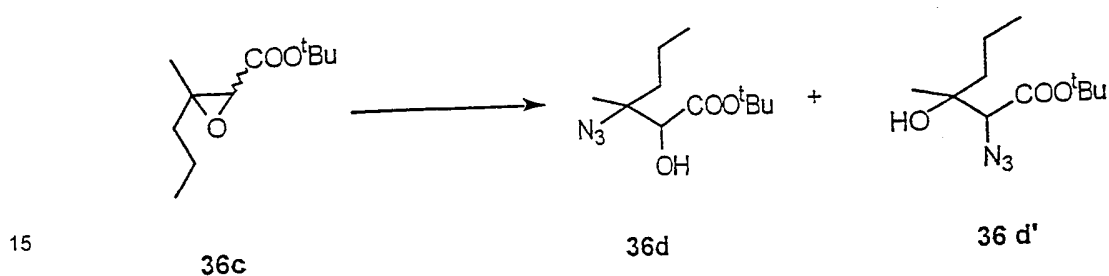
Krok B



Roztok **36b** (5,0 g, 27,1 mmol) byl rozpuštěn v dichlorethanu a smísen s 4,4'-thiobis-(2-*tert*-butyl-5-methylfenolem) (100 mg) a MCPBA (60 - 80 %, 7,76 g, 27,1 mmol) a zahříván pod zpětným chladičem 4 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl zředěn etherem (200 ml). Etherová vrstva byla dvakrát promyta nasyceným vodným Na₂S₂O₃, vodným NaOH a roztokem soli (100 ml). Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu za získání 4,2 g (77 %) sloučeniny **36c**, která byla použita jako taková v následujícím kroku.

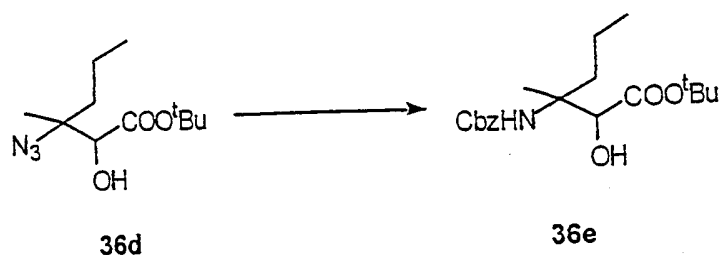
10

Krok C



Roztok epoxidu (4,0 g, 18,4 mmol) v suchém ethanolu (100 ml) byl smísen s NaN₃ (12 g, 184 mmol) a NH₄Cl (9,6 g, 184 mmol) a zahříván pod zpětným chladičem 36 hod. Reakční směs byla zředěna vodou a extrahována etherem (300 ml). Spojené organické vrstvy byly sušeny Na₂SO₄ a zakoncentrovány. Zbytek byl čištěn chromatografií SiO₂ (EtOAc/hex 1 : 19) za získání 1,1 g (28 %) sloučeniny **36d** a 731 mg (18 %) **36d'** jako bezbarvé kapaliny.

25 Krok D

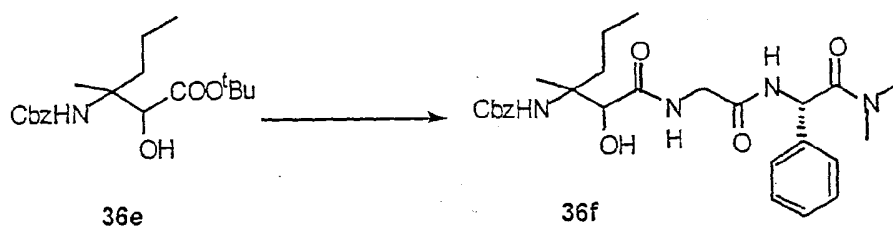


Roztok azidu **36d** (2,1 g, 8,7 mmol) byl rozpuštěn v CH₃OH (100 ml) a smísen s Pd/C (50 mg) a hydrogenován (40 psi, 276 kPa) 24 hod. Reakční směs byla zfiltrována přes lože celitu a filtrát byl
5 zakoncentrován ve vakuu. Zbytek byl použit v následující reakci bez dalšího čištění.

Roztok Cbz-Cl (1,48 g, 8,7 mmol, 1,23 ml) byl po kapkách přidán ke směsi aminu a Et₃N (878 mg, 1,25 ml) při -78 °C v CH₂Cl₂ (30 ml). Reakční směs byla zahřáta na teplotu laboratoře a
10 zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl čištěn chromatografií na SiO₂ (EtOAc/hex 8 : 2) za získání sloučeniny **36e** (450 mg, 15 %) jako bezbarvé pevné látky.

Krok E

15



20

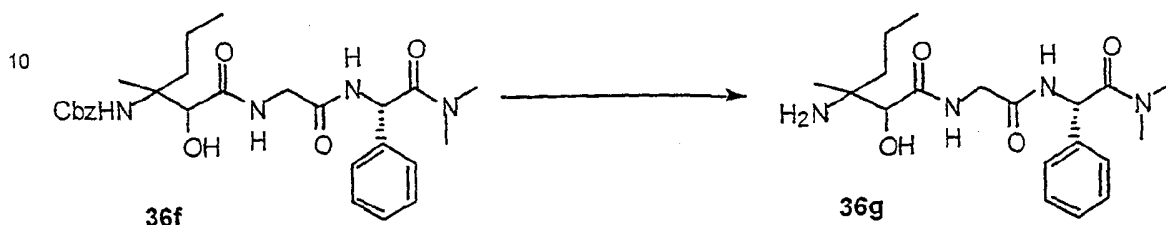
Roztok **36e** (450 mg, 1,29 mmol) v CH₂Cl₂/TFA (10 ml, 1 : 1) byl míchán při teplotě laboratoře 4 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu za získání kyseliny (250 mg), která byla použita v příštím kroku bez dalšího čištění.

25

Kyselina získaná hydrolýzou sloučeniny **36e** byla rozpuštěna v CH₂Cl₂ (10 ml) při -20 °C a smíšena se sloučeninou H-glycyl-fenylglycyl-N(CH₃)₂ (281 mg, 0,93 mmol), HOObt (208 mg, 1,27 mmol, 1,25 ekv.), EDCI (244 mg, 1,27 mmol) a NMM (343 mg, 3,4 mmol, 490 µl). Reakční směs byla uchována v mrazicím boxu 24 hod a

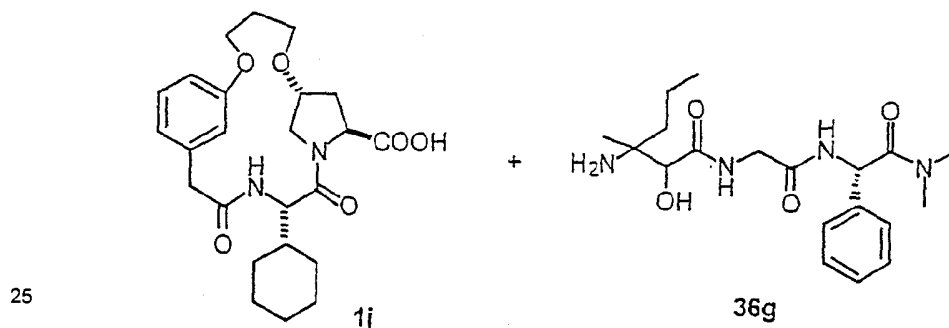
zředěna vodným HCl (1M, 50 ml). Reakční směs byla extrahována CH₂Cl₂ (3 x 50 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným HCl (1M, 100 ml), vodným NaHCO₃ (1M, 100 ml), roztokem soli (100 ml), sušeny (MgSO₄), zfiltrvány a zakoncentrovány ve vakuu a
5 čištěny chromatografií na SiO₂ (aceton/hexany 1 : 3) za získání **36f** (330 mg, 75 %) jako bezbarvé pevné látky.

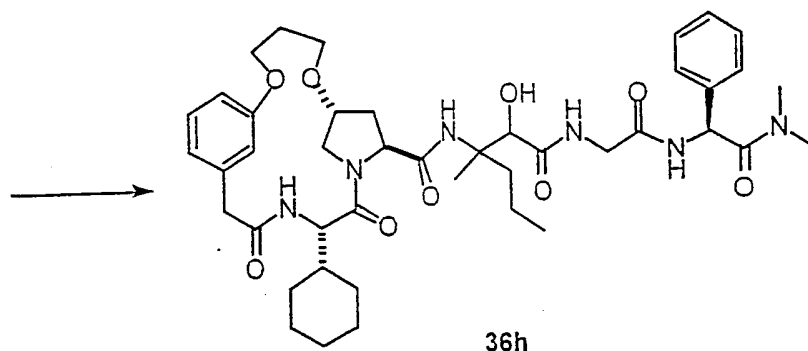
Krok F



15 Roztok **36f** se rozpustí v CH₃OH (20 ml) a smísí s Pd/C (10 mol%, 20 mg). Reakční směs se hydrogenuje při 40 psi (276 kPa) 12 hod. Reakční směs se zfiltruje přes lože celitu a filtrát se zakoncentruje ve vakuu a okamžitě použije v dalším kroku.

20 Krok G

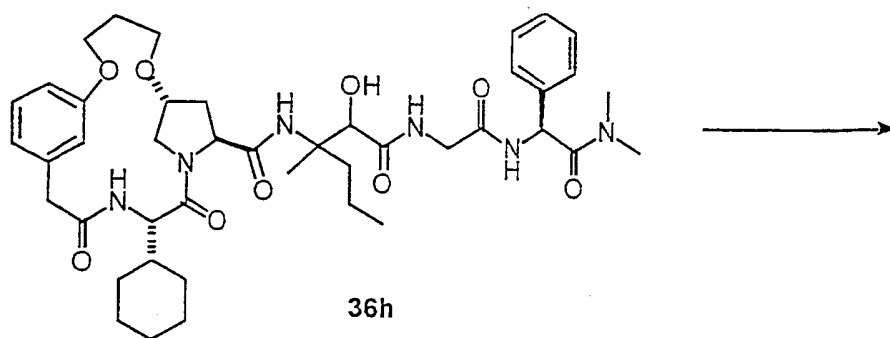




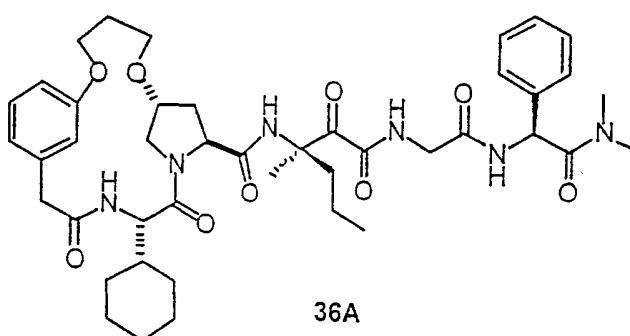
Očekávaný produkt **36h** se syntetizuje jak bylo popsáno dříve pro příklad 1, krok J. Zreagovaný materiál se použije přímo v dalším kroku pro syntézu **36A** a **36B**.

10

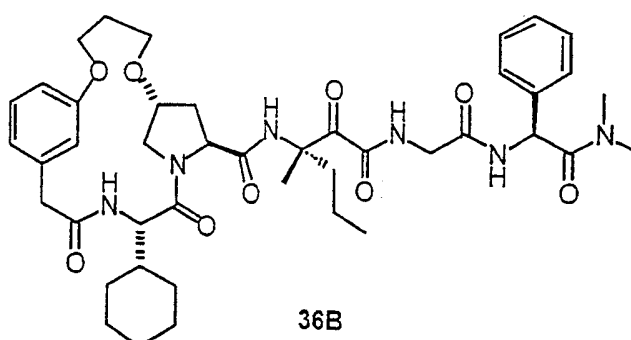
Krok H



15



20

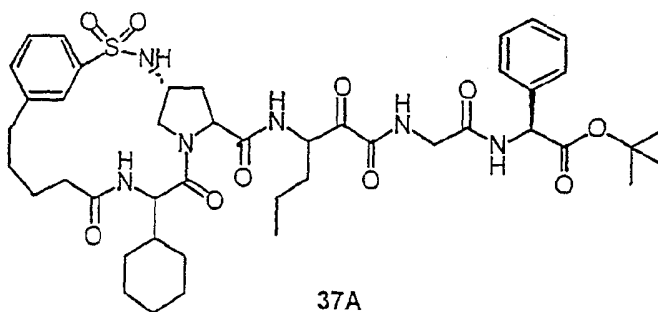


25

Požadované produkty **36A** a **36B** se získají protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K.

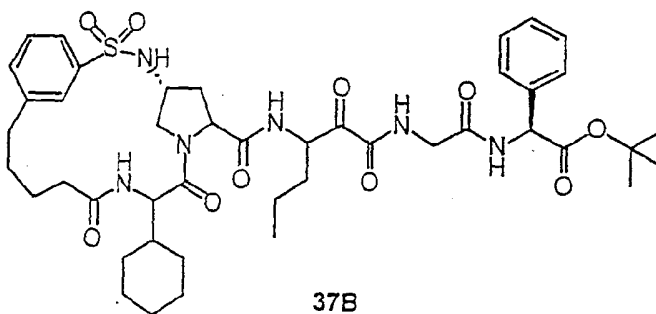
Příklad 37: Příprava sloučeniny 37

5



37A

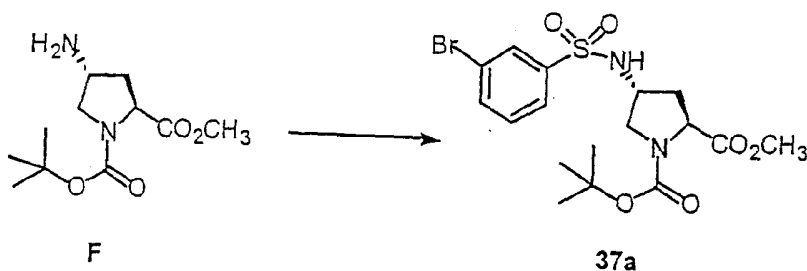
10



37B

15

Krok A



F

37a

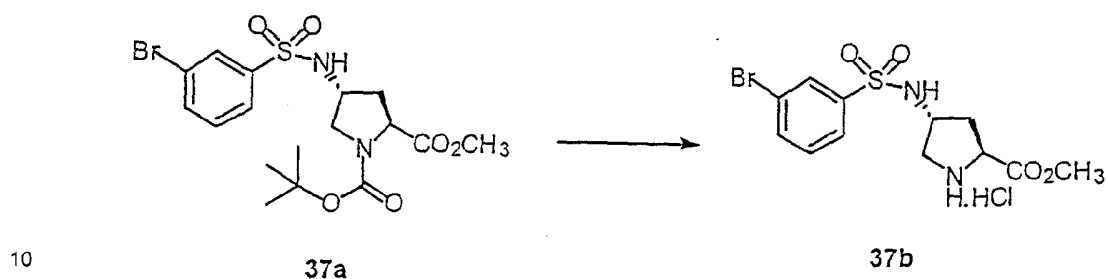
20

K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **F** (2,3g g, 9,43 mmol) v dichlormethanu (20 ml) byl přidán triethylamin (3,97 ml, 28,28 mmol), DMAP (několik krystalů) a 3-brombenzensulfonylchlorid (3,61 g, 14,14 mmol). Reakční směs byla ponechána stát v chladicím boxu (0 až 5 °C) přes noc. Reakční směs byla promyta nasyceným NaHCO₃ a 10% roztokem kyseliny citronové. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována. Zbytek byl čištěn bleskovou

25

chromatografií s použitím směsi 95/5 až 90/10 dichlormethan/EtOAc za získání 2,7 g (62% výtěžek) sloučeniny **37a**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{17}H_{24}N_2O_6SBr$: 465,0518 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 465,0497.

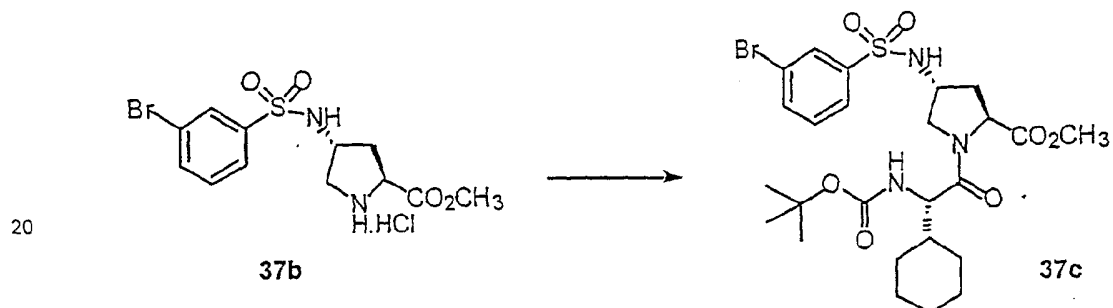
5 Krok B



Požadovaný produkt **37b** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

15

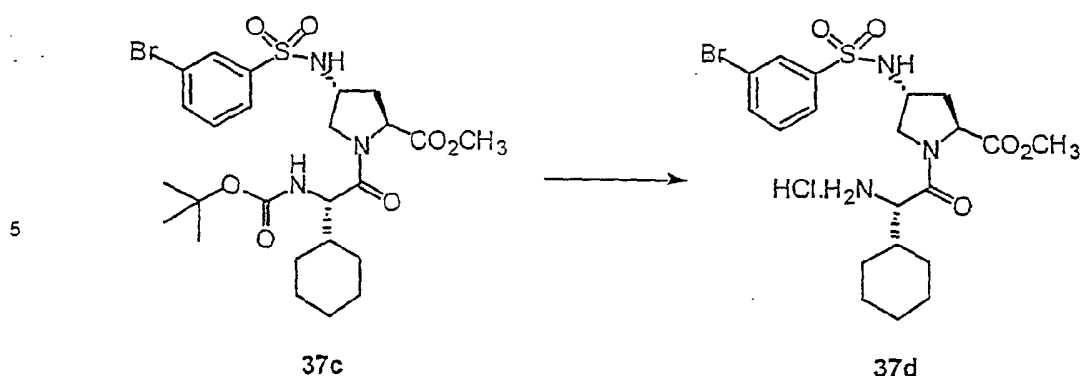
Krok C



Požadovaný produkt **37c** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok D v 97% výtěžku. Materiál po zpracování byl dostatečně čistý pro další kroky.

25

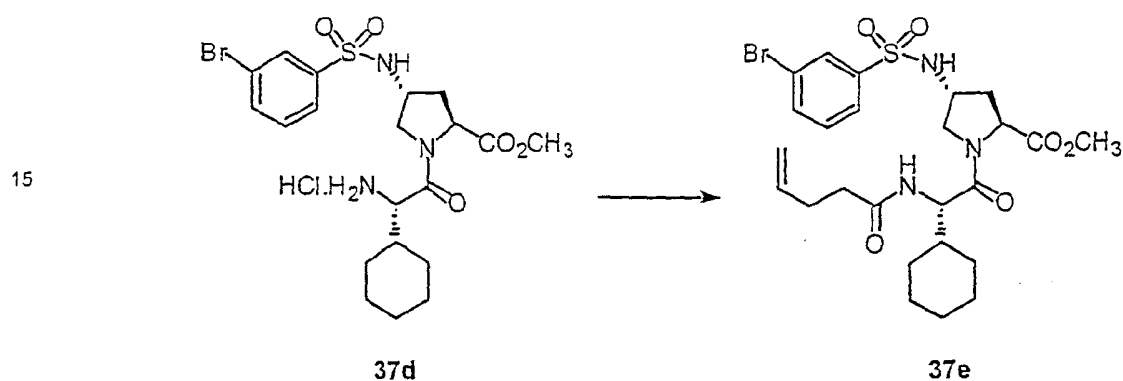
Krok D



Požadovaný produkt **37d** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok E. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

10

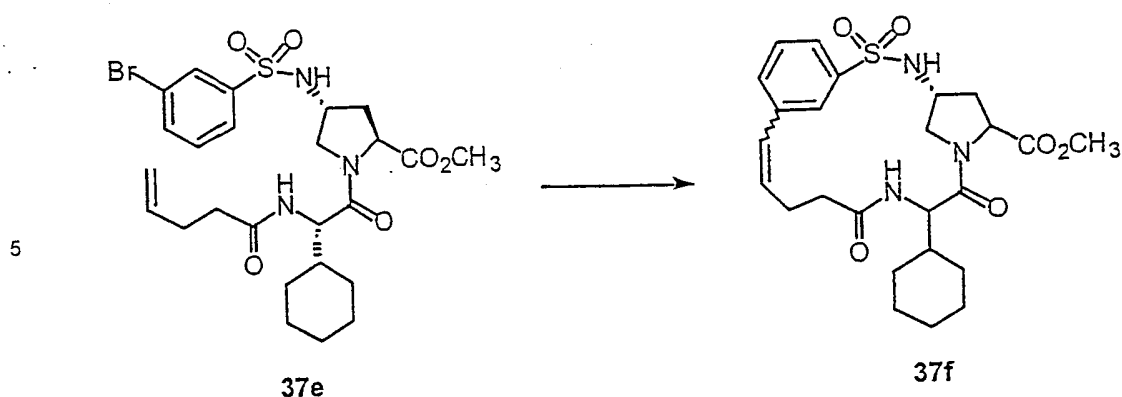
Krok E



Požadovaný produkt **37e** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok F s použitím kyseliny pentenové jako reakčního partnera. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 90/10 až 80/20 dichlormethan/EtOAc poskytlo 35% výtěžek **37e**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{35}N_3O_6SBr$: 586,1409 $(M+H)^+$. Nalezeno: 586,1423.

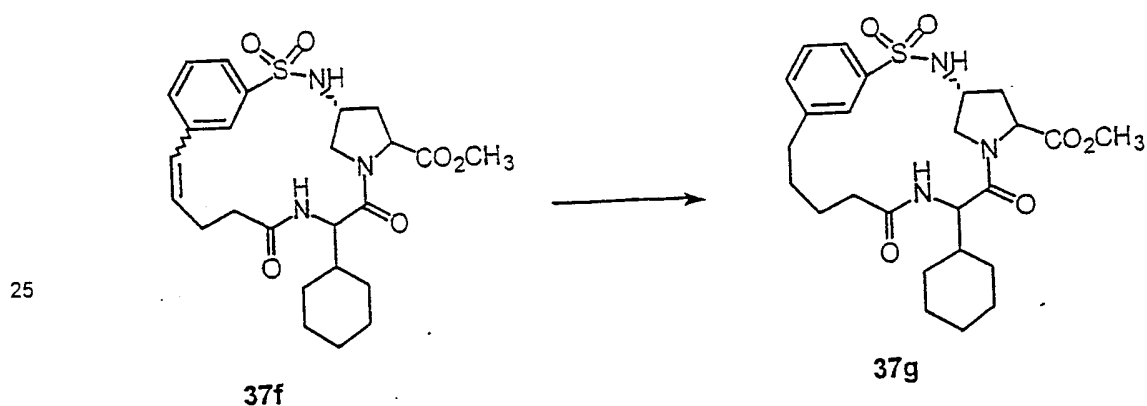
25

Krok F



K míchanému roztoku **37e** (660 mg, 1,13 mmol) v DMF (10 ml) v atmosféře dusíku byl přidán triethylamin (3,61 ml, 32,77 mmol),
 10 uhličitán draselný (780 mg, 5,65 mmol), tetrabutylamoniumbromid (730 mg, 2,26 mmol), a octan paladnatý (33 mg, 0,15 mmol). Směs byla zahřívána na 100 °C po dobu 2 hod. Reakční směs byla ochlazena na teplotu laboratoře, zředěna EtOAc a promyta 5% roztokem kyseliny fosforečné. Organická vrstva byla oddělena, sušena
 15 (Na_2SO_4) a zakoncentrována za získání 280 mg (49% výtěžek) **37f** jako směsi diastereomerů. Tento materiál byl dostatečně čistý pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$: 504,2168 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Nalezeno: 504,2155.

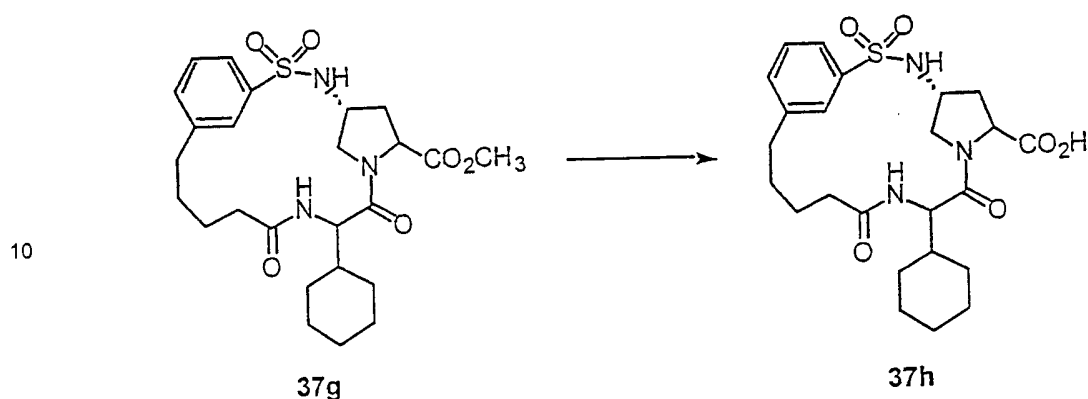
20 Krok G



Požadovaný produkt **37g** byl získán hydrogenací, postupem popsaným pro příklad 1, krok G, v 73% výtěžku. Materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{36}N_3O_6S$: 506,2325 (M+H)⁺. Nalezeno: 506,2314.

5

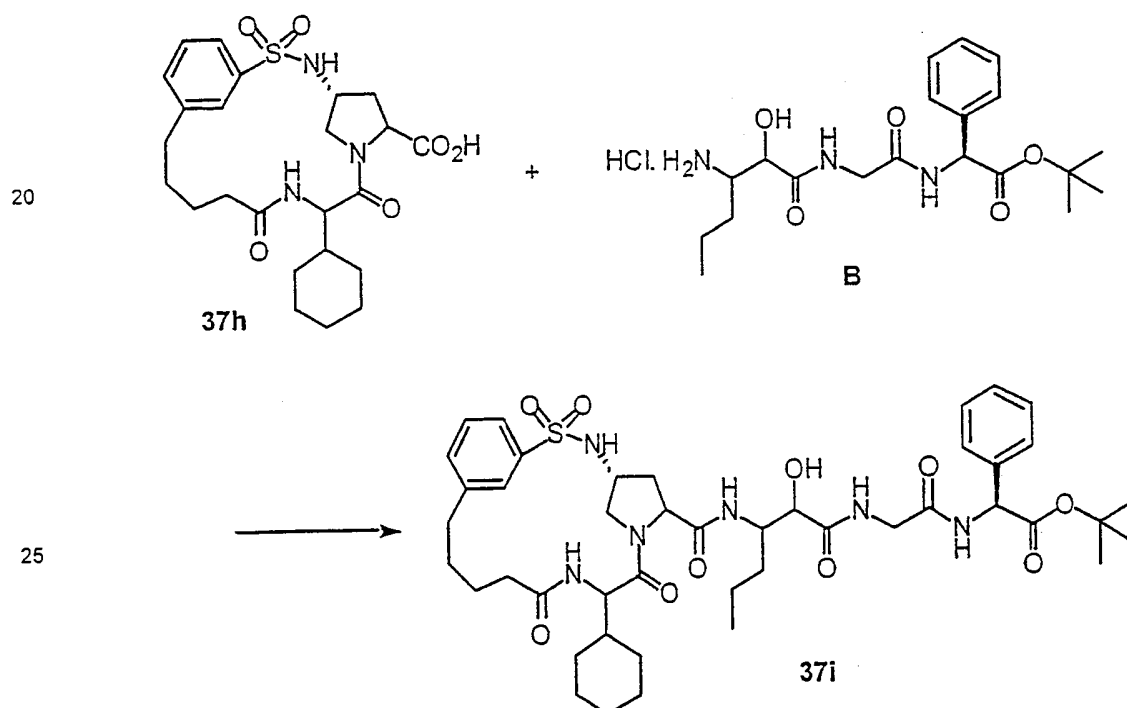
Krok H



Požadovaný produkt **37h** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok H v 84% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{24}H_{34}N_3O_6S$: 492,2168 (M+H)⁺. Nalezeno: 492,2175.

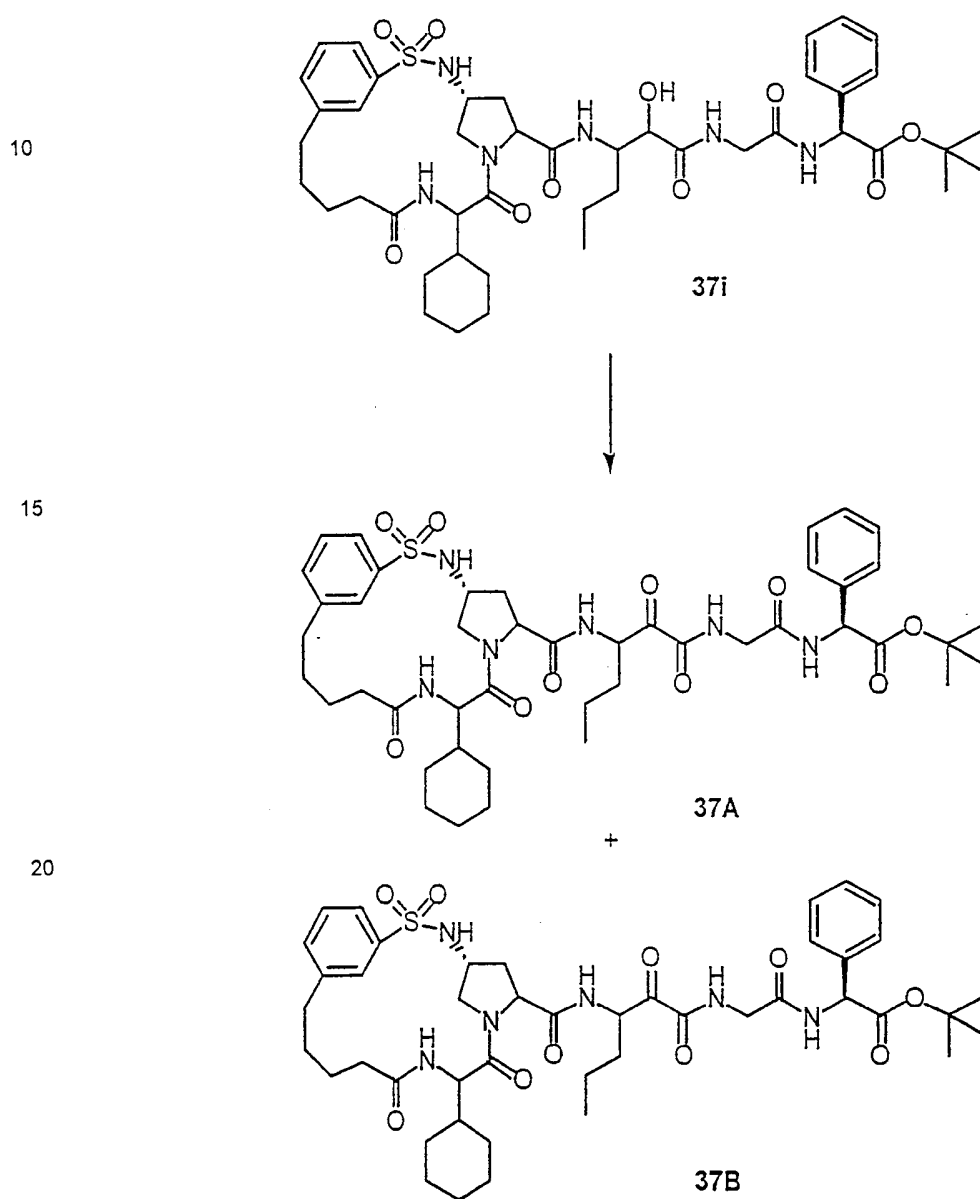
15

Krok I



Očekávaný produkt **37i** byl získán způsobem popsaným pro příklad 2, krok A v 90% výtěžku. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{44}H_{63}N_6O_{10}S$:
5 867,4326 (M+H)⁺. Nalezeno: 867,4342.

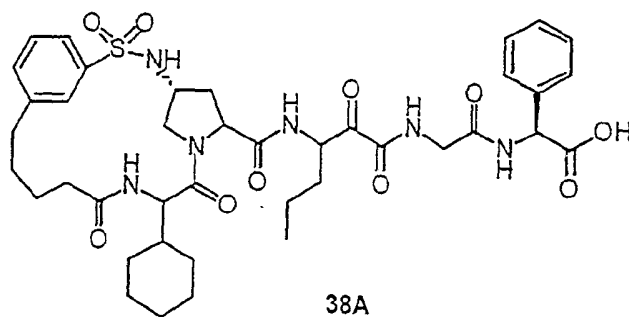
Krok J



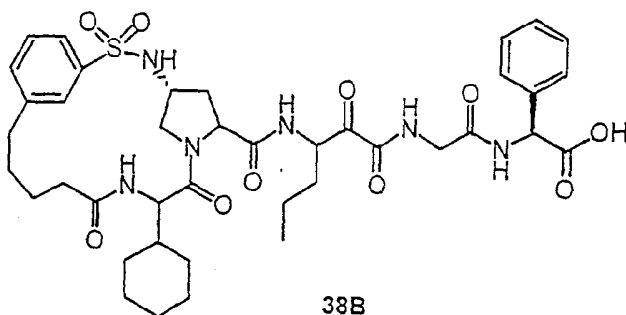
Požadované materiály **37A** a **37B** byly syntetizovány protokolem oxidace popsaným pro příklad 2, krok B. Čištění zbytku s použitím směsi 98/2 až 96/4 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **37A** (61 %, méně polární) a **37B** (15 %, více polární) jako směs diastereomerů. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{44}H_{61}N_6O_{10}S$: 865,4170 (M+H)⁺. Nalezeno: 865,4190 (**37A**), 865,4181 (**37B**).

Příklad 38: Příprava sloučeniny 38

10



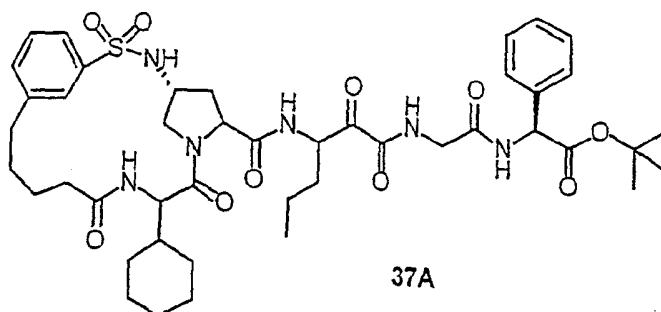
15



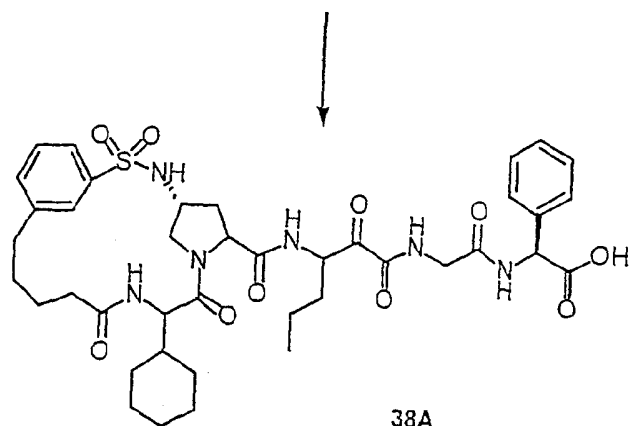
20

Krok A

25

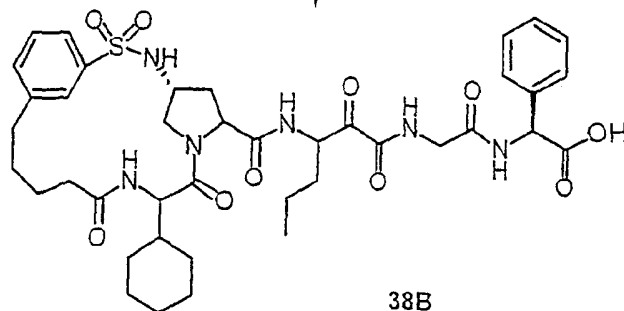
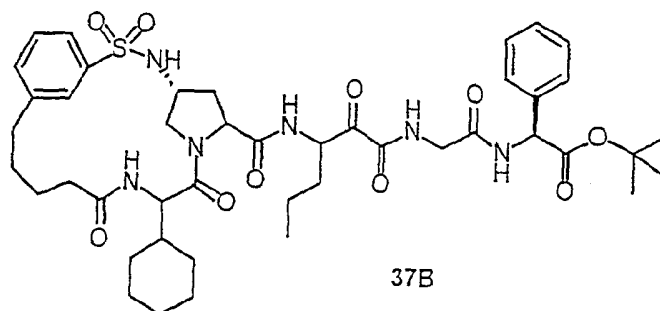


14.11.02
- 221 -



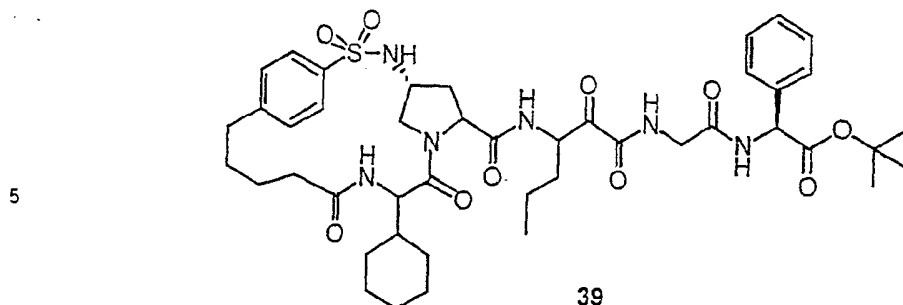
Požadovaný materiál **38A** byl syntetizován jak je popsáno pro příklad 3, krok A, v 91% výtěžku.

10 Krok B

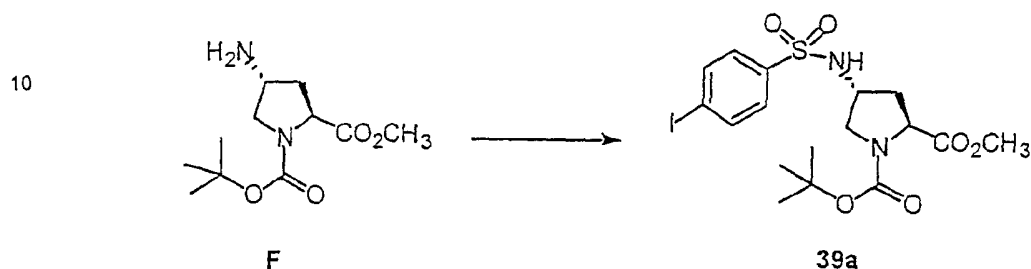


Požadovaný materiál **38B** byl syntetizován jak je popsáno pro příklad 3, krok A, v 83% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{53}N_6O_{10}S$: 809,3544 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 809,3547.

Příklad 39: Příprava sloučeniny 39

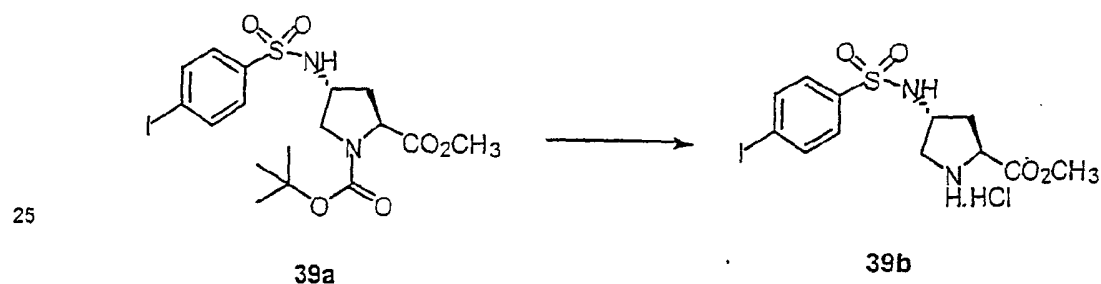


Krok A



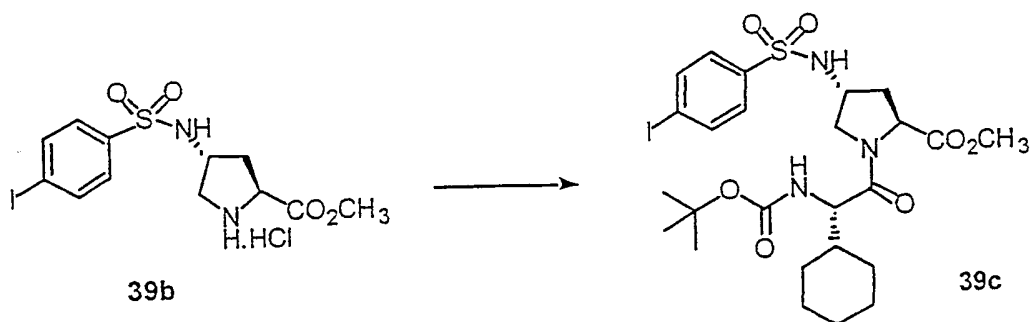
Požadovaný produkt **39a** byl získán způsobem popsaným pro
15 příklad 37, krok A s použitím pipsylchloridu namísto 3-
brombenzensulfonylchloridu. Čištění zbytku chromatografií na koloně
s použitím směsi 95/5 až 90/10 dichlormethan/EtOAc poskytlo 75%
výtěžek **39a**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{17}H_{24}N_2O_6Si$: 511,0400
($M+H$)⁺. Nalezeno: 511,0386.

Krok B



Požadovaný produkt **39b** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

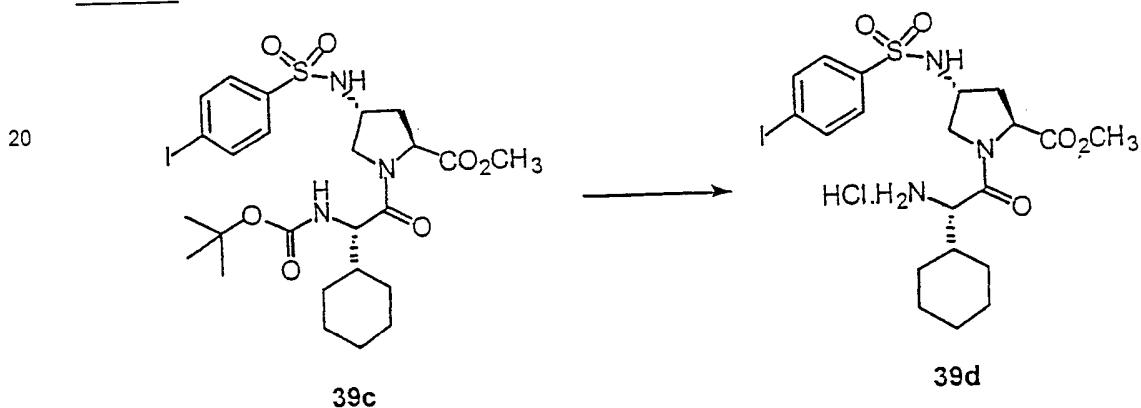
5 Krok C



10

Požadovaný produkt **39c** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok D. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 90/10 až 80/20 dichlormethan/EtOAc poskytlo 68% výtěžek **39c**.
 15 HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{37}N_3O_7SI$: 650,1397 ($M+H$)⁺.
 Nalezeno: 650,1398.

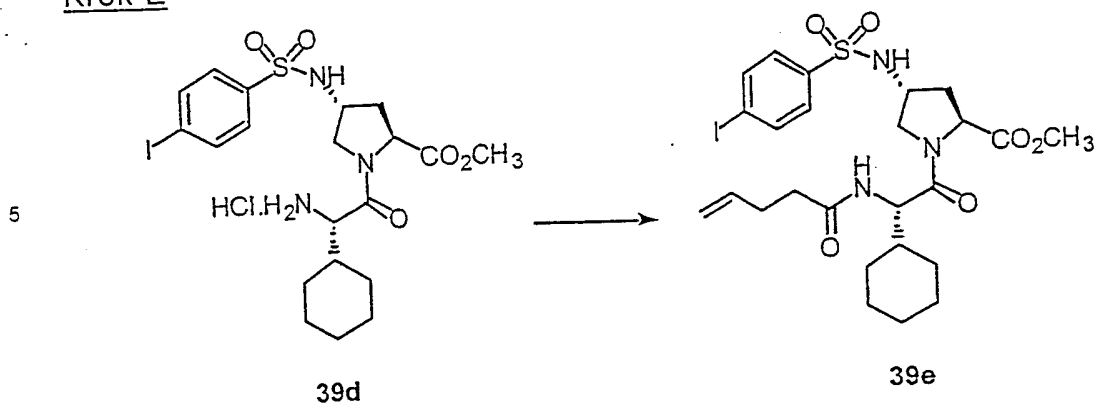
Krok D



25

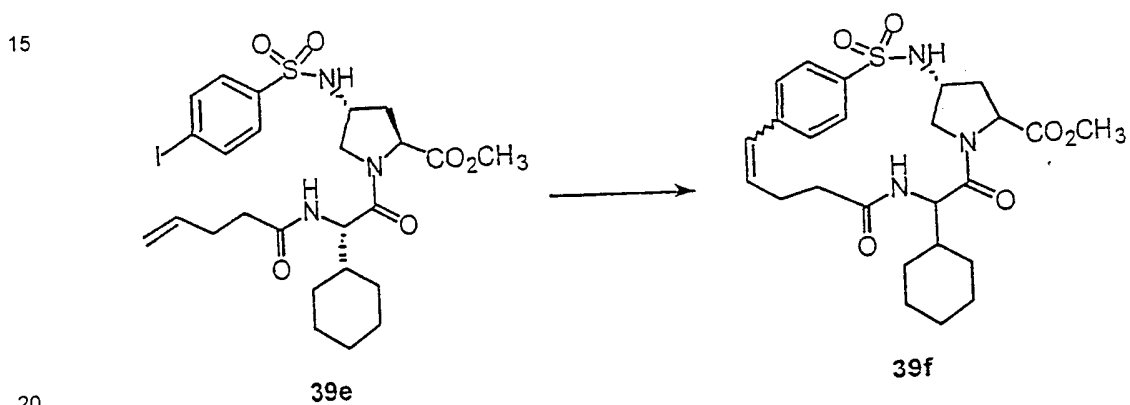
Požadovaný produkt **39d** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok E. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

Krok E



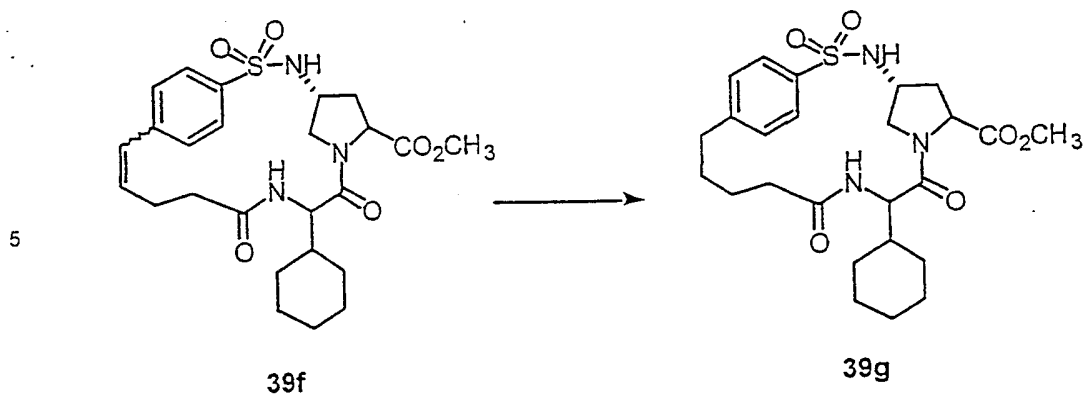
10 Požadovaný produkt **39e** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok F s použitím kyseliny pentenové jako reakčního partnera. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH poskytlo 76% výtěžek **39e**.

Krok F



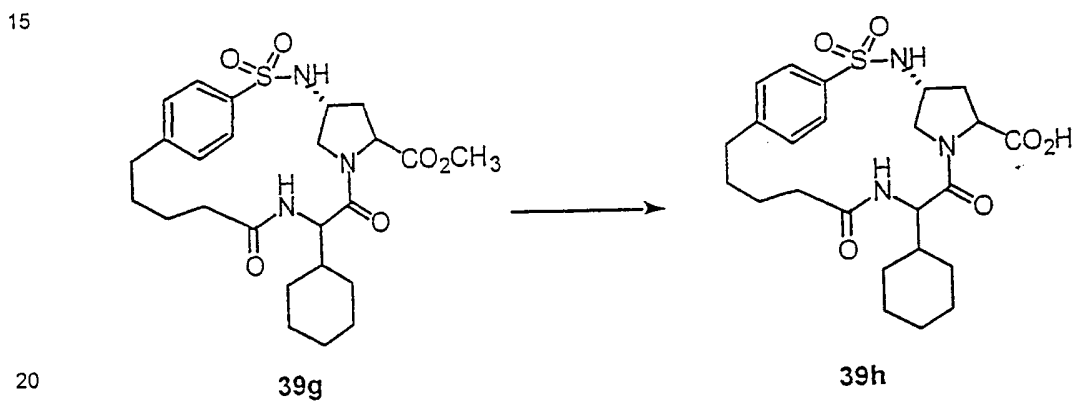
25 Požadovaný produkt **39f** byl získán způsobem popsaným pro příklad 37, krok F. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH poskytlo 28% výtěžek **39f** jako směsi diastereomerů. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{34}N_3O_6S$: 504,2168 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 504,2160.

Krok G



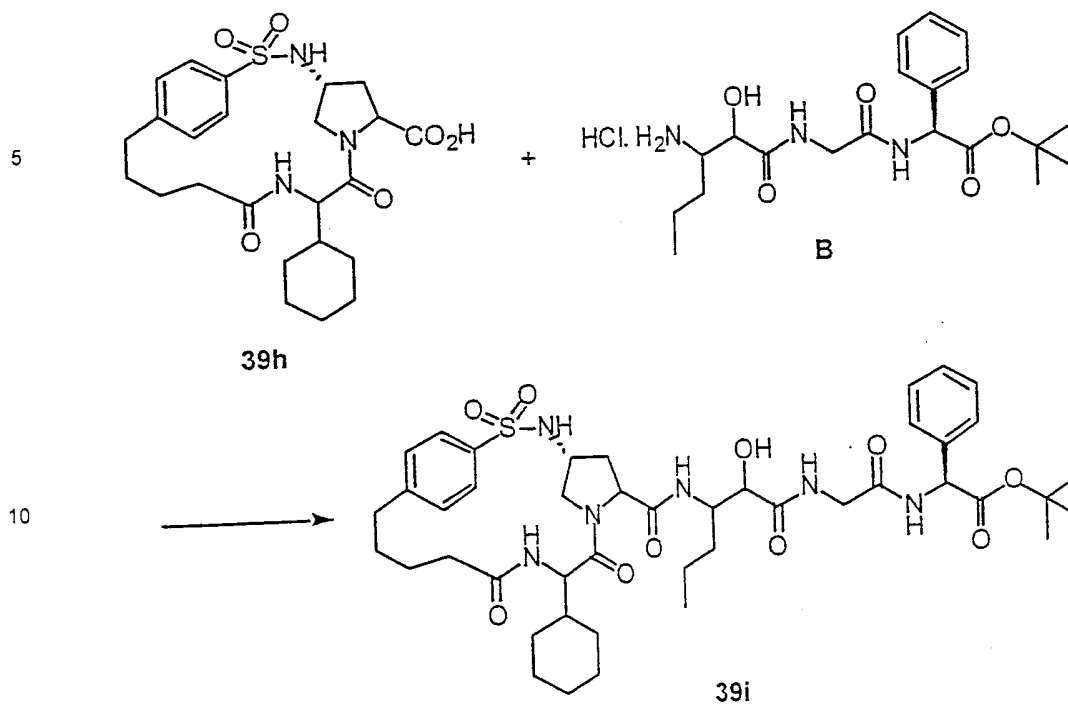
Požadovaný produkt **39g** byl získán hydrogenací, postupem
10 popsaným pro příklad 1, krok G v 84% výtěžku. Materiál měl
dostatečnou čistotu pro další studie. HRMS (FAB) Vypočteno pro
 $C_{25}H_{36}N_3O_6S$: 506,2325 (M+H)⁺. Nalezeno: 506,2314.

Krok H



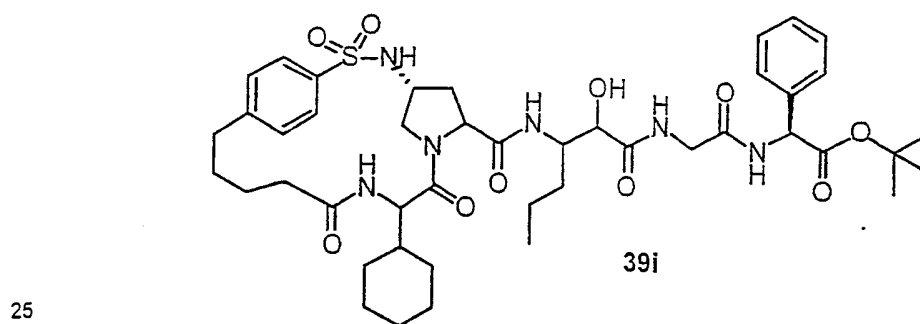
Požadovaný produkt **39h** byl získán způsobem popsaným pro
příklad 1, krok H v kvantitativním výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro
 $C_{24}H_{34}N_3O_6S$: 492,2168 (M+H)⁺. Nalezeno: 492,2175.

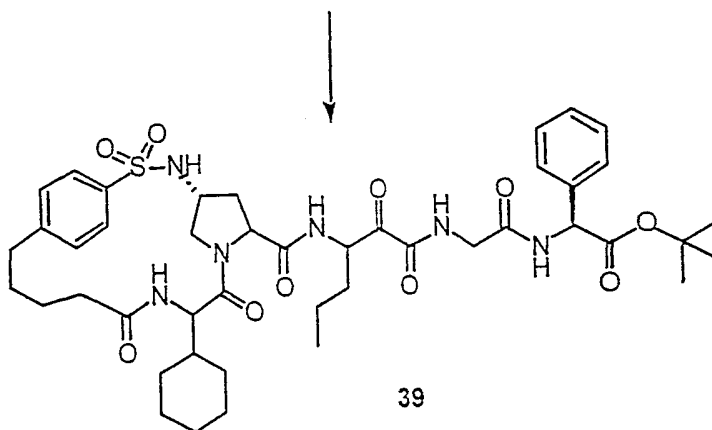
Krok I



15 Očekávaný produkt **39i** byl získán způsobem popsaným pro příklad 2, krok A v 36% výtěžku. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{44}H_{63}N_6O_{10}S$: 867,4326 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 867,4342.

20 Krok J

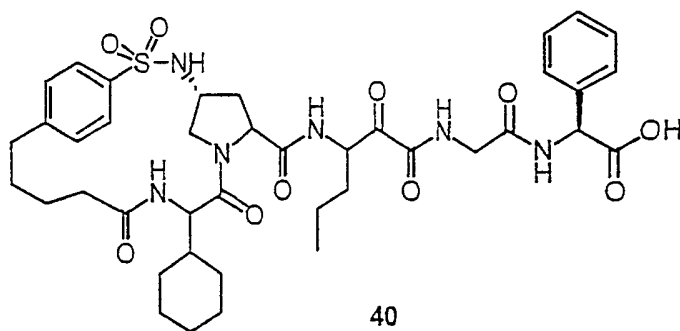




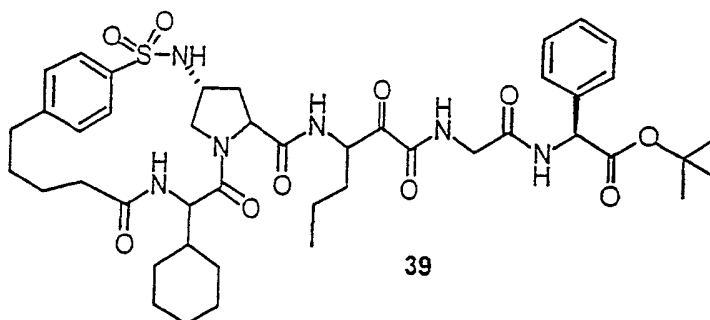
Požadovaný materiál **39** byl získán postupem oxidace popsaným pro příklad 2, krok B. Čištění zbytku s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **39** ve 24% výtěžku jako směs diastereomerů. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{44}H_{61}N_6O_{10}S$: 865,4170 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 865,4181.

10

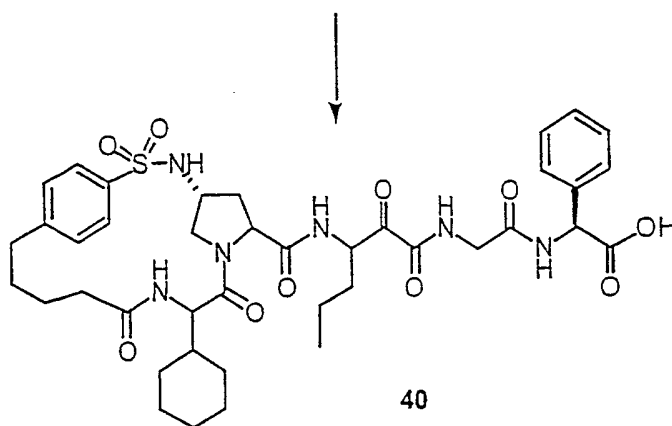
Příklad 40: Příprava sloučeniny 40



Krok A



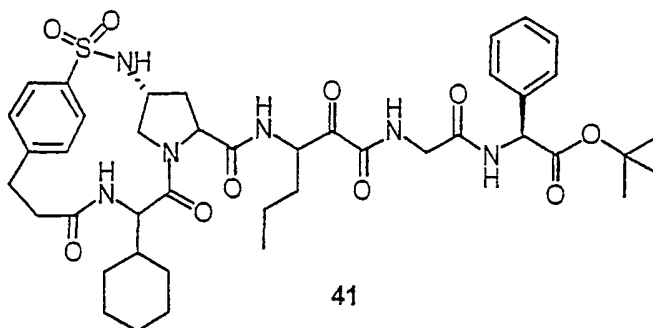
5



Požadovaný materiál **40** byl získán způsobem popsáním pro
příklad 3, krok A v 93% výtěžku jako směs diastereomerů. HRMS
10 (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{53}N_6O_{10}S$: 809,3544 $(M+H)^+$. Nalezeno:
809,3544.

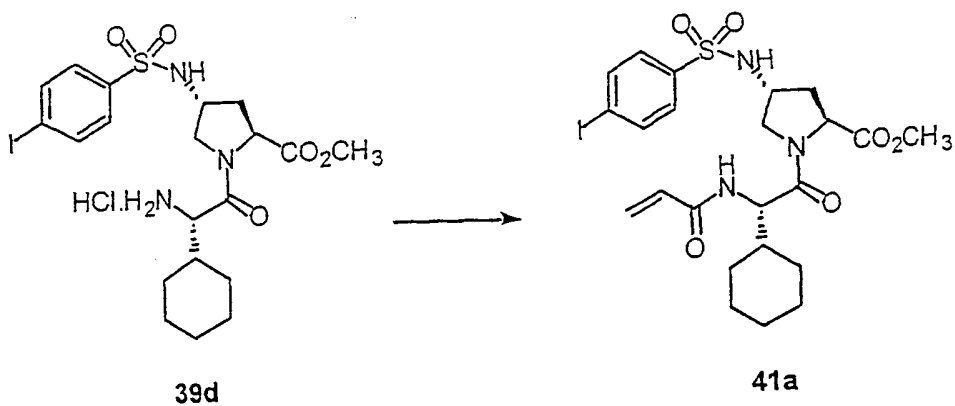
Příklad 41: Příprava sloučeniny 41

15



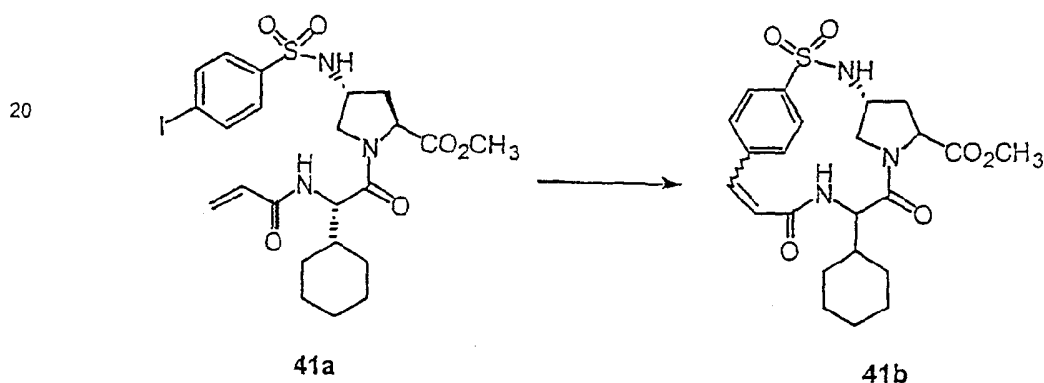
Krok A

25



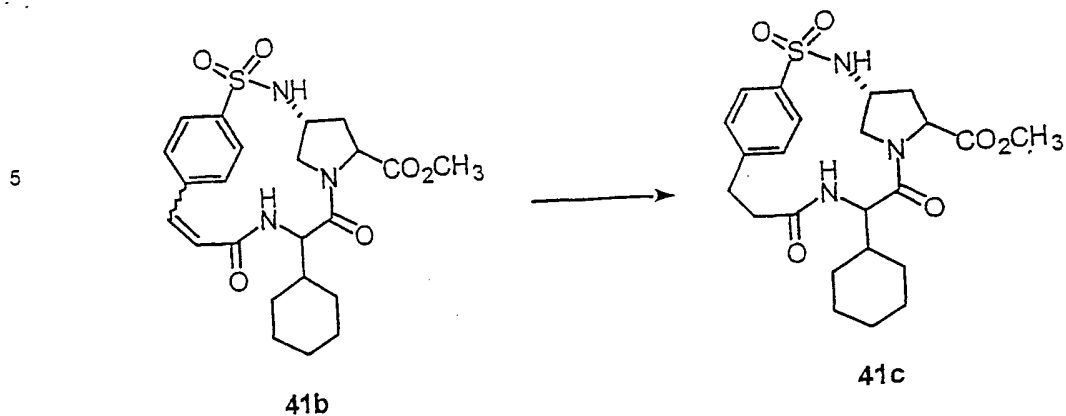
Do 25 ml přidávací nálevky byl přidán benzen (5 ml), DMF (0,32 ml, 4,1 mmol) a thionylchlorid (0,33 ml, 4,5 mmol). Po 5 min se objevily dvě vrstvy. Nižší vrstva byla oddělena a pomalu přidána k chladnému (0 - 5 °C) roztoku sloučeniny kyseliny akrylové (0,19 ml, 2,8 mmol) v dichlormethanu. Směs byla udržována při této teplotě po dobu 10 min. Potom byl přidán triethylamin (0,77 ml, 5,5 mmol), následovaný sloučeninou **39d** (1,13 g, 2,1 mmol). Reakční směs byla zahřáta na teplotu laboratoře v průběhu 5 hod a reakce byla ukončena nasyceným NaHCO₃. Organická vrstva byla oddělena, promyta 5% roztokem H₃PO₄ a roztokem soli. Dichlormethanová vrstva byla usušena (Na₂SO₄), a zakoncentrována. Surový materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH za získání 870 mg **41a** (67% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₂₃H₃₁N₃O₆SI: 604,0978 (M+H)⁺. Nalezeno: 604,0964.

Krok B



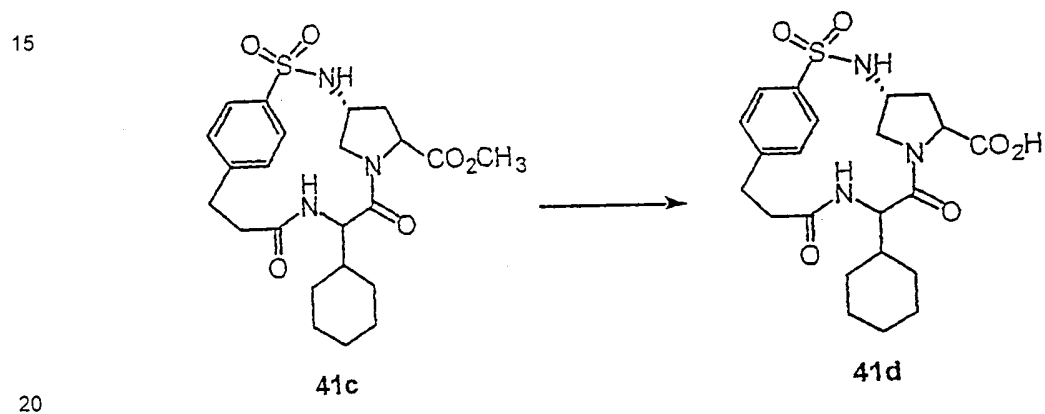
25 Požadovaný produkt **41b** byl získán způsobem popsáním pro příklad 37, krok F. Zbytek byl čištěn s použitím směsi 97/3 dichlormethan/MeOH za získání sloučeniny **41b** v 26% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₂₃H₃₀N₃O₆S: 476,1855 (M+H)⁺. Nalezeno: 476,1858.

Krok C



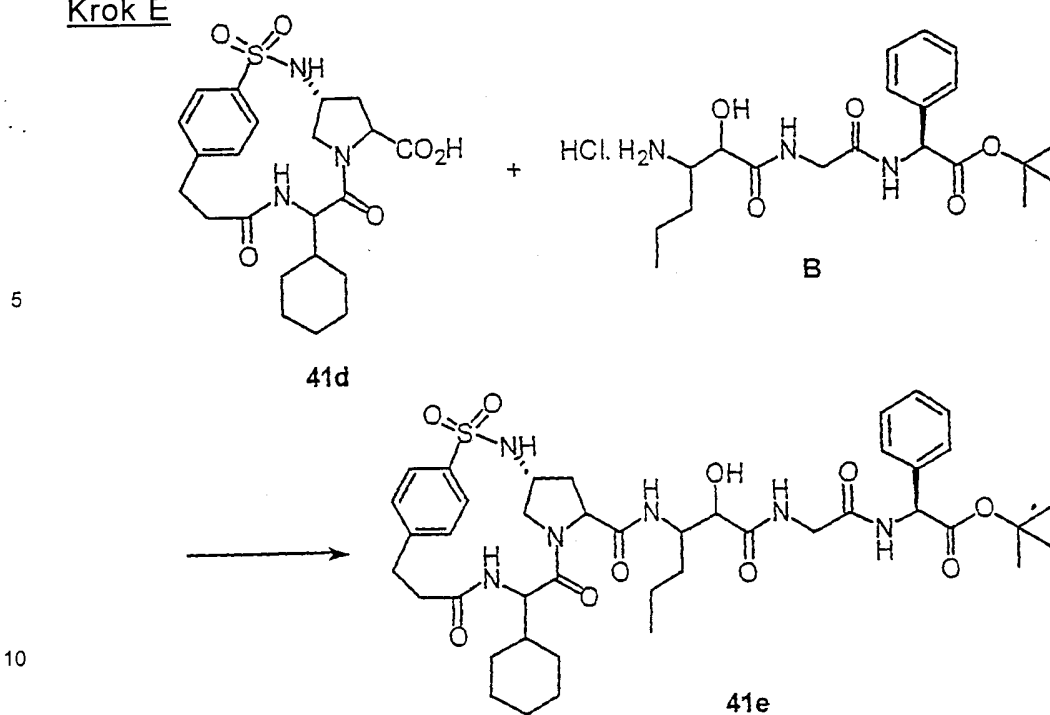
10 Požadovaný produkt **41c** byl získán hydrogenací způsobem popsaným pro příklad 1, krok D v 75% výtěžku. Materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie.

Krok D



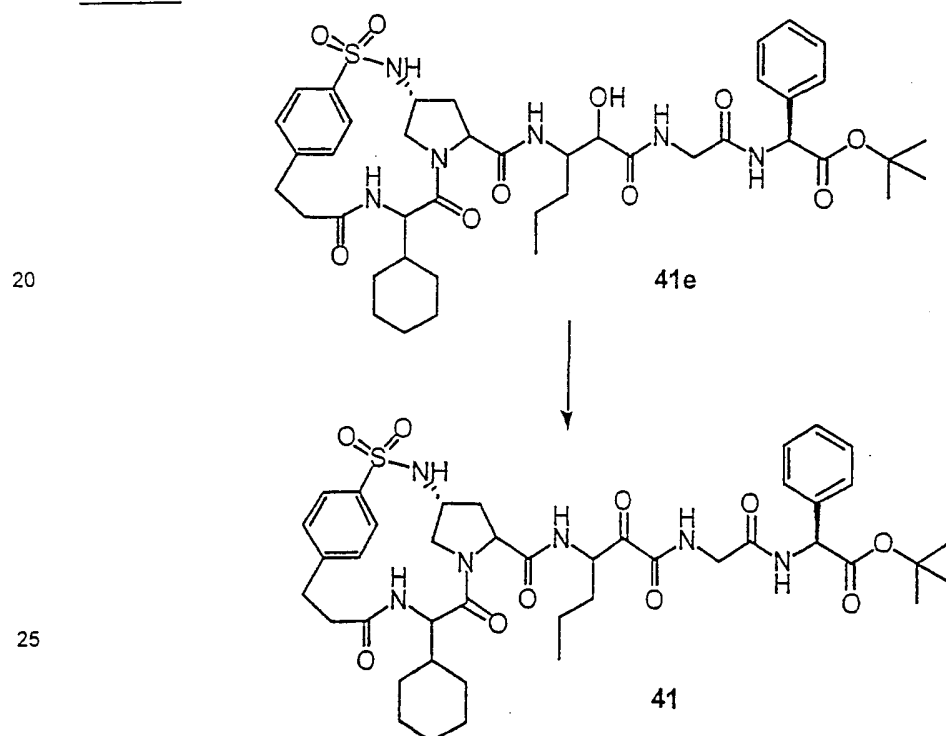
Požadovaný produkt **41d** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok E. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

Krok E



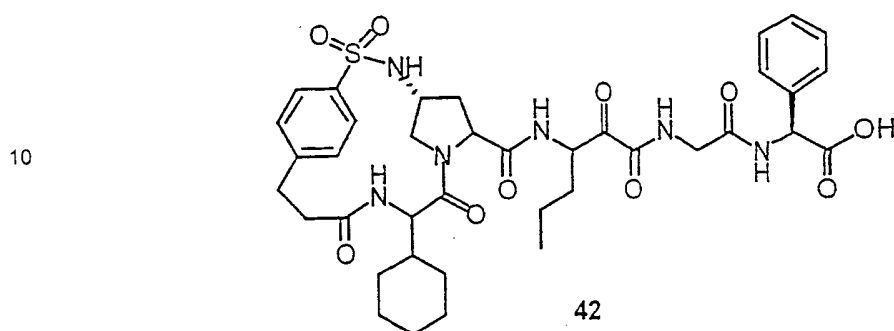
Očekávaný produkt **41e** byl získán způsobem popsáním pro příklad 2, krok A v 63% výtěžku. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie.

Krok F

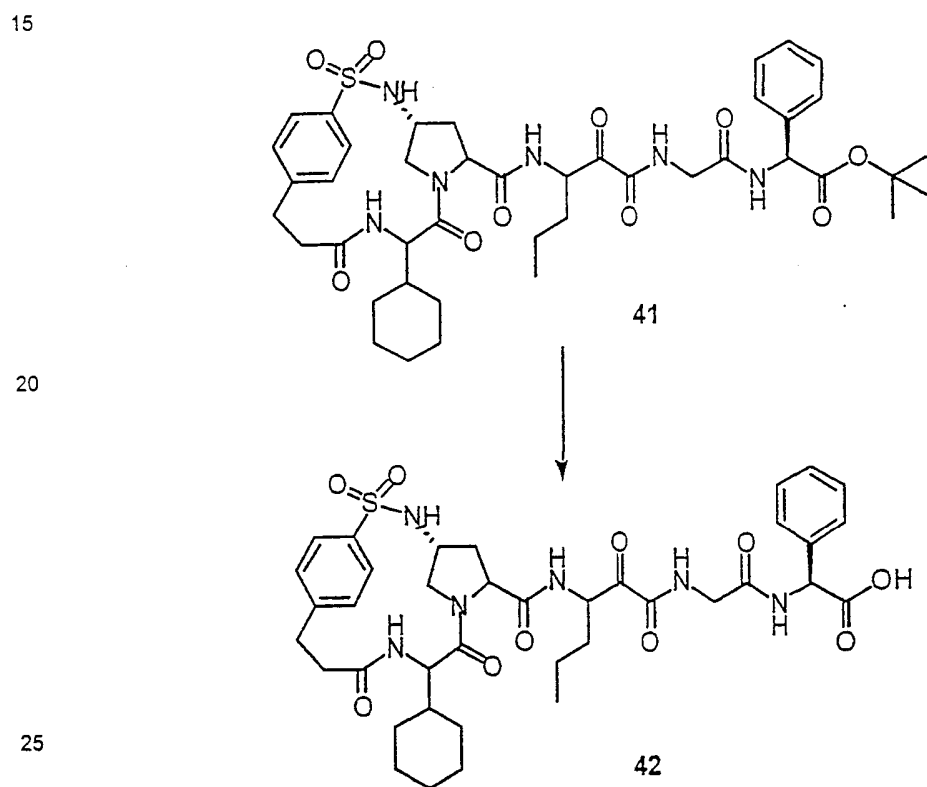


Požadovaný materiál **41** byl získán protokolem oxidace popsaným pro příklad 2, krok B. Čištění zbytku s použitím směsi 98/2 až 95/5 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **41** v 52% výtěžku jako směs diastereomerů.

Příklad 42: Příprava sloučeniny 42

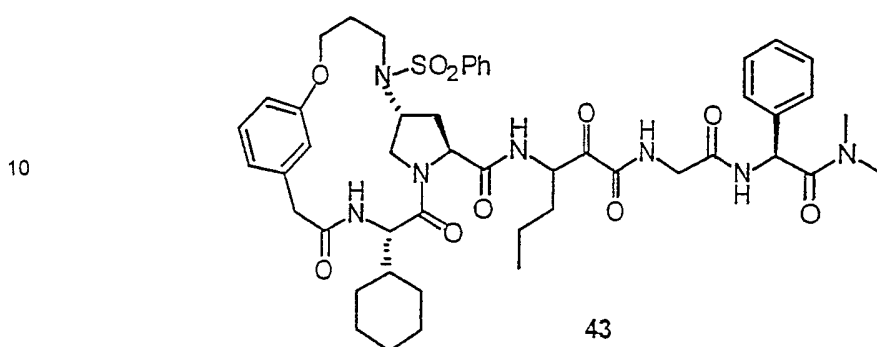


Krok A

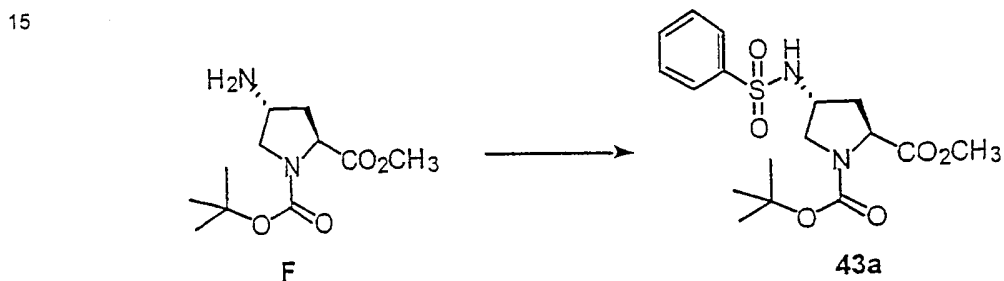


Požadovaný materiál **42** byl získán způsobem popsaným pro příklad 3, krok A v kvantitativním výtěžku jako směs diastereomerů. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{38}H_{49}N_6O_{10}S$: 781,3231 (M+H)⁺.
 5 Nalezeno: 781,3233.

Příklad 43: Příprava sloučeniny 43



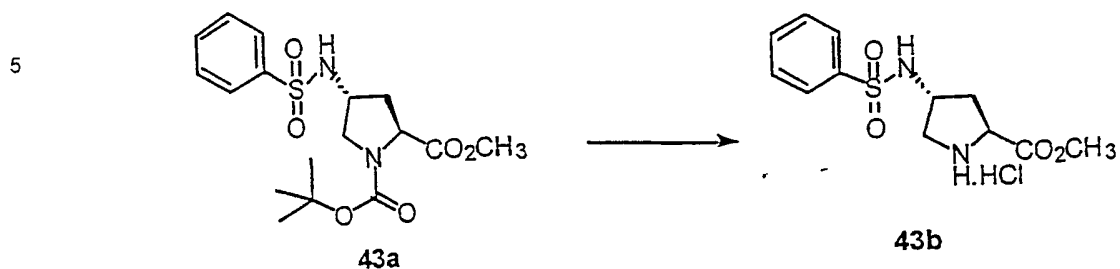
Krok A



20 K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **F** (5,4 g, 22,1 mmol) v dichlormethanu (50 ml) byl přidán triethylamin (6,8 ml, 48,6 mmol), DMAP (několik krystalů) a benzensulfonylchlorid (3,29 g, 24,1 mmol). Reakční směs byla ponechána stát v chladicím boxu (0 - 5 °C) přes noc. Reakční směs byla promyta nasyceným $NaHCO_3$, a 10%
 25 roztokem kyseliny citronové. Organická vrstva byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 95/5 dichlormethan/EtOAc za získání 5,0 g (59%)

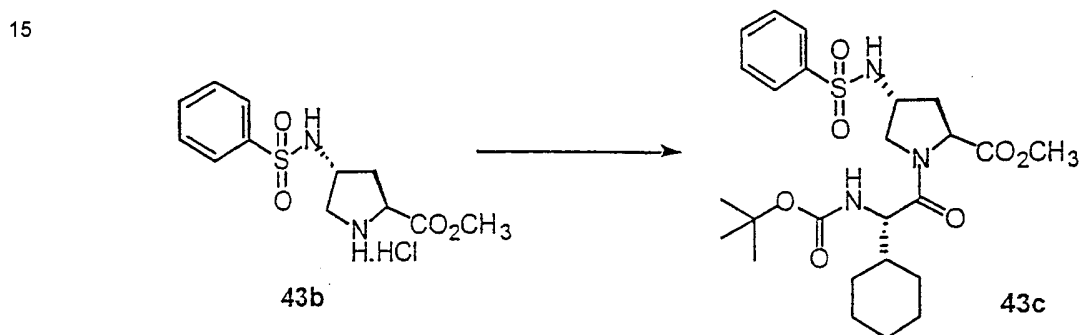
výtěžek) sloučeniny **43a**.

Krok B



10 Požadovaný produkt **43b** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl použit v dalším kroku bez čištění.

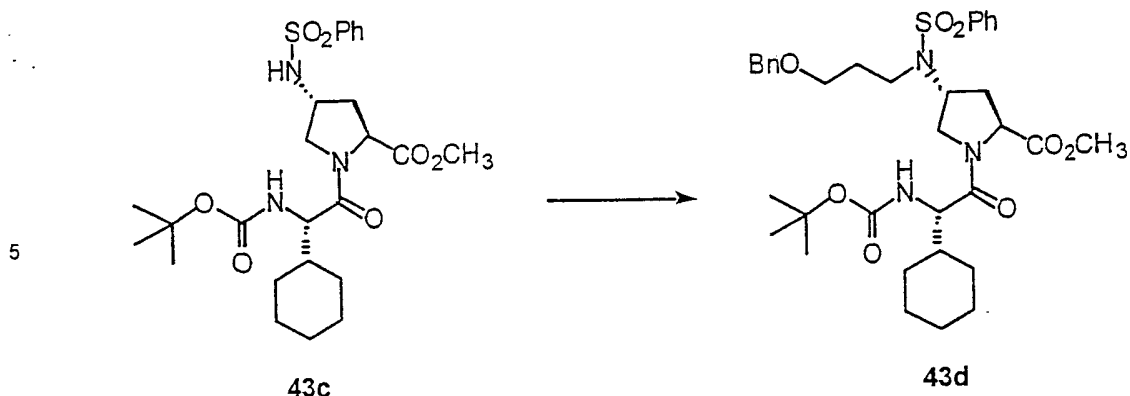
Krok C



20

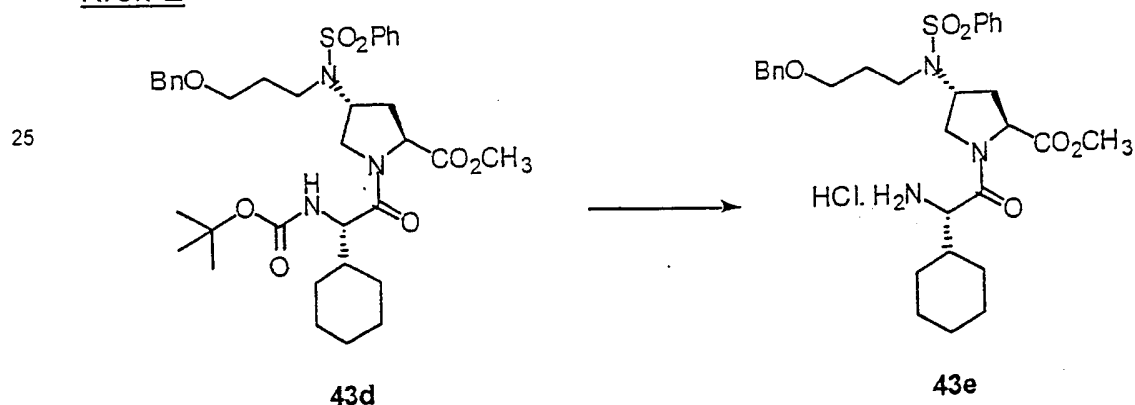
Požadovaný produkt **43c** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok D. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 dichlormethan/MeOH poskytlo 60% výtěžek **43c**.

Krok D



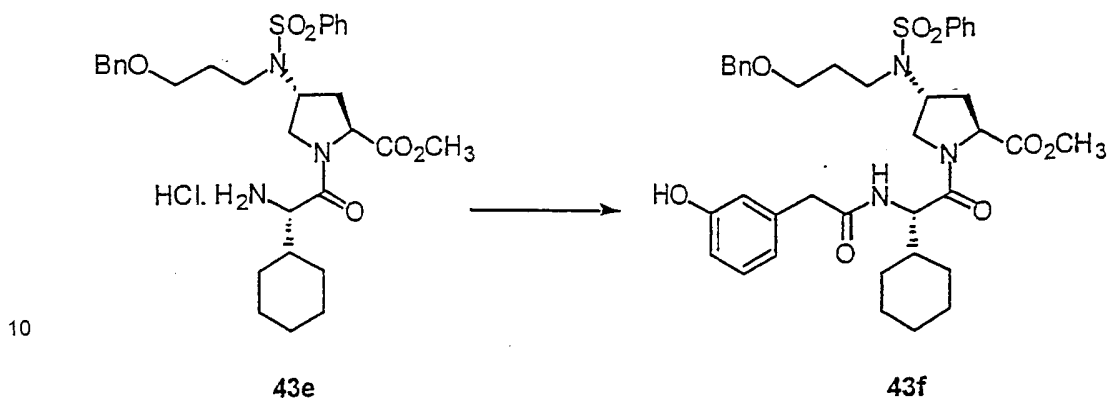
Argon byl probubláván chladným (0 °C) roztokem sloučeniny **43c** (1,72 g, 3,28 mmol) v dichlormethanu (40 ml) 20 až 30 min. Byl přidán
 10 ADDP (2,5 g, 9,84 mmol), potom trifenyfosfin (2,6 g, 9,84 mmol) a 3-benzyloxypropanol (0,57 ml, 3,61 mmol). Reakční směs byla zahřáta na laboratorní teplotu a ponechána stát dva dny. Reakční směs byla zakoncentrována a byl přidán Et₂O (50 ml). Vysrážený pevný materiál byl odfiltrován. Tato operace byla dvakrát opakována pro odstranění
 15 většiny vedlejších produktů. Filtrát byl zakoncentrován a čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 90/10 až 85/15 dichlormethan/EtOAc za získání 330 mg **43d**. Oddělené výchozí materiály spolu s určitým množstvím trifenyfosfinoxidu byly znovu zpracovány za výše uvedených podmínek za poskytnutí dalších
 20 420 mg **43d**. Kombinovaný výtěžek = 34 %. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₃₅H₅₀N₃O₈S: 672,3319 (M+H)⁺. Nalezeno: 672,3330.

Krok E



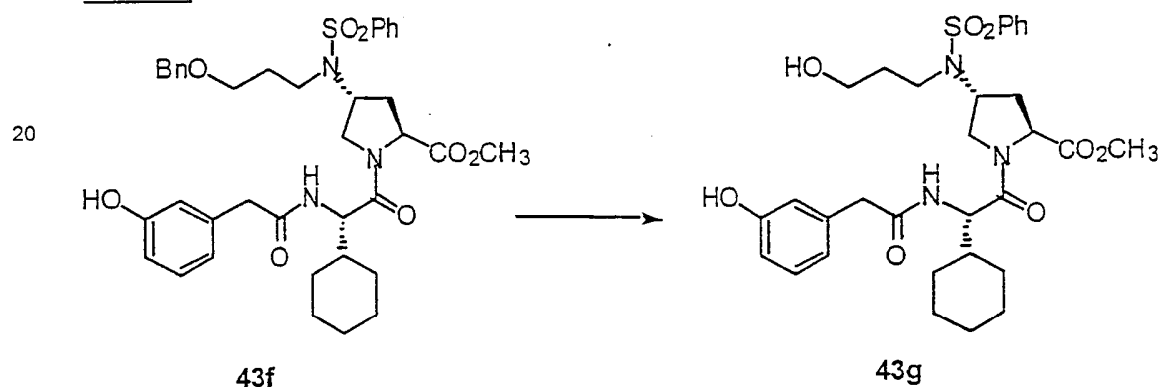
Požadovaný produkt **43e** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok E. Surový produkt byl převeden do dalšího kroku.

5 Krok F



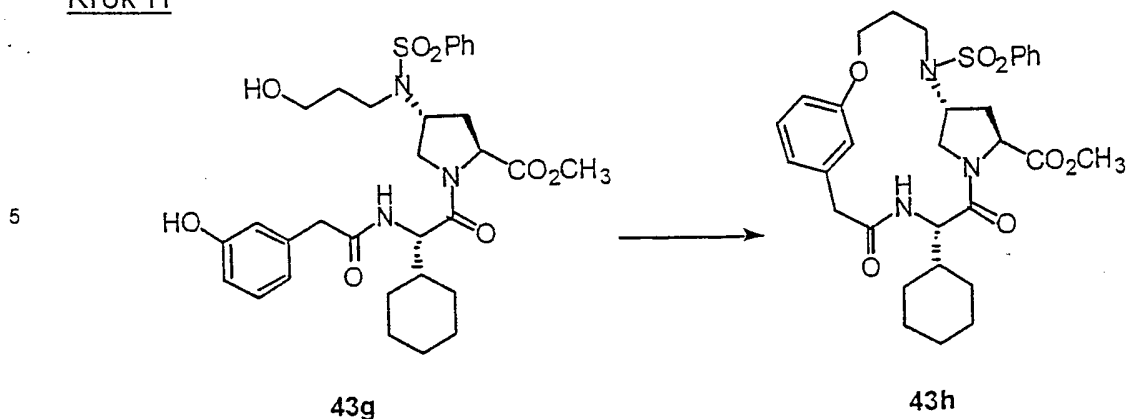
15 Požadovaná sloučenina **43f** byla připravena podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok F. Čištění bleskovou chromatografií bylo provedeno s použitím gradientu 60/40 až 50/50 dichlormethan/EtOAc za získání **43f** v kvantitativním výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{38}H_{48}N_3O_8S$: 706,3162 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 706,3157.

Krok G



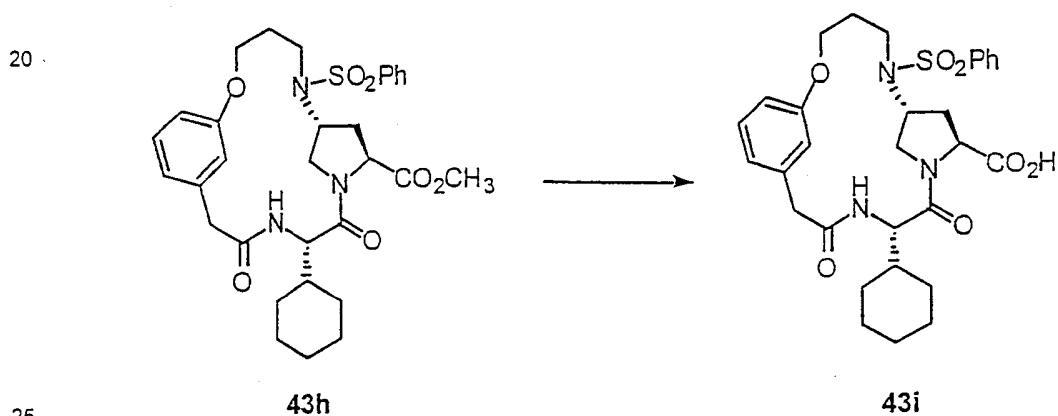
25 Požadovaný produkt **43g** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok G. Materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie.

Krok H



Požadovaný produkt **43h** byl získán způsobem popsáním pro
 10 příklad 1, krok H. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno. Byl
 přidán Et₂O (50 ml) a pevné podíly byly odfiltrovány. Filtrát byl
 zakoncentrován a byla přidána směs Et₂O/EtOAc (50ml/50 ml).
 Vysrážené pevné podíly byly odfiltrovány a filtrát byl zakoncentrován.
 Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 85/15 až
 15 80/20 dichlormethan/EtOAc za získání pure sloučeniny **43h** v 20%
 výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₃₁H₄₀N₃O₇S: 598,2587 (M+H)⁺.
 Nalezeno: 598,2581.

Krok I



Očekávaný produkt **43i** byl získán způsobem popsáním pro
 příklad 1, krok I v 92% výtěžku.

Krok J



10

15

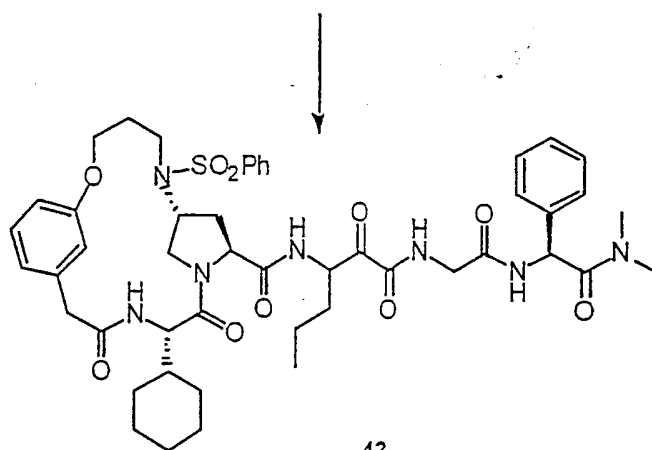
Požadovaný materiál **43j** byl syntetizován jak je popsáno pro příklad 1, krok J. Surový produkt byl dostatečně čistý pro další použití.

Krok K



25

5

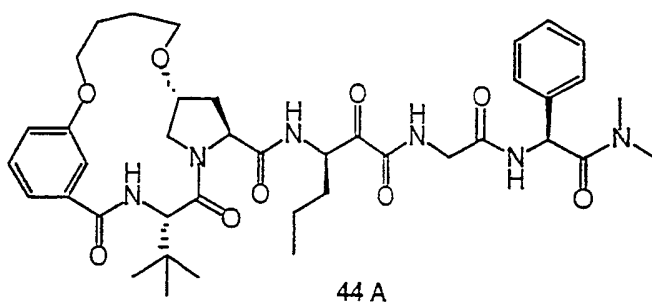


43

Očekávaný produkt **43** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 97/3 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **43** jako směs diastereomerů. Kombinovaný výtěžek = 60% (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{48}H_{62}N_7O_{10}S$: 928,4279 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 928,4290.

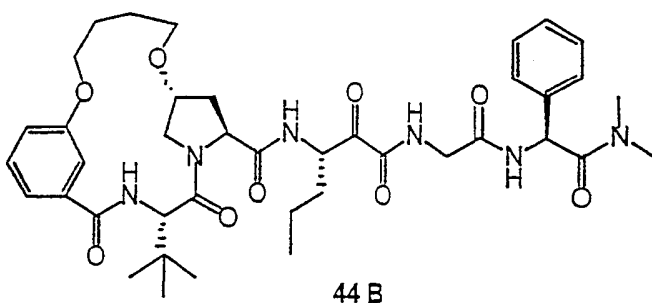
15 Příklad 44: Příprava sloučeniny 44

20



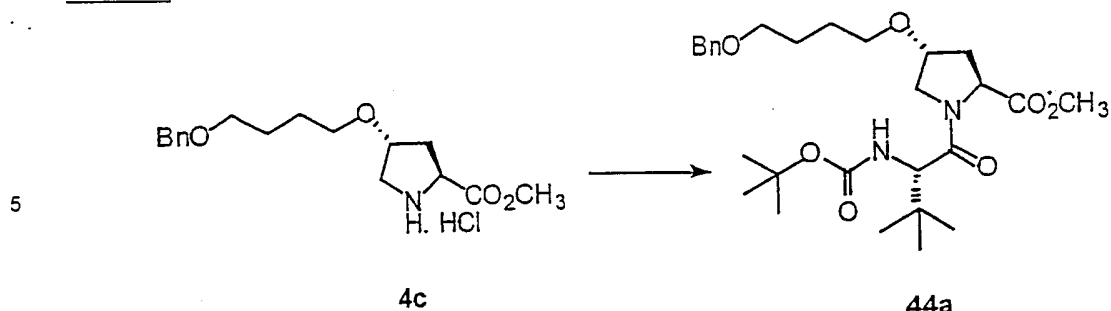
44 A

25



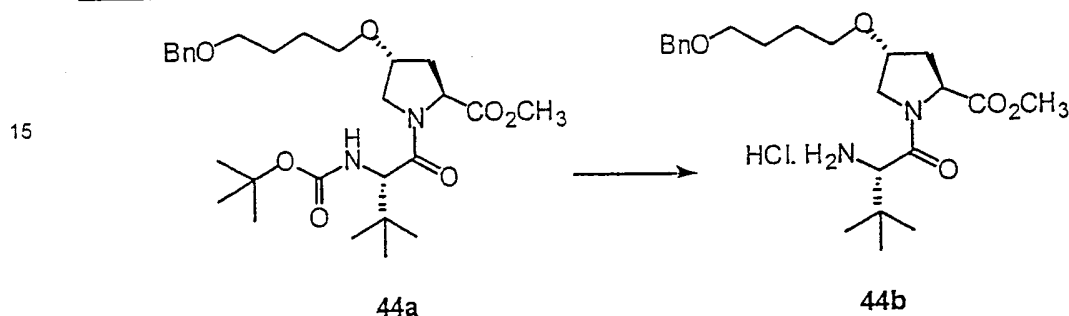
44 B

Krok A



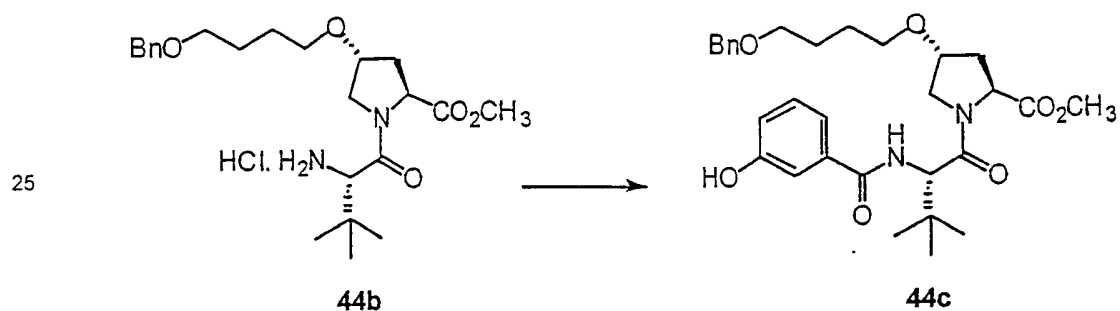
Požadovaný produkt **44a** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok D s použitím N-boc-terc-butylglycinu jako reakčního partnera. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku.

Krok B



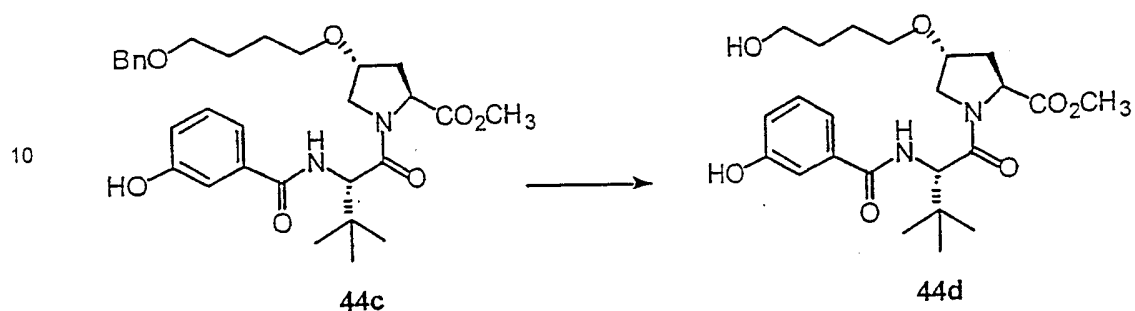
Požadovaný produkt **44b** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok E. Surový materiál byl použit dále bez čištění.

Krok C



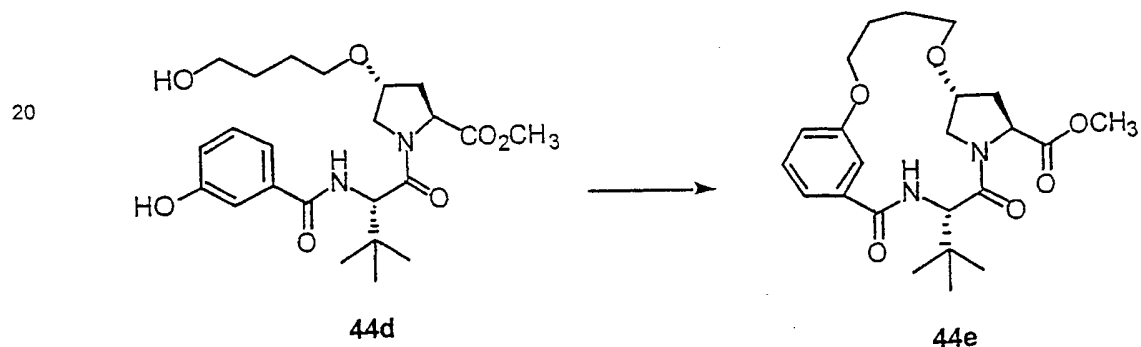
Požadovaný produkt byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok F, s použitím kyseliny 3-hydroxybenzoové. Materiál byl čištěn
bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 85/15 až 65/35
5 dichlormethan/ethylacetát za získání **44c** v 81% výtěžku.

Krok D



Požadovaný produkt **44d** byl získán způsobem popsaným pro
15 příklad 1, krok G. Zbytek po zpracování měl dostatečnou čistotu pro
další manipulaci.

Krok E

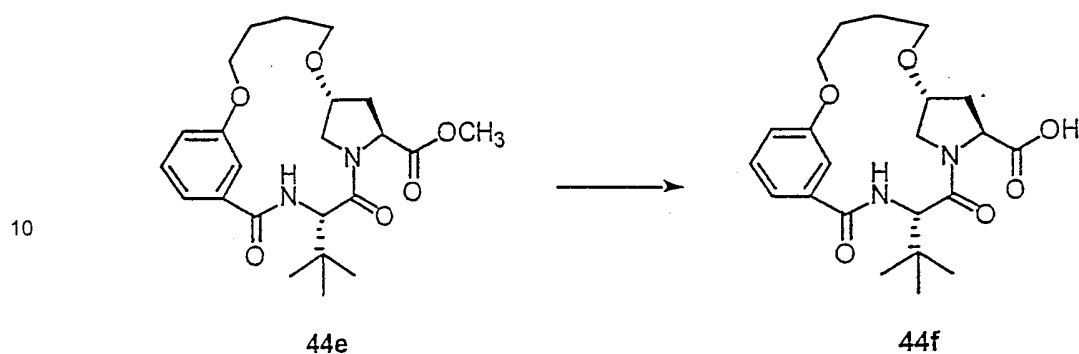


25 Požadovaný produkt **44e** byl získán způsobem popsaným pro
příklad 1, krok H. Surový zbytek po zakoncentrování byl vložen do
směsi hexany/EtOAc (1/1) a pevný materiál byl odfiltrován. Tato

operace byla provedena znovu pro odstranění dalšího množství vedlejších produktů. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi 80/20 dichlormethan/EtOAc poskytlo sloučeninu **44e** spolu s trifenyfosfinoxidem. Tato směs byla převedena do dalšího kroku.

5

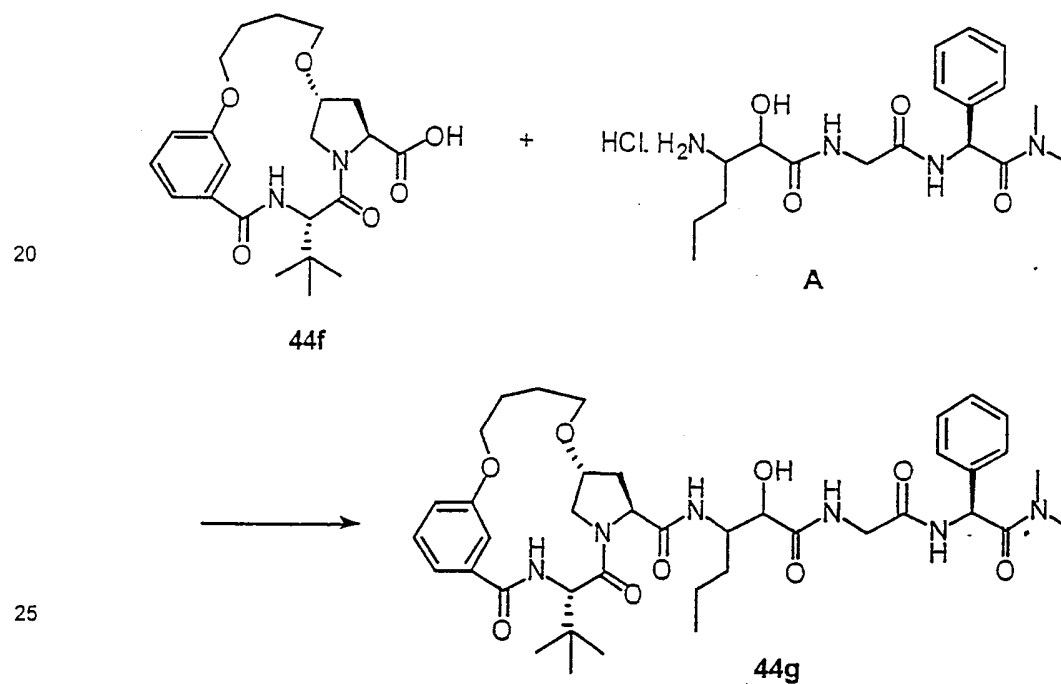
Krok F



Požadovaný produkt **44f** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok I. Výtěžek **44f** (2 kroky) = 11%.

15

Krok G

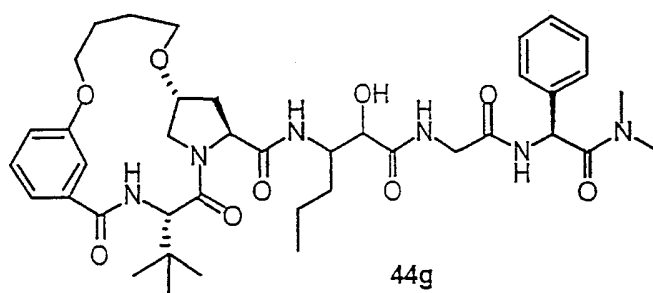


Očekávaný produkt **44g** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování byl převeden do dalšího kroku.

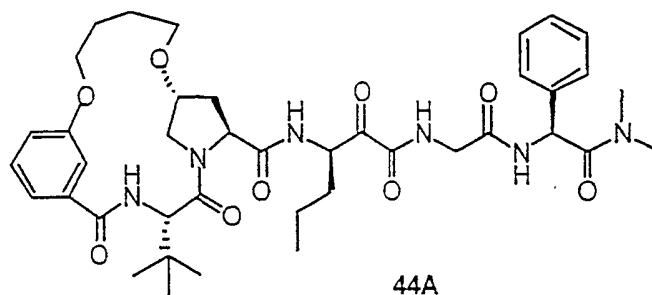
5

Krok H

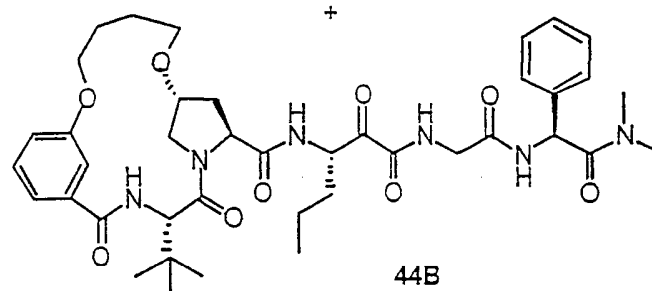
10



15



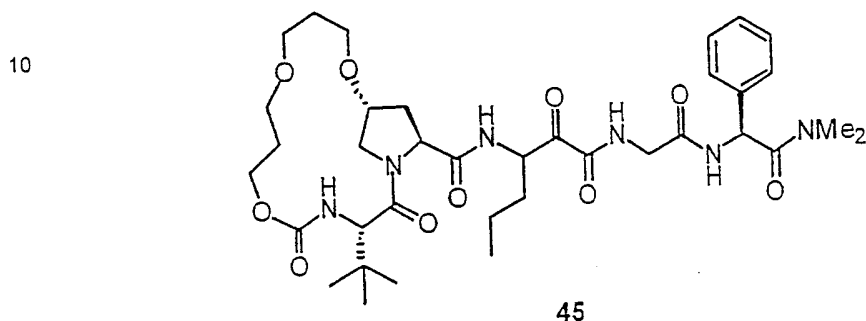
20



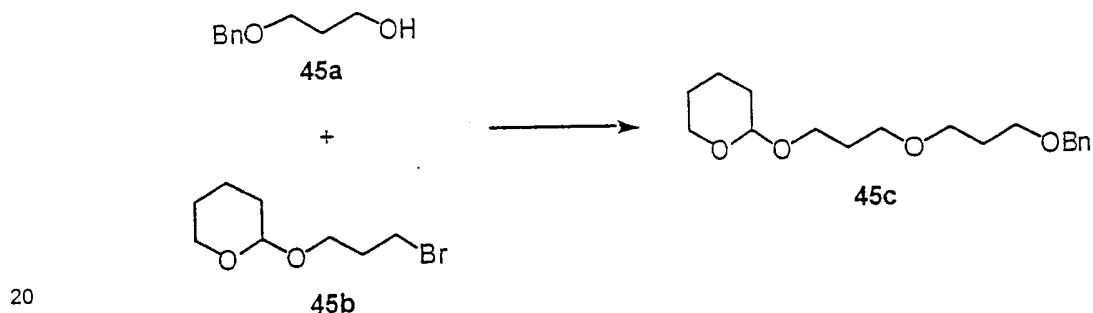
25

Požadované produkty **44A** a **44B** byly získány protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 97/3 až 96/4 dichlormethan/methanol poskytlo stejná množství oddělených isomerů **44A** a **44B**. Kombinovaný výtěžek = 58 % (2 kroky).

Příklad 45: Příprava sloučeniny 45

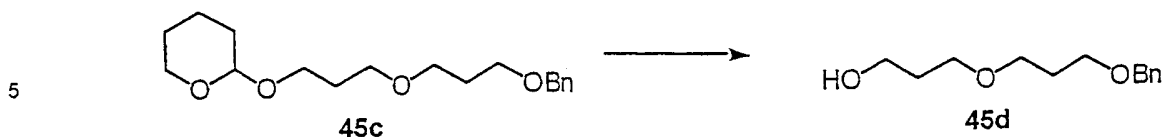


15 Krok A



Alkylace sloučeniny **45a** sloučeninou **45b** byla provedena s použitím postupu popsaného pro příklad 1, krok A. Surový produkt byl čištěn s použitím směsi 85/0/15 až 85/5/10 hexany/EtOAc/dichlormethan, za získání **45c** v 37% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{18}H_{29}O_4$: 309,2066 $(M+H)^+$. Nalezeno: 309,2060.

Krok B

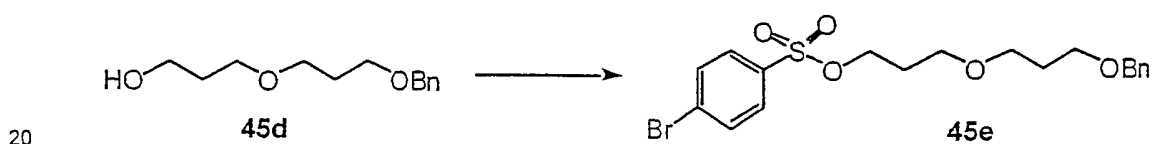


K roztoku **45c** (4,8 g, 15,5 mmol) v MeOH (30 ml) byl přidán pyridinium-*p*-toluensulfonát (780 mg, 3,1 mmol) a roztok byl zahříván pod zpětným chladičem po dobu 3 hod, kdy byl veškerý výchozí materiál spotřebován. Reakční směs byla zakoncentrována. Zbytek byl rozpuštěn v EtOAc, promyt nasyceným NaHCO₃, sušen (Na₂SO₄) a organická vrstva byla zakoncentrována za získání 3,2 g sloučeniny **45d** (92% výtěžek). Tento materiál měl dostatečnou čistotu pro další studie. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₁₃H₂₁O₃: 225,1491 (M+H)⁺. Nalezeno: 225,1486.

10

15

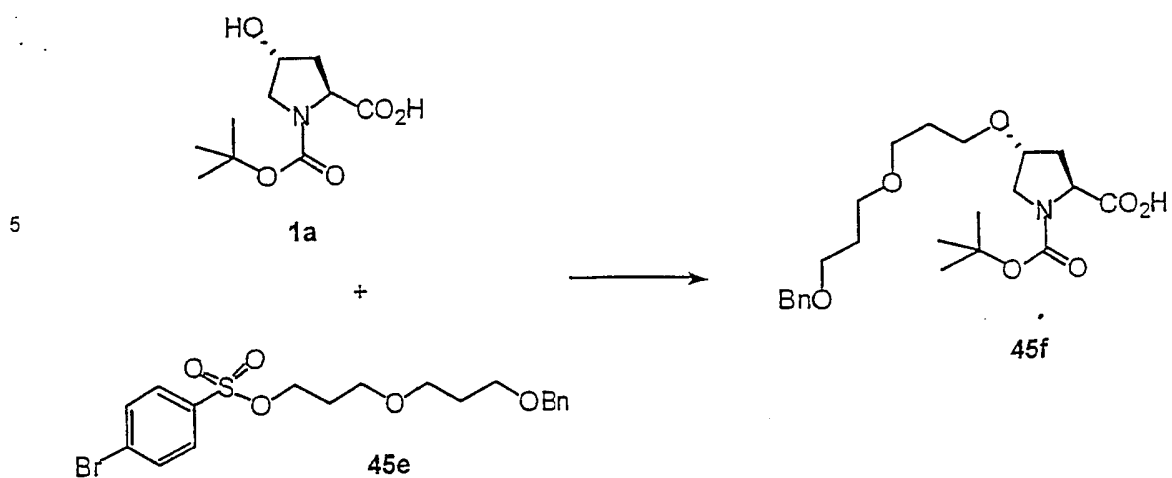
Krok C



Požadovaný produkt **45e** byl získán způsobem popsáním pro příklad 10, krok A s použitím **45d** jako výchozího materiálu. Surový produkt byl čištěn s použitím směsi 90/10 hexany/EtOAc za získání **45e** v 70% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₁₉H₂₄O₅SBr: 443,0528 (M+H)⁺. Nalezeno: 443,0552.

25

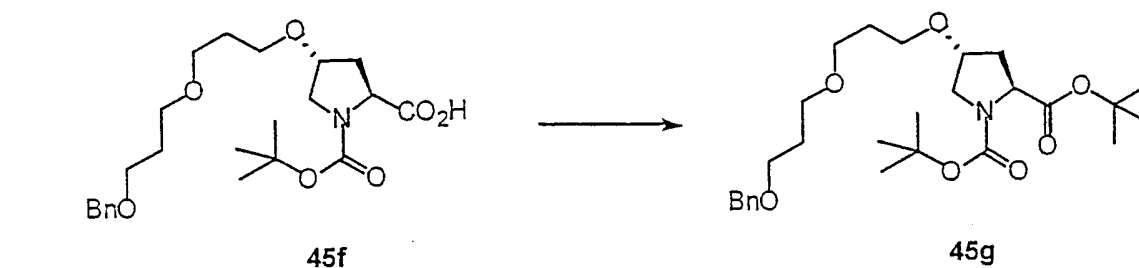
Krok D



10

Požadovaný produkt **45f** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok A s použitím **45e** jako výchozího materiálu. Surový produkt byl použit dále bez čištění.

15 Krok E

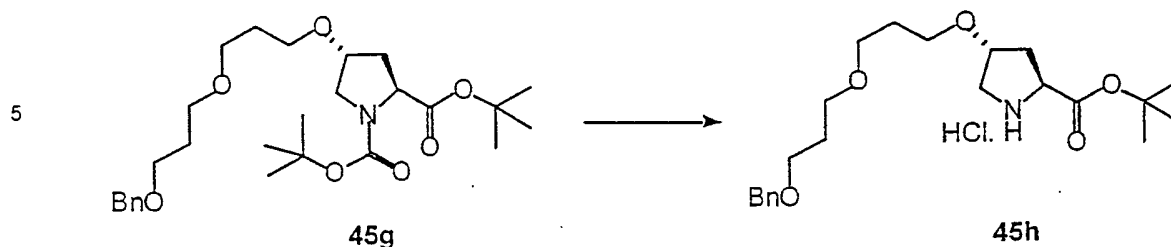


20

Požadovaný produkt **45g** byl získán způsobem popsaným pro příklad 18, krok B s použitím **45f** jako výchozího materiálu. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 90/10 dichlormethan/EtOAc za získání **45g** v 61% výtěžku (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{27}H_{44}NO_7$: 494,3118 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 494,3107.

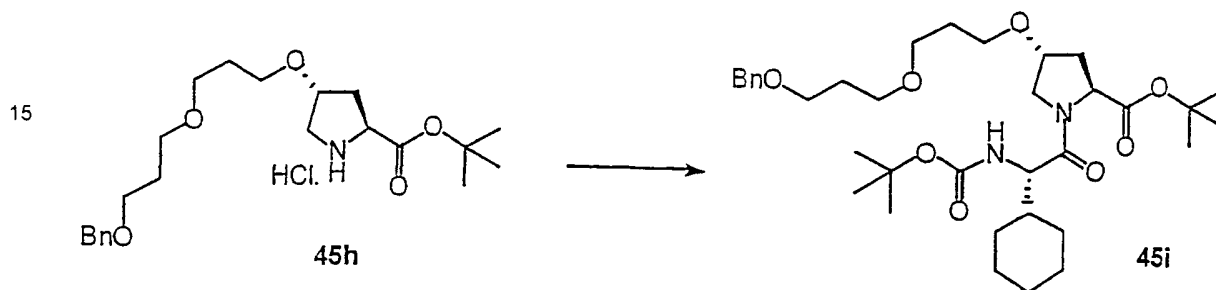
25

Krok F



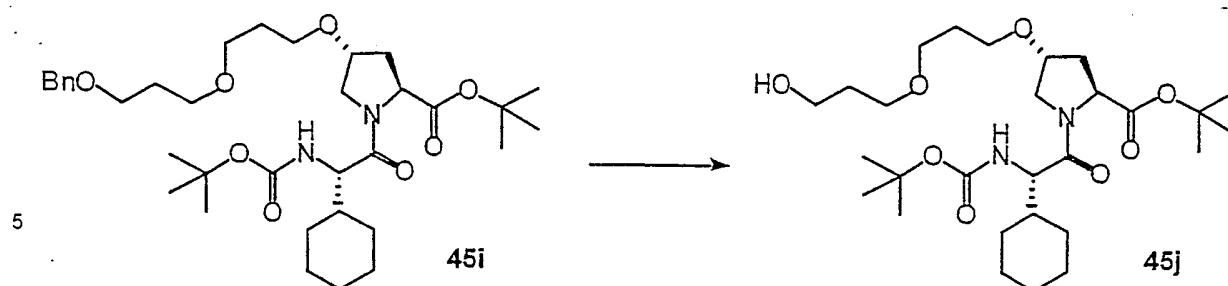
Požadovaná sloučenina **45h** byla připravena podle protokolu
10 popsaného pro příklad 1, krok C. Materiál byl použit dále.

Krok G



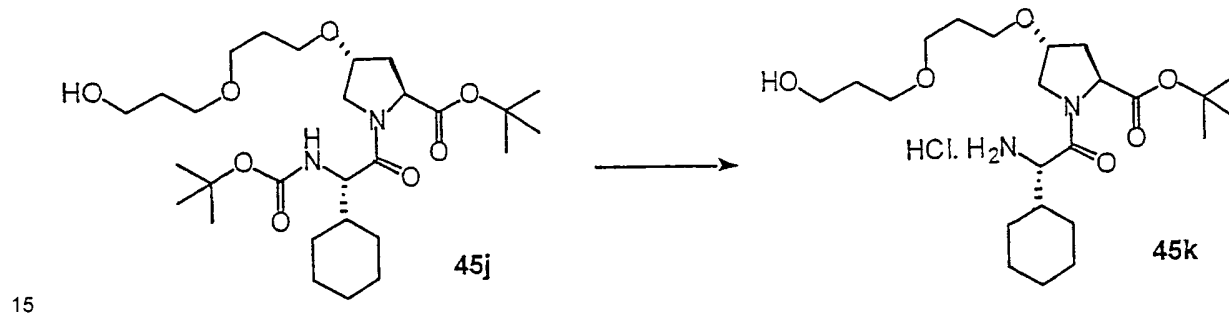
Požadovaný produkt **45i** byl získán způsobem popsaným pro
20 příklad 1, krok D. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií
s použitím směsi 90/10 až 85/15 dichlormethan/EtOAc za získání **45i**
v 41% výtěžku.

Krok H



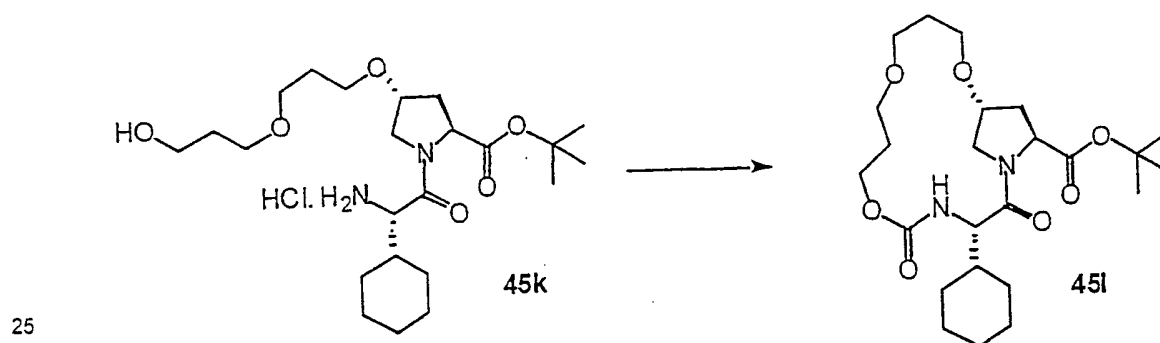
Požadovaný produkt **45j** se získá hydrogenací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok G.

10 Krok I



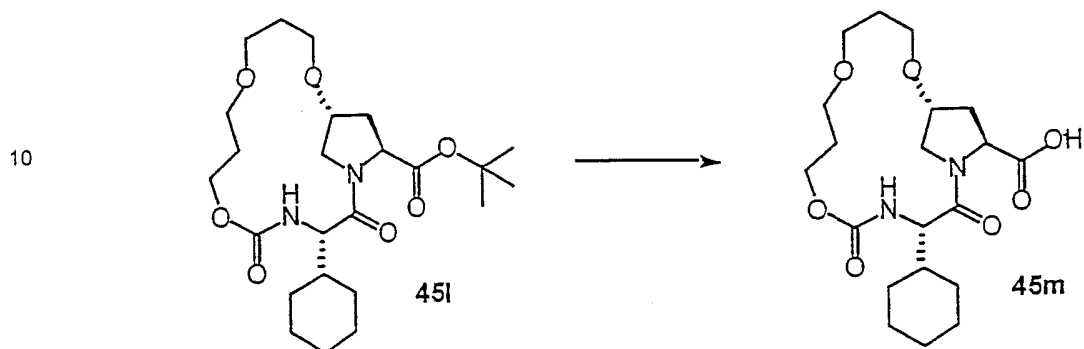
Požadovaný produkt **45k** se získá postupem popsaným výše pro příklad 1, krok C.

20 Krok J



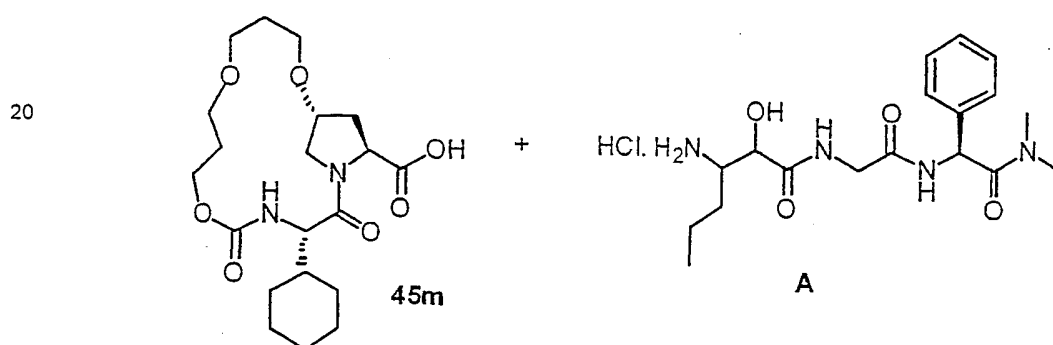
K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **45k** v dichlormethanu se přidá triethylamin, potom karbonyldiimidazol. Očekává se, že pomalé zahřívání na laboratorní teplotu přes noc poskytne požadovaný produkt **45l**. Tento produkt může být čištěn použitím běžné bleskové chromatografie na koloně za získání čisté sloučeniny **45l**.

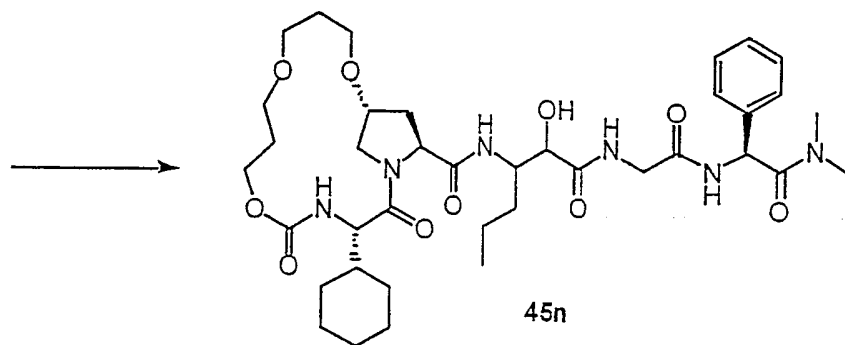
Krok K



Požadovaný produkt **45m** se získá postupem popsaným výše pro příklad 3, krok A.

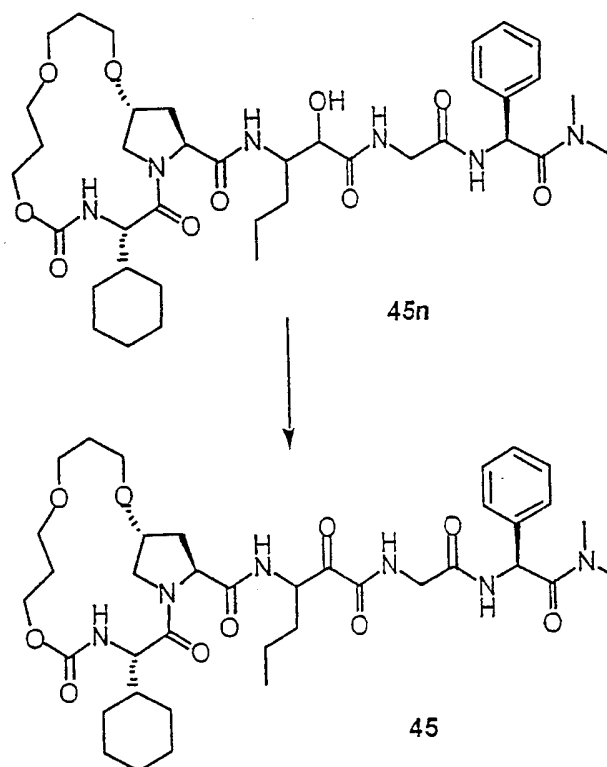
Krok L





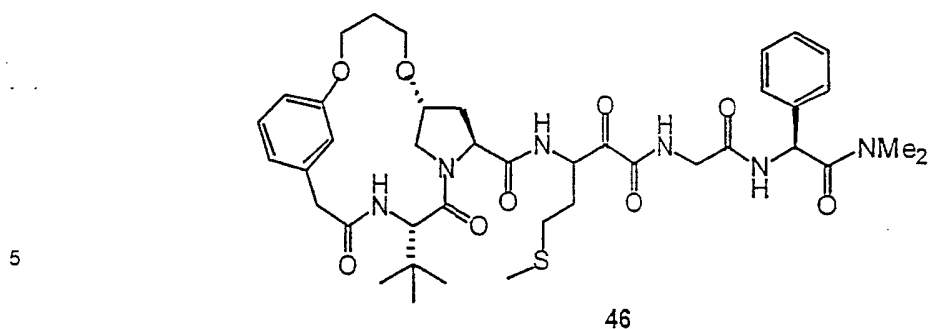
Očekávaný produkt **45n** se syntetizuje jak bylo popsáno dříve pro příklad 1, krok J.

Krok M

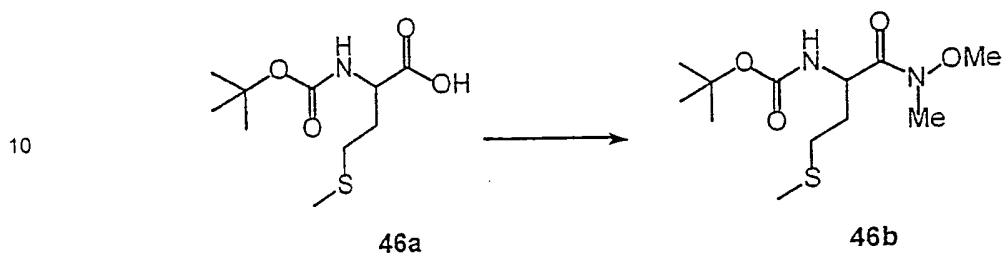


Požadovaný produkt **45** se získá protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně poskytne čistou sloučeninu **45**.

Příklad 46: Příprava sloučeniny 46

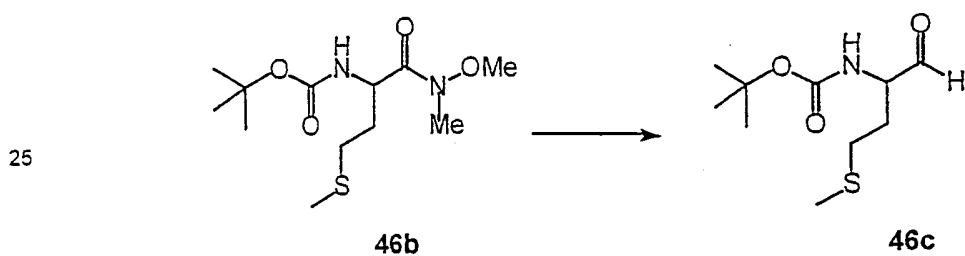


Krok A



K roztoku **46a** (10,0 g, 42,9 mmol) v dichlormethanu (100 ml) byl přidán BOP (22,75 g, 51,5 mmol) a roztok byl míchán při teplotě laboratoře po dobu 10 min. Byly přidány N,O-dimethylhydroxylamin-
 15 -hydrochlorid (4,18 g, 42,9 mmol), potom triethylamin (18,1 ml, 128,7 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hod a potom promyta 3N HCl, nasyceným NaHCO₃, a roztokem soli. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována.
 20 Surový materiál, **46b**, byl použit v následujícím kroku bez čištění.

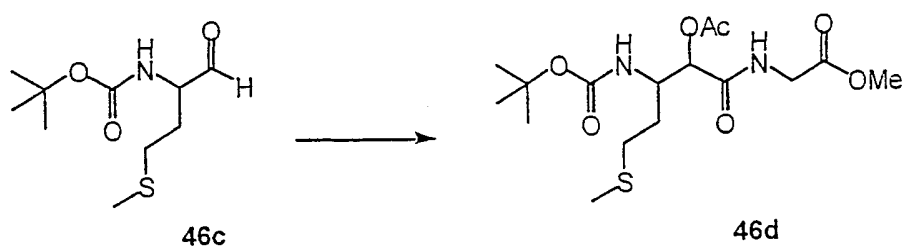
Krok B



K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **46b** v THF (60 ml) byl přidán roztok LAH (1M v THF, 50 ml, 50 mmol) v atmosféře dusíku. Reakce byla udržována na této teplotě po dobu 30 min. Reakce byla
 5 ukončena (pomalým přidáváním) 10% roztokem hydrogenfosforečnanu draselného (30 ml). Směs byla dvakrát extrahována EtOAc. Spojená organická vrstva byla promyta 3N HCl, nasyceným NaHCO₃ a roztokem soli. Vrstva EtOAc byla sušena nad síranem sodným a zakoncentrována. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií na
 10 koloně s použitím směsi 10/90 až 30/70 EtOAc/dichlormethan za získání 4,2 g **46c** (45% výtěžek - 2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₁₀H₂₀NO₃S: 234,1164 (M+H)⁺. Nalezeno: 234,1168.

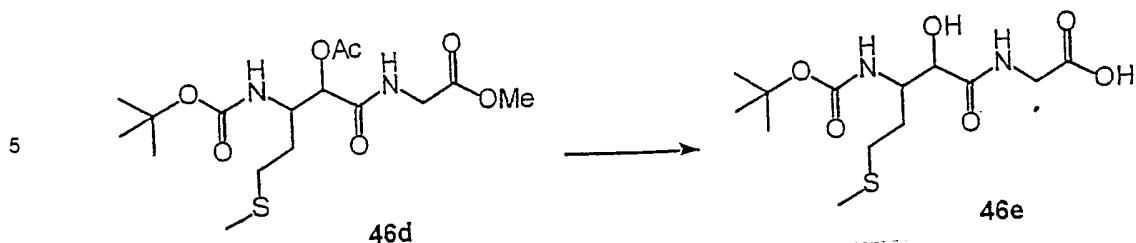
Krok C

15



20 K chladnému (-15 °C) roztoku sloučeniny **46c** (4,2 g, 19,4 mmol) v dichlormethanu byla přidána kyselina octová (2,14 ml, 38,8 mmol) a potom methylisokynoacetát (1,76 ml, 19,4 mmol). Reakční směs byla zahřáta na teplotu laboratoře a ponechána stát 16 hod. Reakční směs byla zředěna EtOAc a promyta nasyceným NaHCO₃, roztokem soli a
 25 vodou. Organická vrstva byla sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 30/70 EtOAc/dichlormethan poskytlo čistou sloučeninu **46d** (6,5 g) jako bílou pevnou látku v 92% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro C₁₆H₂₉N₂O₇S: 393,1695 (M+H)⁺. Nalezeno: 393,1692.

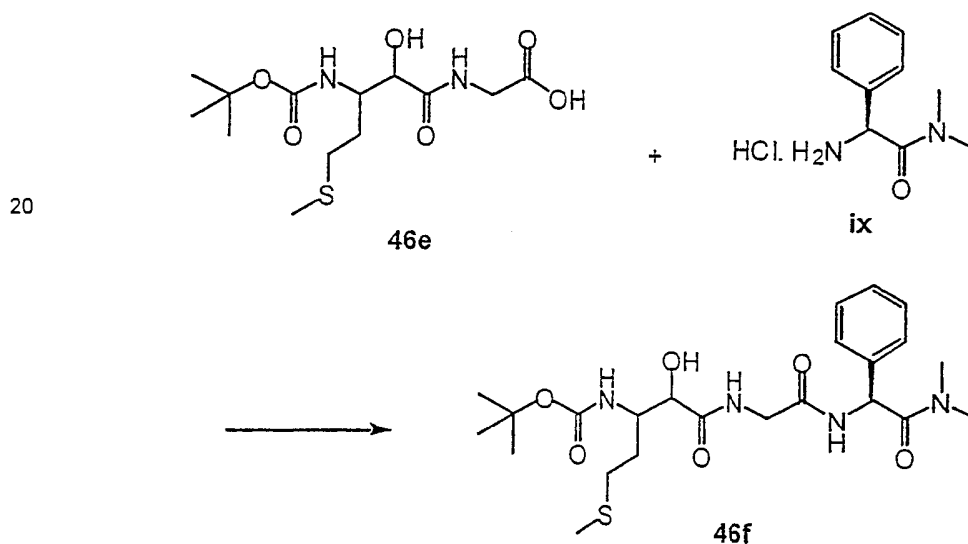
Krok D



K roztoku **46d** (6,5 g, 16,6 mmol) v MeOH (30 ml) byl přidán roztok hydroxidu lithného (1,19 g, 50 mmol) ve vodě (30 ml). Po 10 45 min byla reakční směs zakonzentrována. Byla přidána vodná kyselina citronová až do dosažení kyselého pH (3) a produkt byl extrahován do EtOAc. Zakonzentrování organické vrstvy poskytlo kyselinu **46e** (5,6 g, 90% výtěžek). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{13}H_{25}N_2O_6S$: 337,1433 (M+H)⁺. Nalezeno: 337,1430.

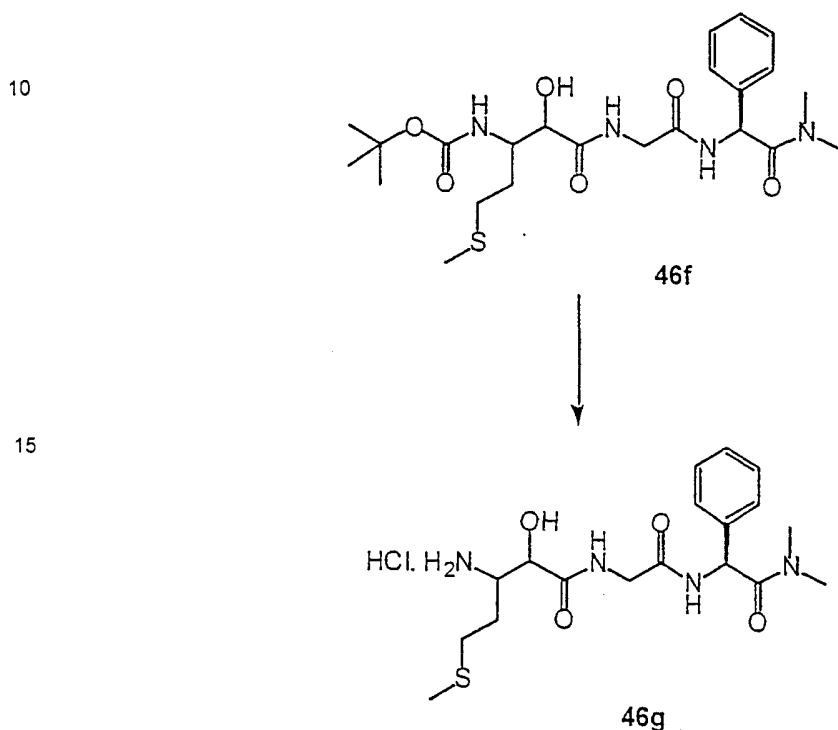
15

Krok E



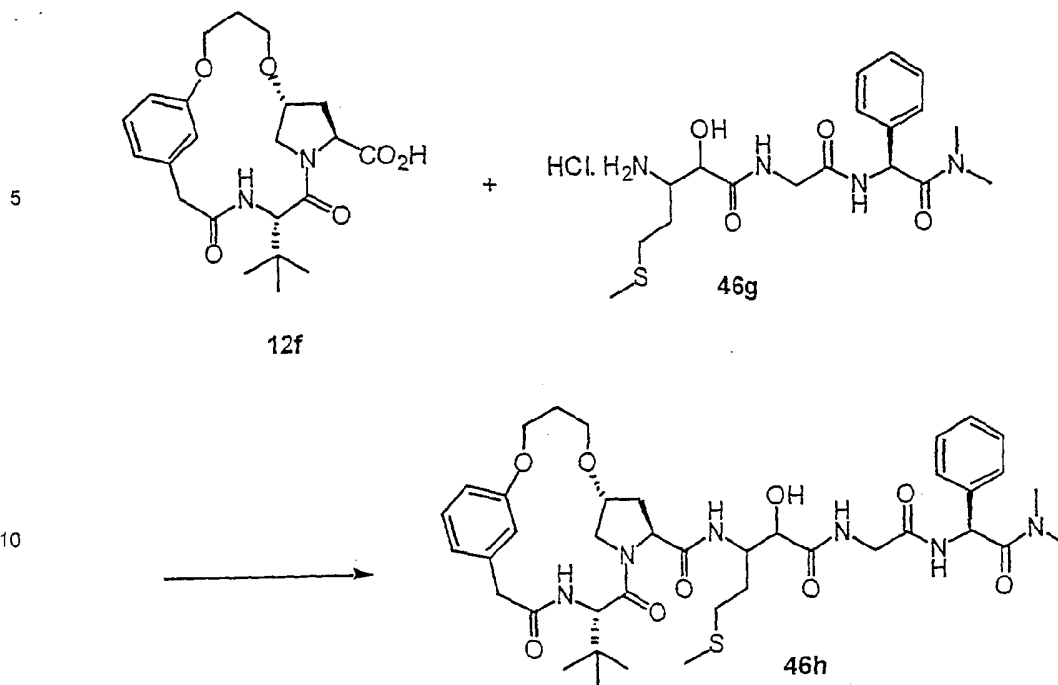
Požadovaný produkt **46f** byl získán způsobem popsaným pro meziprodukt A, krok 3. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 20/0/80 až 50/5/45 EtOAc/NH₃ ve směsi MeOH/dichlormethan poskytlo 3,0 g **46f** (51%). HRMS (FAB) Vypočteno pro C₂₃H₃₇N₄O₆S: 497,2434 (M+H)⁺. Nalezeno: 497,2439.

Krok F



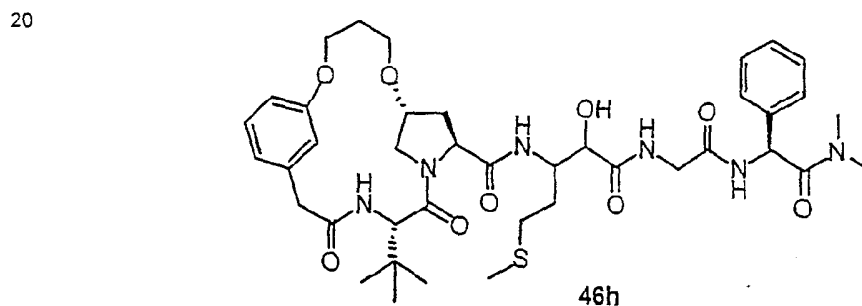
Požadovaná sloučenina **46g** byla připravena podle protokolu popsaného pro meziprodukt A, krok 4. Materiál byl použit dále pro další studie.

Krok G

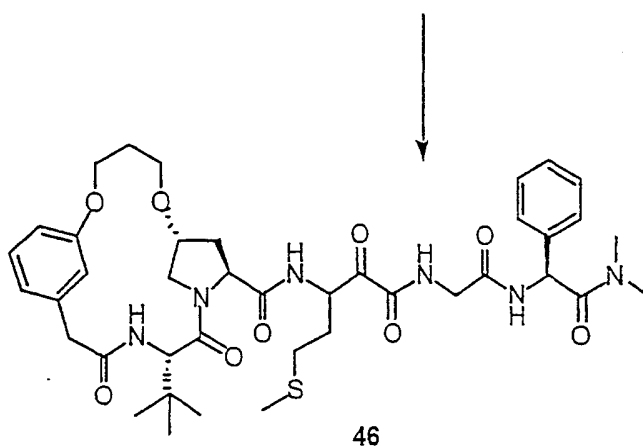


Požadovaný produkt **46h** byl získán způsobem popsáním pro
 15 příklad 1, krok J. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další
 manipulaci. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{57}N_6O_9S$: 797,3908
 (M+H)⁺. Nalezeno: 797,3896.

Krok H

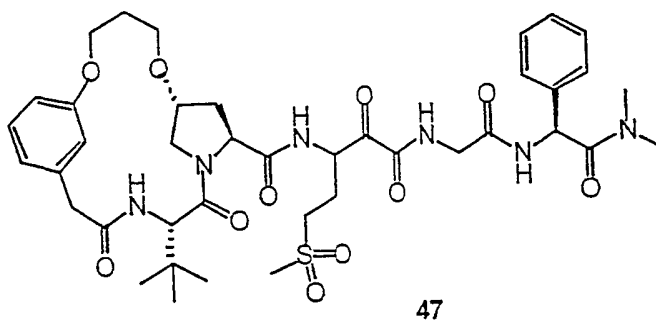


14-1102
- 256 -

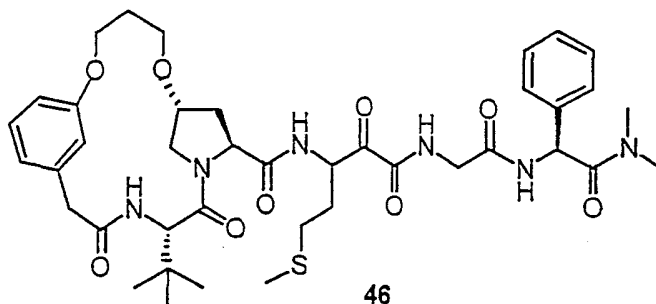


Požadovaný produkt **46** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 10, krok J. Reakce trvala 4 dny do úplného ukončení. Čištění zbytku bleskovou chromatografií na koloně (dvakrát)
10 a preparativní TLC s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH poskytly sloučeninu **46** jako směs diastereomerů v 12% výtěžku (2 kroky). HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{55}N_6O_9S$: 795,3751 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 795,3761.

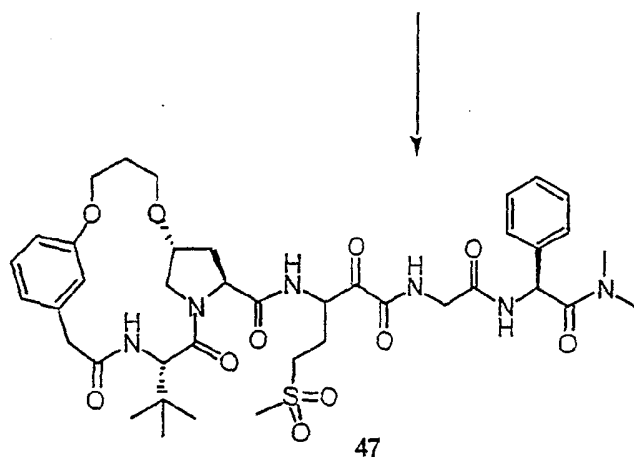
15 Příklad 47: Příprava sloučeniny 47



Krok A



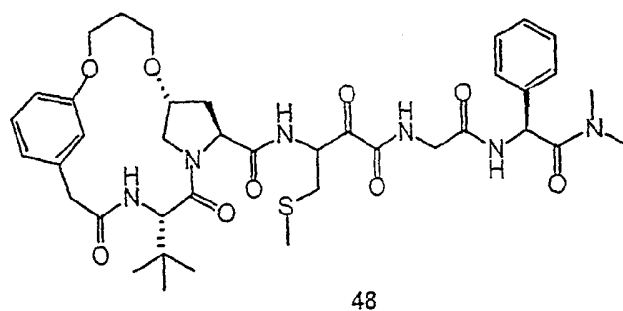
5



Požadovaný produkt **47** se získá protokolem oxidace popsaným
10 výše pro příklad 11, krok A.

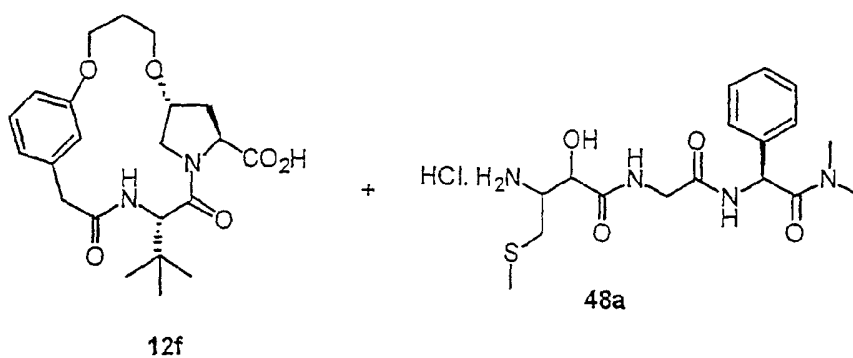
Příklad 48: Příprava sloučeniny 48

15

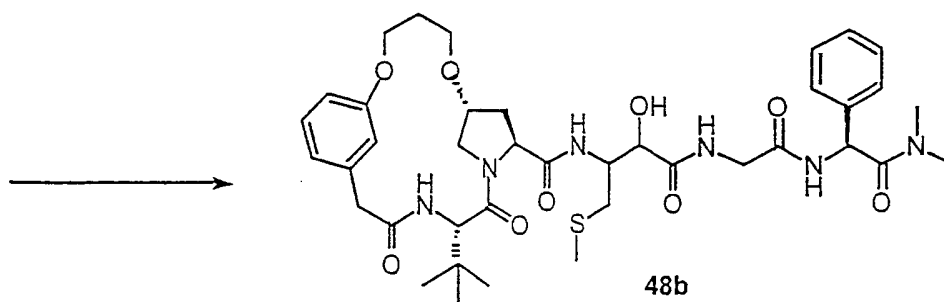


Krok A

20

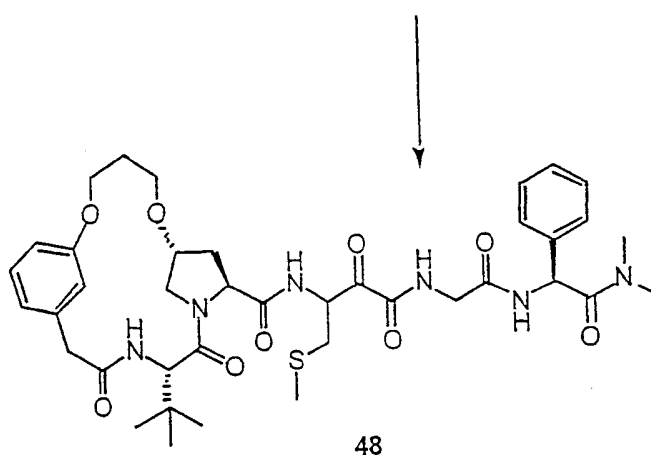
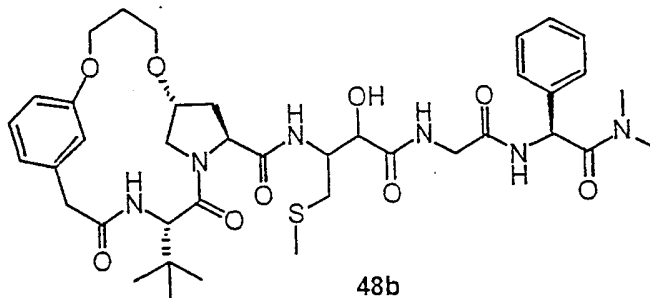


25



Požadovaný produkt **48b** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok J. Surový materiál měl dostatečnou čistotu pro další manipulaci (pozn.: prekursor **48a** byl získán z komerčně dostupného *N*-*boc*-*S*-methylcysteinu postupem popsaným pro **46g**).

Krok B

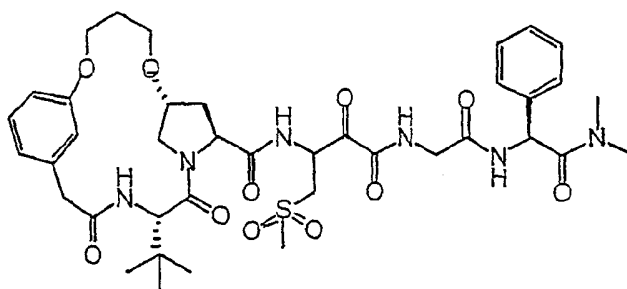


Požadovaný produkt **48** byl získán protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 10, krok J. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH

poskytlo sloučeninu **48** jako směs diastereomerů v 21% výtěžku (2 kroky).

Příklad 49: Příprava sloučeniny 49

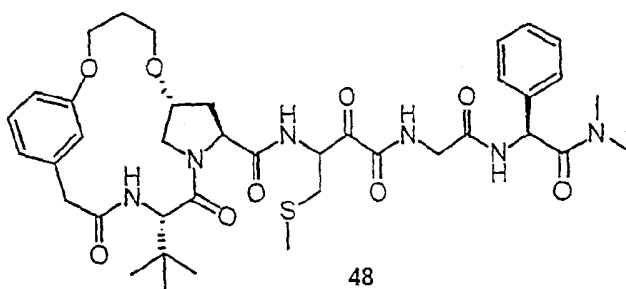
5



49

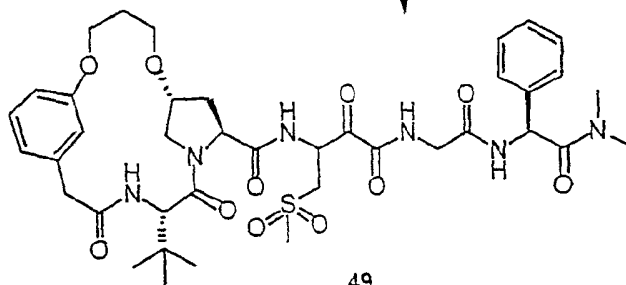
10

Krok A



48

15



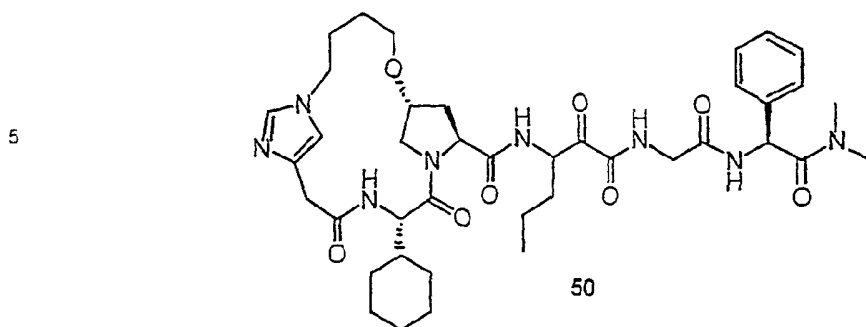
49

20

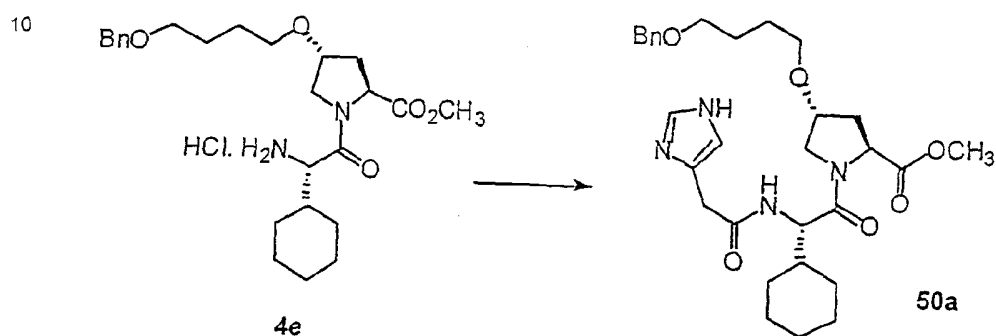
Požadovaný produkt **49** se získá protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 11, krok A.

25

Příklad 50: Příprava sloučeniny 50



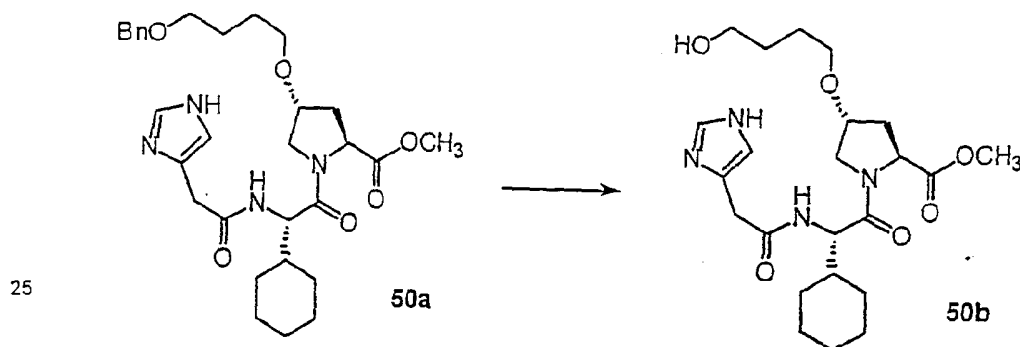
Krok A



15

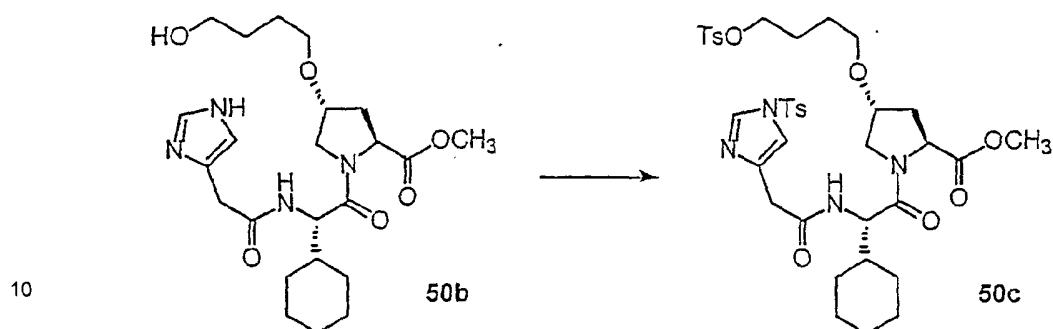
Požadovaný produkt **50a** se získá způsobem popsaným pro příklad 1, krok F, s použitím kyseliny imidazol-4-octové jako reakčního partnera.

20 Krok B



Požadovaný produkt **50b** se získá způsobem popsaným pro příklad 1, krok G.

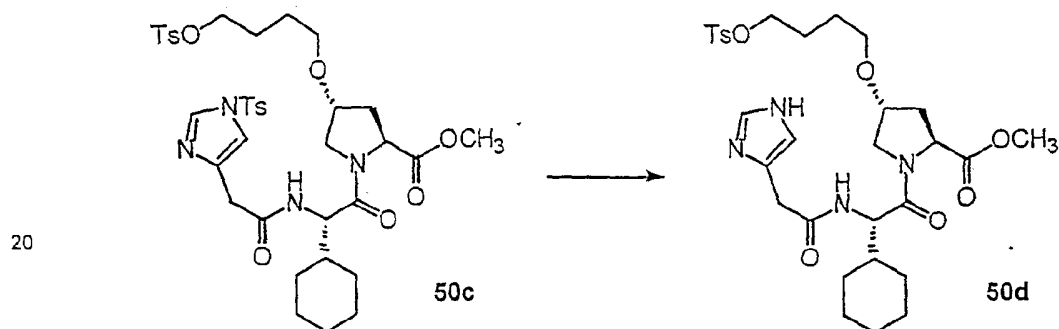
5 Krok C



Požadovaný produkt **50c** se získá způsobem popsaným pro příklad 10, krok A s použitím *p*-toluensulfonylchloridu jako výchozího materiálu.

15

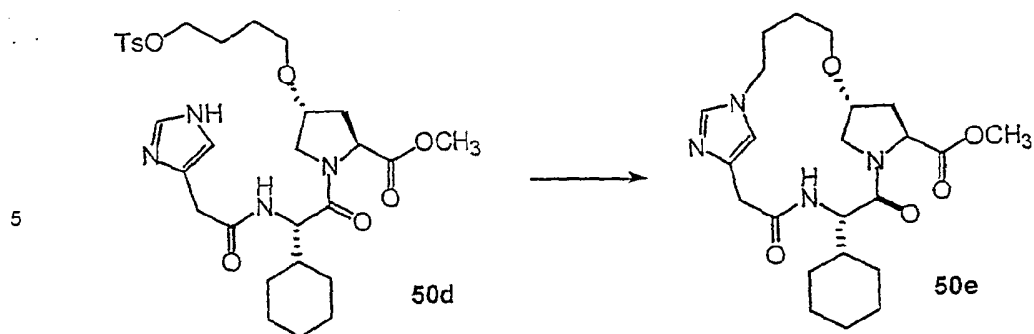
Krok D



Požadovaný produkt **50d** se získá smísením **50c** s HOBt v THF při laboratorní teplotě v průběhu několika hodin.

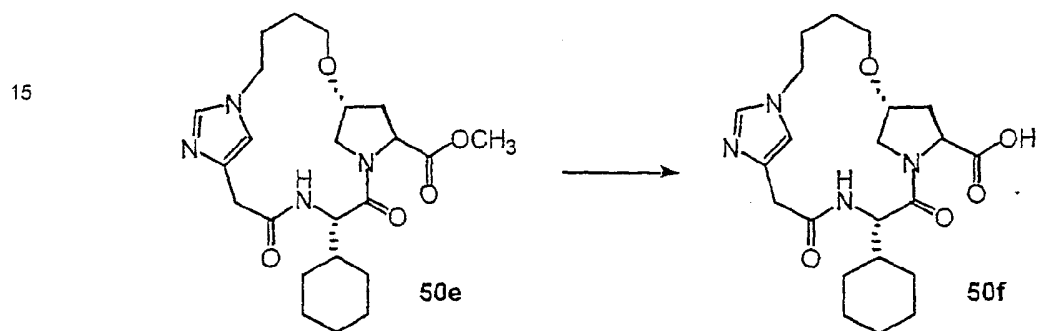
25

Krok E



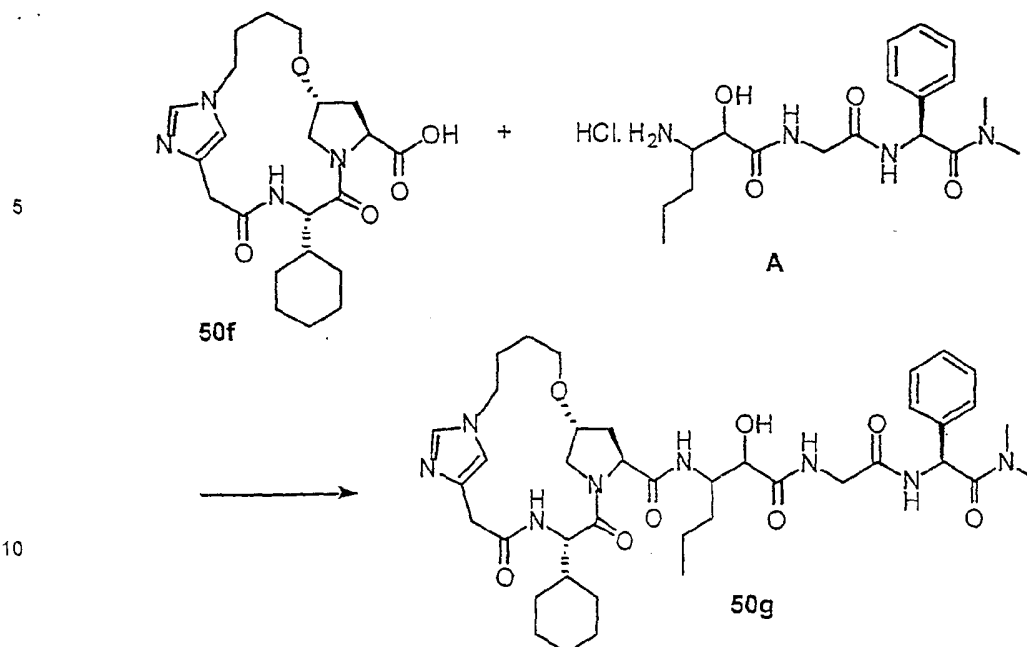
Očekávaný produkt **50e** se syntetizuje zahříváním **50d** s uhlíčanem sodným a jodidem sodným v acetonu při 50 °C
10 v průběhu několika hodin. Produkt může být čištěn běžnou bleskovou chromatografií.

Krok F



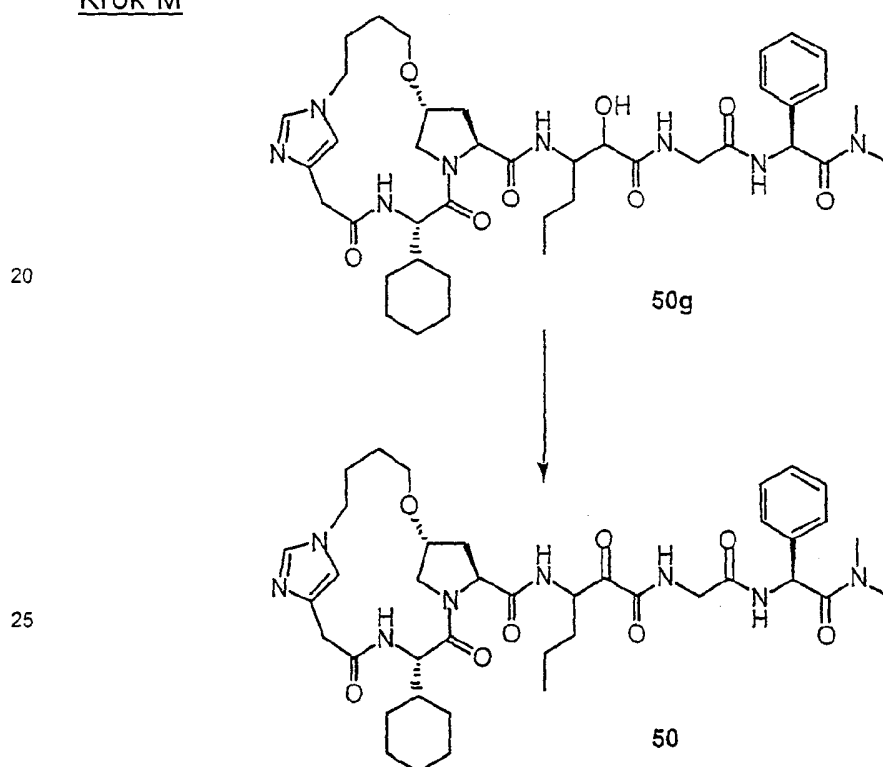
20 Požadované produkty **50f** se získají hydrolýzou podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok I.

Krok G



Očekávaný produkt **50g** se syntetizuje jak bylo popsáno výše pro příklad 1, krok J.

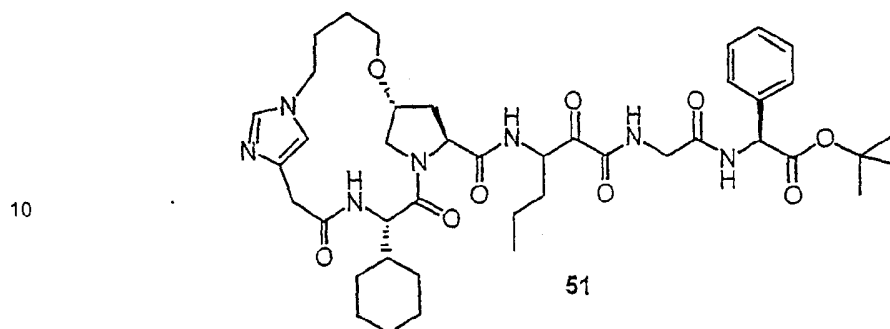
Krok M



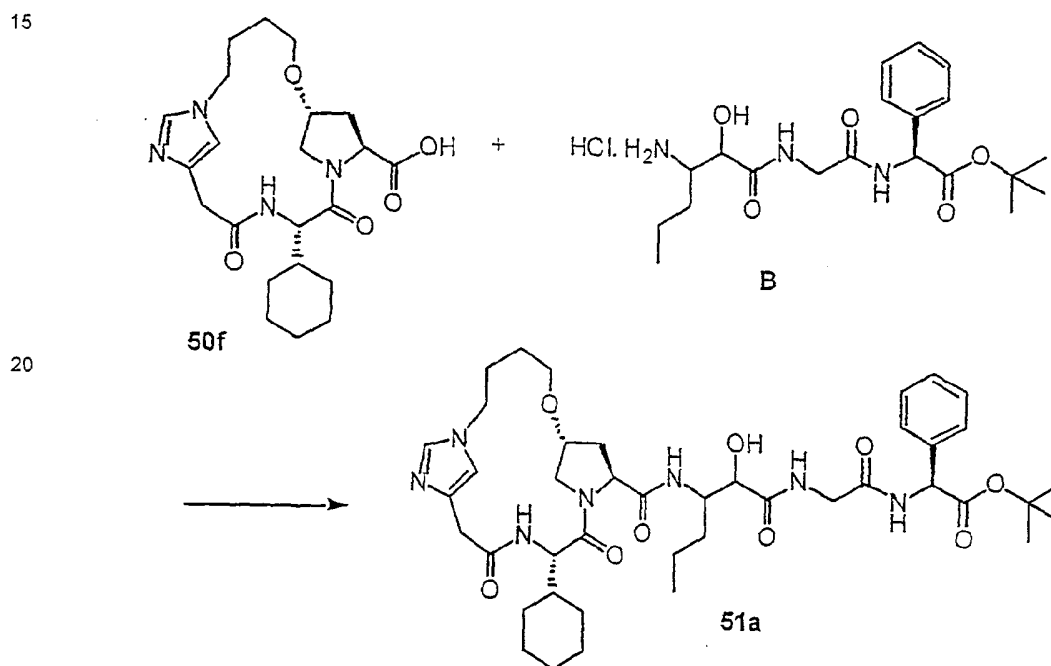
Požadovaný produkt **50** se získá oxidací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně poskytne čistou sloučeninu **50**.

5

Příklad 51: Příprava sloučeniny 51



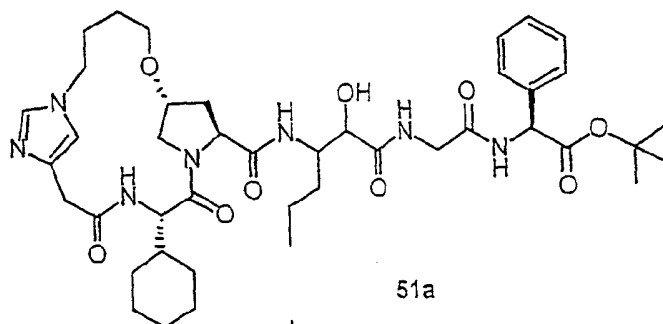
Krok A



Očekávaný produkt **51a** se syntetizuje jak bylo popsáno výše pro příklad 2, krok A.

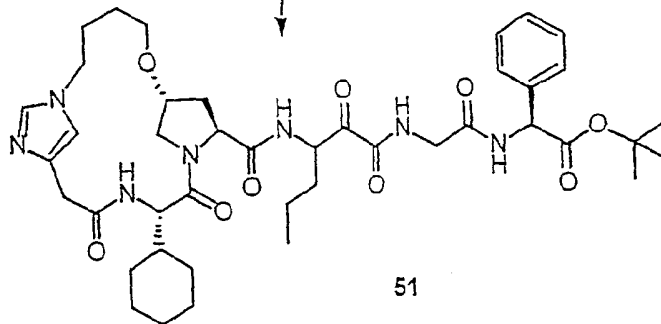
Krok B

5



51a

10

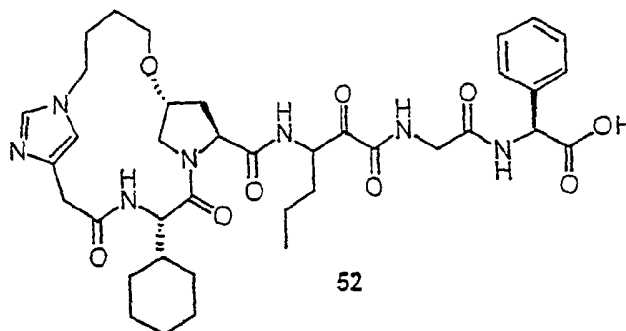


51

15

Požadovaný produkt **51** se získá oxidací podle protokolu popsaného výše pro příklad 2, krok B. Čištění bleskovou chromatografií na koloně poskytne čistou sloučeninu **51**.

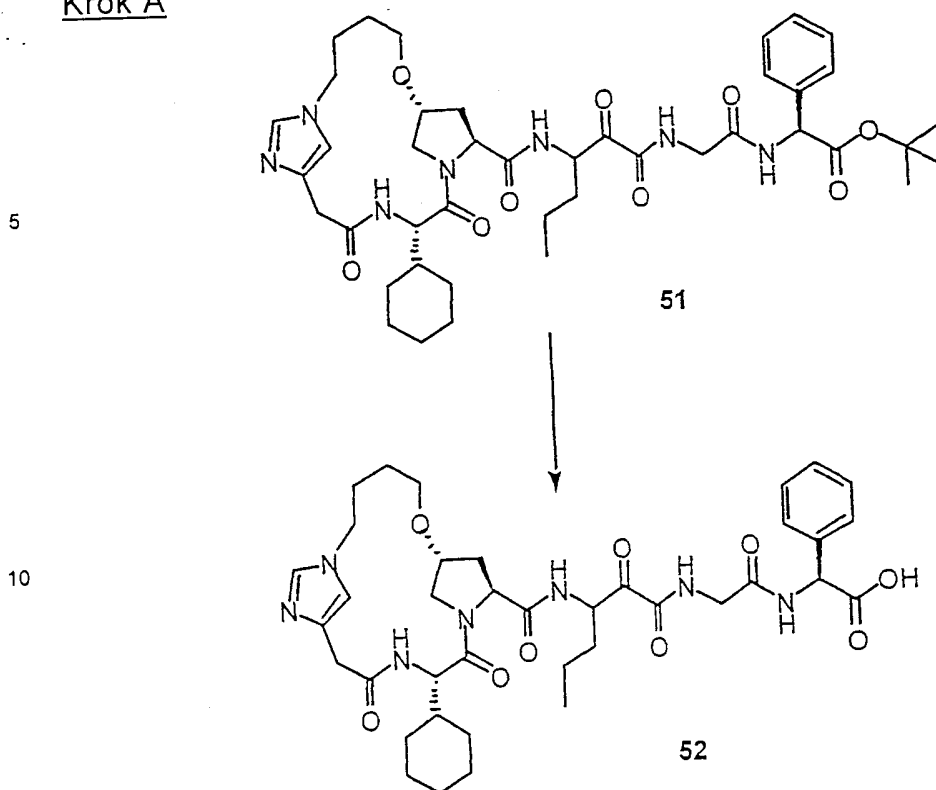
20 Příklad 52: Příprava sloučeniny **52**



52

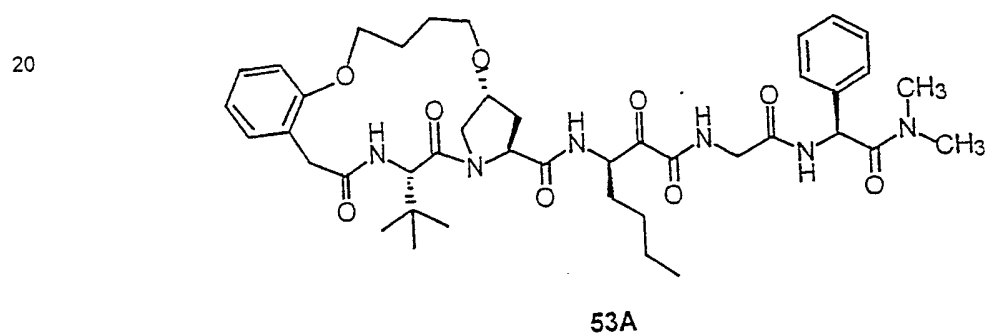
25

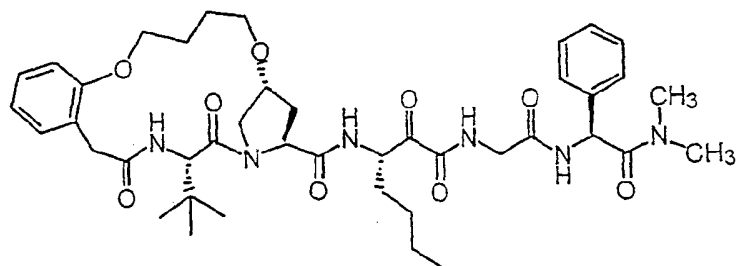
Krok A



15 Požadovaný produkt **52** se získá postupem popsaným výše pro příklad 3, krok A.

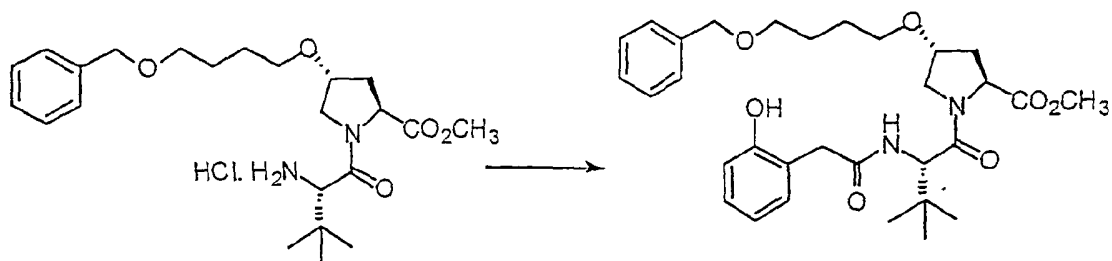
Příklad 53: Příprava sloučenin vzorců **53A** a **53B**





53B

Krok A

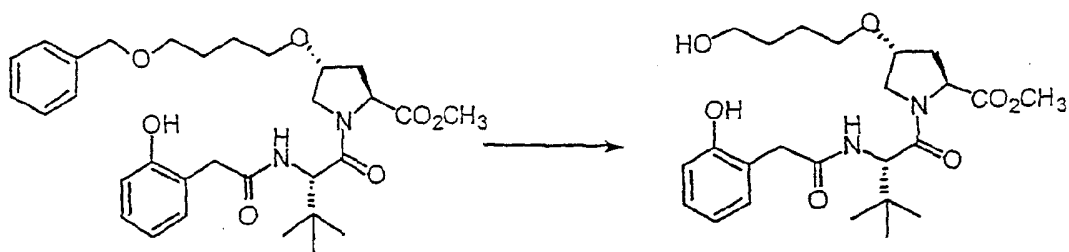


44b

53a

Požadovaný produkt **53a** byl získán způsobem popsáním
v příkladu 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na
koloně s použitím směsi 80/20 až 60/40 dichlormethan/ethylacetát za
získání **53a**.

Krok B



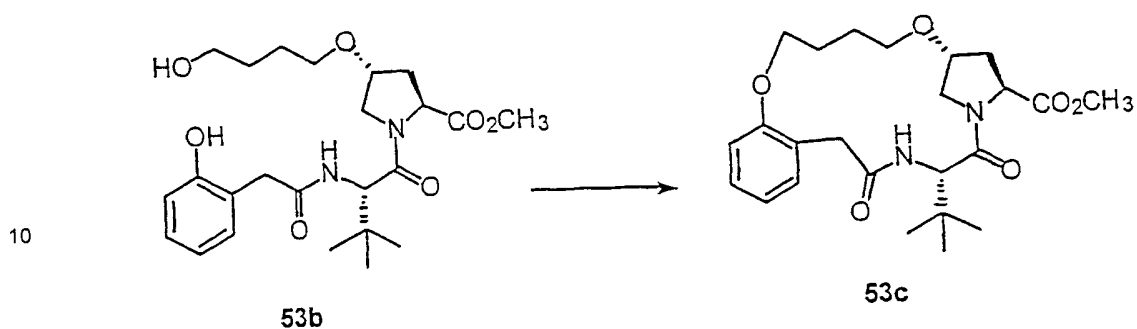
53a

53b

Požadovaný produkt **53b** byl získán způsobem popsáným v příkladu 1, krok G. Surový materiál byl převeden do dalšího kroku jako takový.

5

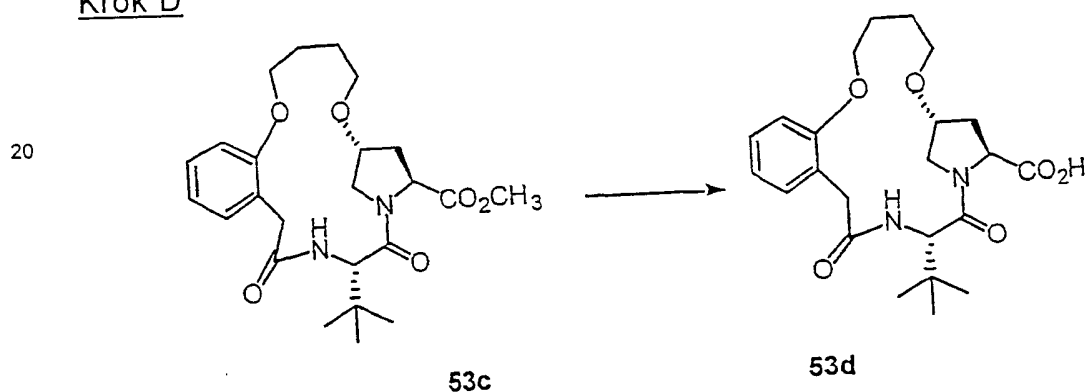
Krok C



Požadovaný produkt **53c** byl získán způsobem popsáným v příkladu 1, krok H. Čištění chromatografií na koloně s použitím směsi 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo sloučeninu **53c** spolu s trifenyfosfinoxidem. Tato směs byla převedena do dalšího kroku.

15

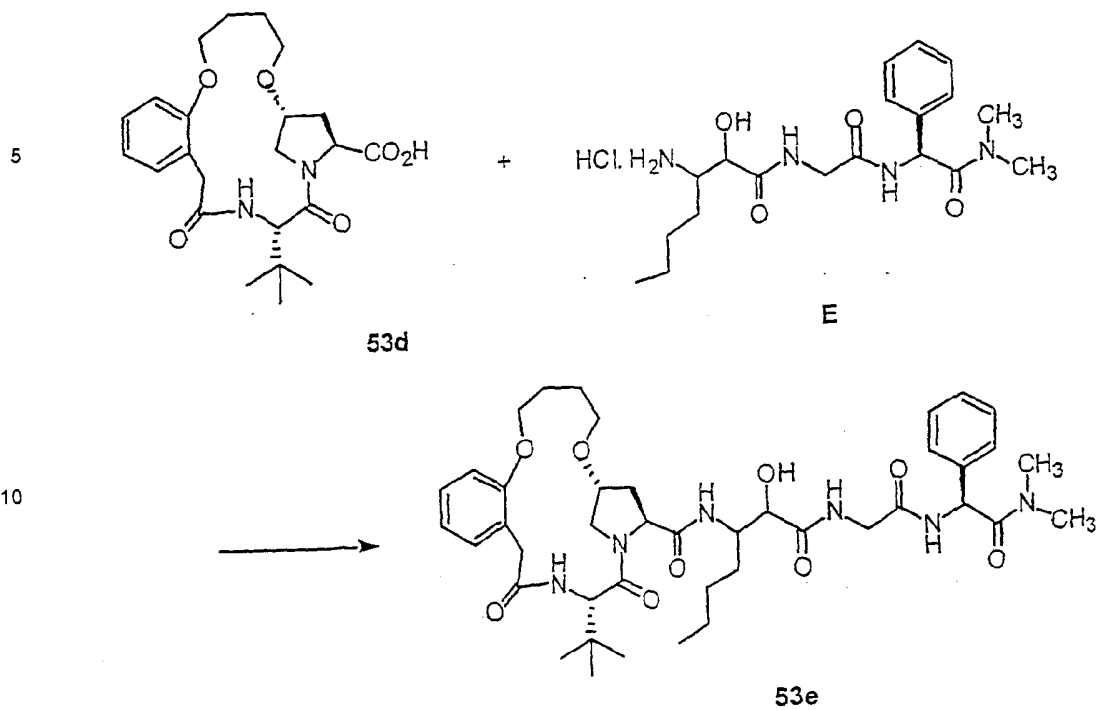
Krok D



25

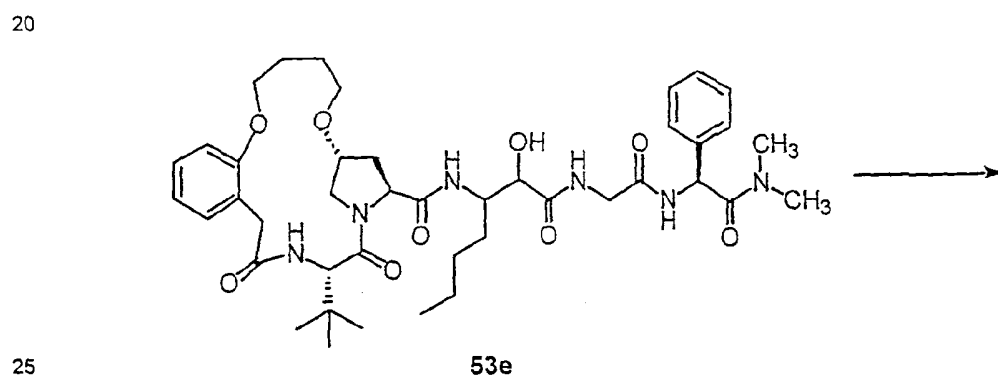
Požadovaný produkt byl získán způsobem popsáným v příkladu 1, krok I.

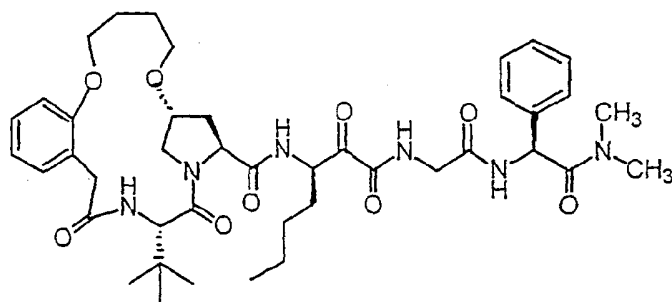
Krok E



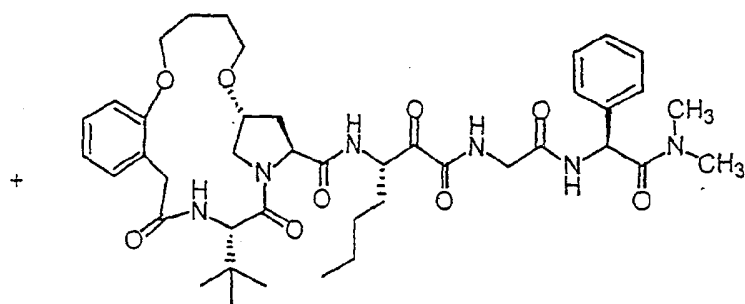
15 Očekávaný produkt **53e** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku.

Krok F





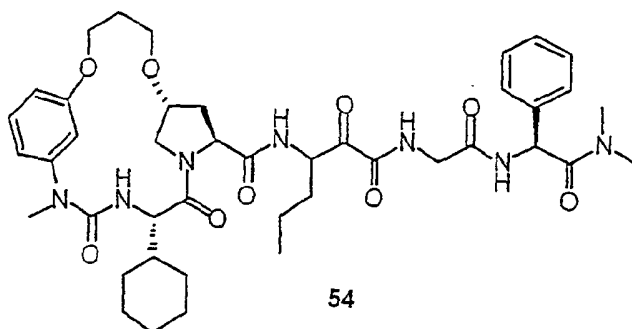
53A



53B

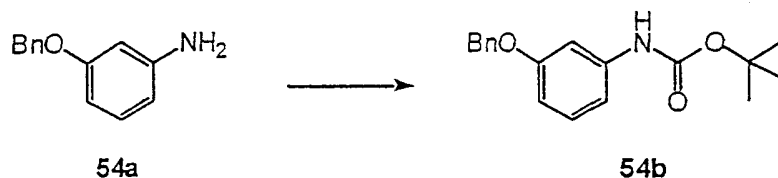
Požadované produkty **53A** a **53B** byly získány oxidací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 100/0 až 99/1 dichlormethan/methanol poskytlo oddělené isomery **53A** a **53B**, a určité množství směsi.

Příklad 54: Příprava sloučeniny 54



54

Krok A

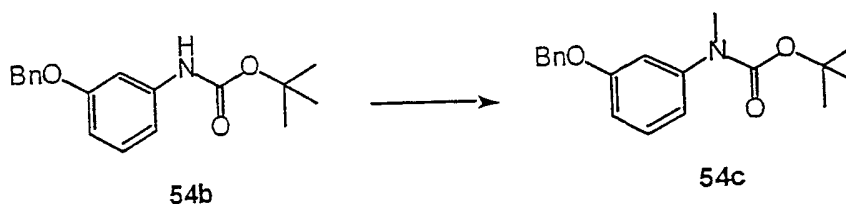


5

Komerčně dostupná sloučenina **54a** byla převedena na požadovaný produkt **54b** použitím postupu popsaného pro meziprodukt A, krok 3, v kvantitativním výtěžku.

10

Krok B



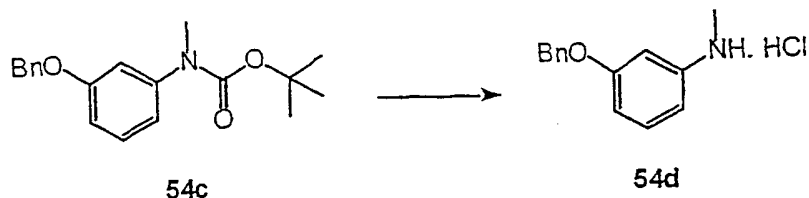
15

K chladnému (0 °C) roztoku sloučeniny **54b** (8 g, 26,8 mmol) v DMF (100 ml) byl přidán hydrid sodný (60% disperze v oleji, 1,3 g, 32,16 mmol). Po 10 min byl přidán jodmethan (2,8 ml, 42,8 mmol) a reakční směs byla zahřáta na laboratorní teplotu v průběhu 2 hod. Reakce byla ukončena vodným roztokem NH₄Cl a extrahována EtOAc. Organická vrstva byla oddělena, sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrována za získání sloučeniny **54c**, která měla dostatečnou čistotu pro další studie.

25

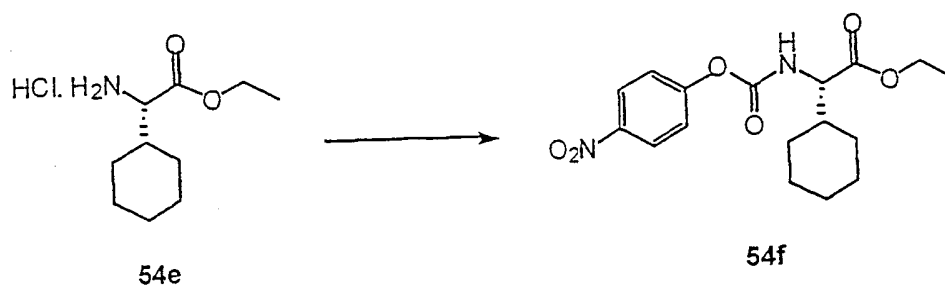
Krok C

5



Požadovaný produkt **54d** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok C. Surový produkt byl použit bez dalšího čištění.

10 Krok D

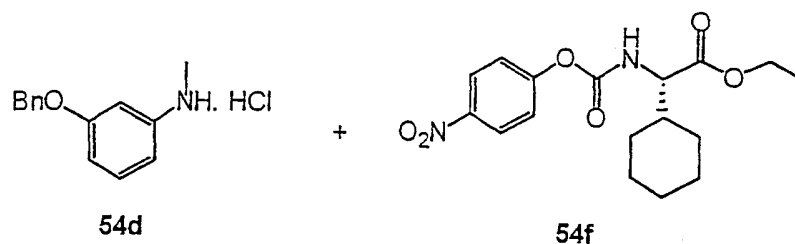


15

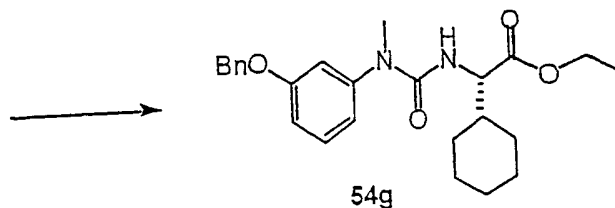
Požadovaný produkt **54f** byl získán způsobem popsaným pro příklad 26, krok A s použitím směsi **54e** jako výchozího materiálu. Surový produkt byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 80/20 až 100/0 dichlormethan/hexany, za získání sloučeniny **54f**.

20

Krok E



25

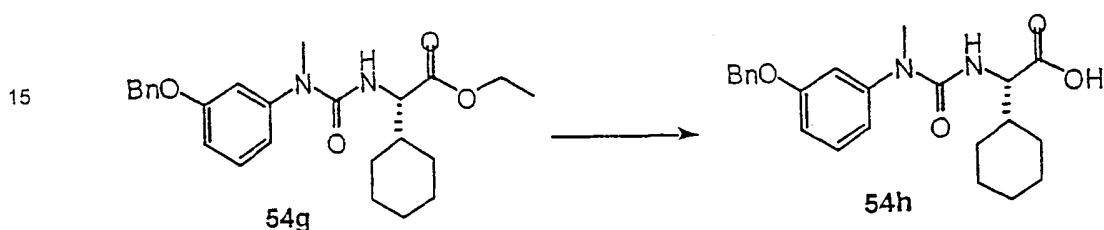


5

Požadovaný produkt **54g** byl získán způsobem popsaným pro příklad 26, krok B s použitím směsi **54d** a **54f** jako výchozích materiálů. Reakce byla prováděna v chlorformu při 50 °C. Zbytek byl čištěn bleskovou chromatografií s použitím směsi 85/15 hexany/EtOAc za získání **54g** v 56% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{33}N_2O_4$: 425,2440 (M+H)⁺. Nalezeno: 425,2424.

10

Krok F

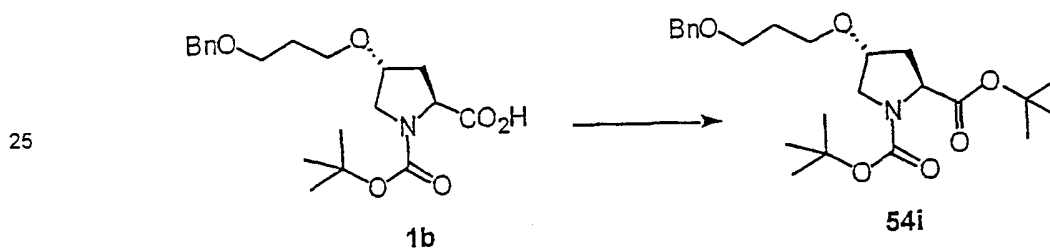


15

Požadovaná sloučenina **54h** byla získána postupem popsaným výše pro příklad 1, krok I s použitím EtOH jako rozpouštědla.

20

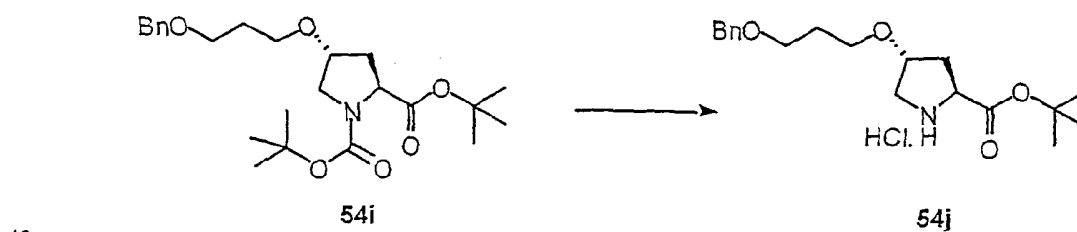
Krok G



25

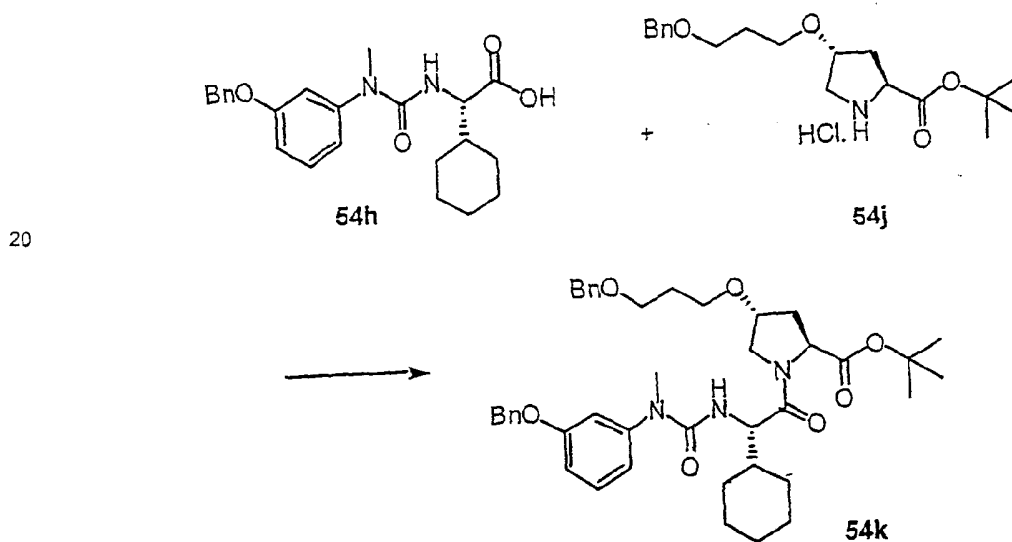
Požadovaná sloučenina **54i** byla připravena by podle protokolu popsaného pro příklad 18, krok B.

5 Krok H



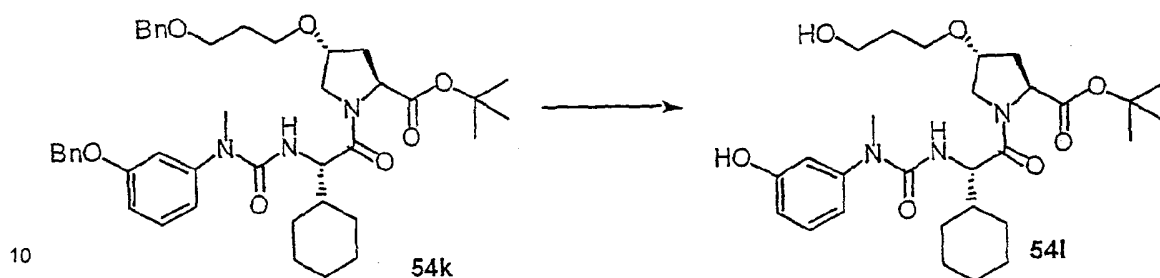
Požadovaný produkt **54j** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl použit bez čištění.

15 Krok I



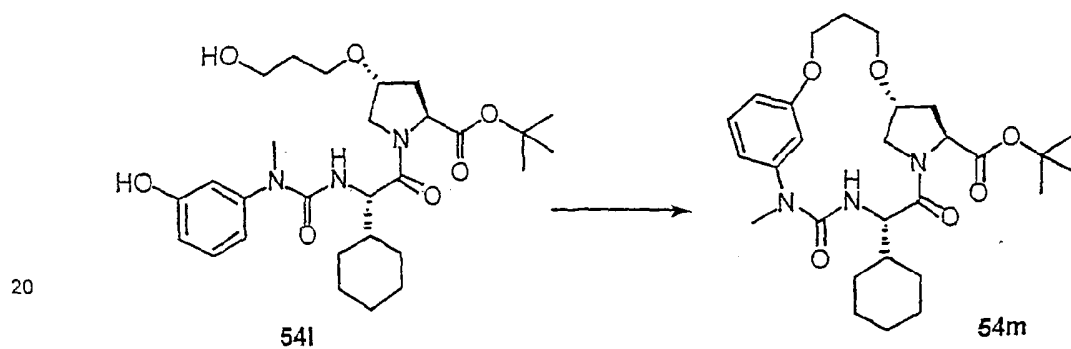
Požadovaný produkt **54k** byl získán s použitím protokolu reakce popsaného výše pro příklad 1, krok D.

5 Krok J



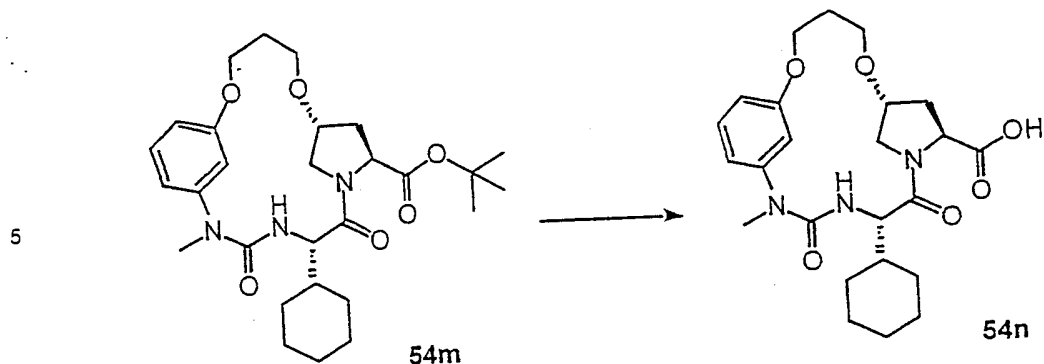
Požadovaný produkt **54l** se získá hydrogenací postupem popsaným výše pro příklad 1, krok G.

15 Krok K



Požadovaný produkt **54m** se získá cyklizací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok H.

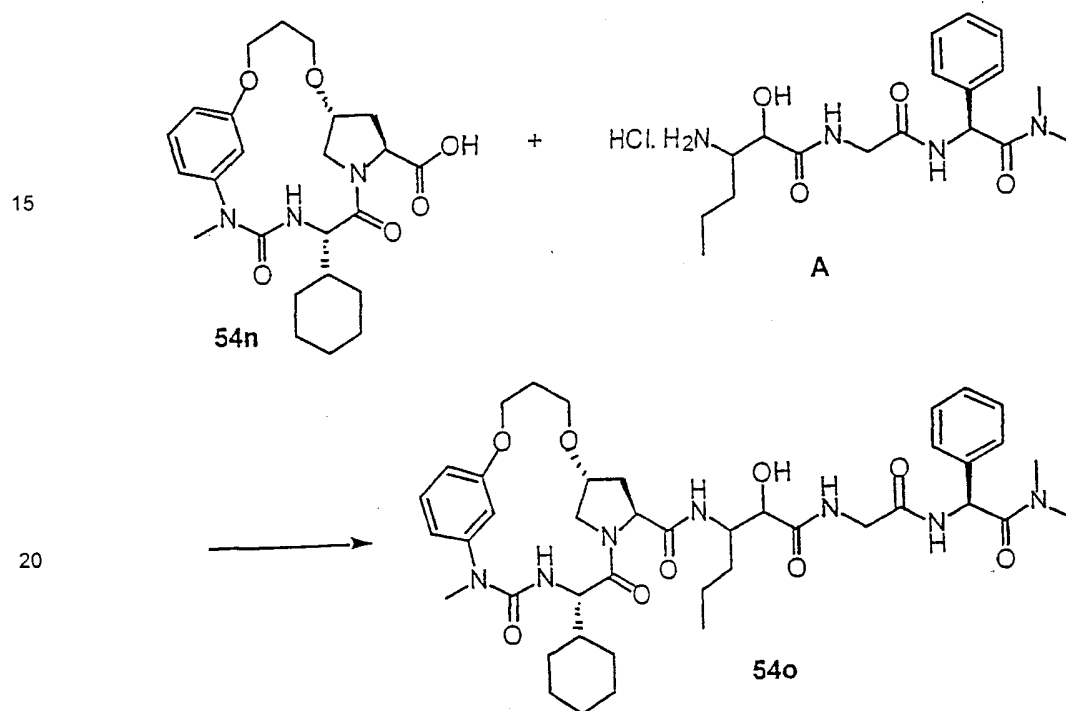
Krok L



Požadovaný produkt **54n** se získá postupem popsáným výše pro příklad 3, krok A.

10

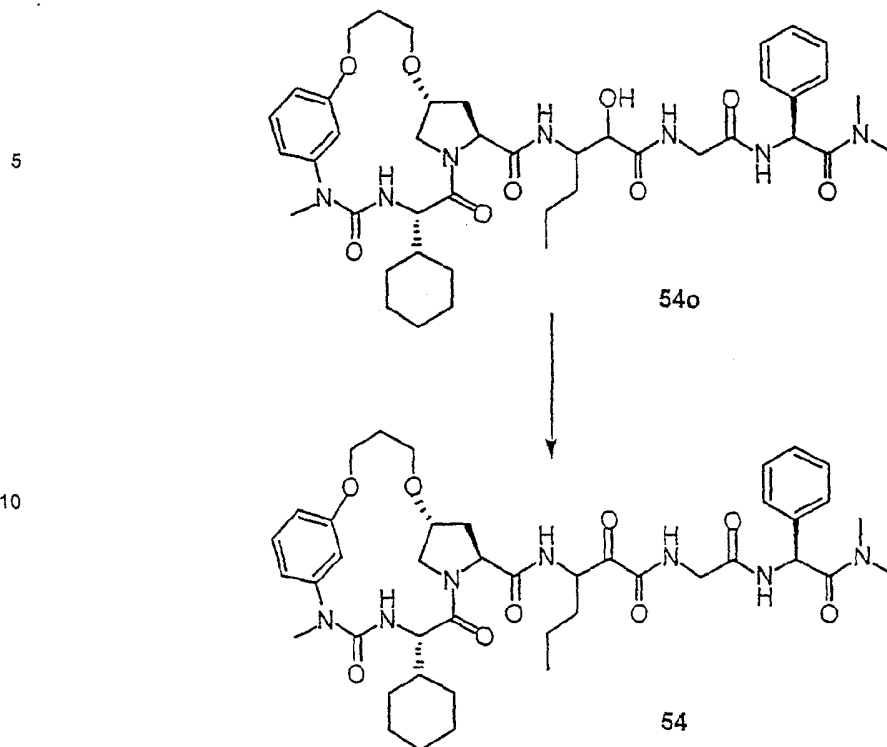
Krok M



Očekávaný produkt **54o** se syntetizuje jak bylo popsáno výše pro příklad 1, krok J.

25

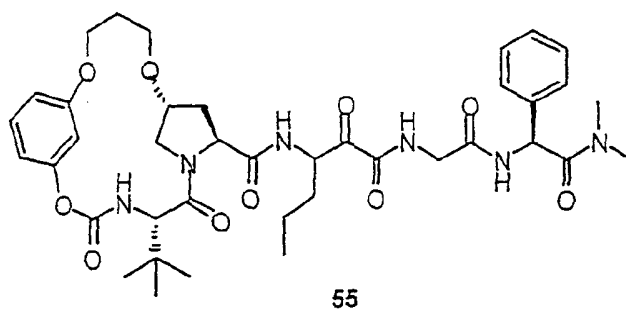
Krok N



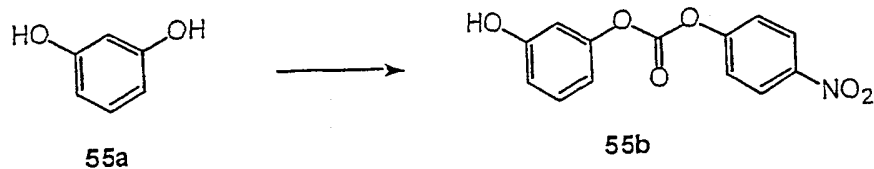
15 Požadovaný produkt **54** se získá oxidací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně poskytne čistou sloučeninu **54**.

Příklad 55: Příprava sloučeniny **55**

20

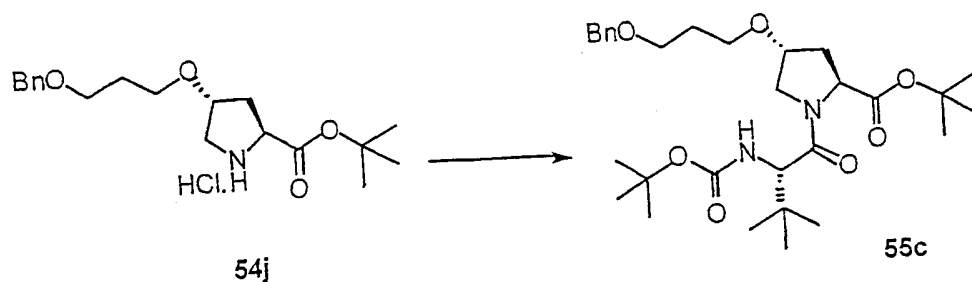


Krok A



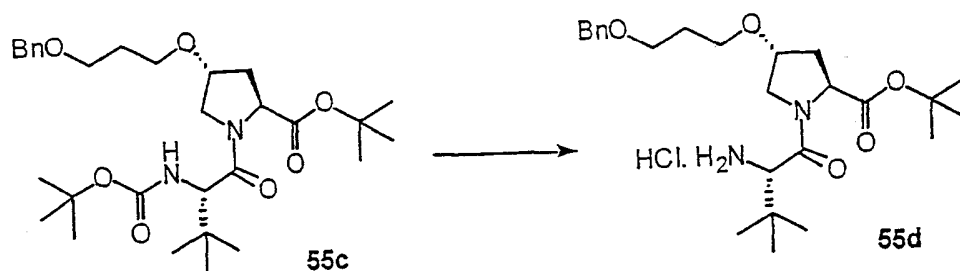
Komerčně dostupná sloučenina **55a** byla převedena na požadovaný produkt **55b** použitím postupu popsaného pro příklad 26, krok A v 41 % výtěžku.

Krok B



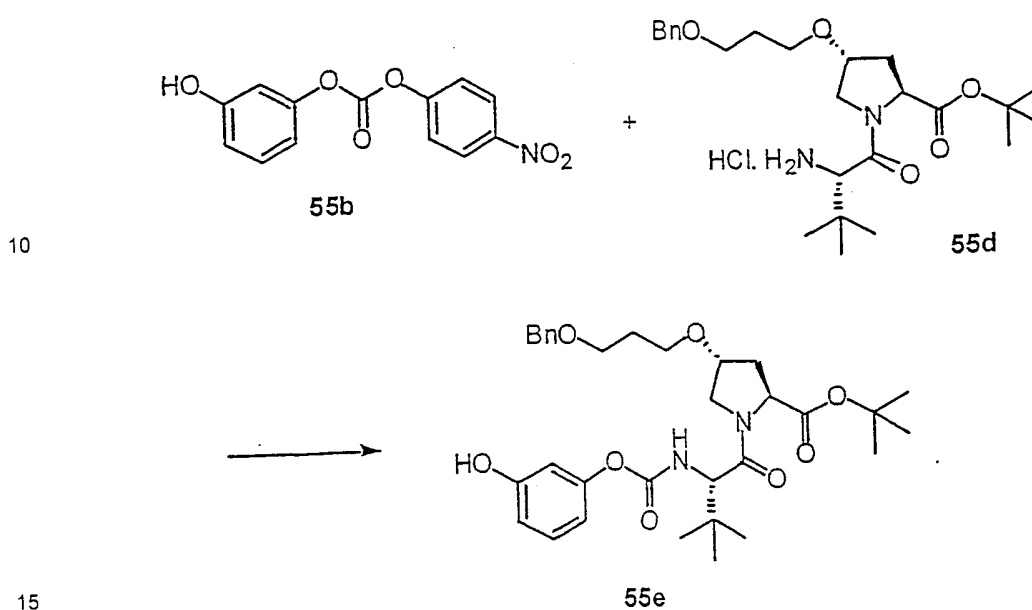
Požadovaný produkt **55c** byl získán podle reakčního protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok D, s použitím *N*-*tert*-butoxycarbonyl-L-glutaminu jako reakčního partnera. Čištění s použitím směsi 95/5 dichlormethan/EtOAc poskytlo sloučeninu **55c** v 57% výtěžku.

Krok C



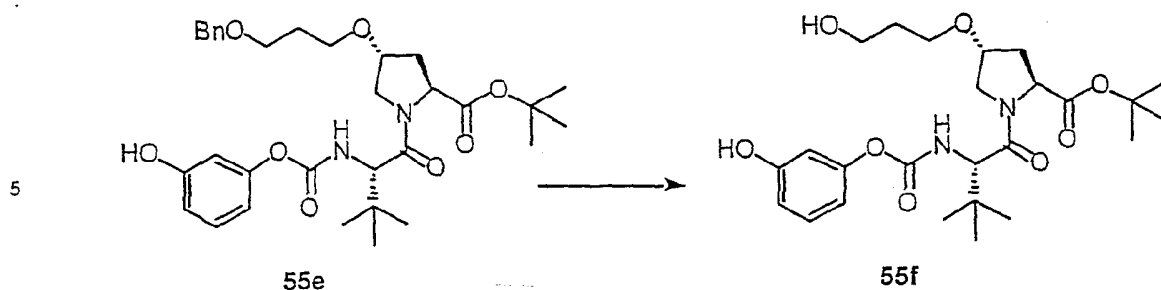
Požadovaný produkt **55d** byl získán postupem popsaným výše pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl převeden dále.

5 Krok D



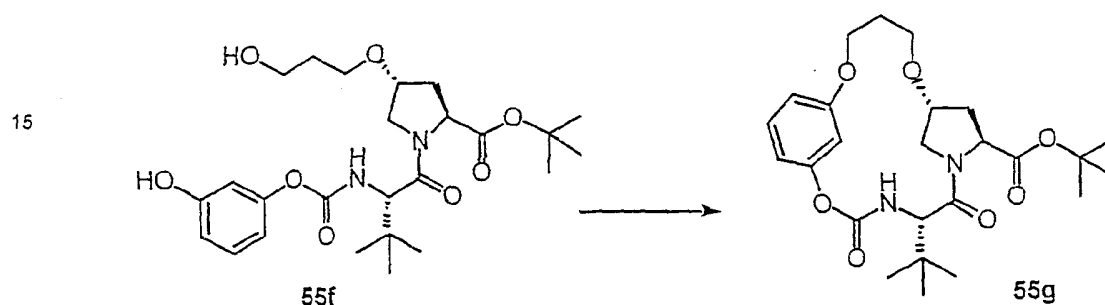
20 Požadovaný produkt **55e** byl získán by podle protokolu popsaného pro příklad 26, krok B. Čištění s použitím směsi 80/20 dichlormethan/EtOAc poskytlo sloučeninu **55e** v 20% výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{32}H_{45}N_2O_8$: 585,3176 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 585,3177.

Krok E



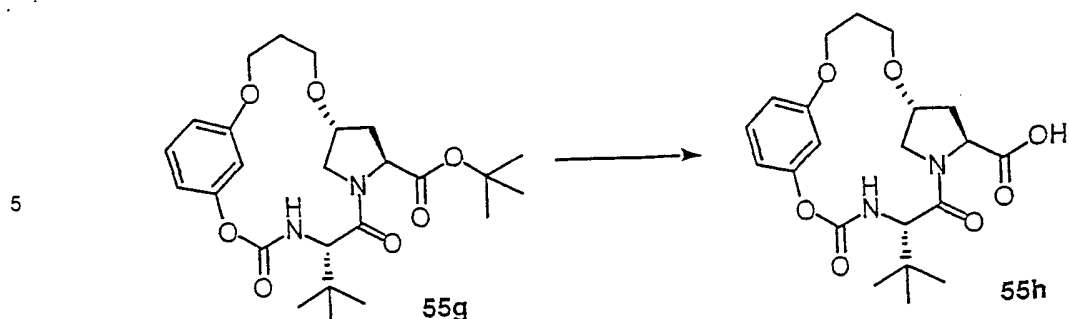
Požadovaný produkt **55f** byl získán postupem popsáním výše pro příklad 1, krok G. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{25}H_{39}N_2O_8$:
 10 495,2706 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 495,2704.

Krok F



20 Očekávaný produkt **55g** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok H. Čištění bleskovou chromatografií s použitím směsi 85/15 dichlormethan/EtOAc poskytlo **55g** v 10% výtěžku.

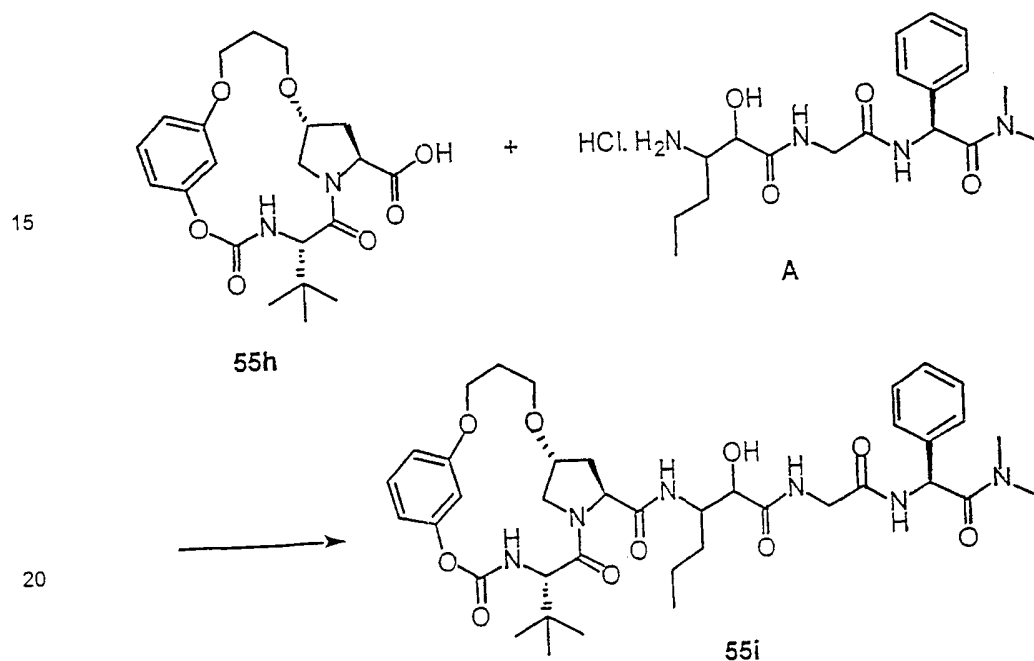
Krok G



Požadovaný produkt **55h** byl získán způsobem popsáným výše pro příklad 3, krok A. Surový materiál byl převeden dále bez čištění.

10

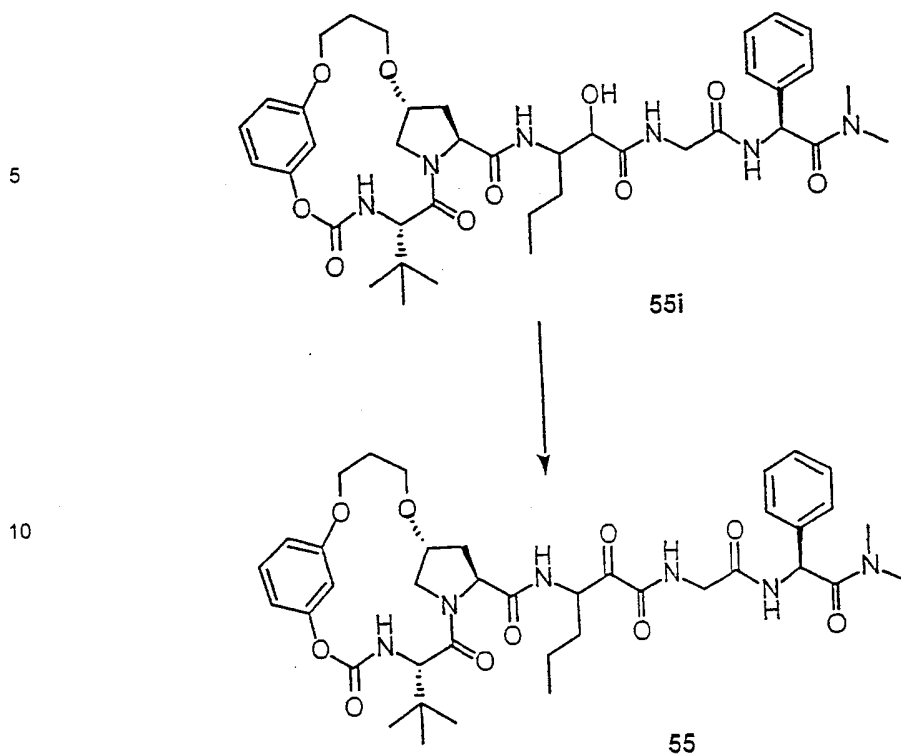
Krok H



Očekávaný produkt **55i** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Surový materiál byl převeden dále bez čištění.

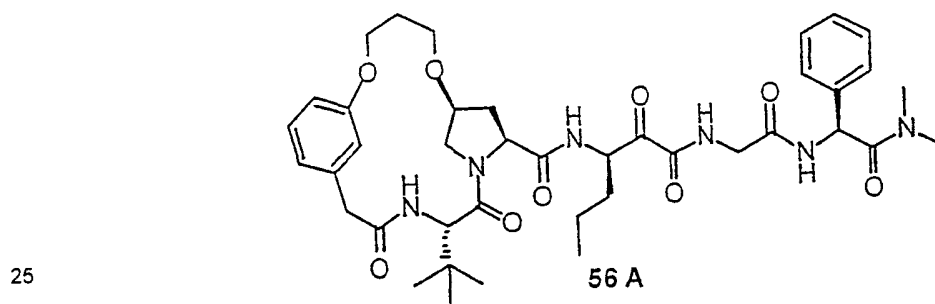
25

Krok I

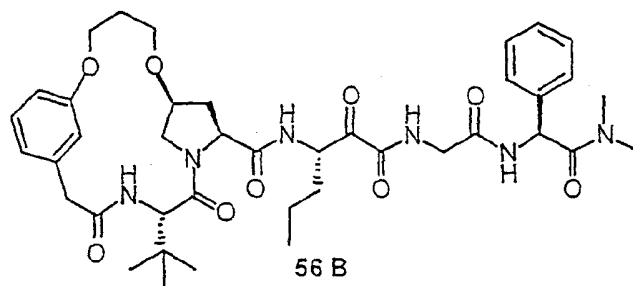


15 Požadovaný produkt **55** byl získán oxidací podle protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH poskytlo sloučeninu **55**.

20 Příklad 56: Příprava sloučeniny 56

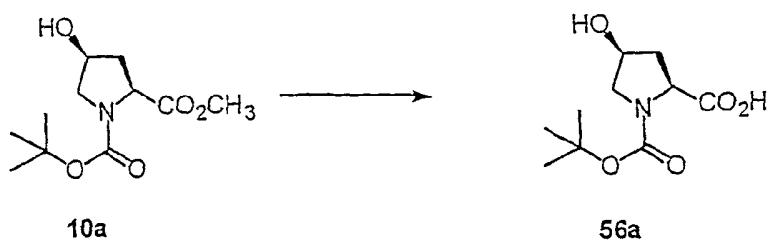


5



Krok A

10



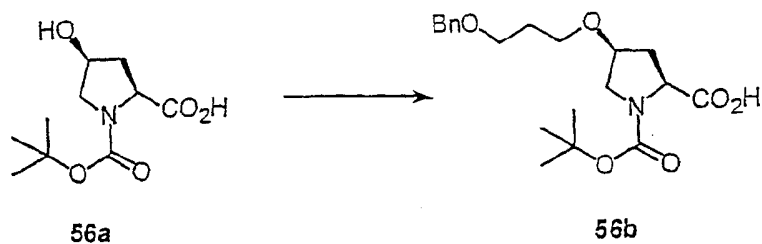
15

K roztoku komerčně dostupného methylesteru **10a** (5,0 g, 20,4 mmol) v MeOH (20 ml) byl přidán roztok LiOH (730 mg, 30,6 mmol) ve vodě (20 ml). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hod. TLC ukázala spotřebování výchozího materiálu. Reakční směs byla zakoncentrována a okyselena 10% roztokem kyseliny citronové. Byl přidán pevný NaCl a vodná vrstva byla několikrát extrahována EtOAc. Spojená vrstva EtOAc byla sušena (Na_2SO_4) a zakoncentrována za získání sloučeniny **56a** v kvantitativním výtěžku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_1\text{O}_5$: 232,1185 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Nalezeno: 232,1189.

20

Krok B

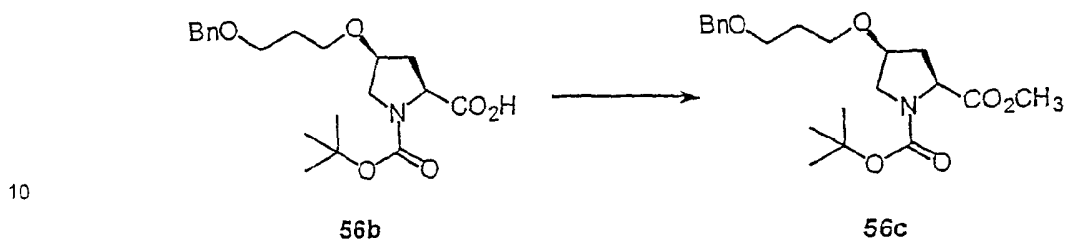
25



Požadovaný produkt **56b** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok A. Surový materiál byl převeden na methylester bez čištění.

5

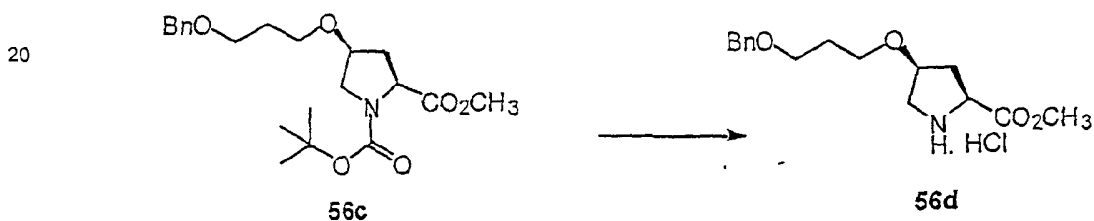
Krok C



Požadovaný produkt **56c** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok B. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 80/20 až 50/50 hexany/EtOAc a potom 70/30 až 40/60 dichlormethan/EtOAc poskytlo 13% **56c**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{21}H_{31}NO_6$: 394,2230 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 394,2224.

15

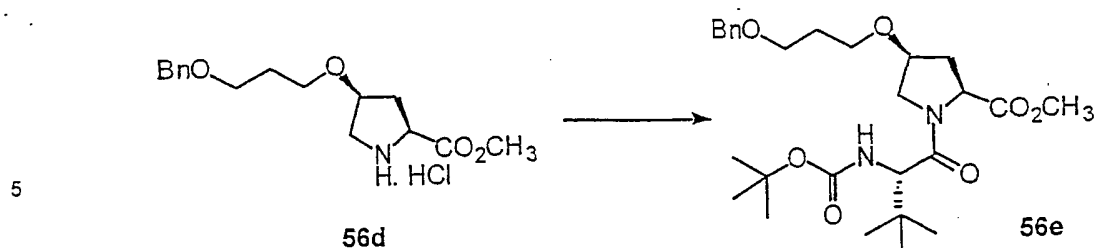
Krok D



Požadovaný produkt **56d** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok C. Surový materiál byl použit bez čištění.

25

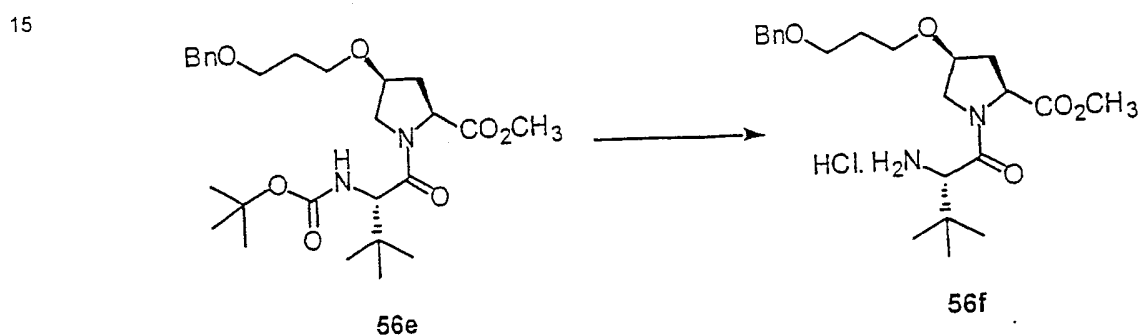
Krok E



Požadovaný produkt **56e** byl získán způsobem popsáním pro příklad 1, krok D, s použitím N-boc-terc-butylglycinu jako reakčního partnera. Čištění zbytku chromatografií na koloně s použitím směsi 90/10 dichlormethan/EtOAc poskytlo 86% **56e**. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{27}H_{43}N_2O_7$: 507,3070 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 507,3072.

10

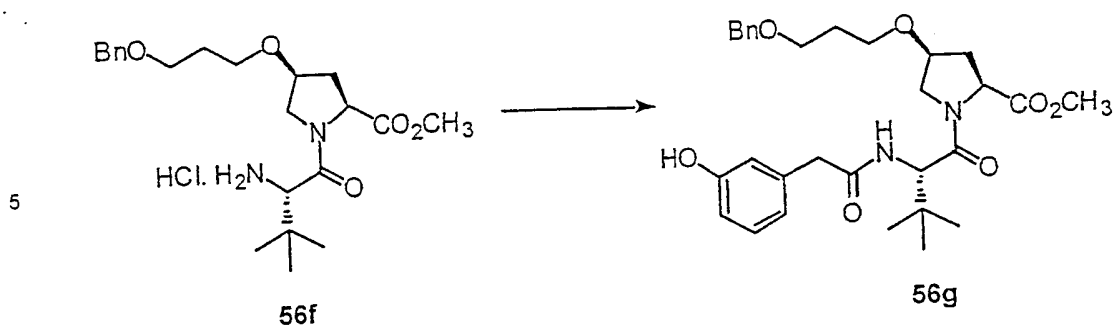
Krok F



20

Požadovaná sloučenina **56f** byla připravena by podle protokolu popsaného pro příklad 1, krok E. Materiál byl převeden do dalšího kroku v surovém stavu.

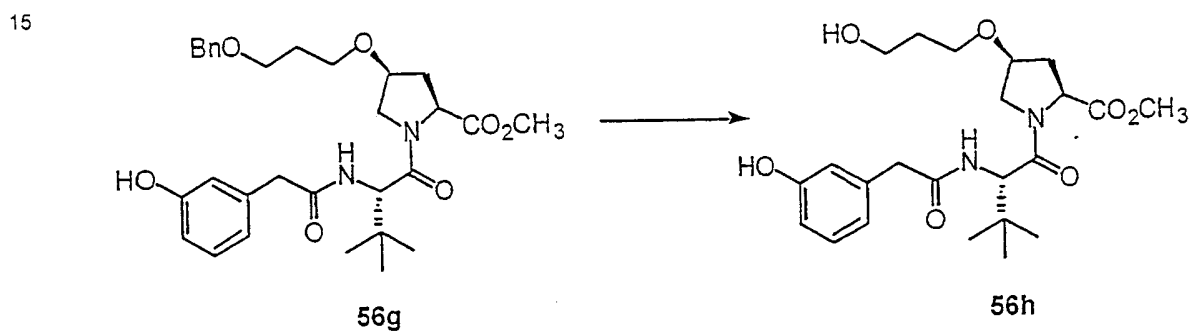
Krok G



Požadovaný produkt **56g** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 dichlormethan/MeOH za získání **56g** v 78% jako bílé pěny. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{30}H_{41}N_2O_7$: 541,2914 (M+H)⁺. Nalezeno: 541,2916.

10

Krok H

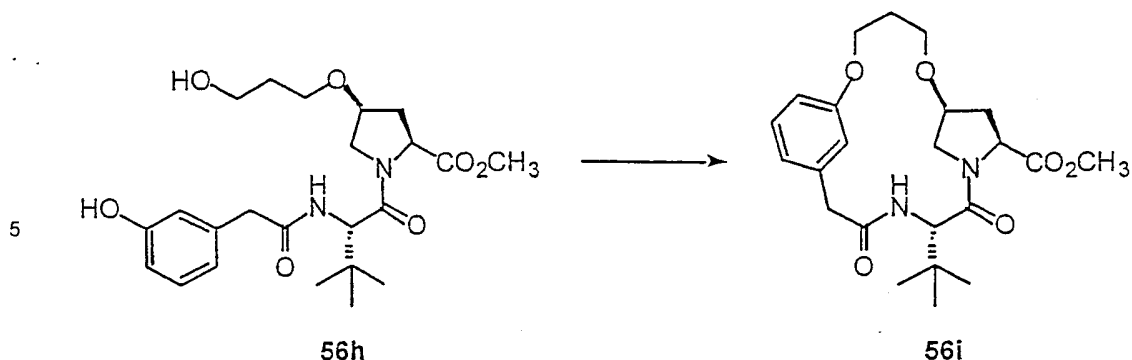


20

Požadovaný produkt **56h** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok G. Produkt získaný po odfiltrování katalyzátoru byl dostatečně čistý pro další manipulaci. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{23}H_{35}N_2O_7$: 451,2444 (M+H)⁺. Nalezeno: 451,2449.

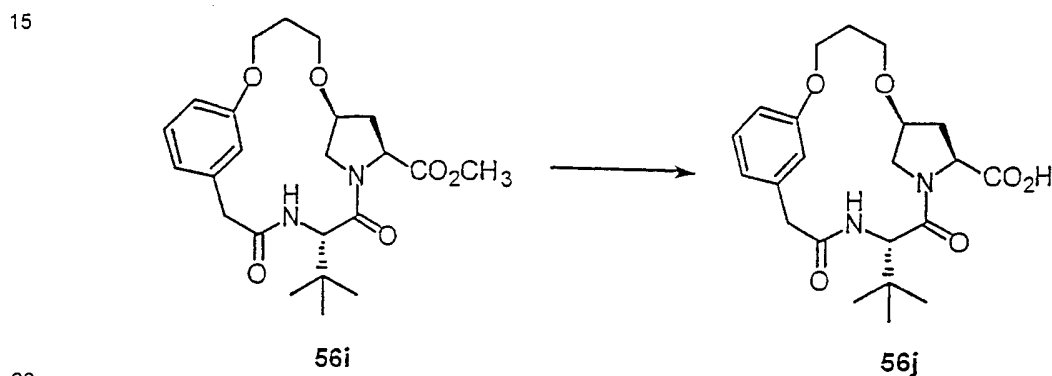
25

Krok I



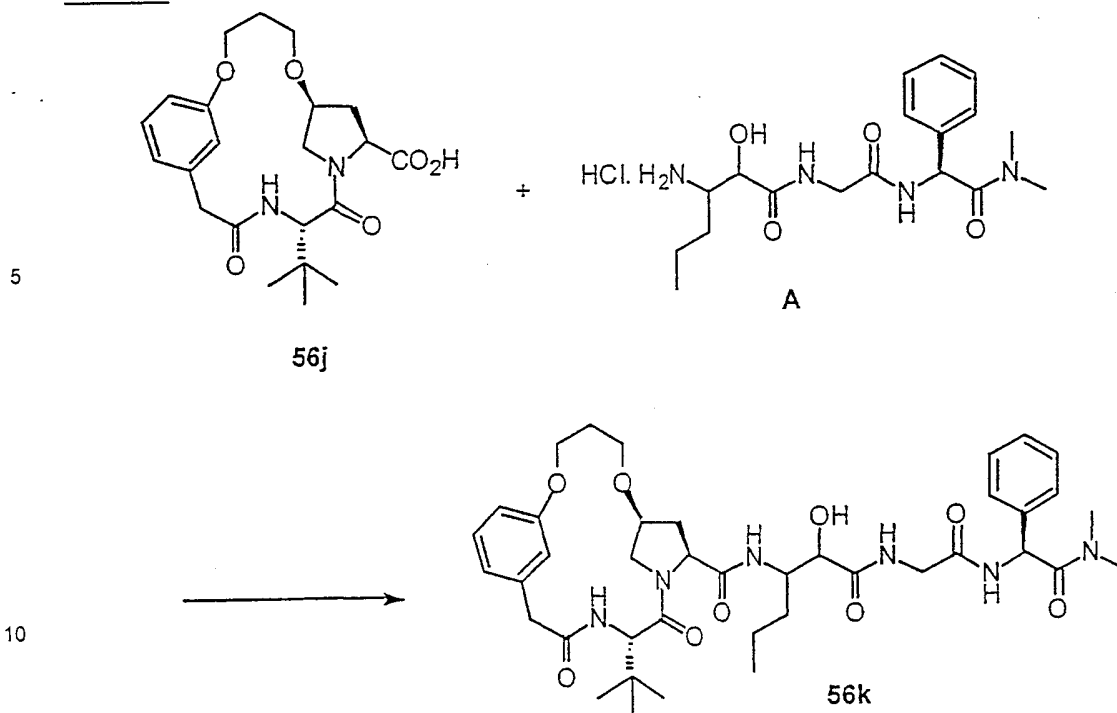
Požadovaný produkt **56i** byl získán způsobem popsáným pro příklad 1, krok H. Čištění surového zbytku s použitím směsi 75/25
 10 hexany/aceton poskytlo směs produktu **56i** spolu s trifenylofosfinoxidem. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{23}H_{33}N_2O_6$: 433,2339 (M+H)⁺. Nalezeno: 433,2343.

Krok J



Očekávaný produkt **56j** byl syntetizován jak bylo popsáno pro příklad 1, krok I. Výtěžek pro dva kroky = 16 %. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{22}H_{31}N_2O_6$: 419,2182 (M+H)⁺. Nalezeno: 419,2176.

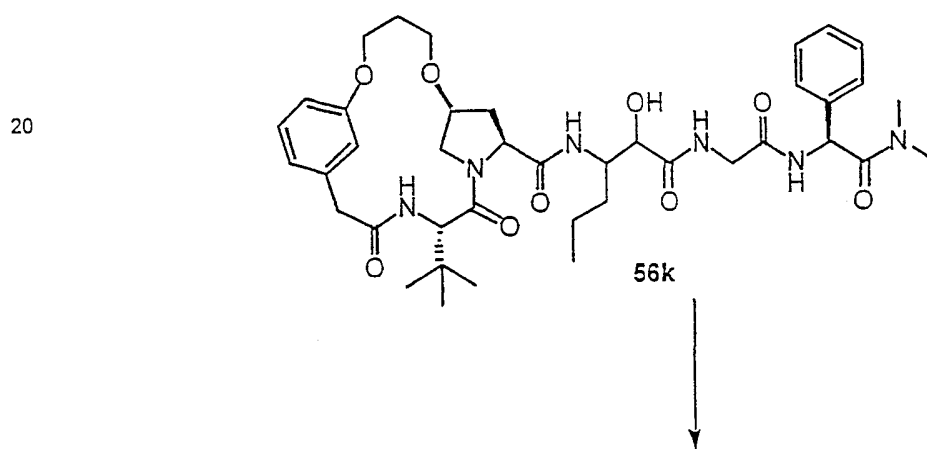
Krok K

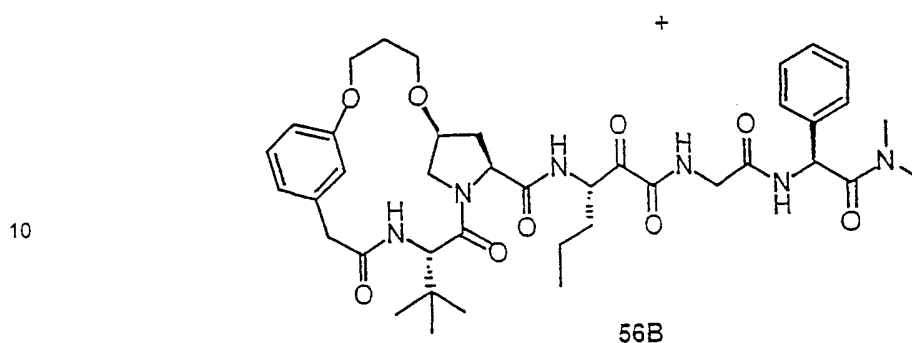
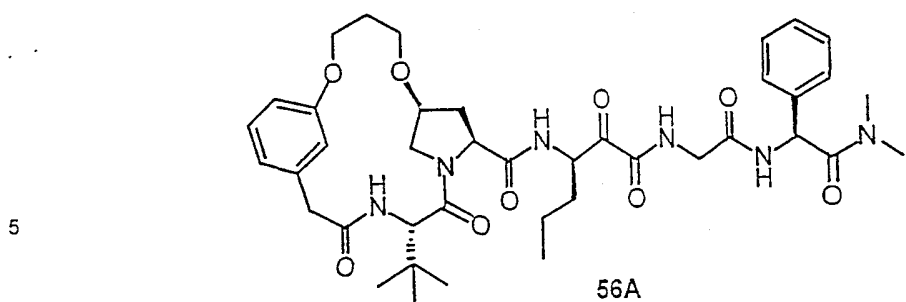


Očekávaný produkt **56k** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Materiál po zpracování měl dostatečnou čistotu pro převedení do dalšího kroku. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{40}H_{57}N_6O_9$: 765,4187 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 765,4198.

15

Krok L

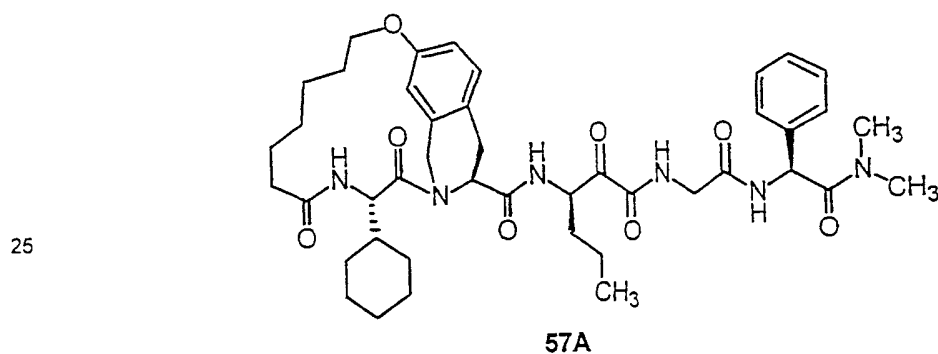


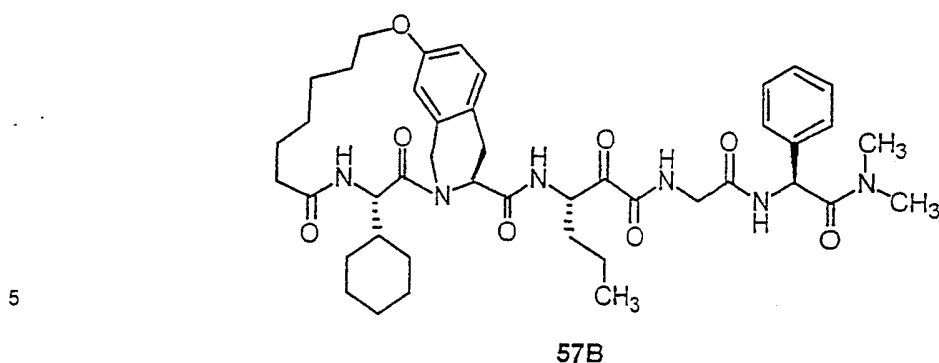


Požadované produkty **56A** a **56B** byly získány oxidací podle
 protokolu popsaného výše pro příklad 1, krok K. Čištění bleskovou
 15 chromatografií na koloně s použitím směsi 98/2 až 96/4
 dichlormethan/MeOH poskytlo oddělené isomery **56A** a **56B**, a určité
 množství směsi. Kombinovaný výtěžek = 35 % (2 kroky). HRMS (FAB)
 Vypočteno pro $C_{40}H_{55}N_6O_9$: 763,4031 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 763,4025
 (**56A**), 763,4040 (**56B**).

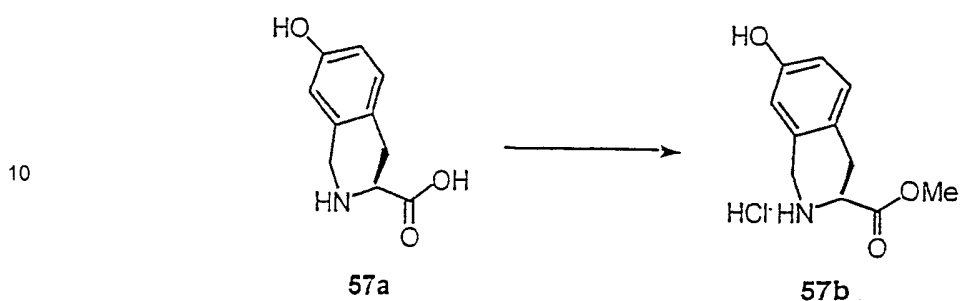
20

Příklad 57: Příprava sloučenin vzorců **57A** a **57B**





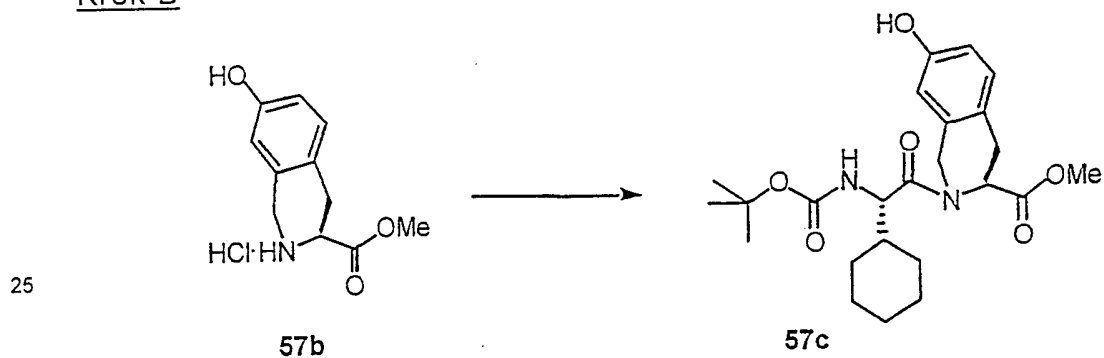
Krok A



15 K roztoku komerčního dihydrátu aminokyseliny (3S)-7-hydroxy-
-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylové kyseliny **57a** (5,0 g,
21,8 mmol) v methanolu (180 ml) byla přidána koncentrovaná kyselina
chlorovodíková (5,0 ml, 60 mmol). Získaný čirý roztok byl potom
zahříván pod zpětným chladičem v olejové lázni 18 hod. Rozpouštědla
byla odstraněna ve vakuu za poskytnutí methylesteru **57b** jako bílé
pevné látky, která byla použita v další reakci bez dalšího čištění.

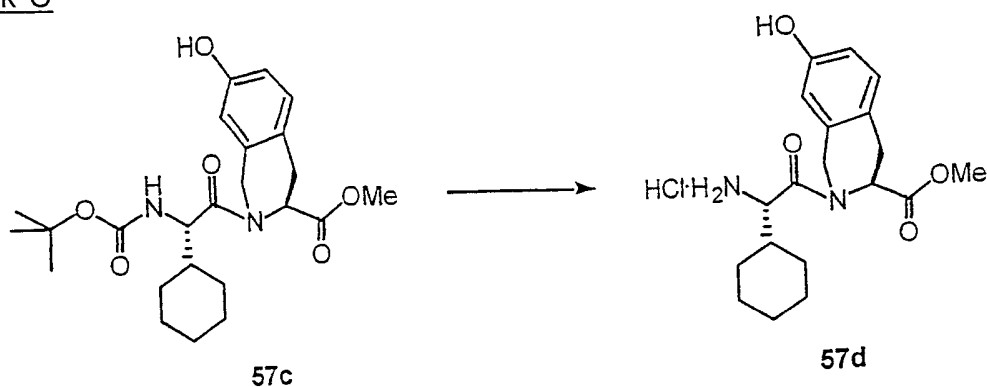
20

Krok B



K roztoku aminhydrochloridu **57b**, *N*-Boc-cyklohexylglycinu (5,95 g, 21,8 mmol), HOObt (3,73 g, 22,9 mmol) a EDCI (5,00 g, 26,1 mmol) v bezvodém DMF (200 ml) a CH₂Cl₂ (200 ml) při -20 °C byl přidán NMM (7,20 ml, 65,5 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována v mrazicím boxu přes noc (18 hod), potom byly přidány EtOAc (600 ml), roztok soli (150 ml) a 5% H₃PO₄ (150 ml). Oddělený organický roztok byl promyt 5% H₃PO₄ (200 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 200 ml), vodou (200 ml) a roztokem soli (200 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu, za získání sloučeniny **57c** (10,3 g, kvant. 2 kroky) jako bílé pevné látky. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,32 (s, 1H), 8,35 - 8,32 (m, 1H), 6,99 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,65 - 6,54 (m, 1H), 4,92 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 4,50 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 4,43 - 4,36 (m, 1H), 4,29 - 4,19 (m, 1H), 3,53 (s, 3H), 3,02 - 2,81 (m, 2H), 1,98 - 1,62 (m, 8H), 1,42 - 1,11 (m, 14 H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 171,6, 171,2, 162,3, 156,0, 133,7, 128,8, 125,3, 114,1, 112,6, 78,0, 54,8, 52,4, 51,9, 45,0, 29,5, 28,1, 28,0, 25,9, 25,6, 25,5; HRMS *m/z* 447,2492 [vypočteno pro C₂₄H₃₄N₂O₆, 447,2495].

Krok C

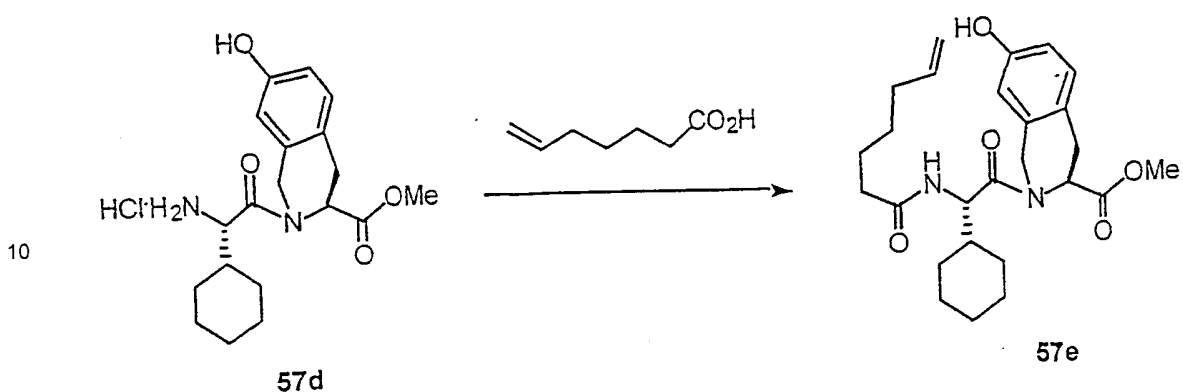


Boc-aminomethylester **57c** (7,20 g, 16,1 mmol) byl rozpuštěn ve 4N HCl (100 ml, 400 mmol) a získaný roztok byl míchán při laboratorní

teplotě. Postup reakce byl monitorován TLC. Po 4 hod byl roztok zakonzentrován ve vakuu a zbytek byl ponechán ve vakuu přes noc za poskytnutí sloučeniny **57d** jako bílé pevné látky, která byla použita při následující reakci bez dalšího čištění.

5

Krok D



K roztoku aminhydrochlorid **57d** (z kroku D), 6-heptenové kyseliny (2,90 g, 22,6 mmol), HOObt (3,70 g, 22,7 mmol) a EDCI (4,80 g, 25,0 mmol) v bezvodém DMF (250 ml) a CH₂Cl₂ (150 ml) při -20 °C byl přidán NMM (7,50 ml, 68,2 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována v mrazicím boxu 2 dny. Potom byla míchána na vzduchu a ponechána ohřát na laboratorní teplotu 1 hod. Byly přidány EtOAc (500 ml), roztok soli (100 ml) a 5% H₃PO₄ (100 ml). Oddělený organický roztok byl promyt 5% H₃PO₄ (100 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 150 ml), vodou (150 ml) a roztokem soli (150 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakonzentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (5 až 30 % EtOAc-CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **57e** (2,30 g, 5,04 mmol, 31 % (2 kroky)) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) 9,32 (s, 1H), 8,06 - 8,01 (m, 1H), 7,00 - 6,6,96 (m, 1H), 6,63 - 6,54 (m, 2H), 5,78 - 5,70 (m, 1H), 5,04 - 4,89 (m, 4H), 4,73 - 4,69 (m, 1H), 4,53 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,01 - 2,91 (m, 2H), 2,15 - 1,93 (m, 4H), 1,76 - 0,97 (m, 15 H); ¹³C NMR (100

15

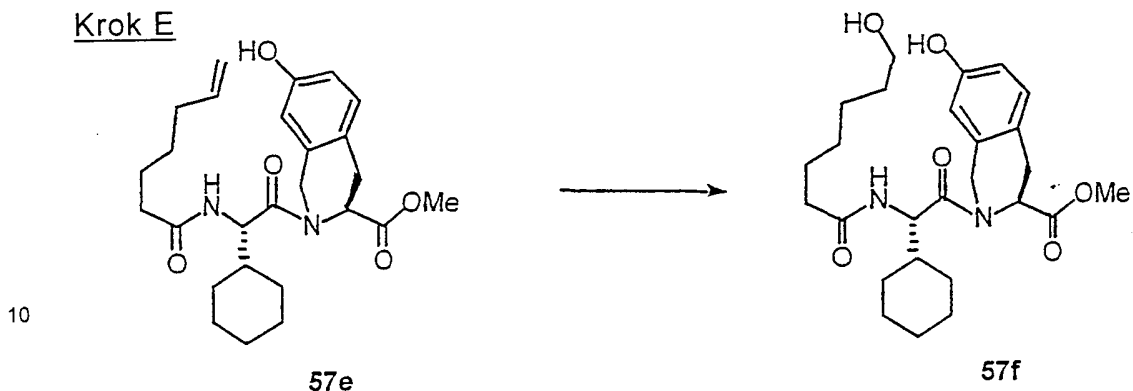
20

25

MHz, d_6 -DMSO) δ 172,0, 171,5, 171,1, 156,0, 138,6, 134,0, 128,7, 122,5, 114,6, 114,1, 112,5, 52,9, 52,2, 51,9, 45,0, 34,5, 32,8, 32,7, 29,4, 28,7, 28,1, 27,7, 25,9, 25,5, 25,5, 24,8; HRMS m/z 457,1 [vypočteno pro $C_{26}H_{36}N_2O_5$, 456,6].

5

Krok E



K roztoku sloučeniny **57e** (2,20 g, 4,82 mmol) v bezvodém THF (100 ml) v atmosféře dusíku při 0 °C byl opatrně přidán roztok boranu v THF (20 ml, 1,0M, 20 mmol). Získaný roztok byl míchán při 0 °C v atmosféře vodíku 1 hod 40 min. Potom byl přidán ethanol (10 ml) a pufr pH 7 (15 ml), potom 30% roztok H_2O_2 (15 ml). Po míchání při 0 °C po dobu 20 min byla reakční směs zahřáta na laboratorní teplotu a míchána 2 hod. Byly přidány EtOAc (400 ml) a roztok soli (200 ml) a vrstvy byly odděleny. Vodná vrstva byla extrahována EtOAc (2 x 150 ml). Spojený organický roztok byl sušen síranem hořečnatým, zfiltrován, zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (3 až 5 % MeOH- CH_2Cl_2) poskytla sloučeninu **57f** (2,18 g, 4,47 mmol, 93 %) jako bílou pevnou látku. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 9,32 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 1H), 6,99 - 6,96 (m, 1H), 6,63 - 6,51 (m, 2H), 5,05 - 5,00 (m, 1H), 4,73 - 4,21 (m, 3H), 4,51 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,03 - 2,90 (m, 2H), 2,15 - 2,00 (m, 2H), 1,75 - 1,56 (m, 6H), 1,49 - 0,97 (m, 13H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 172,2, 171,6, 171,2, 156,0, 134,1, 128,7, 122,6, 114,2, 112,5, 60,7, 52,9, 52,3, 51,9, 45,1, 34,8, 32,4, 29,5, 28,7, 28,53, 28,47, 28,10, 25,9, 25,6, 25,5, 25,4, 25,2; HRMS m/z 475,2812 [vypočteno pro $C_{26}H_{38}N_2O_6$, 475,2808].

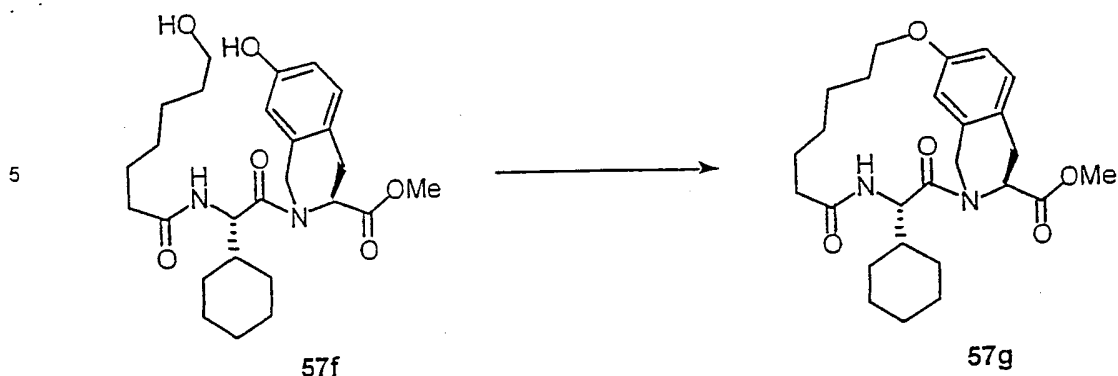
15

20

25

30

Krok F

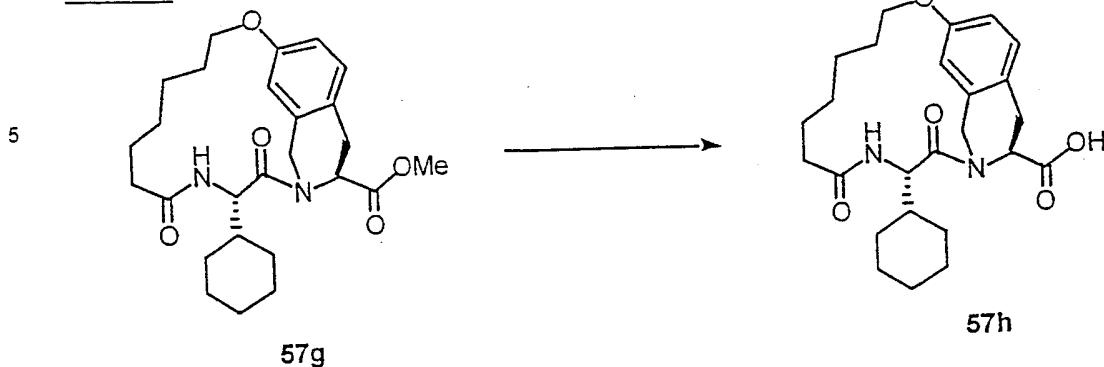


Roztok fenolalkoholu **57f** (2,08 g, 4,38 mmol) a ADDP (3,00 g, 11,9 mmol) v bezvodém CH₂Cl₂ byl probubláván argonem přes skleněnou fritu po dobu 20 min. K tomuto roztoku byl při 0 °C přidán trifenylofosfin (3,45 g, 13,2 mmol). Po míchání při 0 °C po dobu 20 min byl roztok zahřát na laboratorní teplotu a míchán přes noc (18 hod) pod dusíkem. TLC ukázala přítomnost podstatného množství výchozího materiálu. Byla přidána druhá dávka ADDP (3,00 g, 11,9 mmol) a trifenylofosfinu (3,45 g, 13,2 mmol) a směs byla míchána v atmosféře dusíku 2 dny a 16 hod. TLC ukázala úplné spotřebování výchozího materiálu. Po odstranění rozpouštědla ve vakuu byl zbytek částečně čištěn bleskovou chromatografií (1 až 2 % MeOH v CH₂Cl₂) za získání směsi makrocyclu **57g** a trifenylofosfinoxidu. Makrocyclická sloučenina **57g** byla hydrolyzována na odpovídající kyselinu bez dalšího čištění. ¹H NMR 400 MHz, d₆-DMSO) δ 8,00 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,82 - 6,76 (m, 2H), 5,14 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,79 - 4,74 (m, 1H), 4,39 (dd, *J* = 11,5, 6,4 Hz, 1H), 4,25 (d, *J* = 14,7 Hz, 1H), 4,22 - 4,18 (m, 1H), 4,08 - 4,02 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,18 (dd, *J* = 15,1, 6,4 Hz, 1H), 2,85 (dd, *J* = 14,7, 11,5 Hz, 1H), 2,07 - 2,04 (m, 2H), 1,81 - 1,40 (m, 10 H), 1,32 - 0,85 (m, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 171,9, 171,5, 170,2, 157,1, 137,0, 131,5, 126,4, 115,9, 112,6, 66,5, 54,4, 52,2, 51,9, 46,8, 44,9, 44,4, 33,6, 29,4, 29,1, 28,0, 27,3, 27,0, 26,0, 25,3, 25,2, 24,3, 24,2, 23,9; HRMS *m/z*

10
15
20
25
30

457,2707 [vypočteno pro $C_{26}H_{36}N_2O_5$, 457,2702].

Krok G

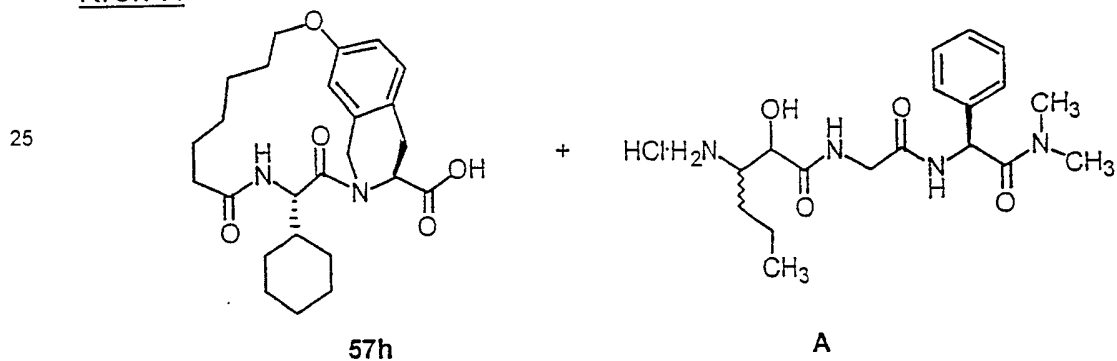


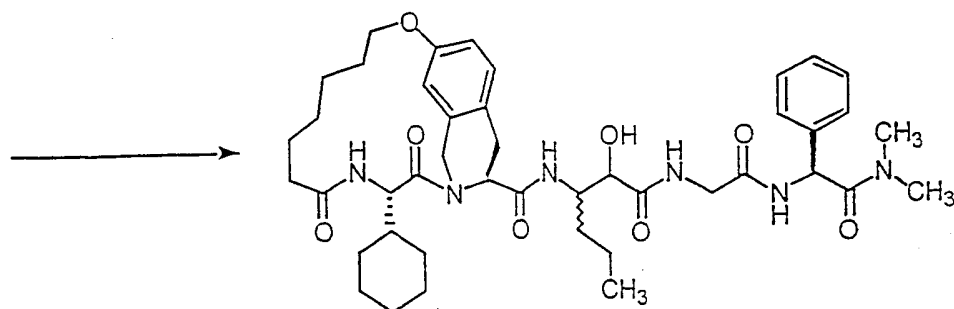
Vodný roztok hydroxidu lithného (0,21 g, 30 ml H_2O , 8,75 mmol) byl přidán k 0 °C roztoku methylesteru **57g** (z kroku 1F) v THF (30 ml) a methanolu (30 ml). Směs byla míchána v ledové lázni a zahřáta na teplotu laboratoře spolu s vodní lázní v průběhu 4 hod. Postup reakce byl monitorován TLC. Po odstranění těkavých podílů ve vakuu byly přidány EtOAc (100 ml) a voda (30 ml) a dvě vrstvy byly odděleny.

15 Vodný roztok byl znovu extrahován CH_2Cl_2 (100 ml), potom byl okyselen na pH = 1. Potom byla přidána EtOAc (150 ml) a vodný roztok byl nasycen pevným chloridem sodným. Po oddělení vrstev byla vodná vrstva extrahována EtOAc (2 x 100 ml). Organické roztoky byly spojeny, sušeny síranem hořečnatým, zfiltrvány a zakoncentrovány

20 ve vakuu za získání sloučeniny **57h** (1,23 g, 2,78 mmol, 63 % (2 kroky)) jako bílé pevné látky.

Krok H





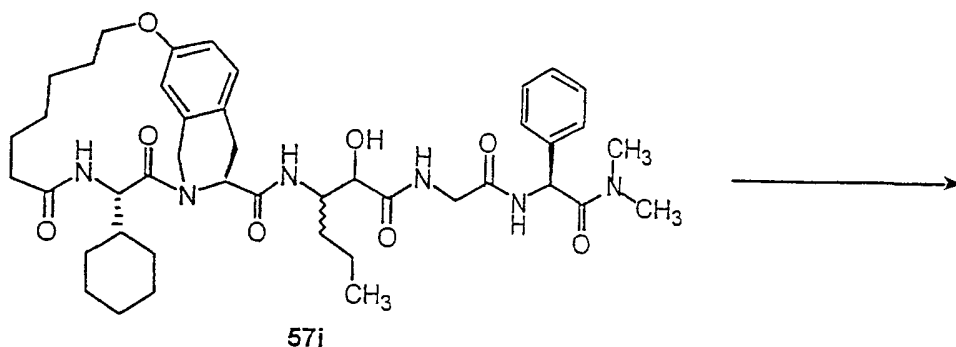
57i

K roztoku kyseliny **57h** (0,390 g, 0,881 mmol), aminu **A** (0,360 g, 0,898 mmol), HOObt (160 mg, 0,981 mmol) a EDCI (210 mg, 1,10 mmol) v bezvodém DMF (50 ml) a CH₂Cl₂ (30 ml) při -20 °C byl
 10 přidán NMM (0,40 ml, 3,64 mmol). Po míchání při této teplotě po dobu 30 min byla reakční směs udržována v mrazicím boxu 66 hod. Potom byly přidány EtOAc (200 ml), roztok soli (50 ml) a 5% H₃PO₄ (50 ml). Oddělený organická roztok byl promyt postupně 5% H₃PO₄ (80 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 80 ml),
 15 vodou (80 ml) a roztokem soli (80 ml), sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH-CH₂Cl₂) poskytla sloučeninu **57i** jako směs čtyř diastereomerů (0,340 g, 0,431 mmol, 49 %) jako bílé pevné látky.
¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8,56 - 8,46 (m, 1H), 7,96 - 7,82 (m, 2H), 7,40 - 7,25 (m, 6H), 7,15 - 6,99 (m, 2H), 6,81 - 6,74 (m, 2H), 6,05 - 5,71 (m, 2H), 5,11 - 5,02 (m, 1H), 4,85 - 4,68 (m, 1H), 4,40 - 3,70 (m, 8H), 3,14 - 3,02 (m, 1H), 2,95 - 2,73 (m, 7H), 2,06 - 2,05 (m, 2H), 1,81 - 1,39 (m, 10H), 1,30 - 1,05 (m, 11H), 0,89 - 0,75 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 172,24, 172,21, 171,87, 171,81, 171,78, 171,7,
 20 170,8, 170,77, 170,74, 170,5, 170,4, 170,0, 169,97, 169,24, 169,22, 169,1, 169,0, 168,0, 167,9, 167,82, 167,78, 157,2, 156,9, 137,61, 137,57, 137,54, 137,47, 137,43, 137,38, 133,2, 132,2, 128,9, 128,44, 128,41, 128,37, 128,0, 127,96, 127,6, 127,4, 127,3, 127,19, 127,16, 115,7, 115,6, 115,5, 112,8, 112,77, 112,7, 112,6, 73,6, 73,39, 73,37,
 30 72,4, 71,7, 66,9, 66,7, 55,8, 55,6, 55,09, 55,07, 53,02, 52,95, 52,9,

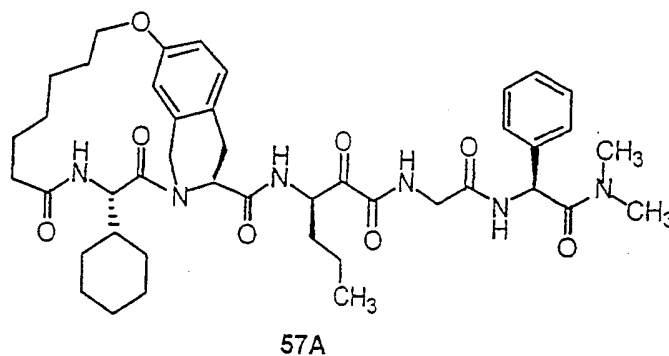
52,6, 51,0, 50,96, 50,91, 50,86, 50,76, 45,6, 45,5, 45,44, 45,36, 41,7,
41,6, 41,5, 41,4, 36,6, 36,55, 36,49, 35,3, 33,7, 33,6, 33,5, 33,0, 32,4,
30,7, 30,3, 30,1, 30,0, 29,8, 29,48, 29,45, 29,41, 28,3, 28,2, 28,1,
27,3, 27,2, 27,13, 27,09, 27,0, 26,9, 26,85, 26,82, 26,1, 25,4, 25,2,
5 24,1, 24,08, 24,03, 24,0, 23,9, 23,8, 18,8, 18,7, 18,6, 18,4, 13,9, 13,8,
13,7; HRMS m/z 789,4560 [vypočteno pro $C_{43}H_{60}N_6O_8$, 789,4551,
chyba = 1 ppm].

Krok I

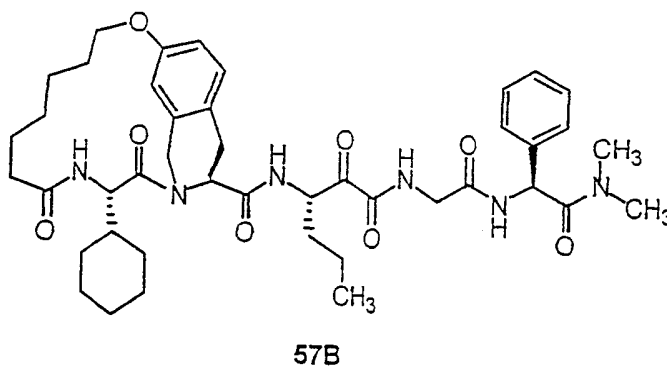
10



15



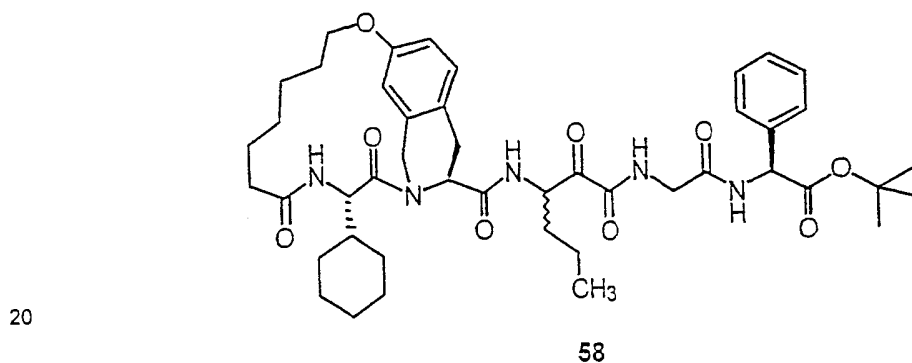
20



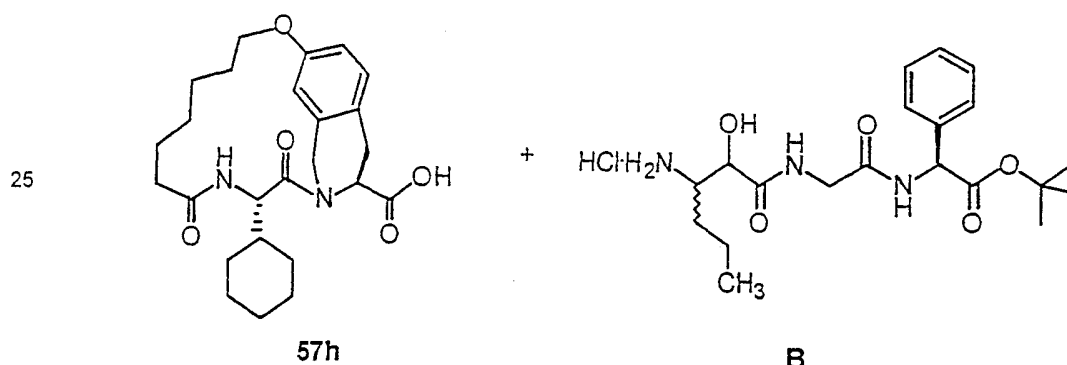
25

Ke směsi hydroxyamidu **57i** (0,320 g, 0,406 mmol) a Des-Martinova činidla (0,400 g, 0,943 mmol) při 0 °C byl přidán bezvodý CH₂Cl₂ (80 ml). Získaná bílá suspenze byla důkladně míchána při 0 °C a zahřáta na laboratorní teplotu spolu s ledovou lázní v průběhu 4 hod. Byly přidány nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného a roztok hydrogensířičitanu sodného (vždy 30 ml) a směs byla důkladně míchána po dobu 10 min před oddělením vrstev. Vodný roztok byl extrahován CH₂Cl₂ (2 x 80 ml). Spojený organický roztok byl sušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakoncentrován ve vakuu. Blesková chromatografie (2 až 5 % MeOH-CH₂Cl₂) poskytla dva stereoisomery **57A** (109 mg, 0,139 mmol) a **57B** (102 mg, 0,130 mmol, 66 % kombinovaný výtěžek) jako pevné látky.

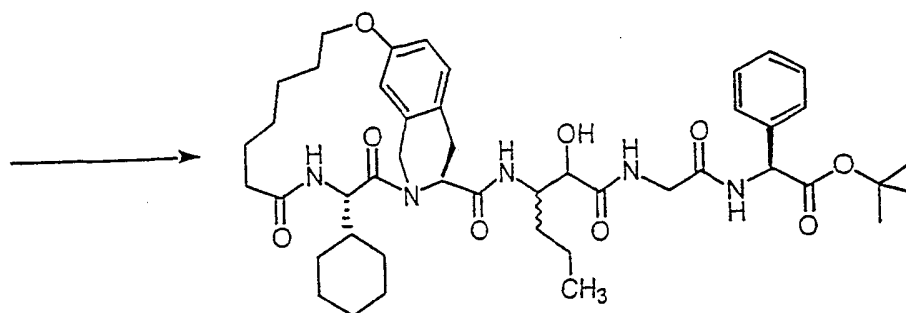
15 Příklad 58: Příprava sloučeniny vzorce 58



Krok A



5

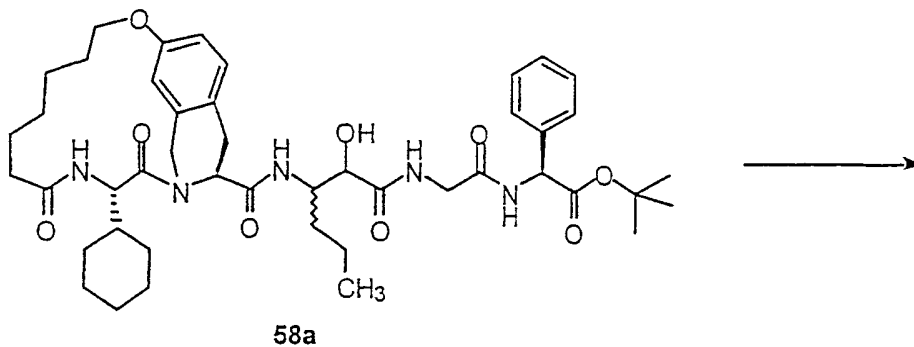


58a

Požadovaná sloučenina **58a** byla připravena způsobem popsaným v příkladu 1, krok J, kromě použití aminhydrochloridu **B** namísto **A**. Hydroxyamid **58a** byl získán jako směs nerozdělitelných diastereomerů ve formě bílé pevné látky v 53% výtěžku.

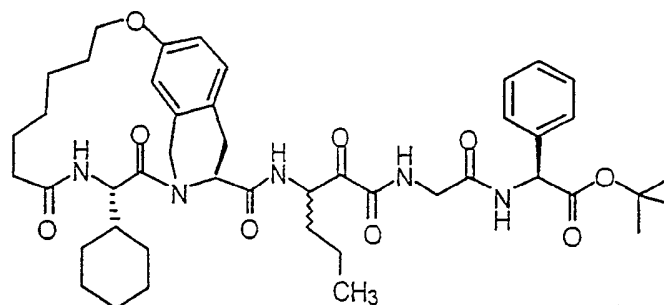
Krok B

15



58a

20



58

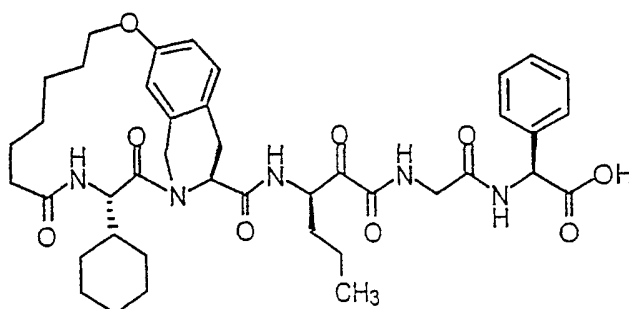
25

Požadovaná sloučenina **58** byla připravena z hydroxyamidu **58a** způsobem popsáním v příkladu 2, krok B. Byla získána jako směs nerozdělitelných diastereomerů ve formě bílé pevné látky v 88% výtěžku.

5

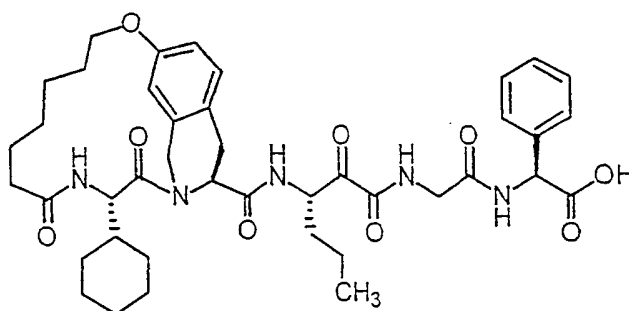
Příklad 59: Příprava sloučenin vzorců **59A** a **59B**

10



59A

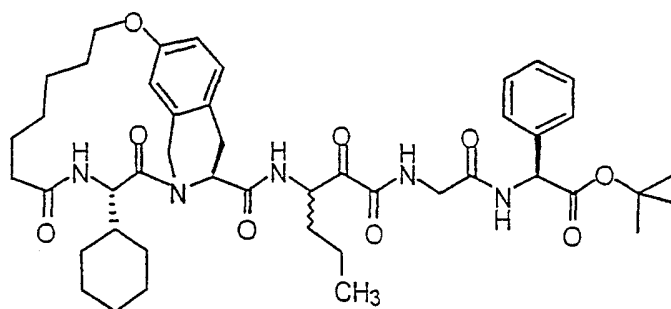
15



59B

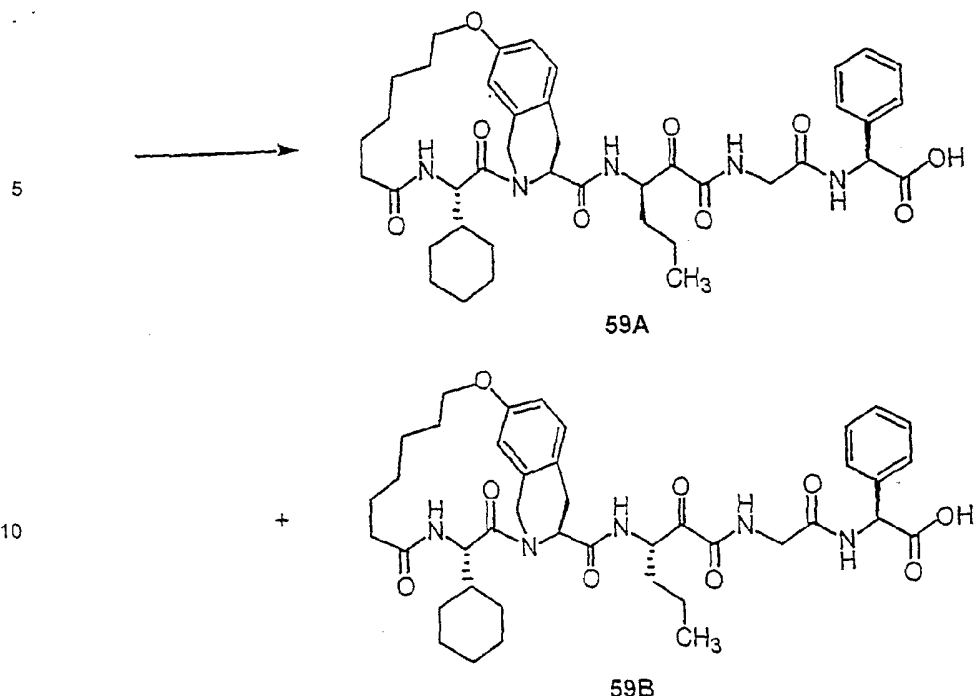
Krok A

20



58

25



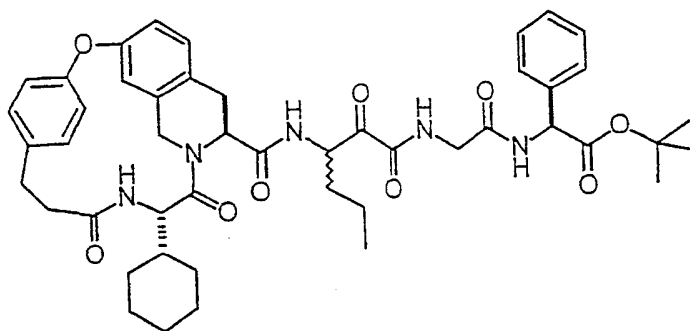
15 Roztok t-butylesteru **58** (18 mg, 0,022 mmol) v kyselině
trifluoroctové (2 ml) a CH₂Cl₂ (2 ml) byl míchán při teplotě laboratoře 3
hod. Po odstranění těkavých podílů ve vakuu byl zbytek rozpuštěn
v 50% MeOH-CH₂Cl₂ (3 ml) a zakoncentrován do sucha ve vakuu za
získání sloučeniny jako bělavé pevné látky. Blesková chromatografie
20 (8 až 15 % MeOH, 0,3 až 0,5 % AcOH v CH₂Cl₂) poskytla dva
stereoisomery **59A** (6,5 mg, 0,0086 mmol) a **59B** (6,1 mg, 0,008 mmol,
75% kombinovaný výtěžek) jako bílé pevné látky.

25 Analytická data pro **59A**: ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8,75 -
8,72 (m, 1H), 8,60 - 8,57 (m, 1H), 8,10 - 8,08 (m, 1H), 7,91 - 7,88 (m,
1H), 7,38 - 7,27 (m, 5H), 7,12 (d, J = 8,14 Hz, 1H), 6,81 - 6,73 (m,
2H), 5,24 - 5,22 (m, 1H), 5,06 - 5,01 (m, 1H), 4,77 - 4,73 (m, 1H), 4,39
- 4,17 (m, 3H), 4,07 - 4,01 (m, 1H), 3,92 - 3,79 (m, 3H), 3,15 - 3,05 (m,
1H), 2,78 - 2,72 (m, 1H), 2,08 - 2,05 (m, 1H), 1,78 - 1,45 (m, 13 H),

1,41 - 1,22 (m, 4H), 1,18 - 1,03 (m, 4H), 0,93 - 0,81 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 196,6, 171,8, 171,5, 171,9, 170,3, 167,2, 161,0, 157,1, 137,4, 128,4, 128,1, 127,7, 127,5, 127,4, 126,9, 115,6, 112,6, 66,8, 56,6, 55,1, 53,4, 52,7, 52,6, 45,4, 41,6, 33,5, 31,7, 30,0, 29,6, 28,2, 27,2, 27,1, 26,1, 25,42, 25,36, 24,0, 23,8, 18,7, 13,5; HRMS m/z 760,3915 [vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_9$, 760,3922].

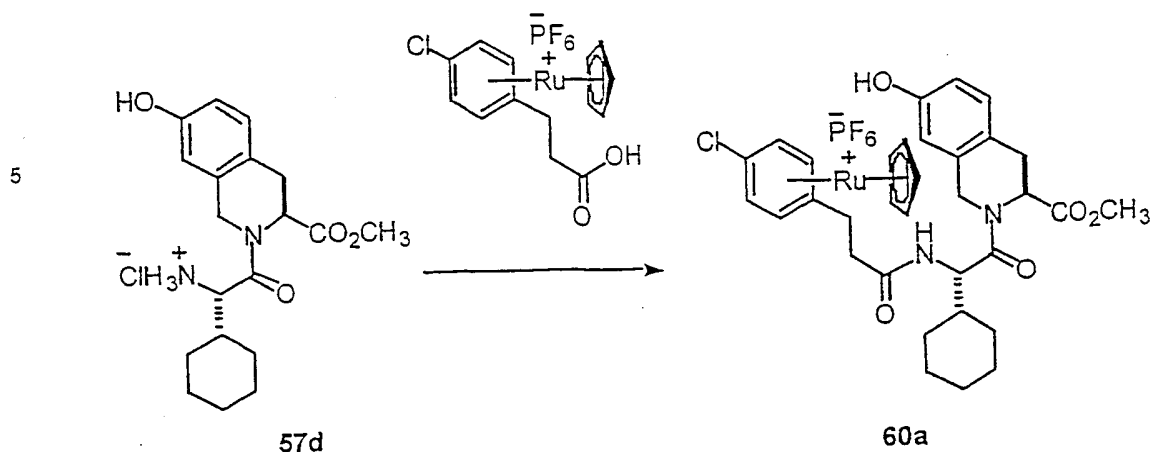
Analytická data pro **59B**: ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 8,76 - 8,73 (m, 1H), 8,55 (dd, J = 6,9, 3,2 Hz, 1H), 8,24 (d, J = 7,11 Hz, 1H), 7,93 - 7,88 (m, 1H), 7,37 - 7,25 (m, 1H), 7,15 - 7,11 (m, 1H), 6,82 - 6,74 (m, 2H), 5,23 - 5,20 (m, 1H), 5,09 - 5,01 (m, 1H), 4,75 - 4,71 (m, 1H), 4,38 - 4,29 (m, 1H), 4,24 - 4,17 (m, 2H), 4,07 - 4,02 (m, 1H), 3,92 - 3,78 (m, 2H), 3,13 - 3,08 (m, 1H), 2,78 - 2,70 (m, 1H), 2,08 - 2,05 (m, 2H), 1,75 - 1,13 (m, 21 H), 0,89 - 0,85 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 196,7, 171,6, 171,2, 169,9, 167,1, 160,8, 157,0, 137,5, 128,3, 128,2, 128,0, 127,97, 127,9, 127,4, 127,3, 127,1, 115,7, 115,6, 112,7, 112,6, 66,7, 56,8, 54,8, 53,3, 45,5, 41,6, 33,6, 31,8, 29,5, 28,1, 27,3, 27,0, 26,1, 25,4, 24,2, 23,9, 18,6, 13,5; HRMS m/z 760,3915 [vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_9$, 760,3922].

20 Příklad 60: Příprava sloučeniny **60**



60

Krok A



10

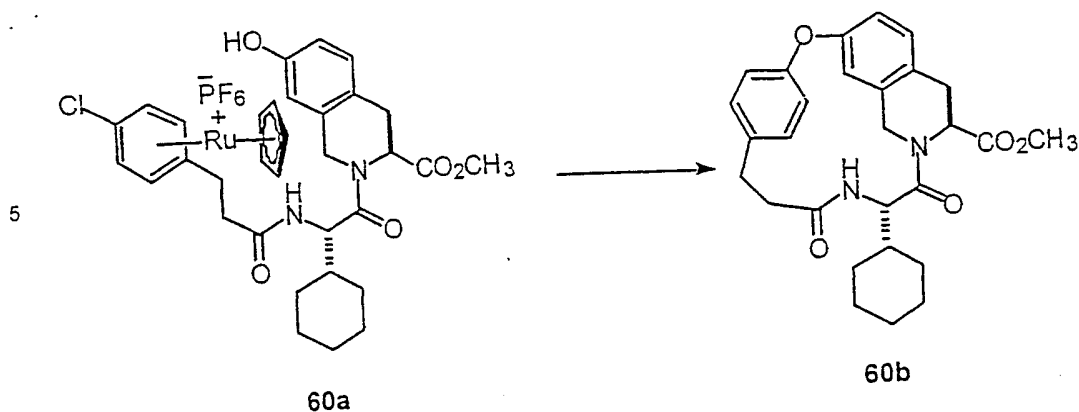
Roztok $[\text{CpRu}(\eta^6\text{-4-chlorfenylpropionové kyseliny})]\text{PF}_6$ (4,14 g, 8,36 mmol) v suchém DMF (20 ml) byl smísen s HOBt (1,69 g, 12,54 mmol, 1,5 ekv.) a Hünigovou bází (6,47 g, 9,20 ml, 50,16 mmol, 6,0 ekv.). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a byla smíšena s EDCI (2,39 g, 12,54 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 30 min a byla přidána amoniová sůl Tic **57d** (2,90 g, 7,6 mmol, 1,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 12 hod a DMF byl oddestilován ve vakuu. Zbytek byl zředěn vodným HCl (1M, 100 ml) a extrahován do CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty vodným NaHCO_3 (1 x 100 ml), roztokem soli (100 ml), sušeny (Na_2SO_4), zfiltrány, zakoncentrovány ve vakuu, za získání hnědé pevné látky **60a** (5,2 g, 83 %), která byla použita pro cyklizaci. MS: (elektrozprašování): 647 $[(\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{PF}_6)^+]$, 100]. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Ru}$ $[(\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{PF}_6)^+]$ 647,1256; Nalezeno: 647,1241.

15

20

25

Krok B



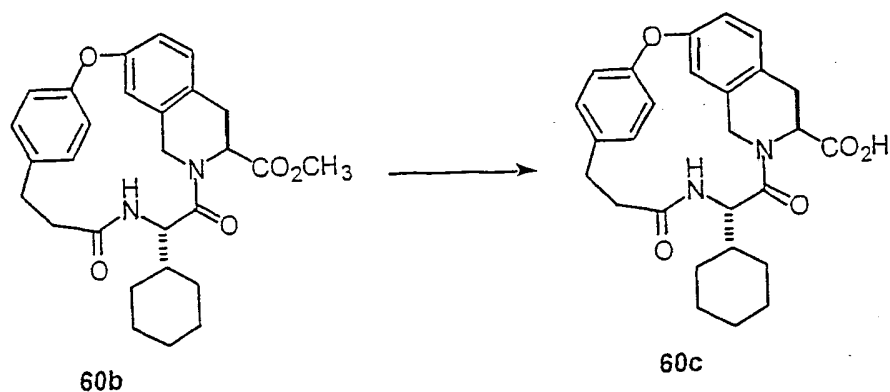
Roztok rutheniového komplexu **60a** (5,0 g 6,01 mmol) v suchém
 10 DMF (300 ml) byl odplyněn suchým N₂ při laboratorní teplotě a byl
 přidán Cs₂CO₃ (10,0 g, 30 mmol, 5,0 ekv.) a směs byla míchána při
 laboratorní teplotě 24 hod. Rozpouštědlo DMF bylo oddestilováno a
 zbytek byl zředěn vodou (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3 x 100 ml) a
 propionitrilem (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány
 15 roztokem soli (100 ml), sušeny (Na₂SO₄) zfiltrovány a zakoncentrovány
 ve vakuu, a sušeny ve vakuu přes noc, za získání hnědé pevné látky
 (5,1 g). Ta byla použita pro fotolytické odstranění Ru bez dalšího
 čištění. MS: (elektrorozprašování): 643 [(M-PF₆)⁺, 100].

Cyklizovaná sloučenina z předchozího kroku byla rozpuštěna
 20 v CH₃CN (50 ml) a zfiltrována do křemenné zkumavky. Roztok byl
 odplyněn a fotolyzován v Raynotově přístroji (λ = 350 nm) 48 hod.
 Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl čištěn
 chromatografií (SiO₂, EtOAc/hexany 3 : 2) za získání a světle hnědé
 pevné látky **60b** (289 mg, 20 %). R_f: 0,73 (aceton/hexany 3 : 7). ¹H
 25 NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,18 (d, 2 H, J = 8,1 Hz), 7,20 - 7,09 (m,
 2H), 6,92 (d, 2 H, J = 7,8 Hz), 6,86 (dd, 1 H, J = 2,1, 7,2 Hz), 6,76 (s,
 1H), 5,41 (d, 1 H, J = 17,4 Hz), 4,23 - 4,18 (m, 2H), 4,00 (bs, 1H), 3,68
 (s, 3H), 3,41 (dd, 1 H J = 12, 3,9 Hz), 3,01 - 2,86 (m, 1H), 1,9 - 1,62
 (m, 4H), 1,52 (bd, 1 H, J = 9,3 Hz), 1,36 - 1,07 (m, 5H); ¹³C NMR

(CDCl₃, 100 MHz, δ) 173,2, 167,2, 163,8, 156,5, 155,1, 135,8, 132,7, 130,2, 129,6, 126,2, 119,1, 117,5, 115,8, 60,2, 55,5, 51,6, 44,2, 42,0, 35,7, 30,2, 29,3, 26,5, 26,2, 25,8, 25,7 MS: (elektorrozprašování): 477 [(M+1)⁺, 100], 315 (20); HRMS vypočteno pro C₂₈H₃₃N₂O₅ (M+1)⁺: 477,2389; Nalezeno 477,2375; CHN vypočteno pro C₂₈H₃₂N₂O₅ 0,5H₂O: C 69,26 % H 6,85 % N 5,77 %; Nalezeno: C 69,62 % H 6,59 % N 5,77 %

Krok C

10

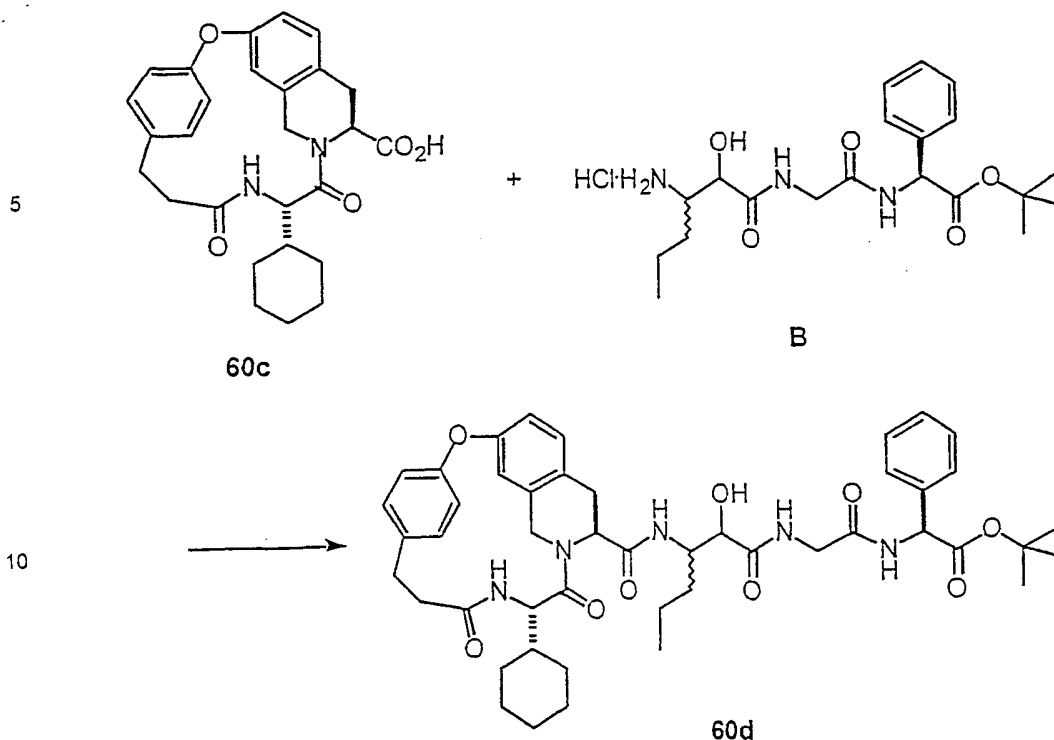


15

Roztok methylesteru **60b** (235 mg, 0,5 mmol), makrocyklu Tic v dioxanu (10,0 ml), H₂O (10,0 ml), CH₃OH (50,0 ml) byl smísen s LiOH.H₂O (41 mg, 1,0 mmol, 2,0 ekv.) a míchán při laboratorní teplotě 3 hod. Reakční směs byla okyselena (4M HCl v dioxanu). Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbylá voda byla zmrazena a lyofilizována za získání bezbarvé pevné látky **60c** použité pro reakci.

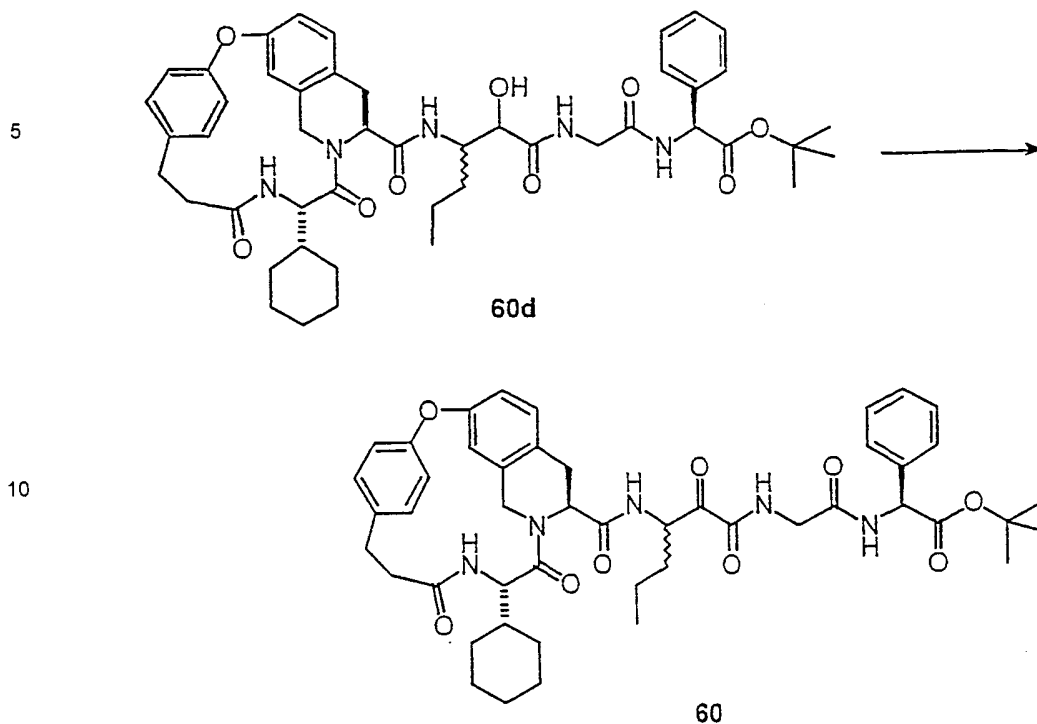
20

Krok D



Roztok hydrolyzované kyseliny **60c** (0,5 mmol) v suchém DMF
 15 (5,0 ml) a CH₂Cl₂ (5,0 ml) byl smísen s HOOBt (132 mg, 0,75 mmol,
 1,5 ekv.) a ochlazen na 0 °C, a byla přidána Hünigova báze (258 mg,
 2,0 mmol, 4,0 ekv, 369 µl). Ke směsi byl postupně přidán EDCI
 (143 mg, 0,75 mmol, 1,5 ekv.) a aminhydrochlorid **B** (214 mg, 0,5
 mmol, 1,0 ekv.). Reakční směs byla skladována v mrazicím boxu
 20 48 hod a zakoncentrována ve vakuu pro odstranění DMF a CH₂Cl₂.
 Zbytek byl zředěn vodným HCl (2M, 50 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3 x
 30 ml) Spojená organická vrstva byla extrahována vodným HCl (1M, 2
 x 50 ml), vodným NaOH (2M 2 x 30 ml), roztokem soli, sušena
 (MgSO₄) a zakoncentrována ve vakuu. Zbytek **60d** (172 mg) byl
 25 oxidován bez dalšího čištění; MS: (elektrozprašování): 838 [(M+1)⁺,
 50], 490 (100); HRMS vypočteno pro C₄₇H₆₀N₅O₉ (M+1)⁺: 838,4391;
 nalezeno: 838,4398.

Krok E

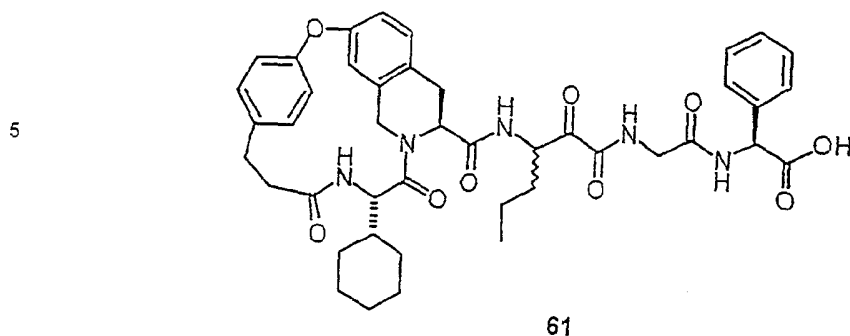


15 Roztok alkoholu **60d** (171 mg, 0,20 mmol) v CH₂Cl₂ (6,0 ml) byl smísen s Dess-Martinovým činidlem (175 mg, 0,41 mmol, 2,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 4 hod a zředěna vodným NaHCO₃ a vodným Na₂S₂O₃. Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře po dobu 20 min a reakční směs byla extrahována

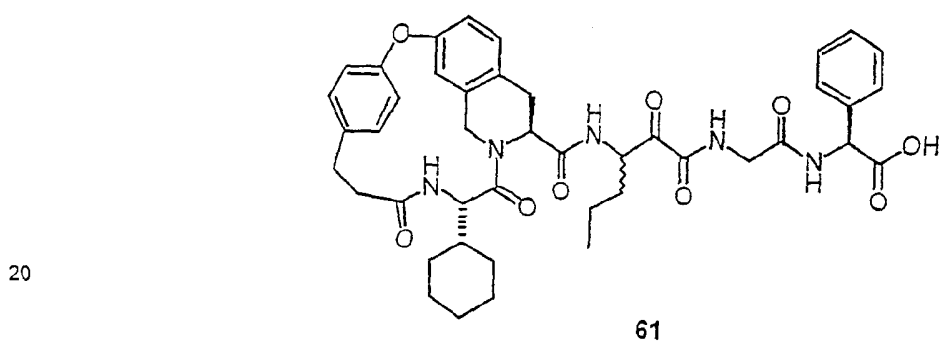
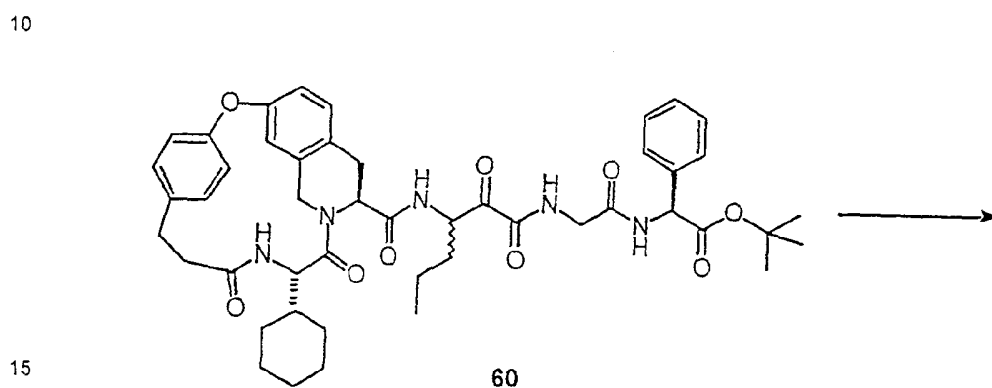
20 CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným Na₂CO₃, sušeny (Na₂SO₄), zfiltrány a zakoncentrovány ve vakuu a zbytek byl čištěn chromatografií (SiO₂, CH₃OH (2M-NH₃)/CH₂Cl₂ 1 : 20) za získání ketoamidu **60** (56 mg, 32 %) jako bezbarvé pevné

25 látky. R_f: 0,35 (CH₃OH (2M NH₃)/CH₂Cl₂ 1 : 18) MS: (elektrorozprašování, *m/z* relativní intenzita): 836 ([M+1]⁺, 90), 490 (100). HRMS vypočteno pro C₄₇H₅₈N₅O₉ (M+1)⁺ 836,4235; Nalezeno: 836,4269.

Příklad 61: Příprava sloučeniny 61



Krok A



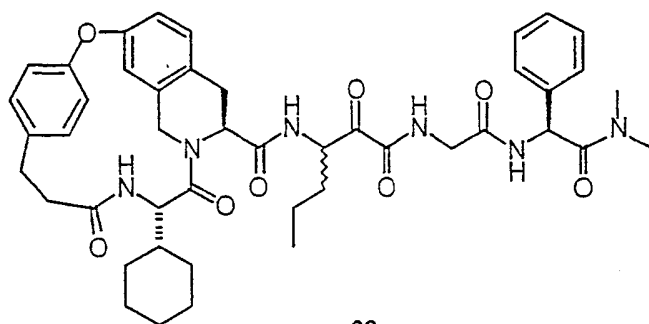
Roztok terc-butylesteru **60** (50 mg, 0,059 mmol) v suchém CH_2Cl_2 (10,0 ml) byl smísen s TFA (10,0 ml) a míchán při laboratorní teplotě 4 hod. Vymízení esteru až na základní hodnotu bylo sledováno
 25 TLC ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 1 : 19). Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl opakovaně rozpuštěn ve směsi heptany/ CH_2Cl_2 a

několikrát zakoncentrován ve vakuu za získání jemné bezbarvé pevné látky **61** (51 mg), která byla sušena ve vakuu; MS (FAB) 780 [(M+1)⁺, 85], 516 (20), 417 (20), 403 (100), 321 (20), 248 (40), 236 (40); HRMS vypočteno pro C₄₃H₅₀N₅O₉ (M+1)⁺: 780,3609; nalezeno 780,3618.

5

Příklad 62: Příprava sloučeniny **62**

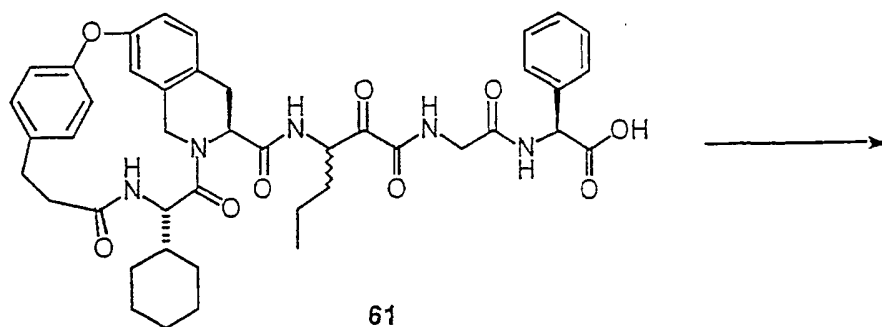
10



62

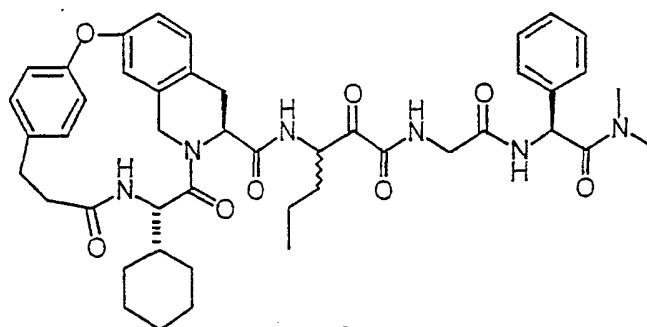
Krok A

15



61

20

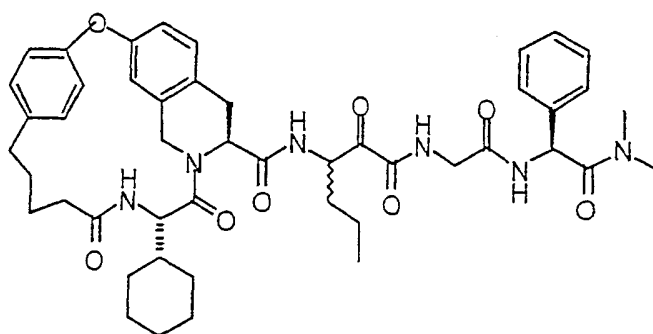


62

25

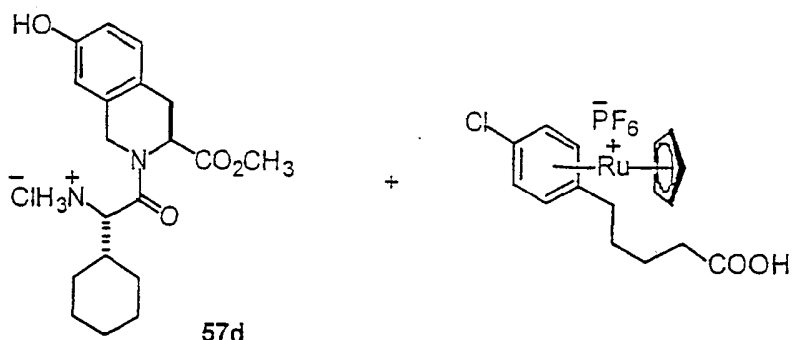
Roztok kyseliny **61** (30 mg, 0,038 mmol), hydrochloridu dimethylaminu (6,2 mg, 0,076 mmol, 2,0 ekv.) v CH₂Cl₂ (1,0 ml) byl smísen s Hünigovou bází (9,1 mg, 0,076 mmol, 2,0 ekv., 15 µl), PyBrOP (35 mg, 0,076 mmol, 2,0 ekv.) a míchán při teplotě laboratoře 24 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a čištěna chromatografií (SiO₂, aceton/hexany 1 : 1) za získání dimethylamidu **62** (14 mg, 46 %) jako bezbarvé pevné látky; R_f (0,31 aceton/hexany 1 : 1). MS (FAB) 807 [(M+1)⁺, 100], 805 (60), 794 (60), 747 (40), 629 (40), 589 (62).

Příklad 63: Příprava sloučeniny 63

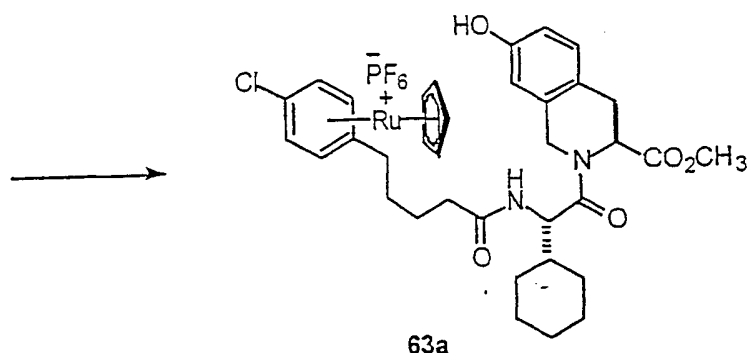


63

Krok A

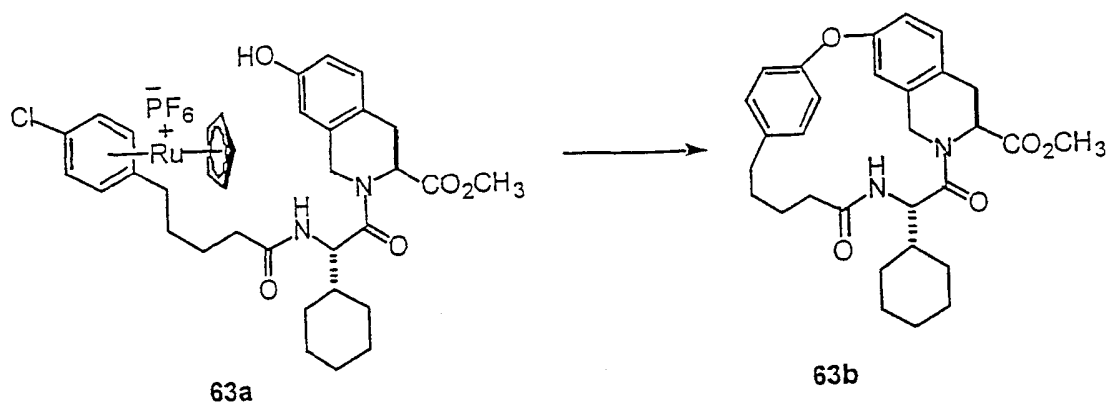


57d



Roztok $[\text{CpRu}(\eta^6\text{-4-chlorfenylpentanové kyseliny})]\text{PF}_6$ (2,2 g, 4,0 mmol) v suchém DMF (10 ml) byl smísen s HOBt (810 mg 5,99 mmol, 1,5 ekv.) a Hünigovou bází (2,58 g, 3,6 ml, 19,9 mmol, 5,0 ekv.). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a smíšena s EDCI (1,14 g, 6,0 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 30 min a byla přidána amoniová sůl Tic **57d** (1,60 g, 4,0 mmol, 1,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 12 hod a DMF byl oddestilován ve vakuu. Zbytek byl zředěn vodným HCl (1M, 100 ml) a extrahován do CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným NaHCO_3 (1 x 40 ml), roztokem soli (100 ml), sušeny (Na_2SO_4), zfiltrány, zakoncentrovány ve vakuu za získání hnědé pevné látky **63a** (2,41 g, 75 %), která byla použita pro cyklizaci.

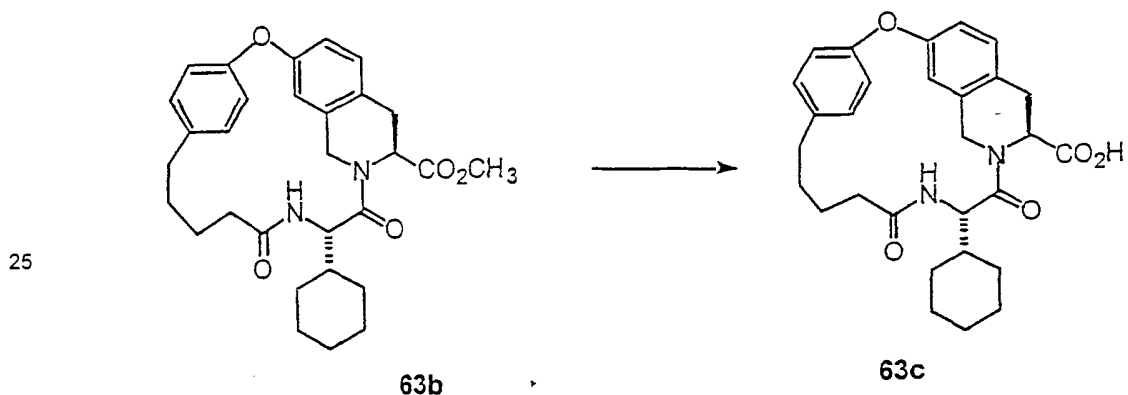
Krok B



Roztok rutheniového komplexu **63a** (2,40 g, 2,8 mmol) v suchém DMF (250 ml) byl odplyněn N₂ při teplotě laboratoře a byl přidán Cs₂CO₃ (4,6 g, 14,0 mmol, 5,0 ekv.) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 14 hod. Rozpouštědlo DMF bylo oddestilováno a zbytek byl zředěn vodou (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy byly extrahovány vodným HCl (1M, 100 ml), NaHCO₃ (100 ml), roztokem soli (100 ml), sušeny (Na₂SO₄), zfiltrovány, zakoncentrovány ve vakuu a sušeny ve vakuu přes noc, za získání hnědé pevné látky (1,9 g, 79 %). Ta byla použita pro fotolytické odstranění Ru bez dalšího čištění. MS: (elektrozprášení): 671 [(M-PF₆)⁺, 40].

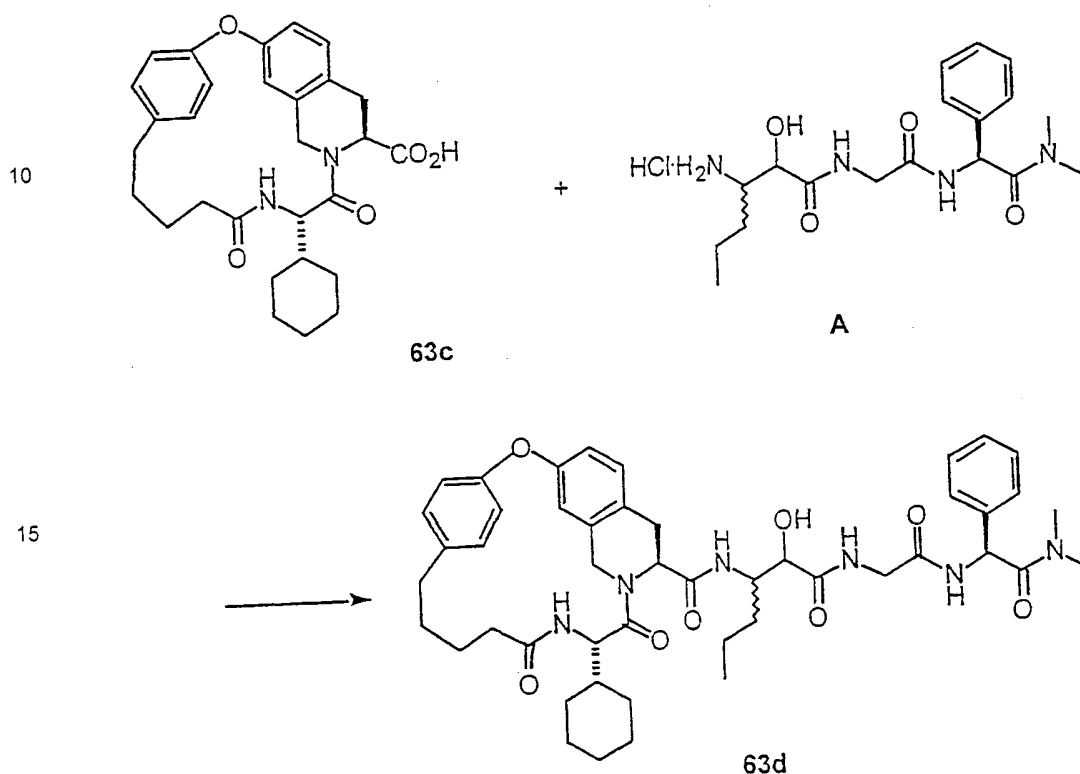
Cyklizovaná sloučenina z předchozího kroku byla rozpuštěna v CH₃CN (60 ml) a zfiltrována do křemenné zkumavky. Roztok byl odplyněn a fotolyzován v Raynotově přístroji (λ = 350 nm) 48 hod. Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl čištěn chromatografií (SiO₂, aceton/hexany 3 : 7) za získání světle hnědé pevné látky **63b** (140 mg, 13 %); R_f: 0,73 (aceton/hexany 3 : 7); MS: (FAB): 505 [(M+1)⁺, 80], 232 (40); HRMS vypočteno pro C₃₀H₃₇N₂O₅ (M+1)⁺: 505,2702; nalezeno: 505,2698.

Krok C



s LiOH.H₂O (41 mg, 1,0 mmol, 2,0 ekv.) a míchán při laboratorní teplotě 3 hod. Reakční směs byla okyselena (4M HCl v dioxanu). Reakční směs byla zakoncentrována ve vakuu a zbývající voda byla zmražena a lyofilizována za získání bezbarvé pevné látky **63c** použité pro reakci.

Krok D

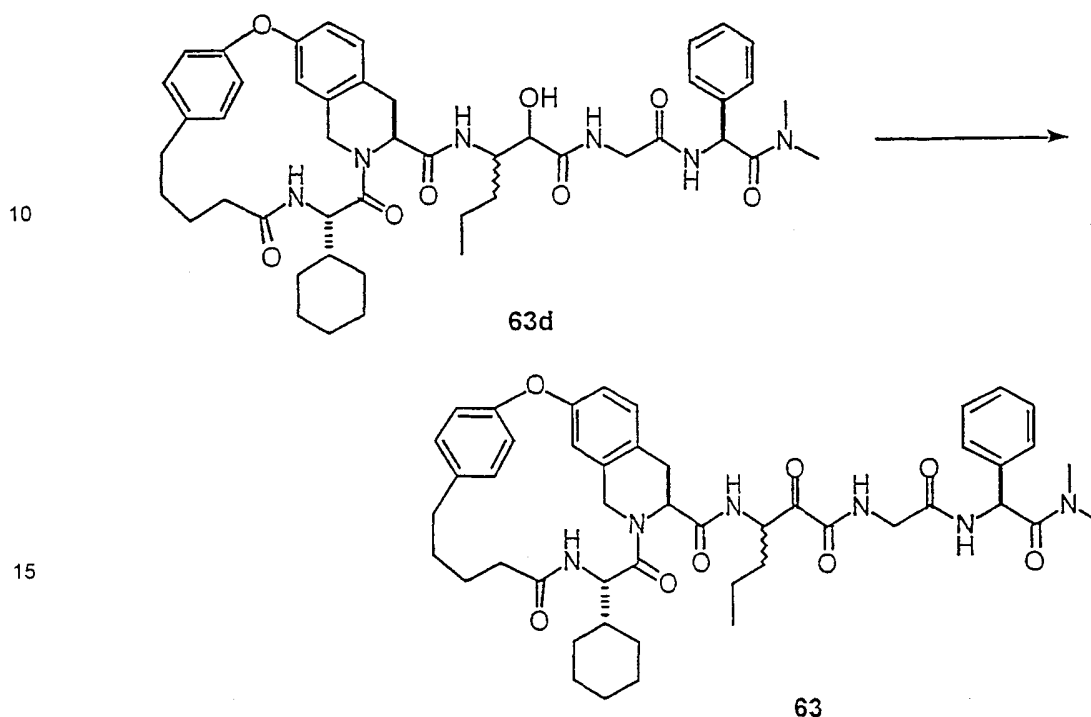


20 Roztok hydrolyzované kyseliny **63c** (100 mg, 0,21 mmol) v suchém DMF (4,0 ml) a CH₂Cl₂ (2,0 ml) byl ochlazen na 0 °C a smísen s HOObt (53 mg, 0,32 mmol, 1,5 ekv.), Hünigovou bází (122 mg, 0,95 mmol, 4,5 ekv., 175 µl), EDCI (61,0 mg, 0,32 mmol, 1,5 ekv.) a míchán 0,5 hod, a smísen s aminhydrochloridem **A** (100 mg, 0,25 mmol, 1 ekv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 hod a zakoncentrována ve vakuu pro odstranění DMF a CH₂Cl₂. Zbytek byl zředěn vodným HCl (2M, 50 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3 x 50 ml) Spojená organická vrstva byla

25

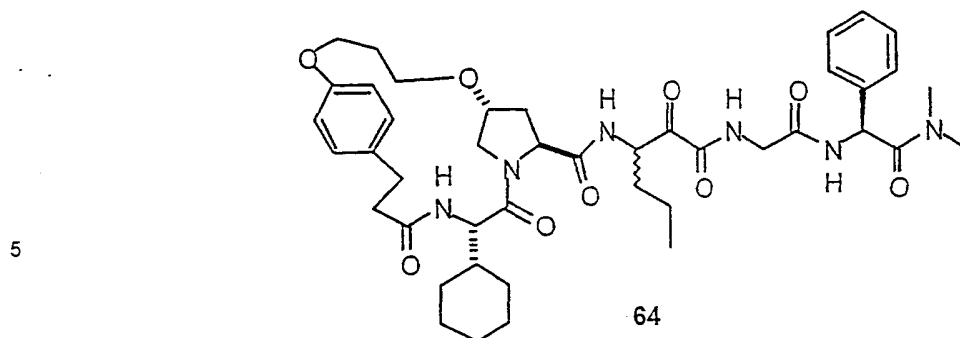
extrahována vodným HCl (1M, 100 ml), vodným NaOH (2M 100), roztokem soli, sušena (Na₂SO₄) a zakoncentrován ve vakuu. Zbytek **63d** (72 mg) byl oxidován bez dalšího čištění.

5 Krok E

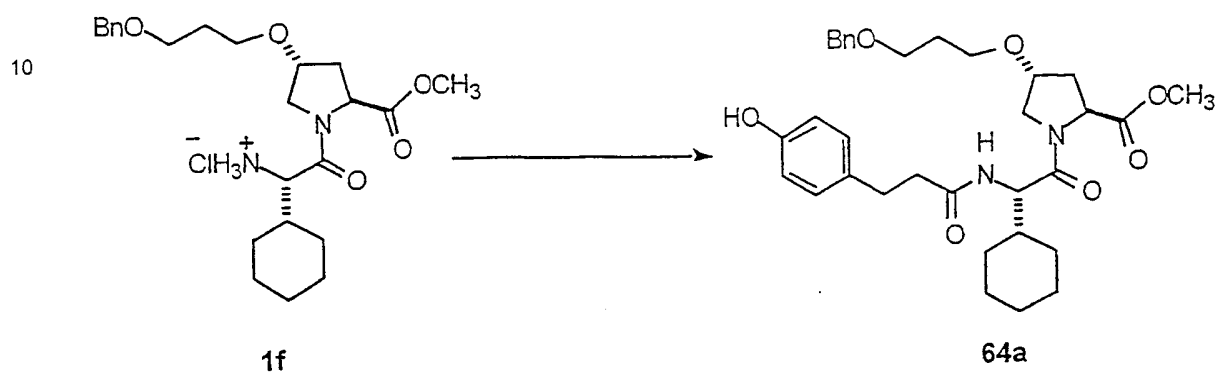


20 Roztok alkoholu **63d** (72 mg, 0,86 μmol) v CH₂Cl₂ (5,0 ml) byl smísen s Dess-Martinovým činidlem (125 mg, 0,28 mmol, 3,2 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě laboratoře 3 hod a byla zakoncentrována ve vakuu a zbytek byl čištěn chromatografií (SiO₂, CH₃OH/CH₂Cl₂ 1 : 19) za získání ketoamidu **63** (11 mg, 15 %) jako bezbarvé pevné látky; MS (FAB): 835 ([M+1]⁺, 90), 490 (100).

Příklad 64: Příprava sloučeniny 64

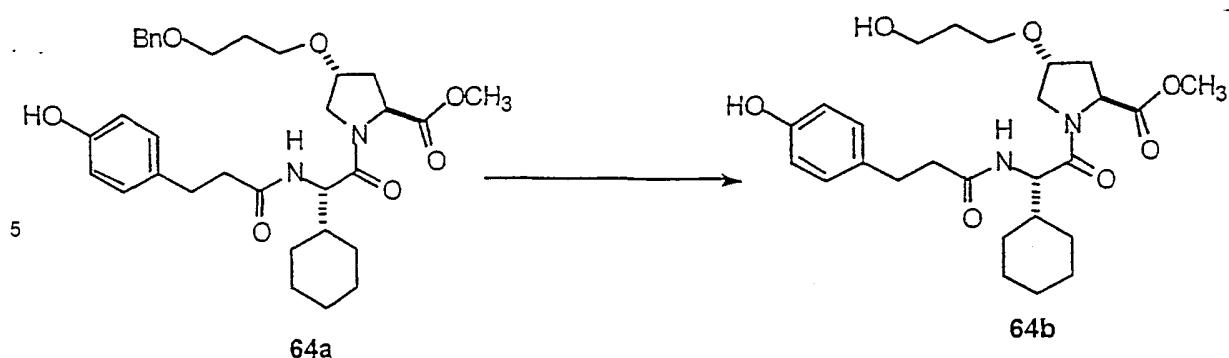


Krok A



15 Požadovaný produkt **64a** byl získán způsobem popsáním pro
příklad 1, krok F. Materiál byl čištěn bleskovou chromatografií na
koloně s použitím směsi EtOAc/hex (7 : 3), za získání **64a** v 80 %;
 ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 7,35 - 7,29 (m, 5H), 7,02 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz), 6,72
(d, 2H, $J = 6,9$ Hz) 6,01 (d, 1H), 4,60 (t, 1H), 4,52 (s, 1H), 3,8 - 3,61
20 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,54 - 3,51 (m, 4H), 2,83 (t, 2 H, $J = 7,5$ Hz),
2,39 (t, 2H, $J = 8,1$ Hz) 2,41 - 2,20 (m, 1H), 2,05 - 1,83 (m, 1H), 1,85 -
1,58 (m, 8H), 1,26 - 1,24 (m, 5H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 172,2, 171,9,
171,0, 154,4, 138,3, 132,2, 129,4, 128,4, 127,7, 127,6, 115,4, 73,0,
66,9, 66,2, 57,9, 54,9, 52,5, 52,3, 41,0, 38,5, 34,7, 30,8, 30,0, 29,4,
25 27,9, 26,1, 26,0, 25,9.

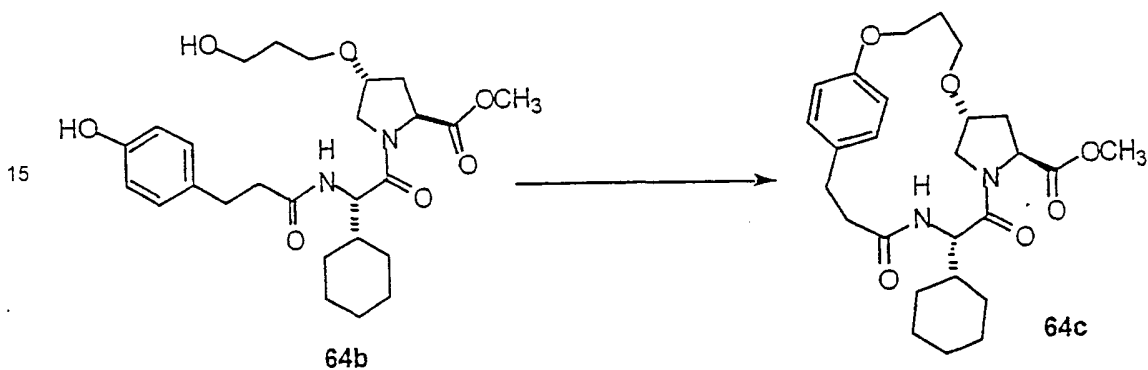
Krok B



Požadovaný produkt **64b** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok G. Produkt získaný po odfiltrování katalyzátoru byl dostatečně čistý pro další krok.

10

Krok C

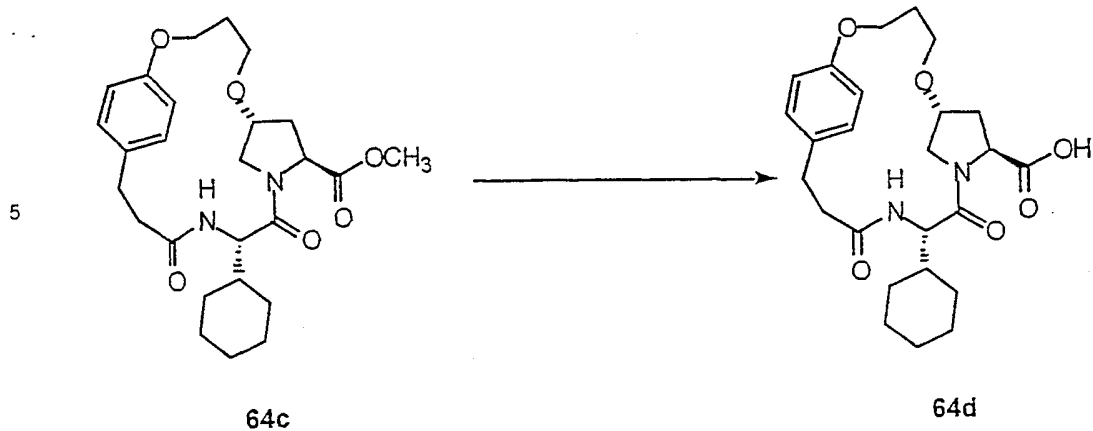


Požadovaný produkt **64c** byl získán způsobem popsaným pro příklad 1, krok H. Surová reakční směs byla čištěna gelovou chromatografií na SiO₂ (aceton/hexany 3 : 7) za získání **64c** (64 mg, 16 %) jako bezbarvé pevné látky; ¹³C NMR (CDCl₃) 172,1, 171,1, 171,0, 157,7, 131,0 129,9, 114,3, 78,1, 64,7, 63,3, 58,7, 55,3, 52,2, 52,0, 42,1, 37,9, 36,1, 30,8, 30,7, 29,7, 28,7, 28,5, 26,2, 26,0; MS (FAB) 473 (M+1)⁺, (100), 327 (20).

20

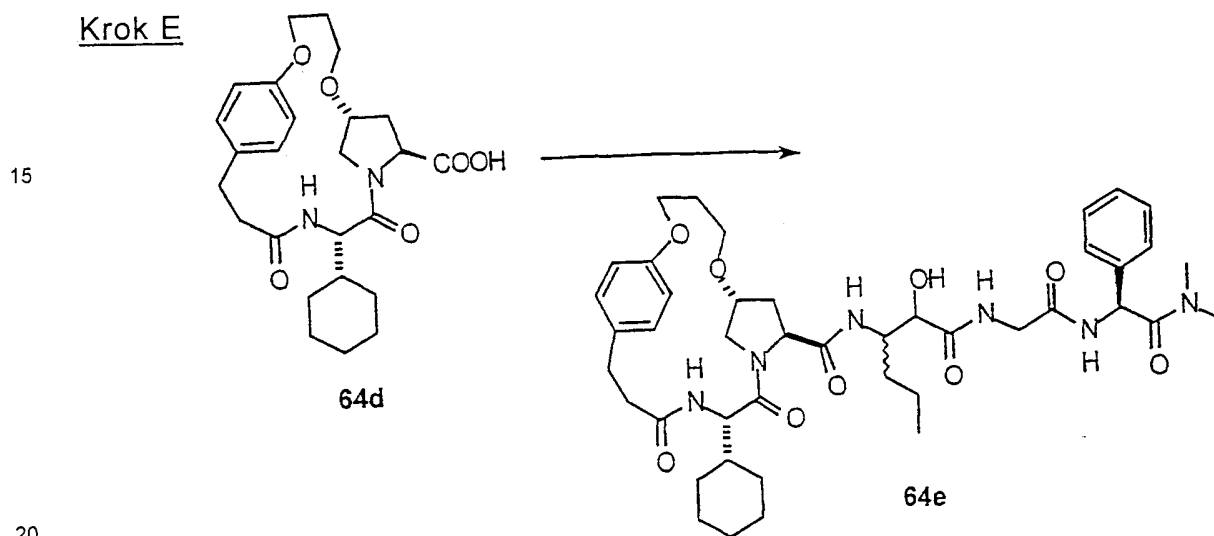
25

Krok D



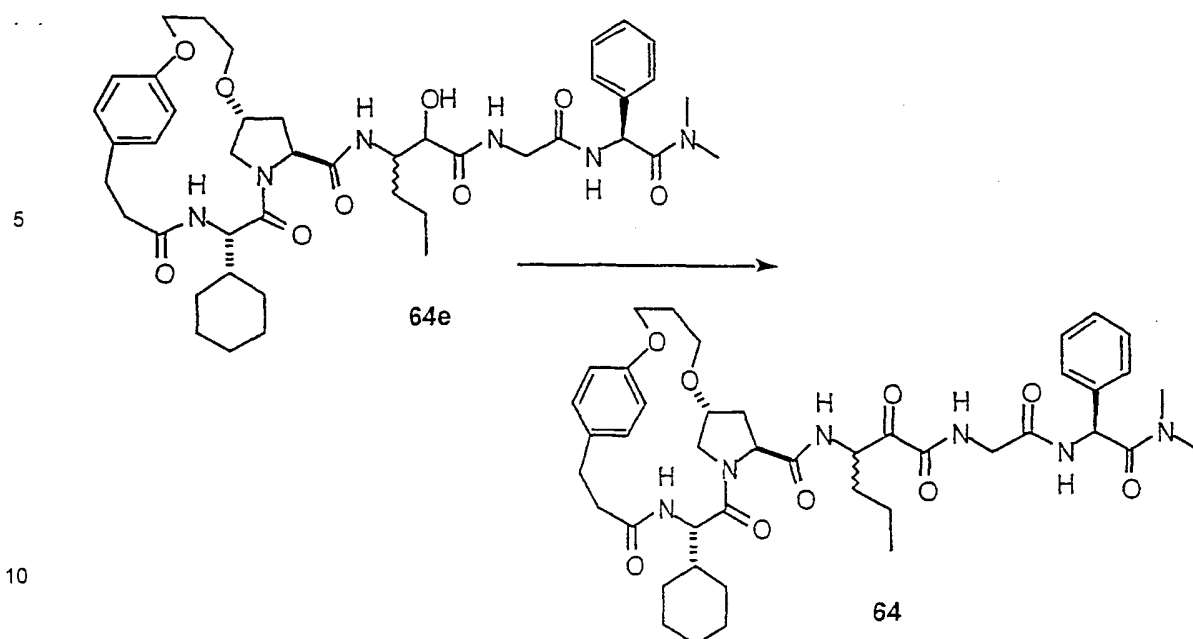
10 Kyselina byla syntetizována jak je popsáno pro příklad 1, krok I v kvantitativním výtěžku. Surová směs byla po odpaření ihned použita v dalším kroku.

Krok E



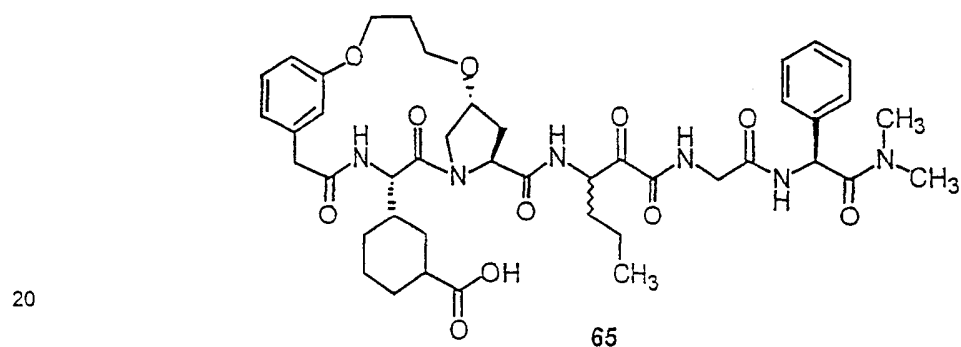
Očekávaný produkt **64e** byl syntetizován jak bylo uvedeno výše pro příklad 1, krok J. Reakční materiál byl ihned použit v dalším kroku pro syntézu **64**.

Krok F



Požadovaný produkt se získá protokolem oxidace popsaným výše pro příklad 1, krok K.

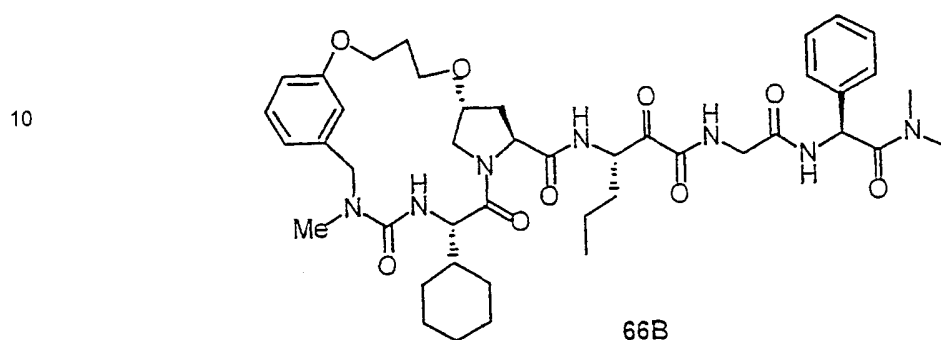
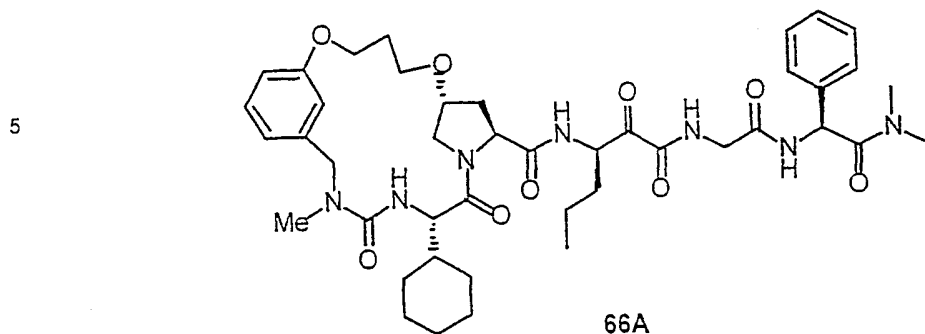
15 Příklad 65: Příprava sloučeniny 65



Syntéza z příkladu 65 byla identická se syntézou z příkladu 14, kromě zahájení syntézy kyselinou 3-vinylbenzoovou. Redukce fenylové skupiny byla podobná jako v příkladu 14, krok C. Byla však získána směs diastereomerů.

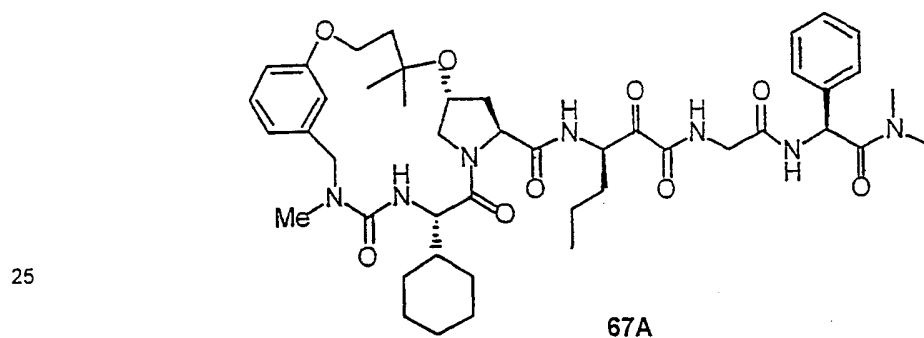
25

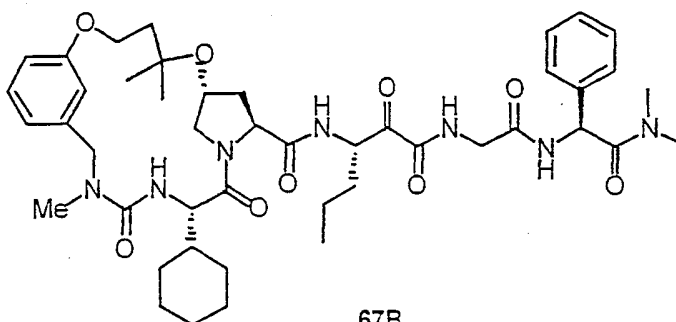
Příklad 66: Příprava sloučenin vzorců 66A a 66B



15 Pořadí syntetických kroků pro příklad 66 bylo stejné jak bylo popsáno pro příklad 54 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Isomery 66A a 66B byly odděleny po oxidaci chromatografií na koloně. LCMS data: 818,2 (M+H)⁺ (pro 66A a 66B).

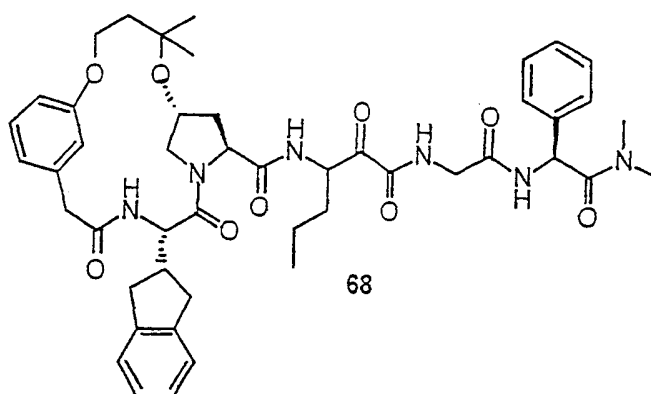
20 **Příklad 67: Příprava sloučenin vzorců 67A a 67B**





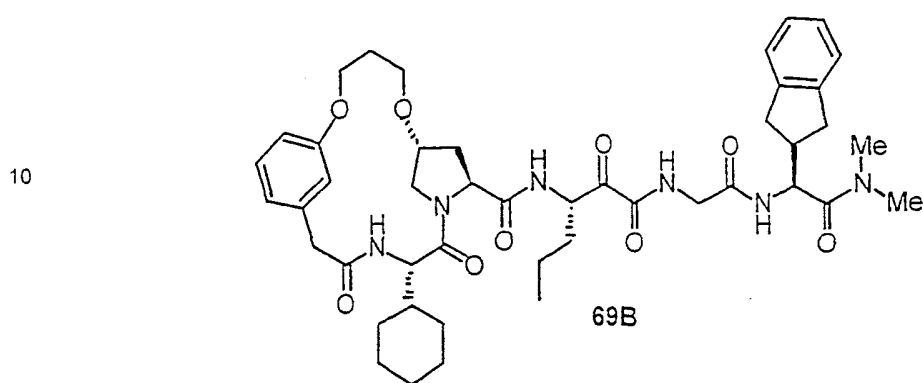
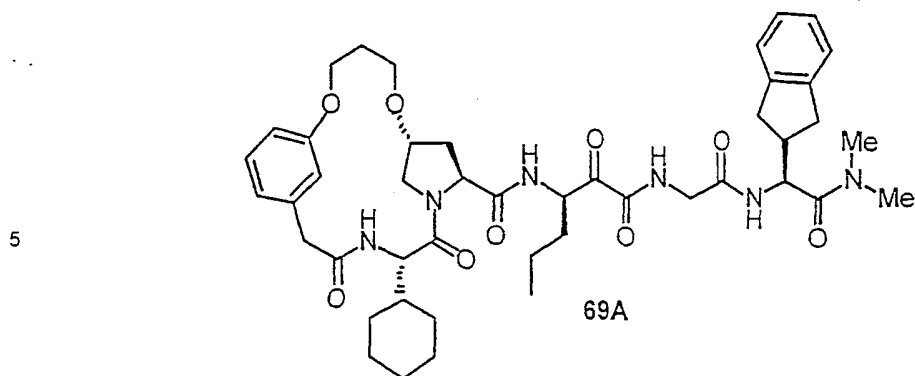
V příkladu 67 byl použit stejný postup syntézy jako bylo popsáno pro příklad 54 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Isomery **67A** a **67B** byly odděleny po oxidaci použitím chromatografie na koloně. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{45}H_{64}N_7O_9$: 846,4766 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 846,4782 (pro **67A**) a 846,4774 (pro **67B**).

Příklad 68: Příprava sloučeniny vzorce 68



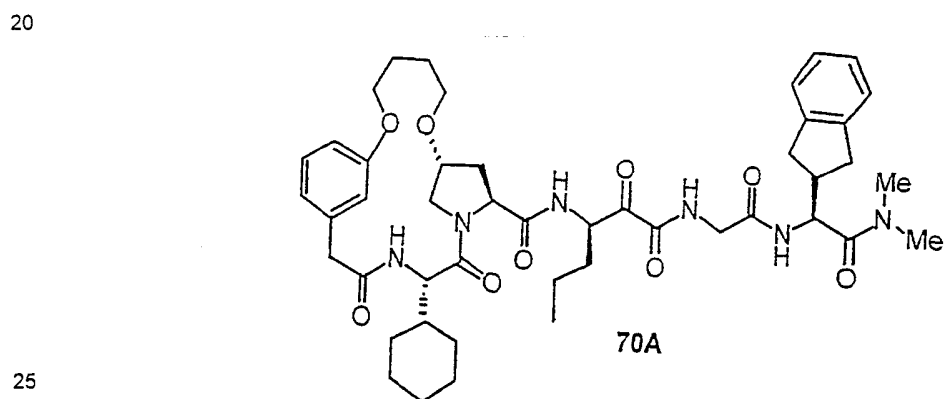
Postup syntézy pro příklad 68 byl stejný jako bylo popsáno pro příklad 30 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Po oxidaci byl požadovaný produkt **68** získán jako směs isomerů použitím chromatografie na koloně. HRMS (FAB) Vypočteno pro $C_{47}H_{59}N_6O_9$: 851,4344 ($M+H$)⁺. Nalezeno: 851,4149.

Příklad 69: Příprava sloučenin vzorce 69A a 69B

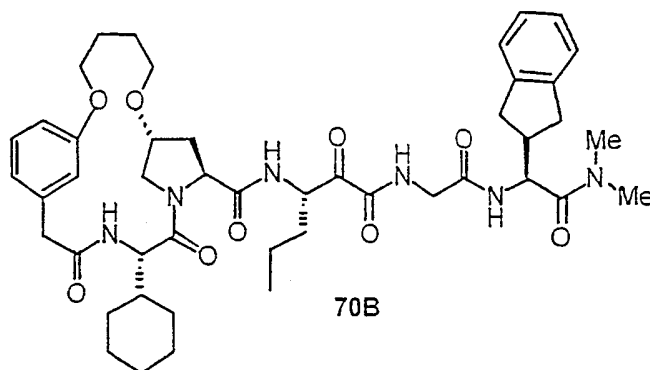


Postup syntézy použitý pro příklad 69 byl stejný jako pro příklad
 15 **1** s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů.
 Po oxidaci byly isomery **69A** a **69B** odděleny použitím chromatografie
 na koloně. LCMS data: 829,2 (M+H)⁺ (pro **69A** a **69B**).

Příklad 70: Příprava sloučenin vzorce 70A a 70B



5

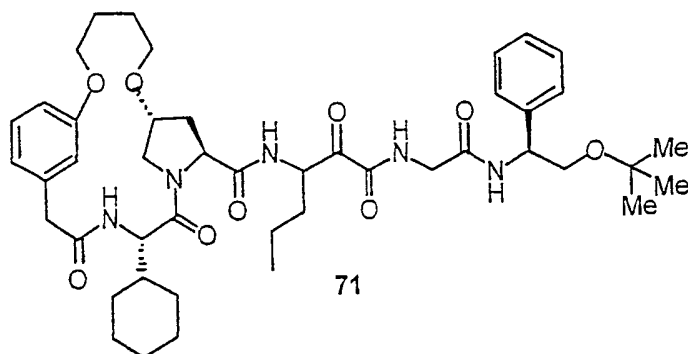


Postup syntézy v příkladu 70 byl stejný jako v příkladu 4 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Po oxidaci byly isomery **70A** a **70B** odděleny použitím chromatografie na koloně. LCMS data: 843,2 (M+H)⁺ (pro **70A** a **70B**).

10

Příklad 71: Příprava sloučeniny vzorce 71

15

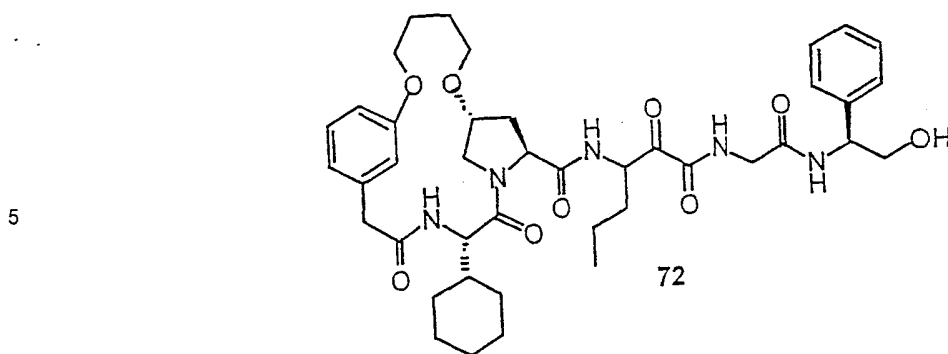


20

Postup syntézy v příkladu 71 byl stejný jako bylo popsáno pro příklad 5 použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Po oxidaci byl požadovaný produkt **71** získán jako směs isomerů použitím chromatografie na koloně. LCMS data: 818,2 (M+H)⁺.

25

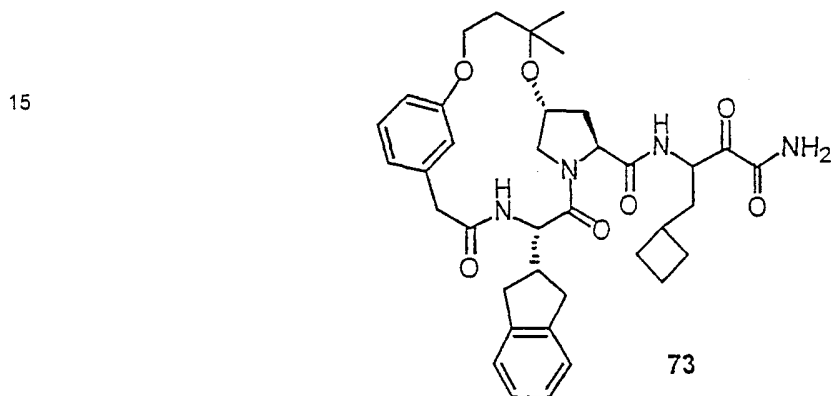
Příklad 72: Příprava sloučeniny vzorce 72



Postup syntézy v příkladu 72 byl stejný jako pro příklad 6 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Po oxidaci byl požadovaný produkt 72 získán jako směs isomerů s použitím chromatografie na koloně. LCMS data: 762,2 (M+H)⁺.

10

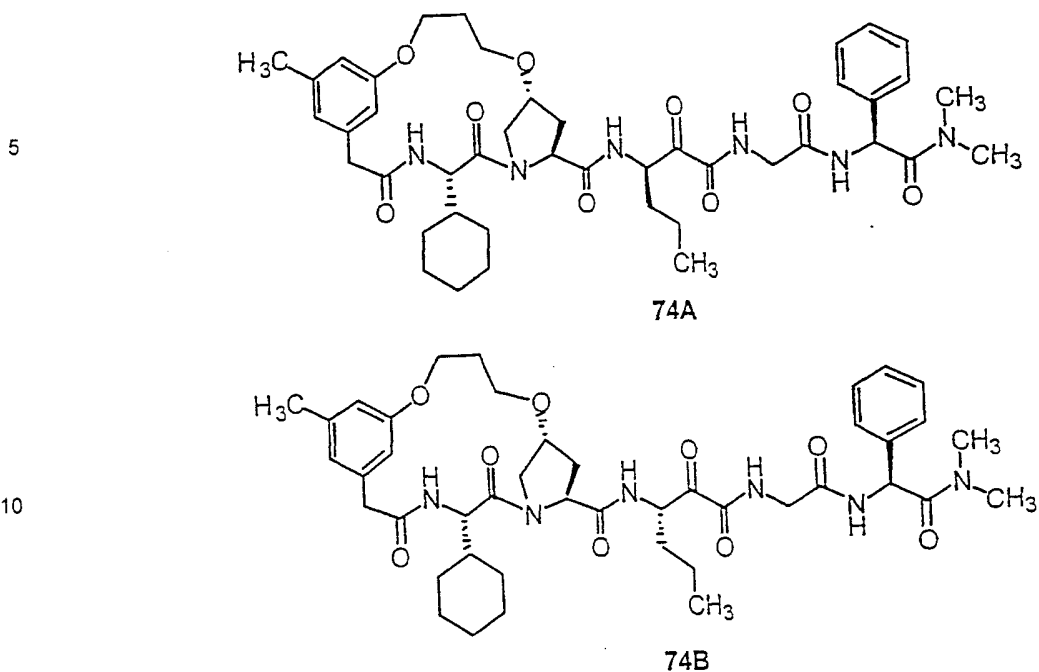
Příklad 73: Příprava sloučeniny vzorce 73



Postup syntézy použitý pro příklad 73 byl stejný jako pro příklad 10 s použitím vhodných příslušně modifikovaných výchozích materiálů. Po oxidaci byl požadovaný produkt 73 získán jako směs isomerů s použitím chromatografie na koloně. LCMS data: 659,2 (M+H)⁺.

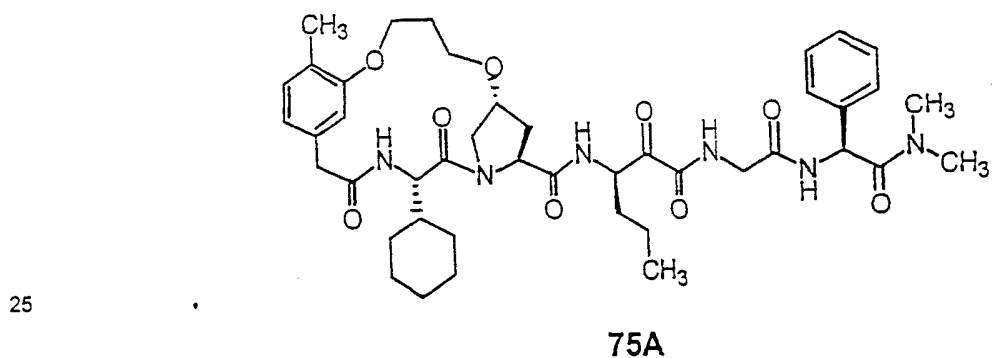
20

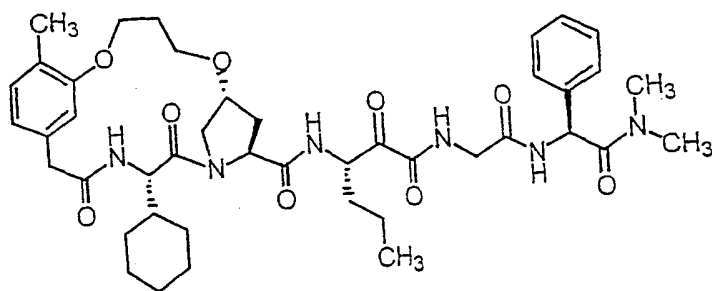
Příklad 74: Příprava sloučenin 74A a 74B



Požadované sloučeniny **74A** a **74B** byly připraveny stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučenin **1A** a **1B** v příkladu 1, s tím rozdílem, že kyselina 5-methyl-3-hydroxyfenyloctová byla použita jako náhrada kyseliny 3-hydroxyfenyloctové v kroku F. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 803,1 [vypočteno pro C₄₃H₅₈N₆O₉, 802,4].

Příklad 75: Příprava sloučenin 75A a 75B

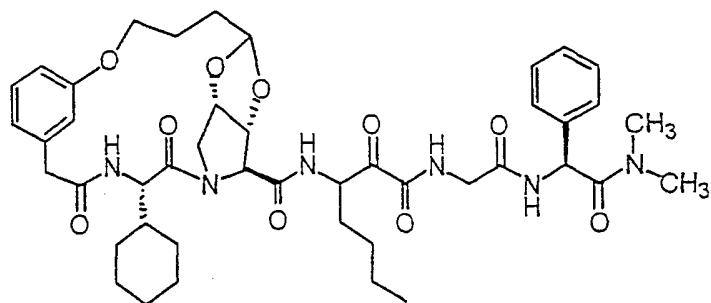




75B

Požadované sloučeniny **75A** a **75B** byly připraveny stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučenin **1A** a **1B** v příkladu 1, s tím rozdílem, že kyselina 4-methyl-3-hydroxyfenyloctová byla použita jako náhrada kyseliny 3-hydroxyfenyloctové v kroku F. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 803,1 [vypočteno pro C₄₃H₅₈N₆O₉, 802,4].

Příklad 76: Příprava sloučeniny 76

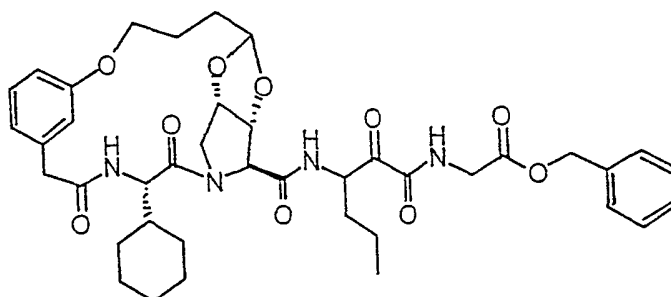


76

Požadovaná sloučenina **76** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučenin **27A** a **27B** v příkladu 27, s tím rozdílem, že amin **E** byl použit jako náhrada aminu **A** v kroku J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 831,1 [vypočteno pro C₄₄H₅₈N₆O₁₀, 830,4].

Příklad 77: Příprava sloučeniny 77

5

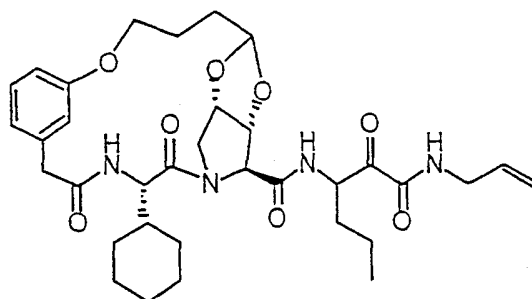


77

Požadovaná sloučenina **77** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučenin **27A** a **27B** v příkladu 27, s tím rozdílem, že pro náhradu aminu **A** v kroku J byl použit odlišný aminový meziprodukt. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 761,1 [vypočteno pro C₄₁H₅₂N₄O₁₀, 760,4].

15

Příklad 78: Příprava sloučeniny 78



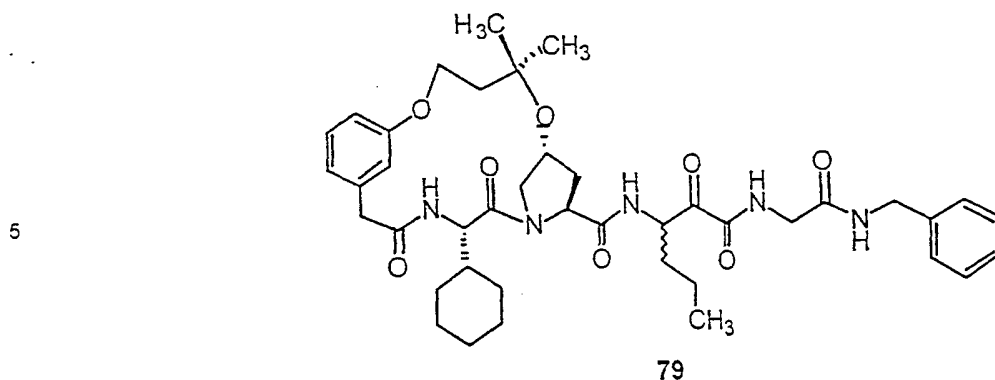
78

20

Požadovaná sloučenina **78** byla připravena stejným způsobem jak je popsáno v přípravě sloučenin **27A** a **27B** v příkladu 27, s tím rozdílem, že pro substituci aminu **A** v kroku J byl použit odlišný aminový meziprodukt. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 653,1 [vypočteno pro C₃₅H₄₈N₄O₈, 652,4].

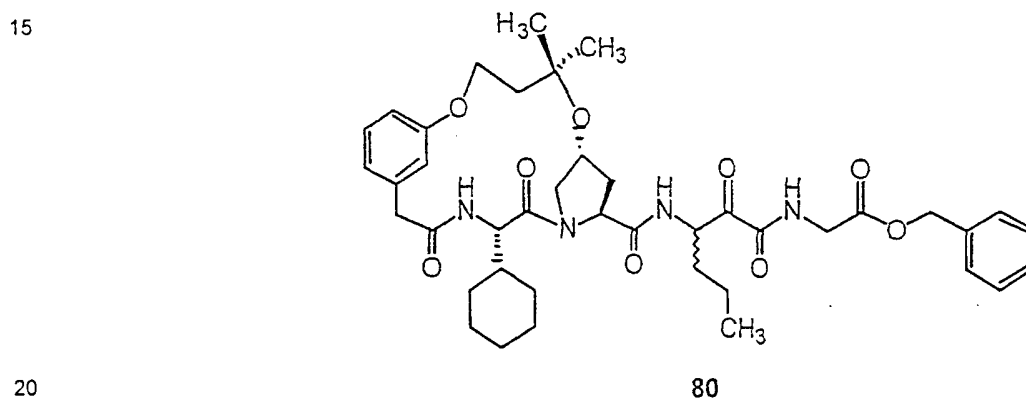
25

Příklad 79: Příprava sloučeniny 79



Požadovaná sloučenina 79 byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučeniny 30 v příkladu 30, s tím
 10 rozdílem, že pro substituci aminu A v kroku I byl použit odlišný aminový meziprodukt. LRMS (M+H)⁺ m/z 746,1 [vypočteno pro C₄₁H₅₅N₅O₈, 745,4].

Příklad 80: Příprava sloučeniny 80



Požadovaná sloučenina 80 byla připravena stejným způsobem jak je popsáno v přípravě sloučeniny 30 v příkladu 30, s tím, že amin D byl použit jako náhrada aminu A v kroku I. LRMS (M+H)⁺ m/z 746,1 [vypočteno pro C₄₁H₅₅N₅O₈, 745,4].

Příklad 81: Příprava sloučeniny 81



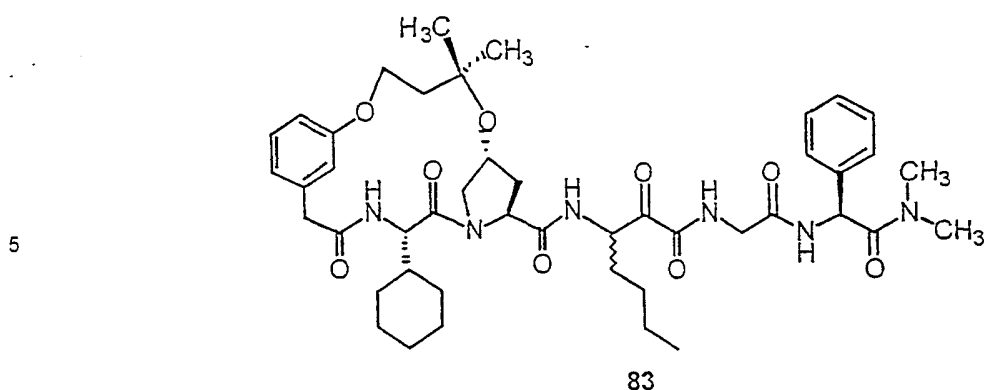
10

Příklad 82: Příprava sloučeniny 82



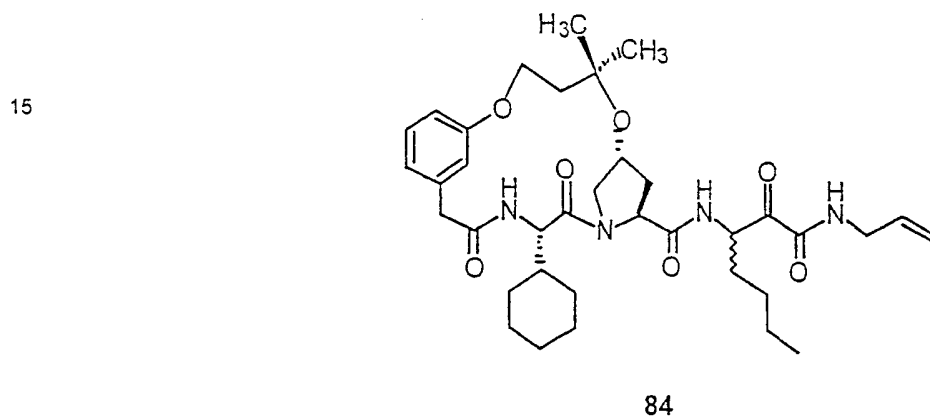
20

Příklad 83: Příprava sloučeniny **83**



Požadovaná sloučenina **83** byla připravena stejným způsobem
jak byl popsán v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem,
10 že amin **E** byl použit namísto aminu **A** v kroku I. LRMS (M+H)⁺ m/z
831,1 [vypočteno pro C₄₅H₅₂N₆O₉, 830,5].

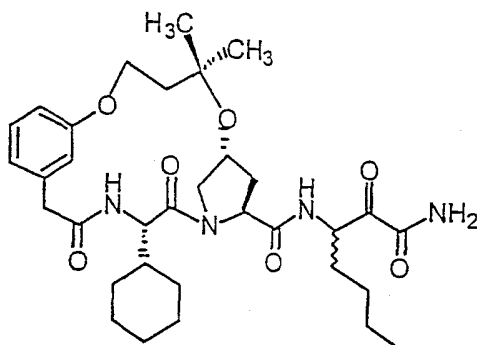
Příklad 84: Příprava sloučeniny **84**



20 Požadovaná sloučenina **84** byla připravena stejným způsobem
jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem,
že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS
(M+H)⁺ m/z 653,1 [vypočteno pro C₃₆H₅₂N₄O₇, 652,4].

Příklad 85: Příprava sloučeniny **85**

5



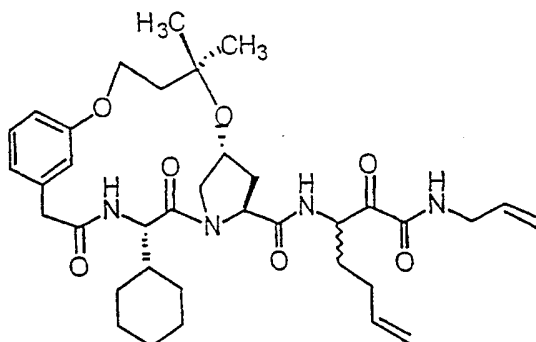
85

Požadovaná sloučenina **85** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin a oxidace byla prováděna postupem popsáným v příkladu **10**, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 613,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₈N₄O₇, 612,4].

10

Příklad 86: Příprava sloučeniny **86**

15



86

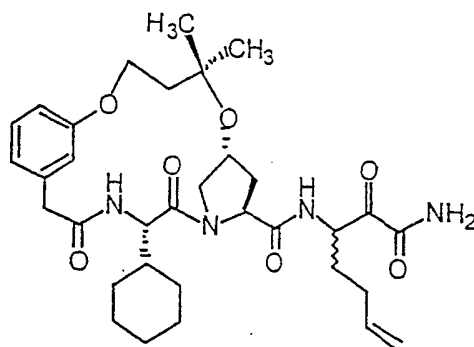
20

Požadovaná sloučenina **86** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 651,1 [vypočteno pro C₃₆H₅₀N₄O₇, 650,4].

25

Příklad 87: Příprava sloučeniny 87

5



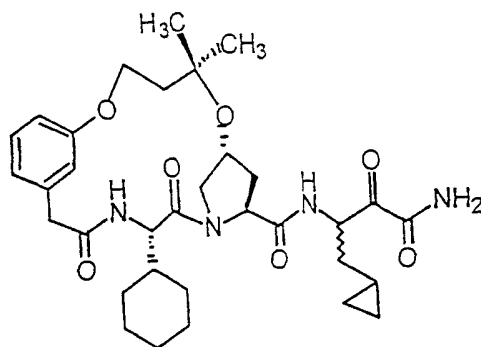
87

Požadovaná sloučenina **87** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin, a že oxidace byla prováděna postupem popsáným v příkladu **10**, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 611,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₆N₄O₇, 610,3].

10

Příklad 88: Příprava sloučeniny 88

15



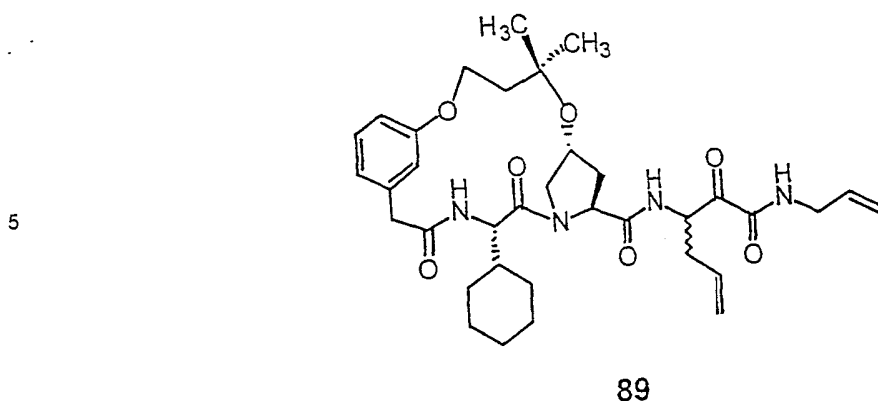
88

20

Požadovaná sloučenina **88** byla připravena stejným způsobem jak je popsáno v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin, a že oxidace byla prováděna postupem popsáným v příkladu **10**, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 611,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₆N₄O₇, 610,3].

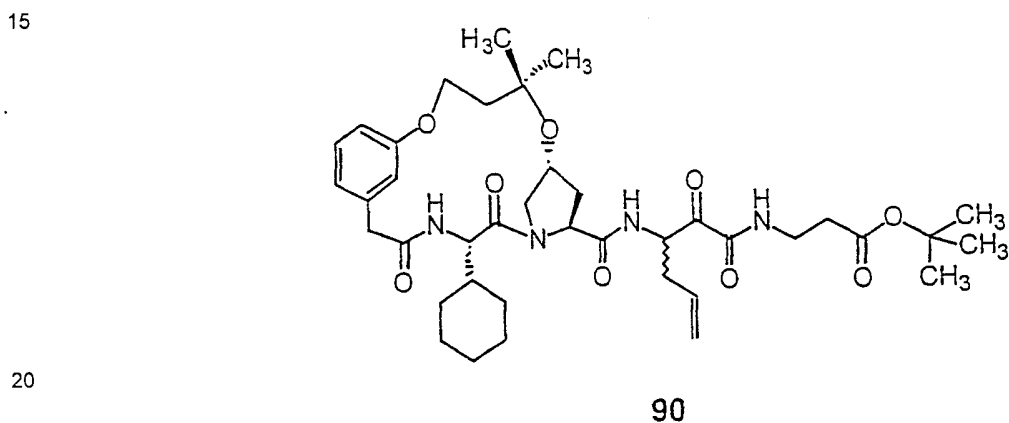
25

Příklad 89: Příprava sloučeniny 89



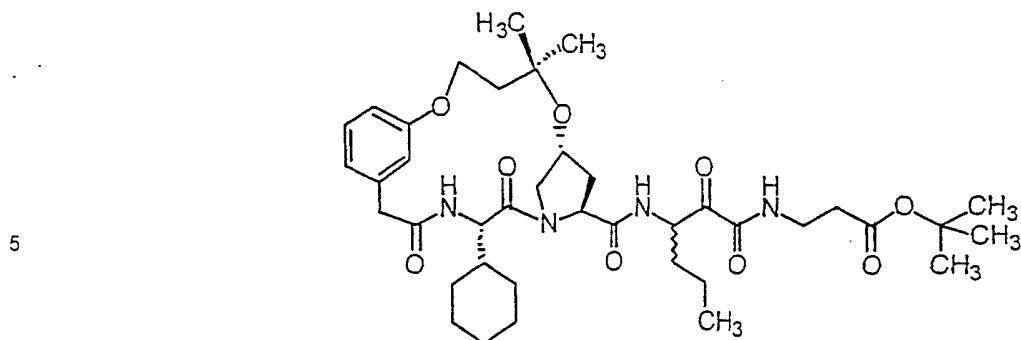
Požadovaná sloučenina **88** byla připravena stejným způsobem
 10 jak je popsáno v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s tím rozdílem,
 že namísto aminu **A** v kroku 1 byl použit odpovídající amin. LRMS
 (M+H)⁺ *m/z* 637,1 [vypočteno pro C₃₅H₄₈N₄O₇, 636,4].

Příklad 90: Příprava sloučeniny 90



Požadovaná sloučenina **90** byla připravena stejným způsobem
 jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s tím rozdílem,
 že namísto aminu **A** v kroku 1 byl použit odpovídající amin. LRMS
 25 (M+H)⁺ *m/z* 725,1 [vypočteno pro C₃₉H₅₆N₄O₉, 724,4].

Příklad 91: Příprava sloučeniny 91

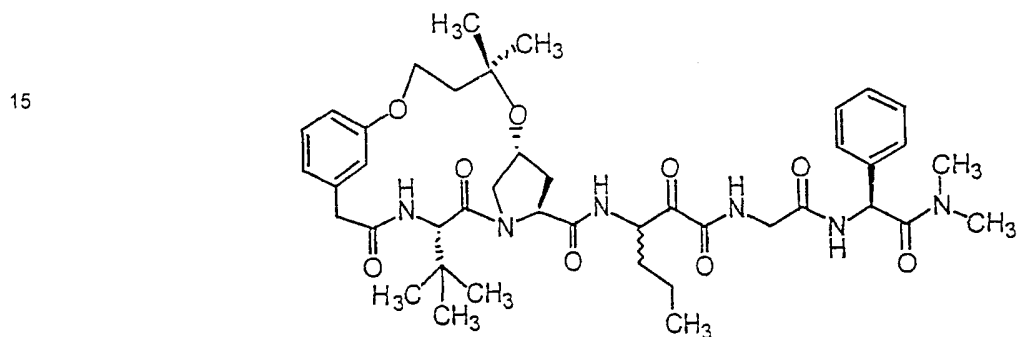


91

Požadovaná sloučenina **91** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 727,1 [vypočteno pro C₃₉H₅₈N₄O₉, 726,4].

10

Příklad 92: Příprava sloučeniny 92



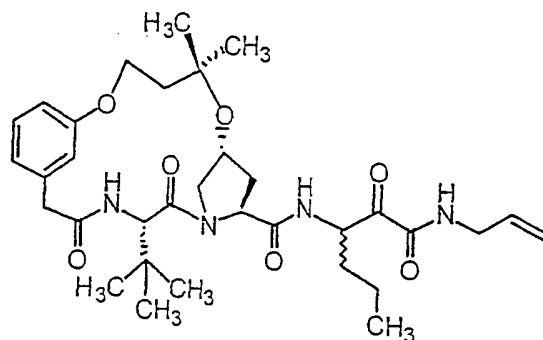
92

Požadovaná sloučenina **92** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že Boc-*tert*-butylglycin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku C. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 791,1 [vypočteno pro C₄₂H₅₈N₆O₉, 790,4].

20

Příklad 93: Příprava sloučeniny 93

5



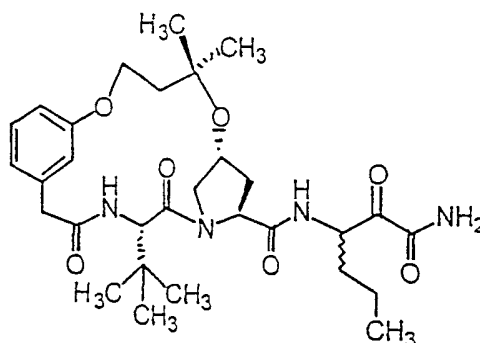
93

Požadovaná sloučenina **93** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **92** v příkladu 92 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 613,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₈N₄O₇, 612,4].

10

Příklad 94: Příprava sloučeniny 94

15



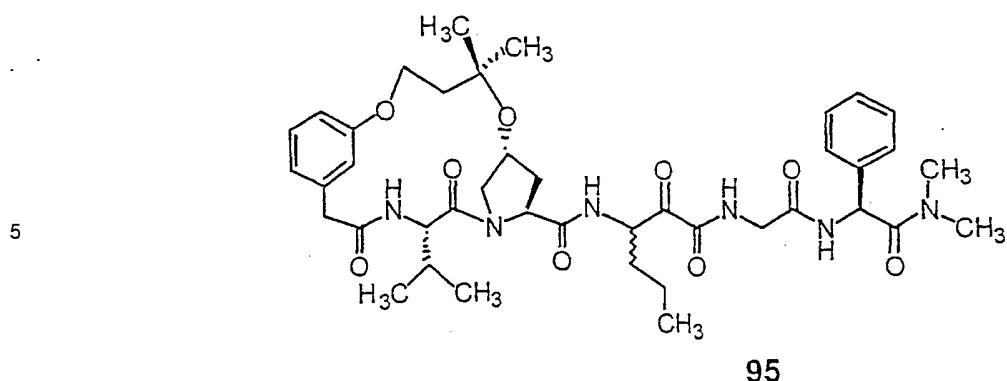
94

Požadovaná sloučenina **94** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **92** v příkladu 92 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin, a že oxidace byla prováděna postupem popsáním v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 573,1 [vypočteno pro C₃₀H₄₄N₄O₇, 572,3].

20

25

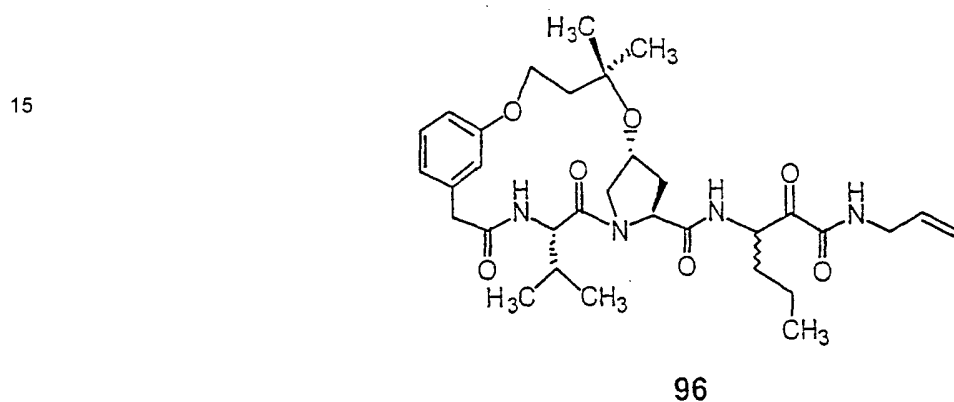
Příklad 95: Příprava sloučeniny 95



Požadovaná sloučenina **95** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že Boc-valin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku C. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 777,1 [vypočteno pro C₄₁H₅₆N₆O₉, 776,4].

10

Příklad 96: Příprava sloučeniny 96

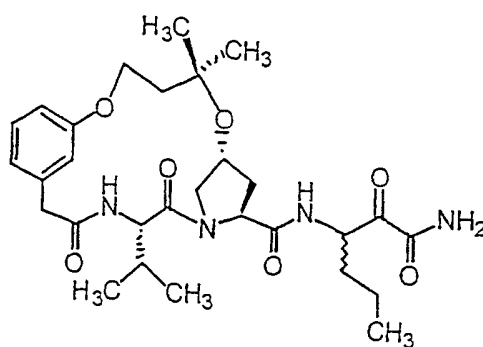


Požadovaná sloučenina **96** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **95** v příkladu 95 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 599,1 [vypočteno pro C₃₂H₄₆N₄O₇, 598,3].

20

Příklad 97: Příprava sloučeniny 97

5

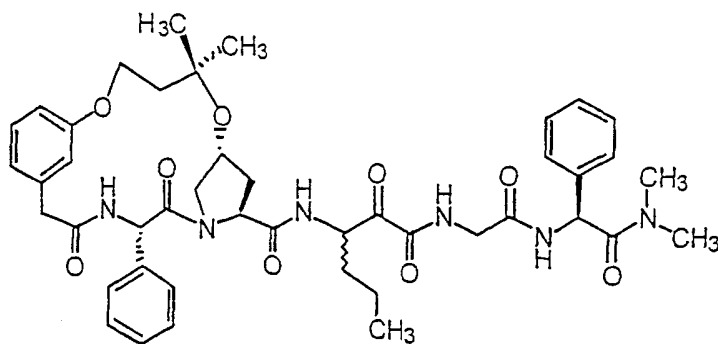


97

Požadovaná sloučenina 97 byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny 95 v příkladu 95 s tím rozdílem, že namísto aminu A byl použit odpovídající amin a že oxidace byla prováděna postupem popsaným v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 559,1 [vypočteno pro C₂₉H₄₂N₄O₇, 558,3].

15

Příklad 98: Příprava sloučeniny 98



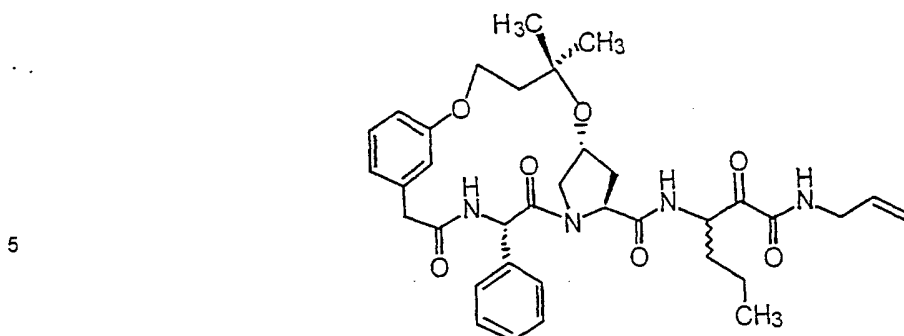
98

20

Požadovaná sloučenina 98 byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny 30 v příkladu 30, s tím rozdílem, že Boc-fenylglycin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku C. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 811,1 [vypočteno pro C₄₄H₅₄N₆O₉, 810,4].

25

Příklad 99: Příprava sloučeniny 99

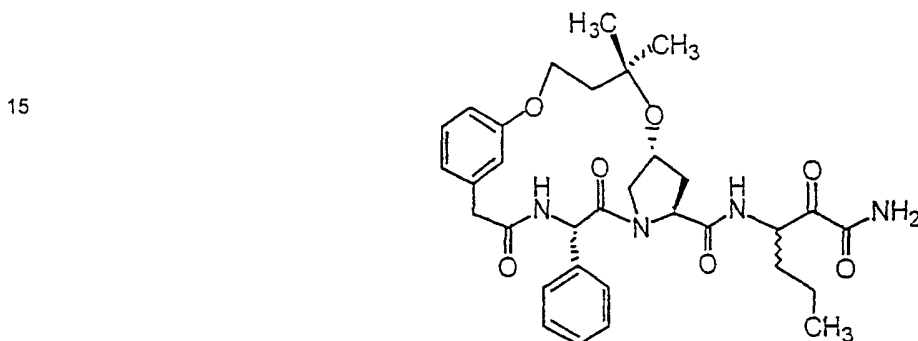


99

Požadovaná sloučenina **99** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **98** v příkladu 98 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 633,1 [vypočteno pro C₃₅H₄₄N₄O₇, 632,3].

10

Příklad 100: Příprava sloučeniny 100

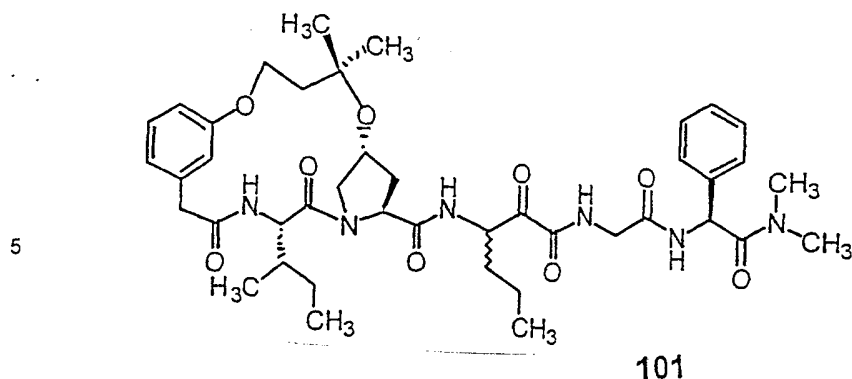


100

Požadovaná sloučenina **100** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **98** v příkladu 98 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin, a že oxidace byla prováděna postupem popsáným v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 593,1 [vypočteno pro C₃₅H₄₀N₄O₇, 592,3].

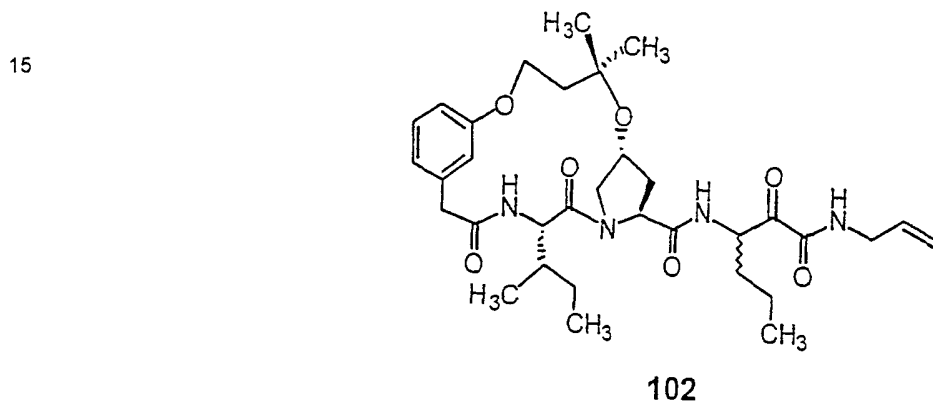
20

Příklad 101: Příprava sloučeniny **101**



Požadovaná sloučenina **101** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že Boc-isoleucin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku C.
 10 LRMS (M+H)⁺ *m/z* 791,1 [vypočteno pro C₄₂H₅₆N₆O₉, 790,4].

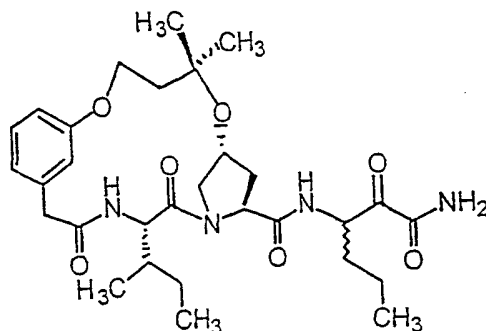
Příklad 102: Příprava sloučeniny **102**



Požadovaná sloučenina **102** byla připravena stejným způsobem jako v přípravě sloučeniny **101** v příkladu 101 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit příslušný amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 613,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₈N₄O₇, 612,4].

Příklad 103: Příprava sloučeniny 103

5



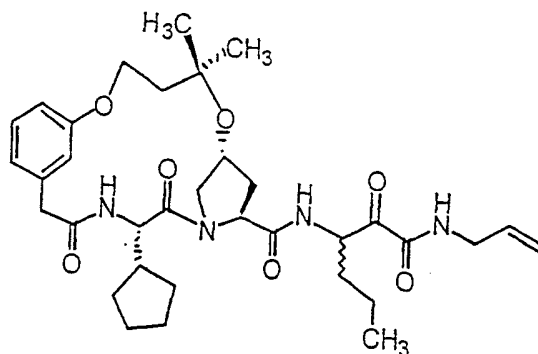
103

Požadovaná sloučenina **103** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **101** v příkladu 101 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit příslušný amin a oxidace byla provedena postupem popsáným v příkladu **10**, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 573,1 [vypočteno pro C₃₀H₄₄N₄O₇, 572,3].

10

Příklad 104: Příprava sloučeniny 104

15



104

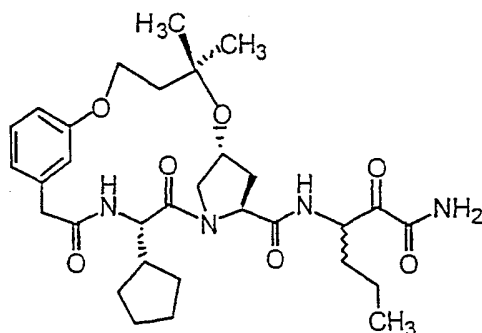
20

Požadovaná sloučenina **104** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30, s tím rozdílem, že Boc-cyklopentylglycin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku C, a že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 625,1 [vypočteno pro C₃₄H₄₈N₄O₇, 624,4].

25

Příklad 105: Příprava sloučeniny 105

5

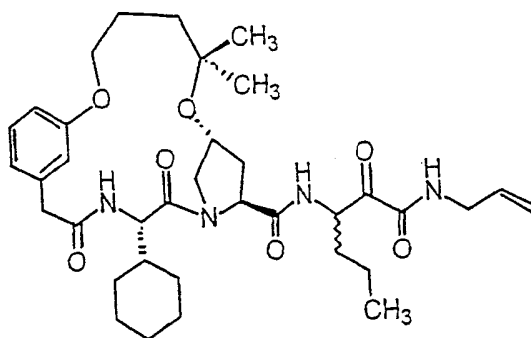


105

Požadovaná sloučenina **105** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **104** v příkladu 104 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** byl použit odpovídající amin a oxidace byla provedena postupem popsaným v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 585,1 [vypočteno pro C₃₁H₄₄N₄O₇, 584,3].

15

Příklad 106: Příprava sloučeniny 106



106

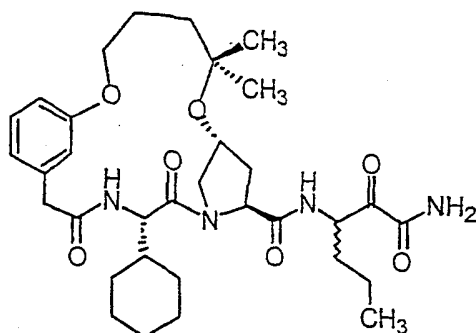
20

Požadovaná sloučenina **106** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučeniny **30** v příkladu 30 s následujícími rozdíly: (a) 5-benzyloxy-2-methyl-1-penten byl použit namísto 4-benzyloxy-2-methyl-1-butenu v kroku A; (b) namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 653,1 [vypočteno pro C₃₆H₅₂N₄O₇, 652,4].

25

Příklad 107: Příprava sloučeniny 107

5

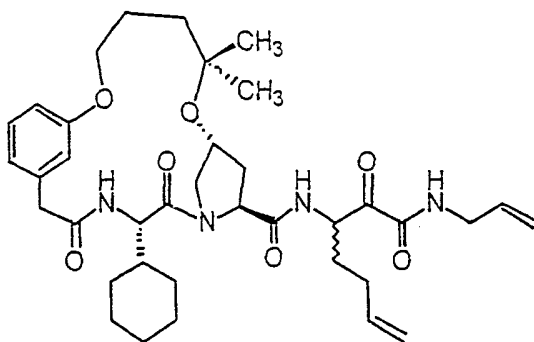


107

Požadovaná sloučenina **107** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučeniny **106** v příkladu 106 s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin a oxidace byla prováděna způsobem popsaným v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 613,1 [vypočteno pro C₃₃H₄₈N₄O₇, 612,4].

15

Příklad 108: Příprava sloučeniny 108



20

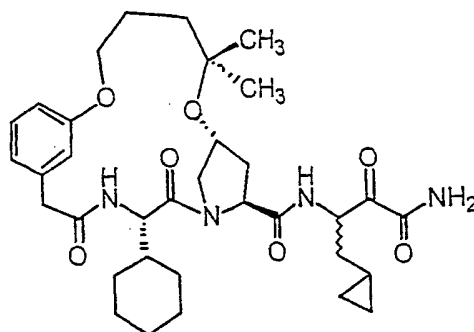
108

Požadovaná sloučenina **108** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučeniny **106** v příkladu 106, s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 665,1 [vypočteno pro C₃₇H₅₂N₄O₇, 664,4].

25

Příklad 109: Příprava sloučeniny 109

5

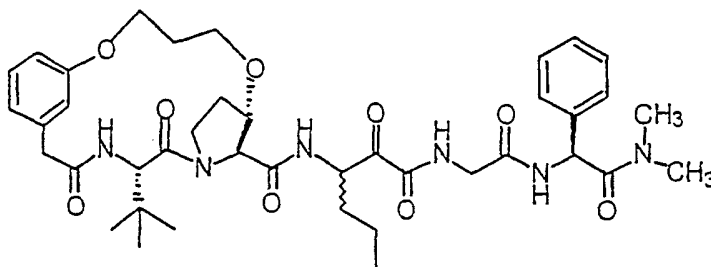


109

Požadovaná sloučenina **109** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučeniny **106** v příkladu 106, s tím rozdílem, že namísto aminu **A** v kroku I byl použit odpovídající amin, a oxidace byla provedena postupem popsaným v příkladu 10, krok J. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 625,1 [vypočteno pro C₃₄H₄₈N₄O₇, 624,4].

Příklad 110: Příprava sloučeniny 110

15



110

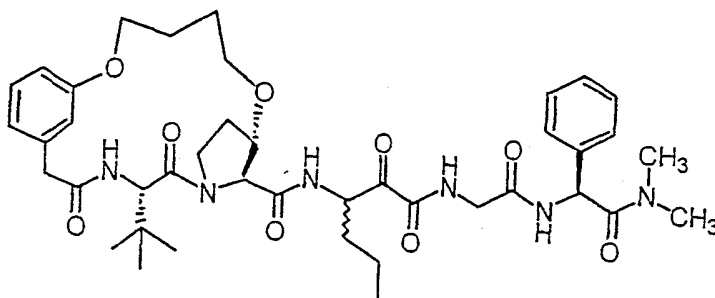
20

Požadovaná sloučenina **110** byla připravena stejným způsobem jak se popisuje v přípravě sloučenin **1A** a **1B**, příklad 1, s tím, že Boc-3-hydroxyprolin byl použit namísto prolinu **1a** v kroku A, a Boc-*tert*-butylglycin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku D. LRMS (M+H)⁺ *m/z* 763,1 [vypočteno pro C₄₀H₅₄N₆O₉, 762,4].

25

Příklad 111: Příprava sloučeniny 111

5

**111**

Požadovaná sloučenina **111** byla připravena stejným způsobem jak bylo popsáno v přípravě sloučenin **4A** a **4B** v příkladu 4, s tím, že
 10 Boc-3-hydroxyprolin byl použit namísto prolinu **1a** v kroku A, a Boc-*tert*-butylglycin byl použit namísto Boc-cyklohexylglycinu v kroku D.
 LRMS (M+H)⁺ *m/z* 777,1 [vypočteno pro C₄₁H₅₆N₆O₉, 776,4].

Test na inhibiční aktivitu na proteázu HCV15 Spektrofotometrický test

Spektrofotometrické testy na serinovou proteázu HCV byly u sloučenin podle vynálezu prováděny postupem popsaným autory R. Zhang a další, *Analytical Biochemistry*, 270 (1999) 268 - 275, jehož obsah se zařazuje odkazem. Test je založen na proteolýze
 20 chromogenních esterových substrátů a je vhodný pro kontinuální monitorování aktivity proteázy NS3 HCV. Substráty byly odvozeny od místa P propojovací sekvence NS5A-NS5B (Ac-DTEDVVX(Nva), kde X = A nebo P), jehož C-koncové karboxylové skupiny byly esterifikovány
 25 jedním nebo čtyřmi různými chromoforními alkoholy (3- nebo 4-nitrofenol, 7-hydroxy-4-methylkumarin nebo 4-fenylazofenol). Dále jsou popsány syntéza, charakterizace a použití těchto nových spektrofotometrických esterových substrátů pro vysoce výkonný screening a podrobné kinetické vyhodnocení inhibitorů proteázy NS3 HCV.

Materiály a metody

Materiály: Chemická činidla potřebná pro pufrы používané při testu byla získána od firmy Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri). Reagencie pro syntézu peptidů byly od firmy Aldrich Chemicals, Novabiochem (San Diego, California), Applied Biosystems (Foster City, California) a Perseptive Biosystems (Framingham, Massachusetts). Peptidy byly syntetizovány manuálně nebo na automatizovaném syntezátoru ABI model 431A (firmy Applied Biosystems). Použitý UV/VIS Spectrometer model LAMBDA 12 byl od firmy Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut) a 96-jamkové destičky pro UV byly získány od firmy Corning (Corning, New York). Blok pro přehřívání byl od firmy USA Scientific (Ocala, Florida) a míchačka pro 96-jamkové destičky byla od firmy Labline Instruments (Melrose Park, Illinois). Čtečka mikrotitračních destiček Spectramax Plus microtiter plate reader s monochromátorem byla získána od firmy Molecular Devices (Sunnyvale, California).

Příprava enzymu: Rekombinantní heterodimerní proteáza HCV NS3/NS4A (kmen 1a) byla připravena postupem popsáným dříve (D. L. Sali a další, *Biochemistry*, 37 (1998) 3392 - 3401). Koncentrace proteinu byly zjišťovány metodou barvení Biorad s použitím standardů rekombinantní proteázy HCV, které byly předtím kvantifikovány analýzou aminokyselin. Před zahájením testu byl zaměněn pufr pro skladování enzymu (50 mM fosfát sodný pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0,05% laurylmaltosid a 10 mM DTT) za testovací pufr (25 mM MOPS pH 6,5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0,05% laurylmaltosid, 5 μM EDTA a 5 μM DTT) na hotové koloně Biorad Bio-Spin P-6 prepacked column.

Syntéza a čištění substrátu: Syntéza substrátu byla prováděna jak bylo uvedeno v R. Zhang a další (výše) a byla zahájena ukotvením Fmoc-Nva-OH na 2-chlortritylchloridovou pryskyřici použitím standardního protokolu (K. Barlos a další, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37

(1991), 513 - 520). Peptidy byly potom sestavovány použitím chemických reakcí Fmoc, buď manuálně nebo na automatickém syntezátoru peptidů ABI model 431. N-acetylované a úplně chráněné fragmenty peptidů byly od pryskyřice odštěpeny buď 10% kyselinou octovou (HOAc) a 10% trifluoroethanolem (TFE) v dichlormethanu (DCM) po dobu 30 min, nebo 2% kyselinou trifluoroctovou (TFA) v DCM po dobu 10 min. Spojený filtrát a promývací DCM byly azeotropně odpařeny (nebo opakovaně extrahovány vodným roztokem Na_2CO_3) pro odstranění kyseliny použité při odštěpování. Fáze DCM byla sušena nad Na_2SO_4 a odpařena.

Esterové substráty byly vytvářeny použitím standardních reakčních postupů kyselina-alkohol (K. Holmber a další, *Acta Chem. Scand.*, B33 (1979) 410 - 412). Peptidové fragmenty byly rozpuštěny v bezvodém pyridinu (30 až 60 mg/ml) a do roztoku bylo přidáno 10 molárních ekvivalentů chromoforu a katalytické množství (0,1 ekv.) kyseliny para-toluensulfonové (pTSA). Pro zahájení reakce byl přidán dicyklohexylkarbodiimid (DCC, 3 ekv.). Tvorba produktu byla monitorována HPLC a bylo zjištěno, že po 12 až 72 hod při teplotě laboratoře je reakce u konce. Pyridinové rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuu a dále odstraněno azeotropní destilací s toluenem. Peptidový ester byl zbaven ochranných skupin 95% TFA v DCM po dobu 2 hod a extrahován třikrát bezvodým ethyletherem pro odstranění přebytku chromoforu. Substrát bez ochranných skupin byl čištěn HPLC s reverzními fázemi na koloně C3 nebo C8 s gradientem 30 % až 60 % acetonitrilu (použitím šesti objemů kolony). Celkový výtěžek po čištění HPLC byl přibližně 20 až 30 %. Molekulová hmotnost byla potvrzena hmotnostní spektroskopií s elektrorozprašovací ionizací. Substráty byly uloženy v exikátoru ve formě suchého prášku.

Spektra substrátů a produktů: Spektra substrátů a odpovídajících chromoforních produktů byla získána v testovacím pufru pH 6,5. Extinkční koeficienty byly určovány při optimální vlnové délce mimo vrchol v kyvetách 1 cm (340 nm pro 3-Np a HMC, 370 nm

pro PAP a 400 nm pro 4-Np) použitím vícenásobného ředění. Optimální vlnová délka mimo vrchol byla definována jako vlnová délka, která poskytne maximální poměrný rozdíl v absorbanci mezi substrátem a produktem $(OD \text{ produktu} - OD \text{ substrátu})/OD \text{ substrátu}$.

- 5 Test na proteázu: Testy na proteázu HCV byly prováděny při 30 °C s použitím 200 μ l reakční směsi v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Podmínky testovacího pufru (25 mM MOPS pH 6,5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0,05% laurylmaltosid, 5 μ M EDTA a 5 μ M DTT) byly optimalizovány pro heterodimer NS3/NS4A (D. L. Sali a další,
- 10 výše)). Typicky bylo do jamek vloženo 150 μ l směsi pufru, substrátu a inhibitoru (konečná koncentrace DMSO 4 % obj./obj.) a směs byla ponechána předinkubovat při 30 °C po dobu přibližně 3 min. Potom bylo pro zahájení reakce použito 50 μ l předehřáté proteázy (12 nM, 30 °C) v testovacím pufru (konečný objem 200 μ l). Destičky byly
- 15 monitorovány po celou dobu testu (60 min) na změnu absorbance při příslušné vlnové délce (340 nm pro 3-Np a HMC, 370 nm pro PAP, a 400 nm pro 4-Np) s použitím čtecího zařízení pro mikrotitrační destičky Spectromax Plus vybaveného monochromátorem (přijatelné výsledky je možno získat s čtecími přístroji využívajícími spektrálních filtrů).
- 20 Proteolytické štěpení esterové vazby mezi Nva a chromoforem bylo monitorováno při vhodné vlnové délce proti blanku bez přidaného enzymu jako kontrole pro neenzymatickou hydrolýzu. Vyhodnocení kinetických parametrů substrátu bylo prováděno v třicetinásobném rozsahu koncentrace substrátu (~6 až 200 μ M). Počáteční rychlosti
- 25 byly zjišťovány metodou lineární regrese a kinetické konstanty byly získány proložením dat rovnicí Michaelise-Mentenové nelineární regresní analýzou (Mac Curve Fit 1,1, K. Raner). Číslo přeměny (k_{cat}) byla vypočtena za předpokladu úplné aktivity enzymu.

- Vyhodnocení inhibitorů a inaktivátorů: Inhibiční konstanty (K_i)
- 30 pro kompetitivní inhibitory Ac-D-(D-Gla)-L-I-(Cha)-C-OH (27), Ac-DTEDVVA (Nva)-OH a Ac-DTEDVVP(Nva)-OH byly zjišťovány experimentálně při pevných koncentracích enzymu a substrátu

vynesením poměru v_o/v_i proti koncentraci inhibitoru ($[I]_o$) podle přeuspořádané rovnice Michaelise-Mentenové pro kinetiku kompetitivní inhibice:

$$v_o/v_i = 1 + [I]_o/(K_i (1 + [S]_o/K_m)),$$

5 kde v_o je neinhibovaná počáteční rychlost, v_i je počáteční rychlost v přítomnosti inhibitoru při jakékoli dané koncentraci inhibitoru ($[I]_o$) a $[S]_o$ je použitá koncentrace substrátu. Získaná data byla proložena metodou lineární regrese a výsledná směrnice, $1/(K_i (1 + [S]_o/K_m))$ byla použita pro výpočet hodnoty K_i .

10 Získané hodnoty K_i pro různé makrocykly podle předkládaného vynálezu jsou uvedeny v tabulce 1 výše, kde sloučeniny byly uspořádány v pořadí rozmezí hodnot K_i . Z výsledků těchto testů by bylo odborníkovi v oboru zřejmé, že sloučeniny podle vynálezu mají vynikající použitelnost jako inhibitory serinové proteázy NS3.

15 Biologické testy na buňkách: Biologické testy serinové proteázy HCV na buňkách byly prováděny pro sloučeniny podle vynálezu postupem popsáným autory S. Agrawal a další, „Development and Characterization of Hepatitis C Virus Serin Protease Cell-based Trans-Cleavage Assay“, *Hepatology*, dodatek dílu 30 (No. 4, část 2, říjen 20 1999), *Abstract* No. 615 (Proceedings of AASLD 50th Annual Meeting, Dallas, Texas, listopad 5 až 9, 1999), který se tímto zařazuje odkazem. Test byl prováděn na buňkách HeLa/Huh7, které byly kotransfekovány plasmidem exprimujícím reporterový proteinový substrát obsahující štěpicí rozpoznávací sekvenci NS5A/5B, a expresním vektorem 1BNS4A₂₁₋₃₂GS-GSNS₃₋₈₁/17K a YFPn1 jako 25 vnitřním standardním proteinem pro kontrolu cytotoxicity. Aktivita proteázy byla měřena SDS-PAGE celkových buněčných lyzátů s následnou detekcí westernovým přenosem použitím monoklonální protilátky proti reporterovému substrátu. Kvantifikace a štěpení 30 substrátu bylo prováděno skanováním imunoblotu na přístroji phosphoimager.

Materiály

Plasmidové DNA

pBFP-5A/5B-GFP: Reporterový gen, který exprimuje substrát, kóduje fúzní protein složený z N'-koncové domény proteinu modré fluorescence (blue fluorescent protein, BFP) a C'-koncové domény proteinu zelené fluorescence (green fluorescent protein, GFP) oddělených 25 aminokyselinami odvozenými od rozpoznávací štěpicí sekvence NS5A/5B. GFP i BFP jsou v podstatě homologní autofluorescenční proteiny, které emitují zelené nebo modré světlo při excitaci UV zářením příslušné vlnové délky. Čtyři substituované aminokyseliny v chromoforu GFP mění emisní vlnovou délku a převádějí protein na BFP.

Substrát a výsledné produkty GFP a BFP mohou být v buněčných lyzátech detekovány imunologickými metodami s použitím monoklonální protilátky, která rozpoznává oba proteiny.

Reporterový gen BFP-5A/5B-GFP obsahuje kódující sekvence autofluorescenčního proteinu BFP a GFP (Quantum Biotechnologies, Inc., Montreal, Canada) oddělené rozpoznávací štěpicí sekvencí NS5A/5B klonované mezi štěpicí místa restričních endonukleáz Nhe I a Bam HI klonovacího vektoru pQBI25 (Quantum Biotechnologies, Inc.). Exprese fúzního proteinu probíhá pod řízením promotoru - zesilující sekvence CMV IE. Sekvence bovinního růstového hormonu p(A) vektoru poskytuje polyadenylační signál pro mRNA. Štěpicí sekvence NS5A/5B je následující: SSGADTEDWCCSMSYTWGTG-
-ALVTP. Pro ověření identity klonu bylo použito sekvenování DNA.

P1BOO2: 1 bNS4A21-32GS-GS NS 3-81/17K: Proteáza subtypu 1b byla klonována jako fragment Xba1/Not1 za promotor CMV ve vektoru pC1neo.

YFPn1: YFPn1 byl získán od firmy CLONTECH (Palo Alto, California). Přídavek třetího plasmidu k transfekci poskytne protein

vnitřního standardu pro kontrolu cytotoxicity a neovlivní procento štěpení proteázy.

Plasmidové DNA byly udržovány a pomnožovány v buňkách DH5 α (získaných od firmy LifeTechnologies) v médiu LB pod vhodným selekčním tlakem antibiotik a čištěny s použitím souprav QIAfilter Plasmid Kits (Qiagen, Valencia, California).

Buněčné kultury:

Buňky **HeLa** byly udržovány a množeny v médiu Eagle's Minimum Essential Media (EMEM; BioWhittaker, Walkersville, Maryland) doplněném 10% fetálním telecím sérem (FCS), 2 mM glutaminem a 100 u/ml penicilin-streptomycinem (BioWhittaker), 2% NaHCO₃.

Buňky **Huh7** byly udržovány a množeny v médiu Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; BioWhittaker) doplněném 10% fetálním telecím sérem (FCS), 100 u/ml penicilin-streptomycinem (BioWhittaker) a 5 ml NEAA (100 x; BioWhittaker)/l.

Postup SOP

Den před transfekcí

Buňky HeLa byly zaočkovány do 24-jamkových destiček (Falcon 3047) na hustotu 6×10^4 buněk/jamku a pěstovány přes noc při 37 °C v inkubátoru při 5% CO₂.

Den transfekce

Plasmidové DNA byly zředěny na konečnou koncentraci 0,05 μ g/ μ l v beznukleázové vodě (Promega, Madison, Wisconsin, katalogové číslo P119C). 0,75 μ g BFP-5A/5B-GFP bylo spojeno a smíseno s 0,175 μ g P1B002 (0,23 x) a 0,02 μ g YFPn1. Tyto DNA byly doplněny na konečný objem 60 μ l médiem EMEM bez FBS, glutaminu a antibiotik. Byly přidány 5 μ l objemy činidla SuperFect Reagent (Qiagen, katalogové číslo 301305) na celkový počet

mikrogramů DNA a směs byla přibližně 10 s důkladně míchána a inkubována 10 min při teplotě laboratoře, aby se mohl vytvořit komplex.

Při tvorbě komplexu bylo růstové médium z destiček s buněčnou kulturou odsáto a buňky byly promyty 1 x 1 ml PBS bez iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} (BioWhitaker). Do zkumavky obsahující transfekční komplexy bylo přidáno 350 μl média EMEM (doplněného pro získání kompletního média) a směs byla opakovaně 2 až 3 krát napipetována. Celkový objem byl převeden do jedné jamky 24-jamkové kultivační destičky. Buňky HeLa byly inkubovány s transfekčními komplexy přibližně 3 hod při 37 °C a 5% CO_2 . Média obsahující transfekční komplexy byla z buněk odstraněna odsátím.

Buňky byly 1x promyty v přibližně 1 ml PBS, PBS bylo odsáto a bylo přidáno 495 μl kompletního média EMEM a potom 5 μl sloučeniny/jamku. Buňky byly inkubovány 22 až 24 hod při 37 °C a 5% CO_2 .

Příprava buněčných lyzátů

Médium z každé jamky bylo odsáto a jamka byla jednou promyta DPBS. Buňky byly sklizeny ve 100 μl vzorkovacího pufru 1 x Tris-SDS-BME (OWL separation system, Portsmouth, New Hampshire, katalogové číslo ER33) a převedeny do mikrocentrifugačních zkumavek. Směs byla povařena 3 až 5 min pro dosažení lyze buněk. Nanášení na gel bylo prováděno v množství 10 μl /jamku SDS-PAGE gelu. Lyzáty byly děleny elektroforézou na 10 cm x 10 cm 12,5% SDS-PAGE (Owl Scientific, katalogové číslo OG-0125B) při proudu 30 mA v pufru Tris-glycin-SDS (Owl Scientific). Před použitím byla membrána PVDF (Immobilon-P; velikost pórů 45 μm ; Millipore, Bedford, Massachusetts) namočená ve 100% methanolu na 10 s a potom byla vložena do destilované vody. Proteiny byly převáděny na filtrační membrány PVDF (0,45 μm , Millipore) při proudu 108 mA na gel po dobu 90 min s použitím polosuchého elektroblotovacího zařízení.

Detekce proteinů westernovým přenosem ECF

(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England, katalogové číslo RPN 5780). Filtrační membrány PVDF byly blokovány 5% blokovacím činidlem (z kitu) v ~10 ml PBS obsahujícího 0,05% Tween 20, pH 7,4 (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, katalogové číslo 3563) přes noc při 2 až 4 °C v chladicím boxu. Další den byly membrány dvakrát krátce promyty promývacím pufrem TPBS obsahujícím 0,05% Tween 20, potom třikrát promyty vždy 5 min v pufru PBS s obsahem 0,05% Tween 20, pH 7,4. Membrány byly inkubovány ve 12 ml ředění 1 : 3000 monoklonální protilátky anti-GFP po dobu 30 min (Clontech, Palo Alto, California) v PBS s obsahem 0,05% Tween 20, pH 7,4, přičemž současně byl přidán 1% BSA (Albumin, bovine katalogové číslo A-2153 firmy Sigma) pro omezení pozadí. Membrány byly promyty dvakrát krátce pufrém TPBS, potom třikrát vždy 5 min promývacím pufrém TPBS. Membrány byly inkubovány ve 12 ml ředění 1 : 600 protilátky proti myšímu Ig s navázaným antifuoresceinem v TPBS po dobu 30 min. Membrány byly krátce promyty dvakrát TPBS, potom třikrát po 5 min promývacím pufrém TPBS. Pro amplifikaci signálu substrátem ECF byly membrány inkubovány v 10 ml ředění 1 : 2500 konjugátu antifuorescein-alkalická fosfatáza po dobu 30 min. Membrány byly krátce opláchnuty dvakrát TPBS, potom třikrát 5 min promývacím pufrém TPBS. Roztok substrátu ECF byl připraven podle doporučení výrobce (příprava alikvoty a zamražení), membrány byly inkubovány 2 až 3 min, nadbytečné činidlo bylo odsáto, potom osušeno filtračními papíry, membrány byly usušeny na vzduchu 9 až 10 min a potom skenovány.

Skenování membrán

Membrána byla vložena na sklo přístroje phosphorimager Storm 860. Byla nastavena modrá chemiluminiscence, velikost pixelů 200, napětí fotonásobiče 700 V. V programu ImageQuant byl otevřen soubor a byla provedena kvantifikace vytvořením čtverců kolem pruhů

reprezentujících substrát (S), produkt (P) a vnitřní kontrolu (IC).
 Procento štěpení substrátu bylo měřeno jako $P/(S+P) \times 100$. Inhibice štěpení působením léčiva byla zjišťována porovnáním duplikátu kontroly s léčivem, který byl přítomen na každém přenosu. Výstupní
 5 protokol byl vytvořen v programu Excel. Výsledky jsou ukázány v tabulce 2. Z těchto výsledků je odborníkovi v oboru zřejmé, že sloučeniny podle vynálezu mají vynikající použitelnost jako inhibitory serinové proteázy NS3.

10 Tabulka 2: Výsledky testu HCV na buňkách

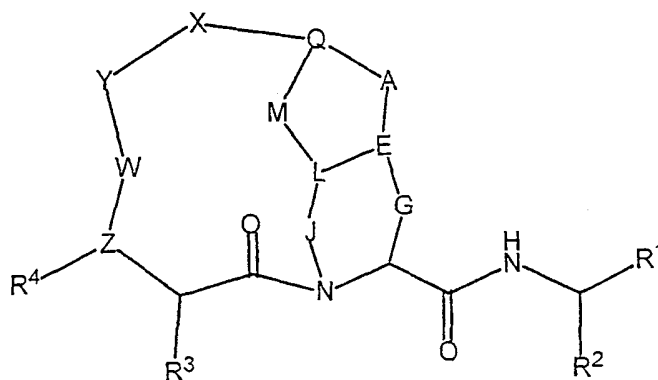
Příklad č.	Test na buňkách (μM)
1B	2
2	2
4A	2,5
4B	1,8
5	0,6
7B	7
8	3,5
12B	5,2
21	2
23	3
30	1
57B	1,5
58	2

Odborníkům v oboru bude zřejmé, že je možno provést mnoho modifikací, variací a změn předkládaného vynálezu, jak co se týče materiálů, tak i použitých metod. Tyto modifikace, variace a změny
 15 spadají do podstaty rozsahu předkládaného vynálezu.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Makrocyclická sloučenina obecného vzorce I:



Vzorec I

kde:

- X a Y jsou nezávisle zvoleny ze skupin: alkyl, alkylaryl, heteroalkyl, heteroaryl, arylheteroaryl, alkylheteroaryl, cykloalkyl, alkylether, alkylarylether, arylether, alkylamino, arylamino, alkylarylamino, alkylsulfid, alkylarylsulfid, arylsulfid, alkylsulfon, alkylarylsulfon, arylsulfon, alkylalkylsulfoxid, alkylarylsulfoxid, alkylamid, alkylarylamid, arylamid, alkylsulfonamid, alkylarylsulfonamid, arylsulfonamid, alkylmočovina, alkylarylmočovina, arylmočovina, alkylkarbamát, alkylarylkarbamát, arylkarbamát, alkylhydrazid, alkylarylhydrazid, alkylhydroxamid, alkylarylhydroxamid, alkylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroalkylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylkarbonyl, arylkarbonyl, heteroalkylkarbonyl, heteroarylkarbonyl, alkoxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylaminokarbonyl, arylaminokarbonyl, heteroarylaminokarbonyl nebo jejich kombinace, s podmínkou, že skupiny X a Y mohou být popřípadě navíc substituovány skupinami zvolenými ze skupiny aromatická skupina, alkyl, alkylaryl,

heteroalkyl, arylheteroaryl, alkylheteroaryl, cykloalkyl, alkylether, alkylarylether, alkylsulfid, alkylarylsulfid, alkylsulfon, alkylarylsulfon, alkylamid, alkylarylamid, alkylsulfonamid, alkylaminy, alkylarylaminy, alkylarylsulfonamid, alkylmočovina, 5 alkylarylmočovina, alkylkarbamát a alkylarylkarbamát;

R^1 znamená COR^5 nebo $B(OR)_2$, kde R^5 je H, OH, OR^8 , NR^9R^{10} , CF_3 , C_2F_5 , C_3F_7 , CF_2R^6 , R^6 , COR^7 , kde R^7 je H, OH, OR^8 , CHR^9R^{10} nebo NR^9R^{10} , kde R^6 , R^8 , R^9 a R^{10} jsou nezávisle zvoleny ze skupiny atom vodíku, alkyl, aryl, heteroalkyl, 10 heteroaryl, cykloalkyl, cykloalkyl, arylalkyl, heteroarylalkyl, $CH(R^1')COOR^{11}$, $CH(R^1')CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')COOR^{11}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')R'$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')COOR^{11}$, 15 $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')CONHCH(R^4')COOR^{11}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')CONHCH(R^4')CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')CONHCH(R^4')CONHCH(R^5')COOR^{11}$, 20 $CH(R^1')CONHCH(R^2')CONHCH(R^3')CONHCH(R^4')CONHCH(R^5')CONR^{12}R^{13}$, kde R^1' , R^2' , R^3' , R^4' , R^5' , R^{11} , R^{12} , R^{13} , a R' jsou nezávisle zvoleny ze skupiny atom vodíku, alkyl, aryl, heteroalkyl, heteroaryl, cykloalkyl, alkylaryl, alkylheteroaryl, arylalkyl a 25 heteroarylalkyl;

Z je zvoleno ze skupiny O, N, nebo CH;

W může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je W přítomno, je W zvoleno ze skupiny C=O, C=S nebo SO_2 ;

Q může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je Q přítomno, je 30 zvoleno ze skupiny CH, N, P, $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CRR')_p$, O, NR, S,

nebo SO_2 ; a jestliže je Q nepřítomno, M je také nepřítomno, a A je přímo navázáno na X;

- A je O, CH_2 , $(\text{CHR})_p$, $(\text{CHR}-\text{CHR}')_p$, $(\text{CRR}')_p$, NR, S, SO_2 nebo vazba;
- 5 E je CH, N nebo CR, nebo dvojná vazba k A, L nebo G ;
- G může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je G přítomno, je zvoleno ze skupiny $(\text{CH}_2)_p$, $(\text{CHR})_p$, nebo $(\text{CRR}')_p$; a jestliže je G nepřítomno, J je přítomno a E je přímo navázáno na atom uhlíku, na který bylo navázáno G;
- 10 J může být nepřítomno nebo přítomno, a jestliže je J přítomno, je zvoleno ze skupiny $(\text{CH}_2)_p$, $(\text{CHR})_p$, nebo $(\text{CRR}')_p$, SO_2 , NH, NR nebo O; a jestliže je J nepřítomno, G je přítomno a E je přímo navázáno na N;
- 15 L může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je L přítomno, je zvoleno ze skupiny CH, CR, O, S nebo NR; a jestliže je L nepřítomno, může být M přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je M přítomno a L nepřítomno, M je přímo a nezávisle navázáno na E, a J je přímo a nezávisle navázáno na E;
- 20 M může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže je M přítomno, je zvoleno ze skupiny O, NR, S, SO_2 , $(\text{CH}_2)_p$, $(\text{CHR})_p$, $(\text{CHR}-\text{CHR}')_p$, nebo $(\text{CRR}')_p$;
- p je číslo 0 až 6; a
- 25 R, R', R^2 , R^3 a R^4 jsou nezávisle zvoleny ze skupiny H; C_1 - C_{10} alkyl; C_2 - C_{10} alkenyl; C_3 - C_8 cykloalkyl; C_3 - C_8 heterocykloalkyl, alkoxy, aryloxy, alkylthio, arylthio, amino, amido, ester, karboxylová kyselina, karbamát, močovina, keton, aldehyd, kyano, nitro; nula až šest atomů kyslíku, dusíku, síry, nebo fosforu;
- 30 (cykloalkyl)alkyl a (heterocykloalkyl)alkyl, kde uvedený cykloalkyl je složen ze tří až osmi atomů uhlíku, a nuly až šesti atomů kyslíku, dusíku, síry, nebo fosforu, a uvedený alkyl obsahuje

jeden až šest atomů uhlíku; aryl; heteroaryl; alkylaryl; a alkylheteroaryl;

kde uvedené skupiny alkyl, heteroalkyl, alkenyl, heteroalkenyl, aryl, heteroaryl, cykloalkyl a heterocykloalkyl mohou být
 5 popřípadě substituovány, přičemž termín „substituovaný“ označuje případnou a vhodnou substituci jednou nebo více skupinami zvolenými ze skupiny alkyl, alkenyl, alkinyl, aryl, aralkyl, cykloalkyl, heterocykl, halogen, hydroxy, thio, alkoxy, aryloxy, alkylthio, arylthio, amino, amido, ester, karboxylová
 10 kyselina, karbamát, močovina, keton, aldehyd, kyano, nitro, sulfonamid, sulfoxid, sulfon, sulfonylmočovina, hydrazid a hydroxamát,
 včetně enantiomerů, stereoizomerů, rotamerů a tautomerů této sloučeniny.

15

2. Makrocyclická sloučenina podle nároku 1, kde $R^1 = COR^5$ a R^5 je H, OH, $COOR^8$, $CONR^9R^{10}$.

20

3. Makrocyclická sloučenina podle nároku 2, kde $R^1 = COCONR^9R^{10}$ a R^9 je H, R^{10} je H, $CH(R^1)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)COOR^{11}$, $CH(R^1)CO-NHCH(R^2)CONR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)(R')$.

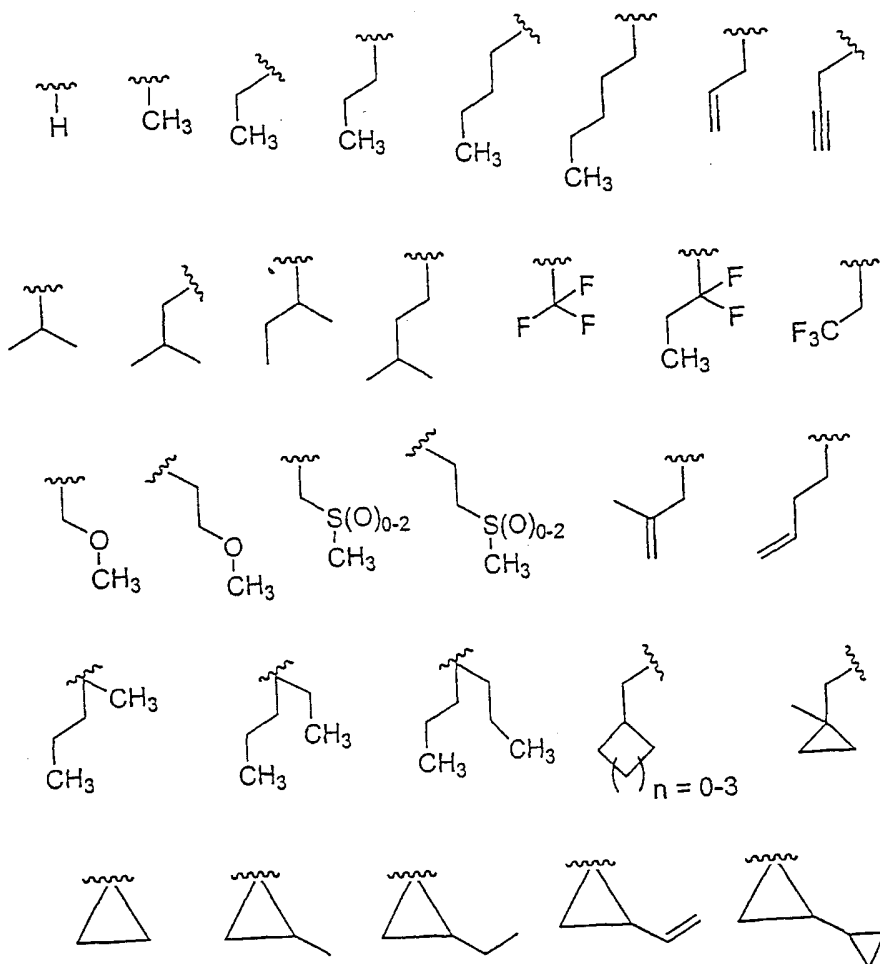
25

4. Makrocyclická sloučenina podle nároku 3, kde R^{10} je $CH(R^1)CONHCH(R^2)COOR^{11}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)CO-NR^{12}R^{13}$, $CH(R^1)CONHCH(R^2)(R')$, kde R^1 je H nebo alkyl a R^2 je fenyl, substituovaný fenyl, heteroatom-substituovaný fenyl, thiofenyl, cyklohexyl, cyklopentyl, cyklopropyl, piperidyl, pyridyl a 2-indanyl.

5. Makrocyclická sloučenina podle nároku 4, kde $R^{1'}$ je H.

6. Makrocyclická sloučenina podle nároku 5, kde $R^{2'}$ je fenyl, thiofenyl, cyklohexyl, 2-indanyl, cyklopentyl, pyridyl, fenyl(4-HNSO₂NH₂), R^{11} je H nebo terc-butyl, R^{12} a R^{13} jsou methyl a R' je hydroxymethyl nebo terc-butoxymethyl.

7. Makrocyclická sloučenina podle nároku 1, kde R^2 je zvolena z následující skupiny:



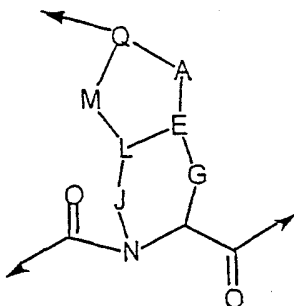
8. Makrocyclická sloučenina podle nároku 7, kde $R^1 = COR^5$ a R^5 je H, OH, COOR⁸, CONR⁹R¹⁰.

9. Makrocyclic compound according to claim 8, where L and M are not present and J is directly connected to E.

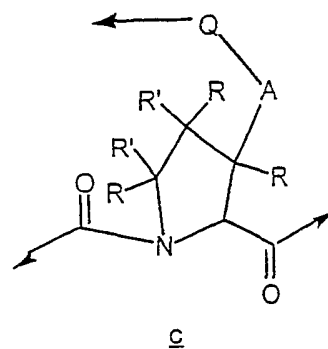
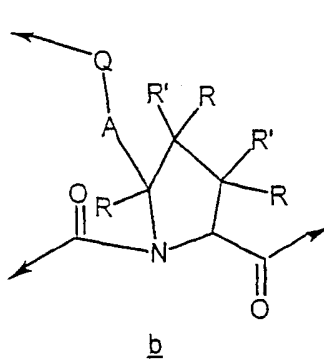
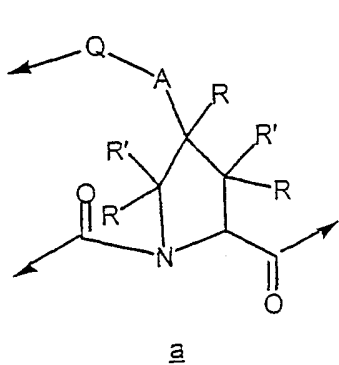
10. Makrocyclic compound according to claim 8, where L, J and M are not present and E is directly connected to N.

11. Makrocyclic compound according to claim 8, where G and M are not present.

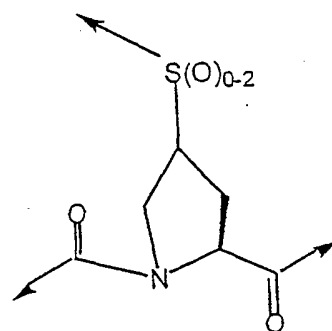
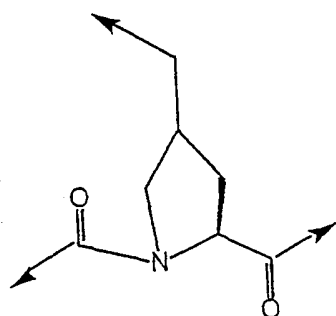
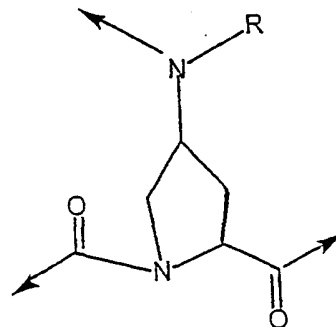
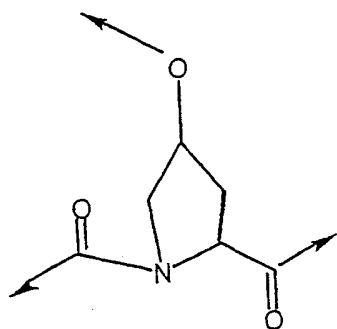
12. Makrocyclic compound according to claim 8, where the group:



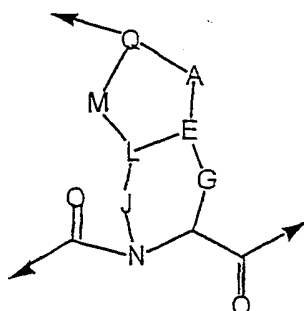
is selected from the group of the following structures a, b or c:



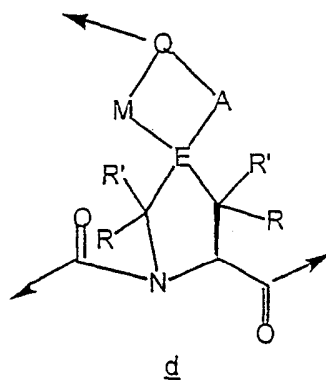
13. Makrocyclic compound according to claim 12, where structure a is selected from the following structures:



14. Makrocyclická sloučenina podle nároku 8, kde



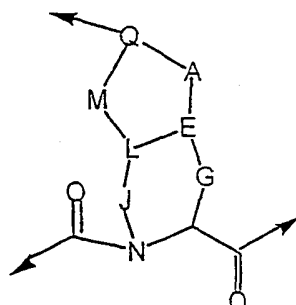
je



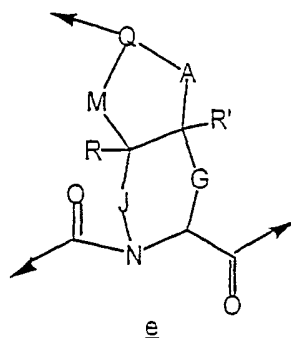
d

kde M může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže M je přítomno, Q je navázáno na E.

15. Makrocyclická sloučenina podle nároku 8, kde



je

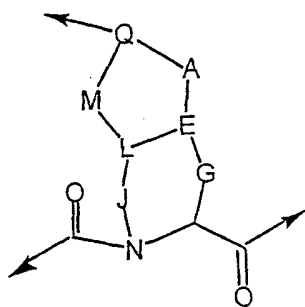


e

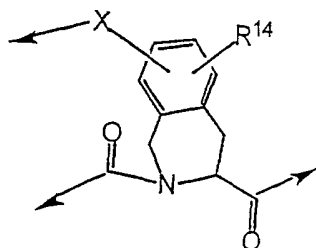
kde G a J jsou nezávisle zvoleny ze skupiny $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, a $(CRR')_p$; A a M jsou nezávisle zvoleny ze skupiny O, S, SO_2 , NR, $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, a $(CRR')_p$; a Q je CH, CR nebo N.

16. Makrocyclická sloučenina podle nároku 8, kde G a J jsou nezávisle zvoleny ze skupiny $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, a $(CRR')_p$; a skupina A-E-L-M-Q je aromatický kruh složený z dvou až osmi atomů uhlíku, nula až šesti heteroatomů, kde X a J jsou ve vzájemné poloze ortho, para nebo meta.

17. Makrocyclická sloučenina podle nároku 16, kde



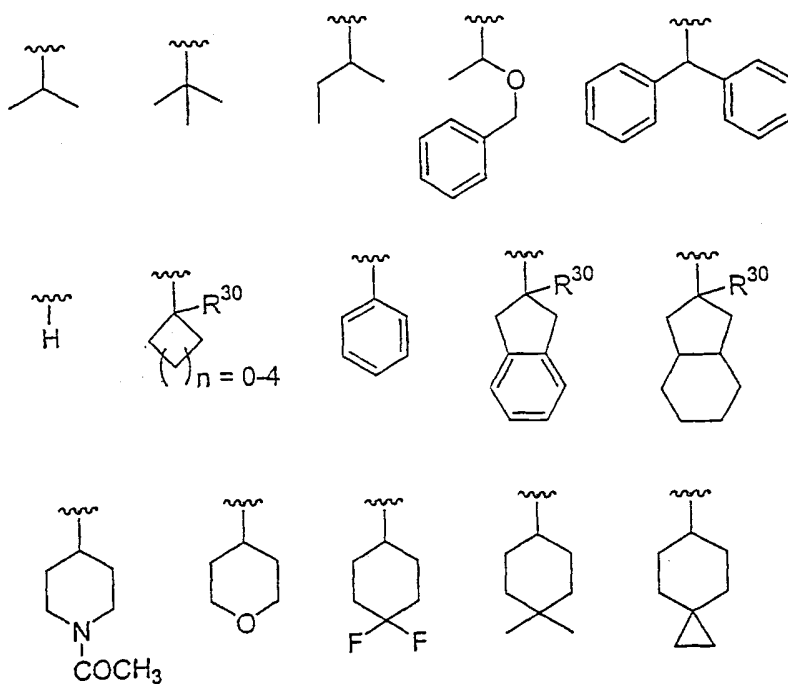
je

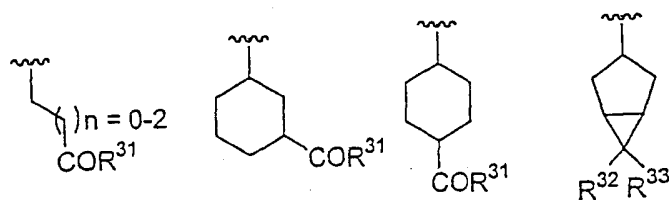


f

kde R^{14} je zvoleno ze skupiny H, alkyl, aryl, heteroalkyl, heteroaryl, cykloalkyl, alkylaryl, alkylheteroaryl, arylalkyl a heteroaralkyl.

18. Makrocyclická sloučenina podle nároku 1, kde R^3 je zvoleno ze skupiny



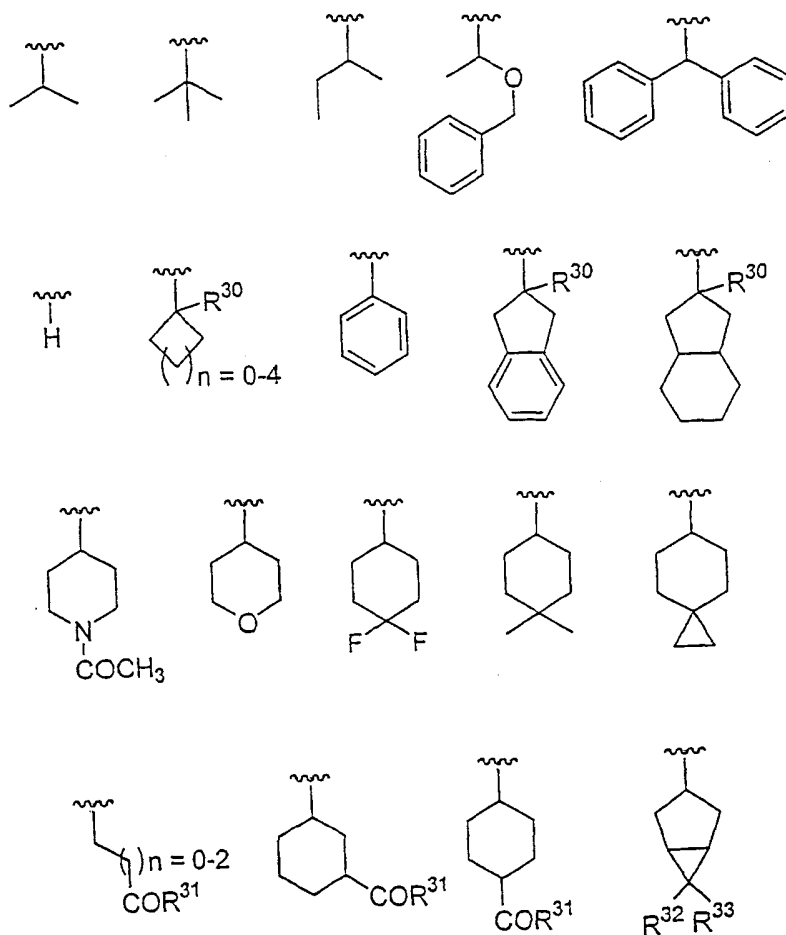


kde $R^{30} = H, CH_3$ nebo jiná alkylová skupina;

5 $R^{31} = OH, O\text{-alkyl}, NH_2, N\text{-alkyl}$; a

R^{32} a R^{33} mohou být stejné nebo různé a jsou nezávisle zvoleny ze skupiny H, F, Cl, Br a CH_3 .

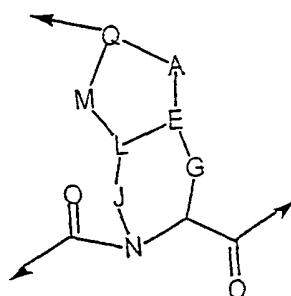
10 19. Makrocyclická sloučenina podle nároku 8, kde R^3 je zvoleno ze skupiny



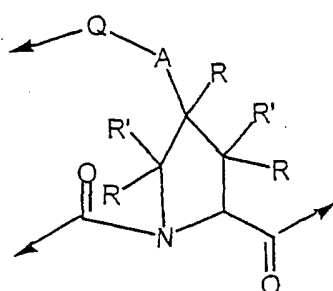
25 kde $R^{30} = H, CH_3$ nebo jiná alkylová skupina;

R^{31} = OH, O-alkyl, NH_2 , N-alkyl; a

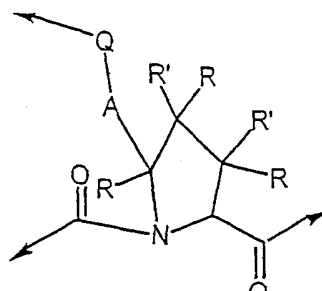
R^{32} a R^{33} mohou být stejné nebo různé a jsou nezávisle zvoleny ze skupiny H, F, Cl, Br a CH_3 ,
a skupina



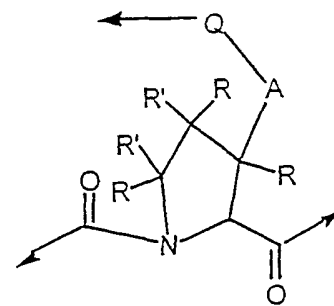
je zvolena z následujících struktur a, b, c, d, e a f



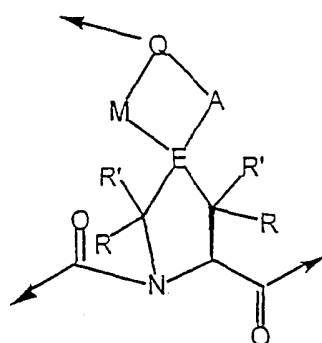
a



b

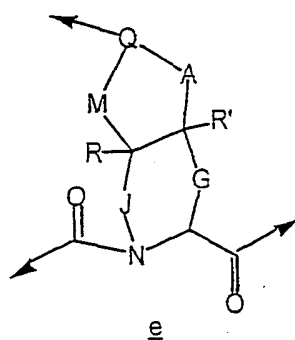


c

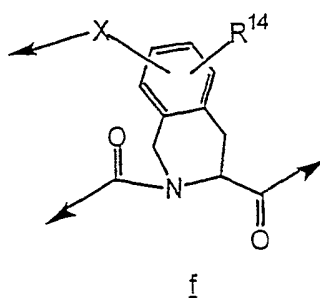


d

kde M může být přítomno nebo nepřítomno, a jestliže M je nepřítomno, Q je navázáno na E;



kde G a J jsou nezávisle zvoleny ze skupiny $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, a $(CRR')_p$; A a M jsou nezávisle zvoleny ze skupiny O, S, SO_2 , NR, $(CH_2)_p$, $(CHR)_p$, $(CHR-CHR')_p$, nebo $(CRR')_p$, Q je CH, CR nebo N; a

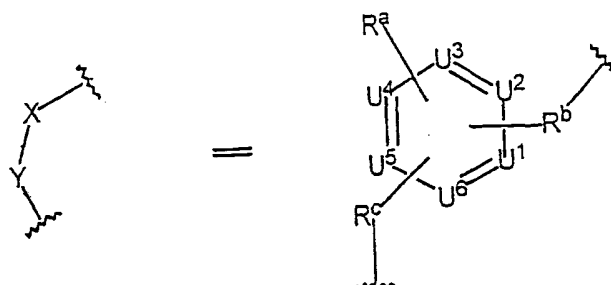


20. Makrocyclická sloučenina podle nároku 19, kde Z = N a $R^4 = H$.

21. Makrocyclická sloučenina podle nároku 20, kde W je C=O.

22. Makrocyclická sloučenina podle nároku 21, kde skupina X-Y je zvolena ze skupiny C_1-C_6 alkyl, O-alkyl, NR-alkyl.

23. Makrocyclická sloučenina podle nároku 21, kde



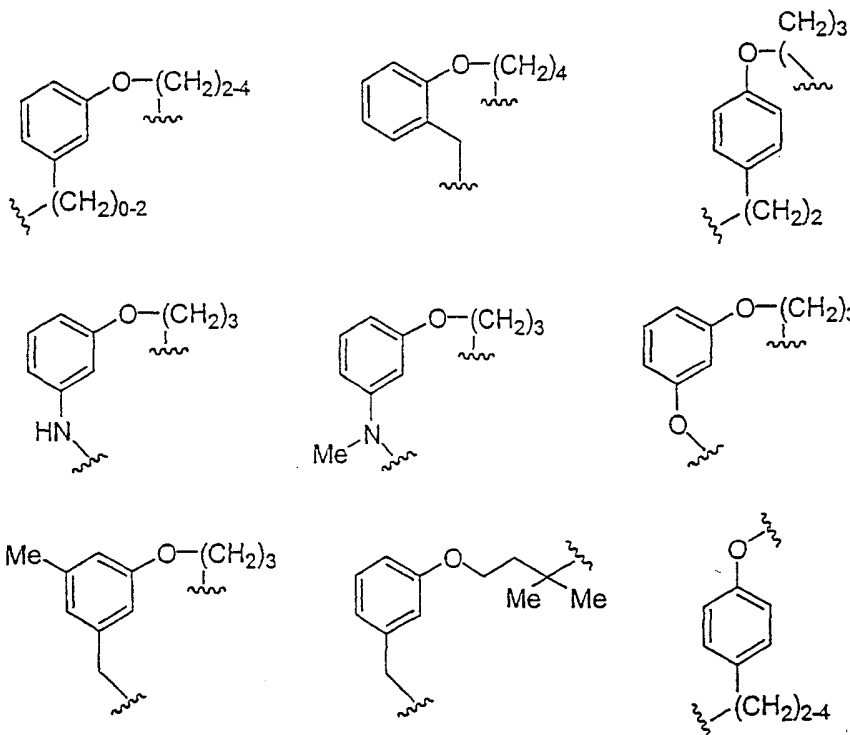
skupina R^b je přímo navázána na skupinu Q, jestliže je Q přítomna, nebo na skupinu A, jestliže je Q nepřítomna; R^c je navázána na W; U^1 až U^6 mohou být částí šestičlenného uhlíkatého kruhu nebo pěti- nebo šestičlenného kruhu obsahujícího jeden nebo více heteroatomů;

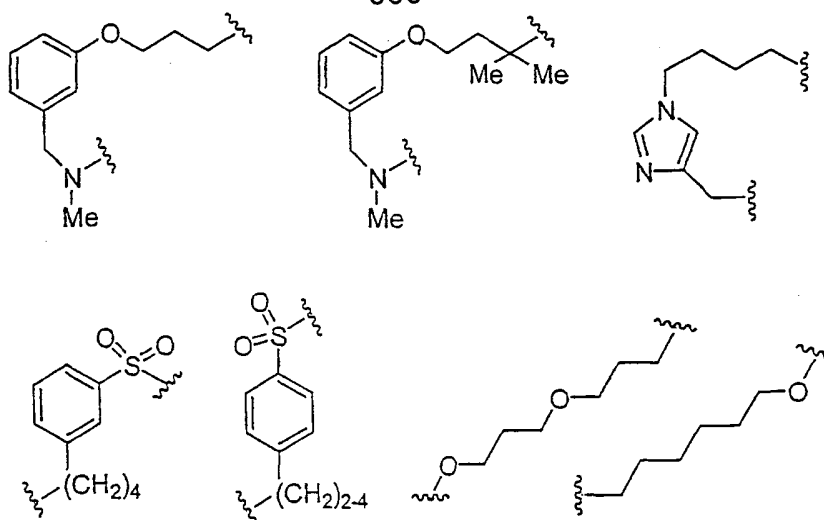
R^a = H, alkyl, alkoxy, hydroxy, thio, halogen, nitro, kyano, karboxylová kyselina, ester, amid, amino, nitril nebo CF_3 ;

R^b je vazba, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkynyl, O, S, SO_2 , NH, O(alkyl), S(alkyl), SO_2 (alkyl) nebo N(alkyl); a

R^c je vazba, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkynyl, O, S, SO_2 , NH, O(alkyl), S(alkyl), SO_2 (alkyl), N(alkyl) nebo CH_2 -N(alkyl), kde skupina CH_2 je navázána na aromatický kruh.

24. Makrocyclická sloučenina podle nároku 21, kde skupina X-Y je zvolena z následujících skupin:





5

10

25. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje makrocyclickou sloučeninu podle nároku 1.

26. Farmaceutický prostředek podle nároku 25 pro použití při léčení onemocnění souvisejících s HCV.

15

27. Farmaceutický prostředek podle nároku 25, vyznačující se tím, že navíc obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič.

20

28. Způsob léčení onemocnění souvisejících s proteázou HCV, který zahrnuje podávání farmaceutického prostředku obsahujícího terapeuticky účinné množství makrocyclické sloučeniny podle nároku 1 pacientovi v případě potřeby.

25

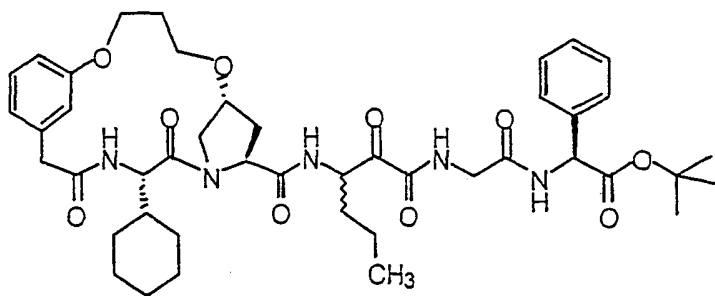
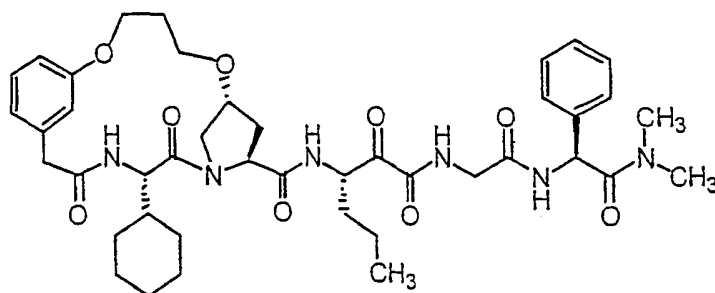
29. Použití makrocyclické sloučeniny podle nároku 1 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení onemocnění souvisejících s proteázou HCV.

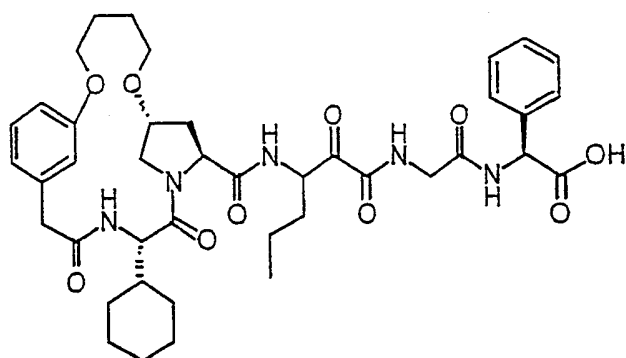
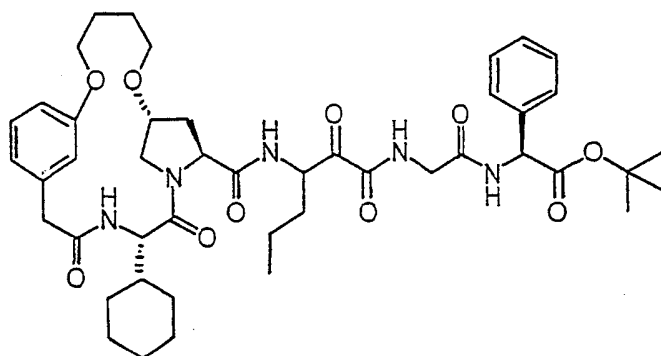
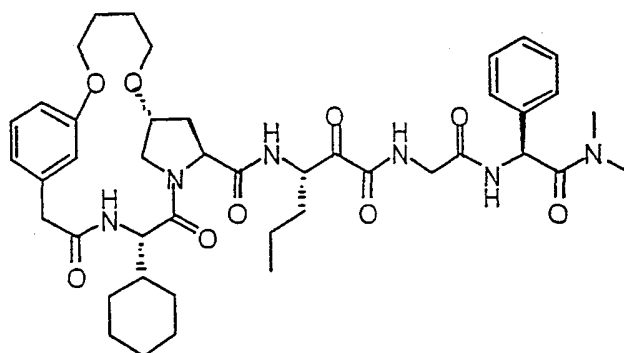
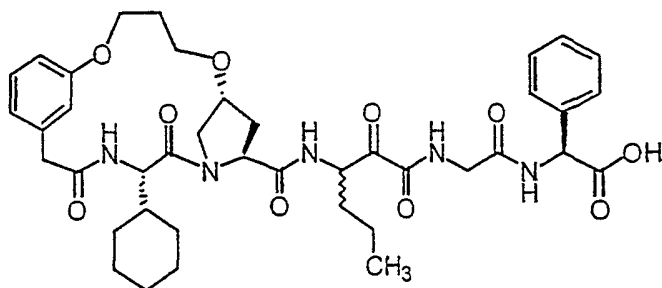
30. Způsob výroby farmaceutického prostředku pro léčení onemocnění souvisejících s proteázou HCV, vyznačující se tím, že se uvede do styku makrocyclická sloučenina podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

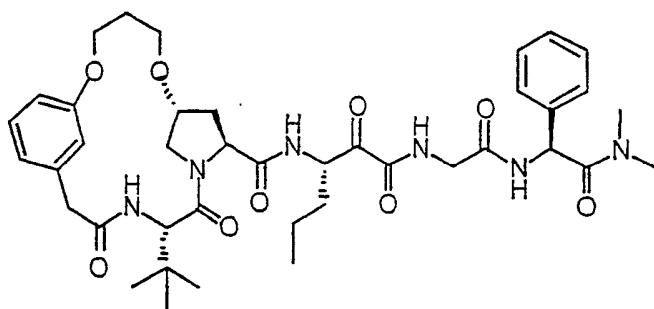
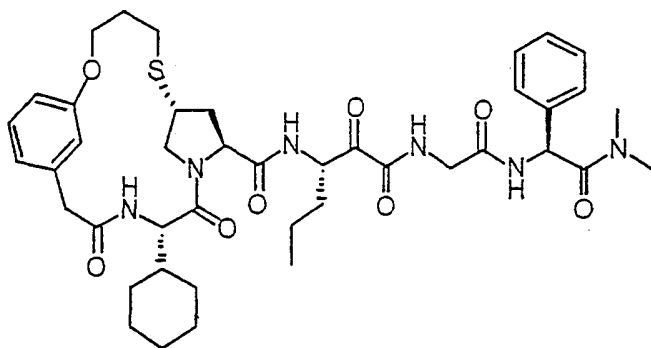
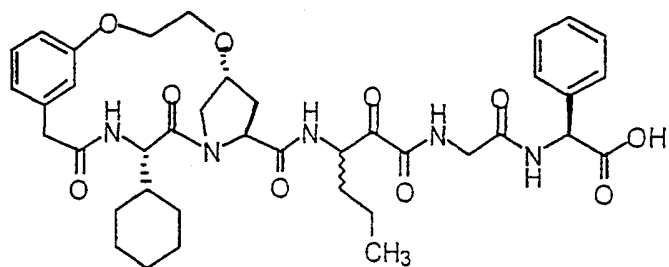
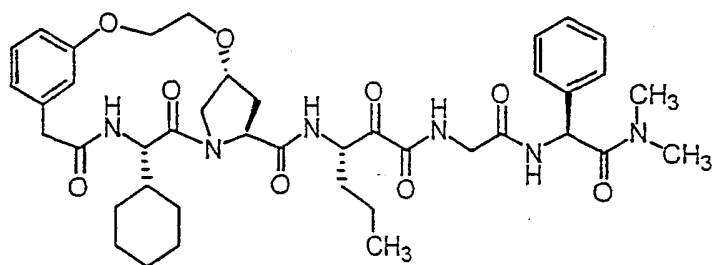
5

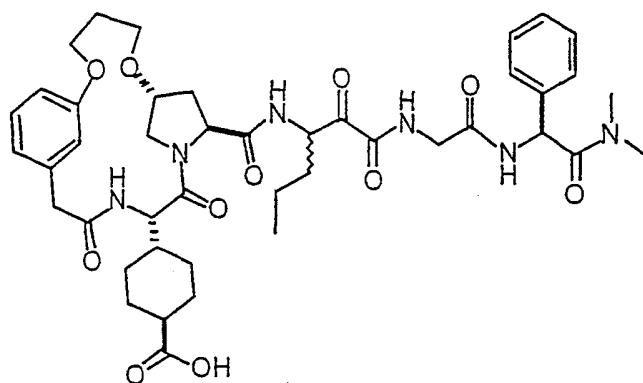
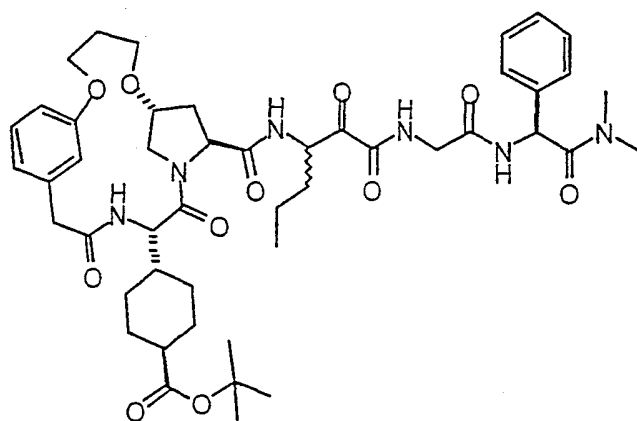
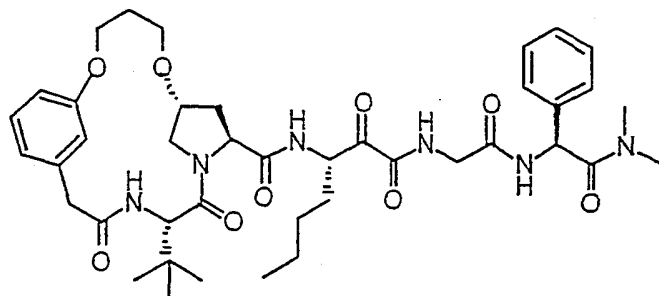
31. Sloučenina s inhibiční aktivitou na proteázu HCV včetně enantiomerů, stereoisomerů a tautomerů této sloučeniny a farmaceuticky přijatelných solí nebo solvátů této sloučeniny, kterou je:

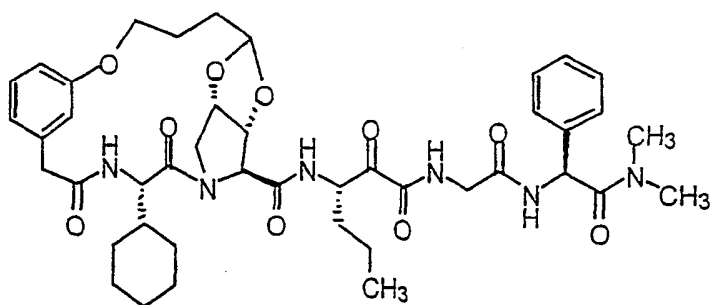
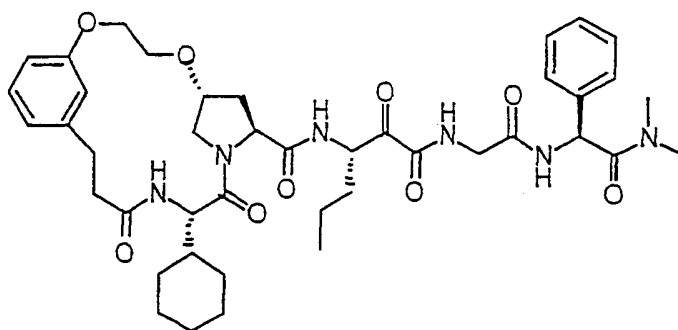
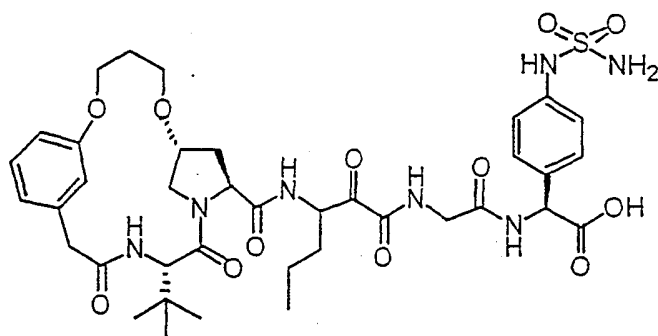
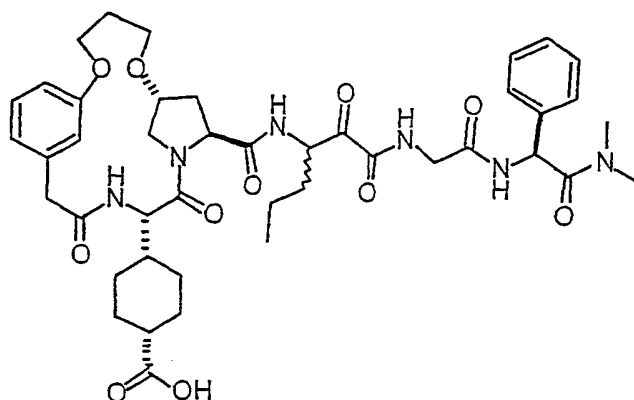
10

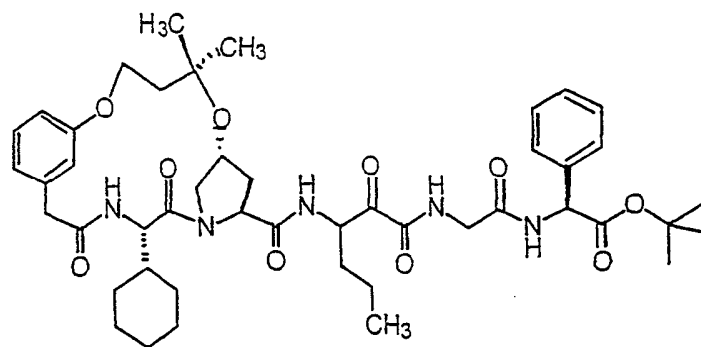
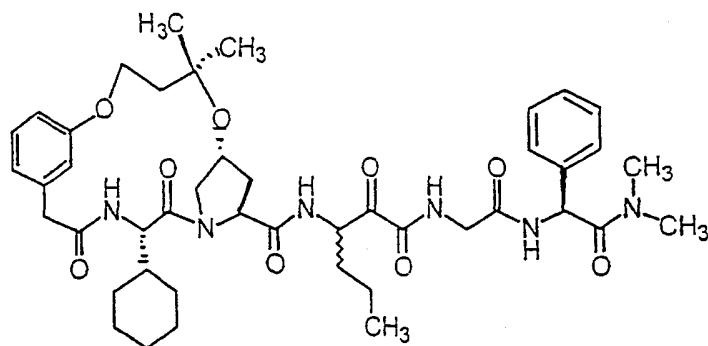
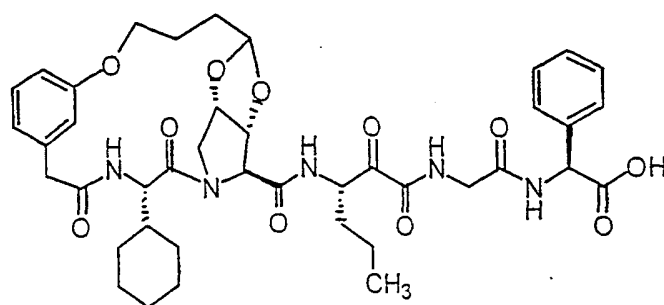
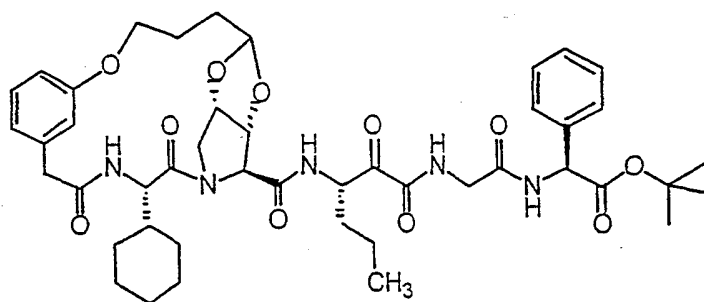


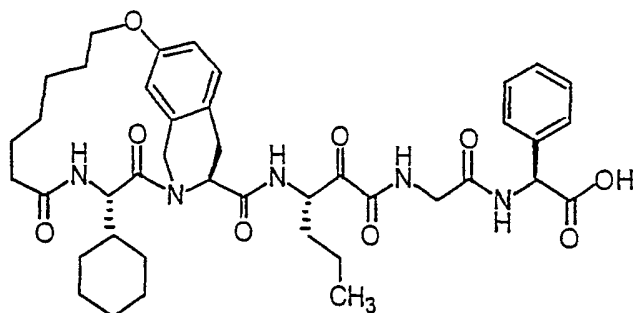
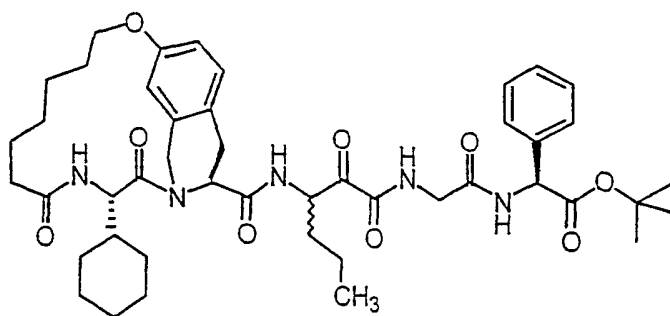
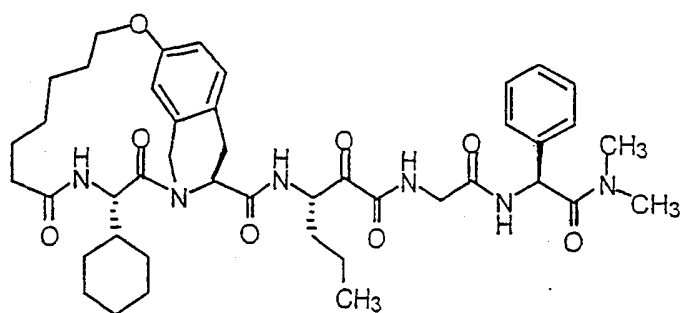
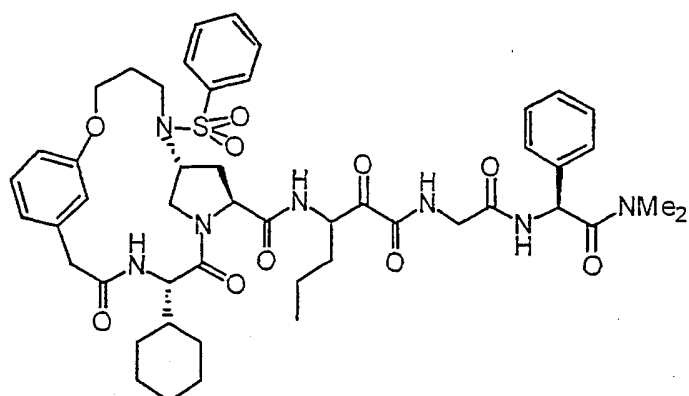


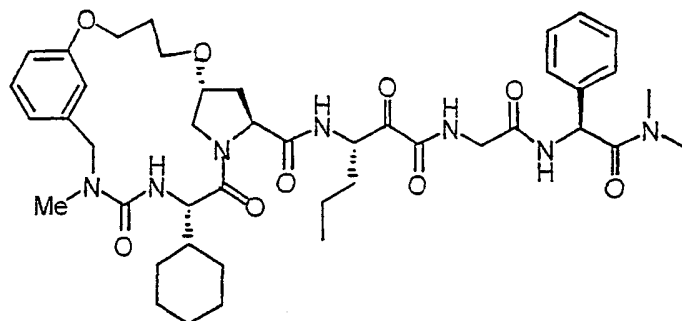
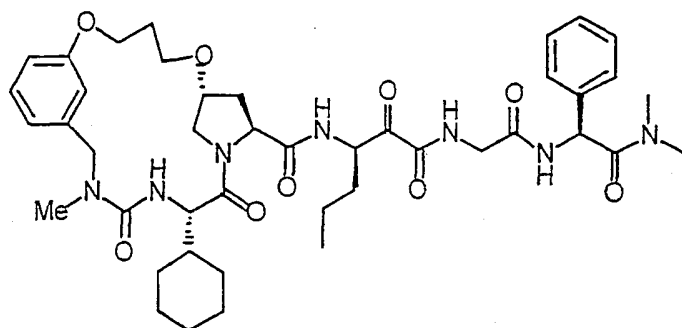
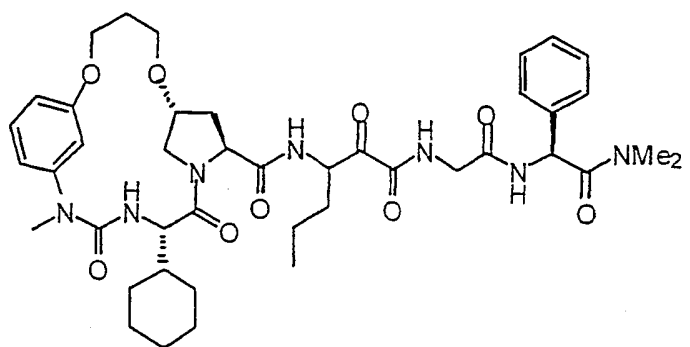
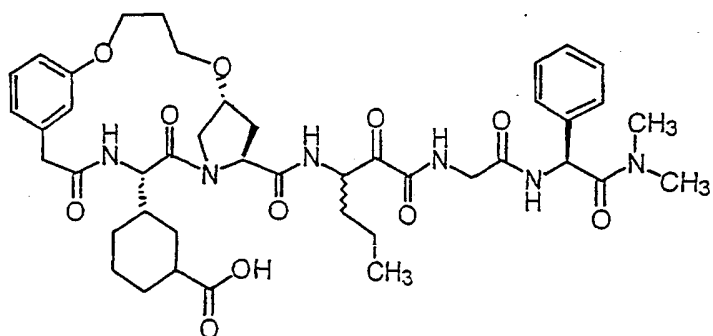


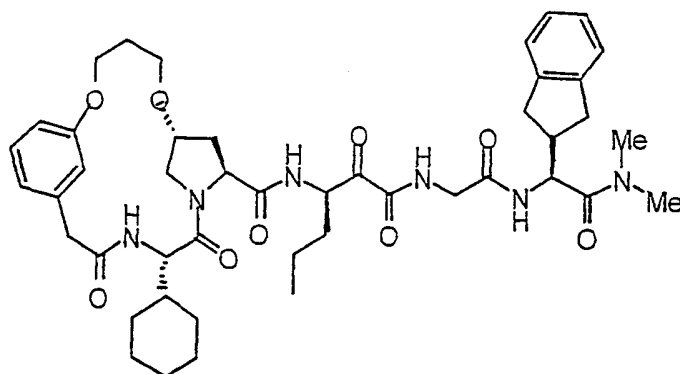
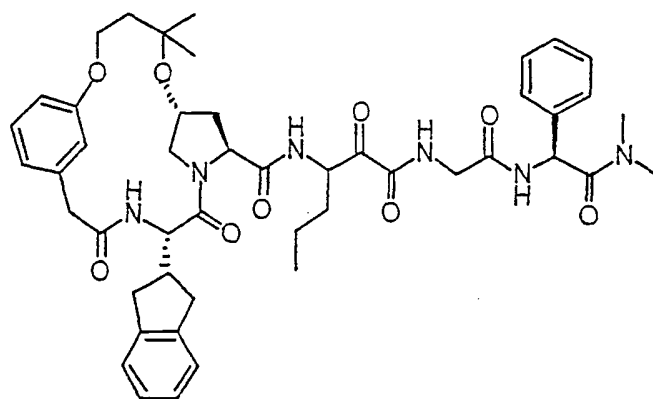
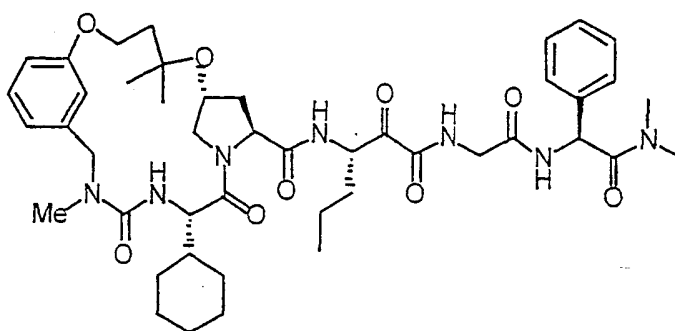
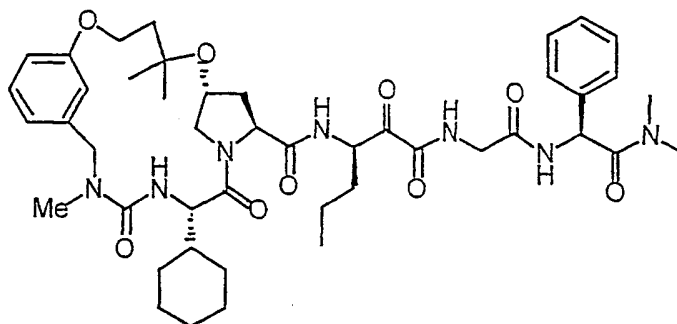


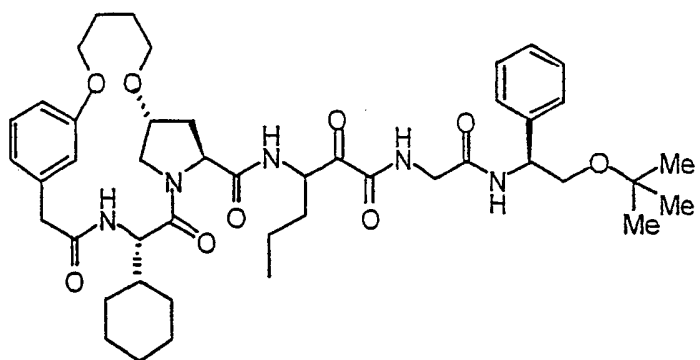


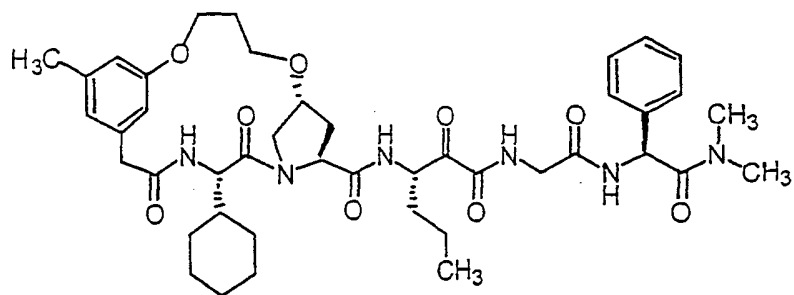
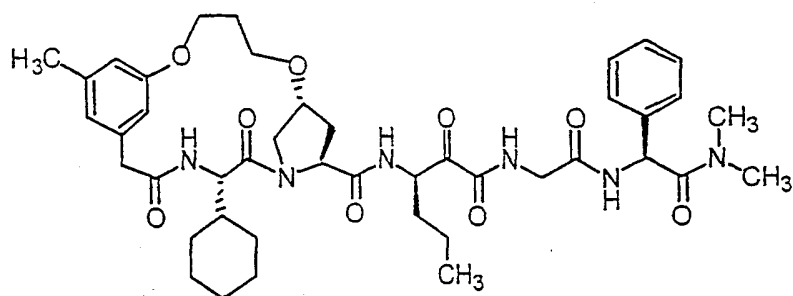
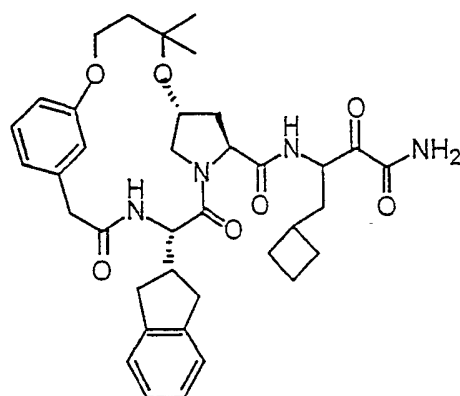
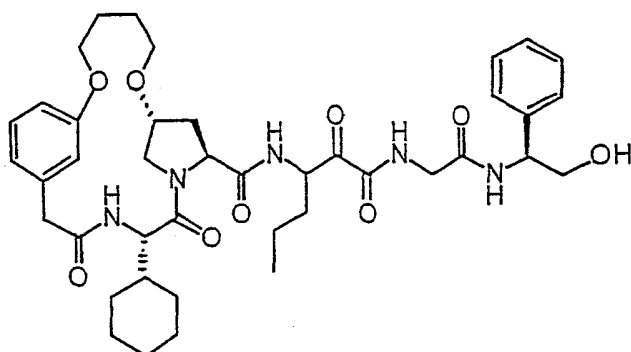


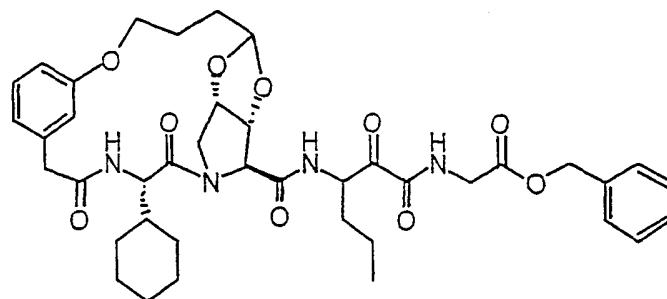
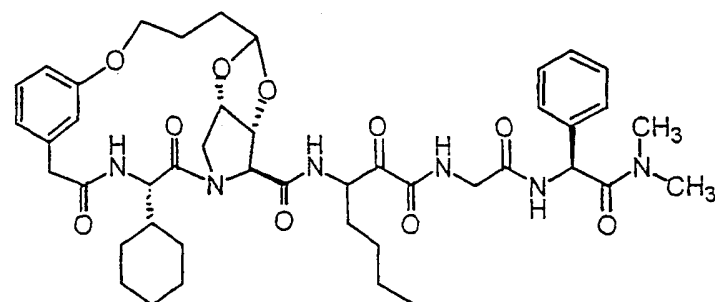
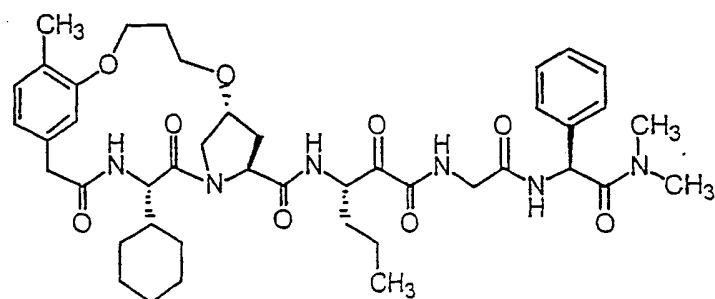
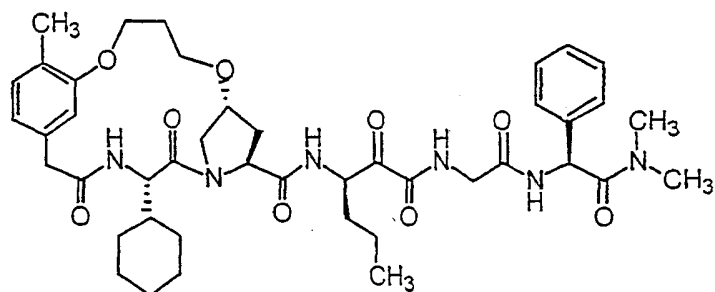


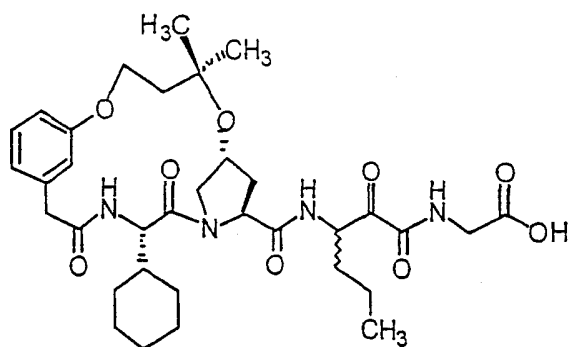
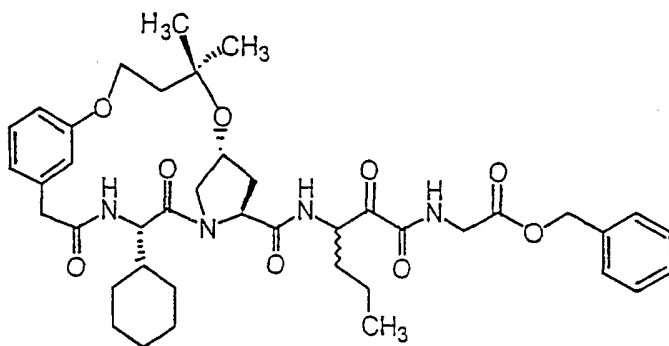
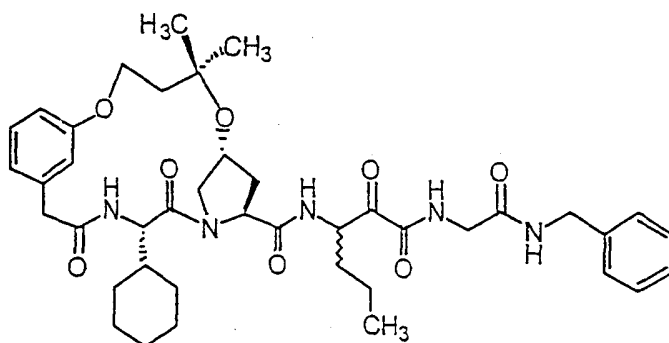
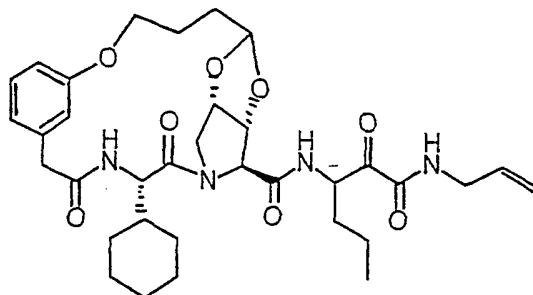


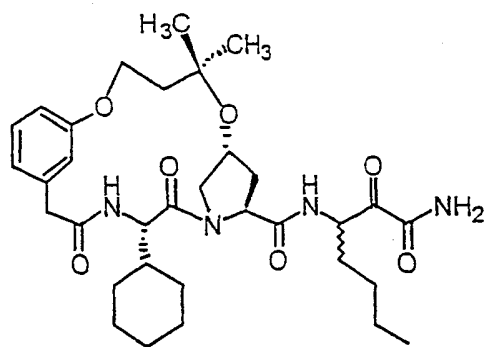
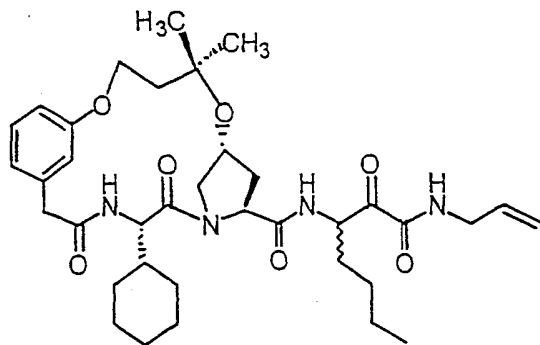
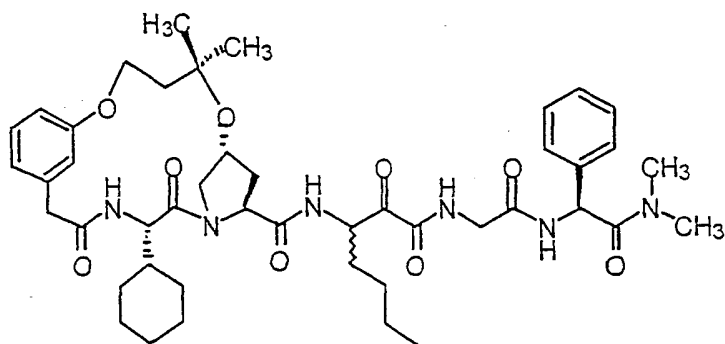
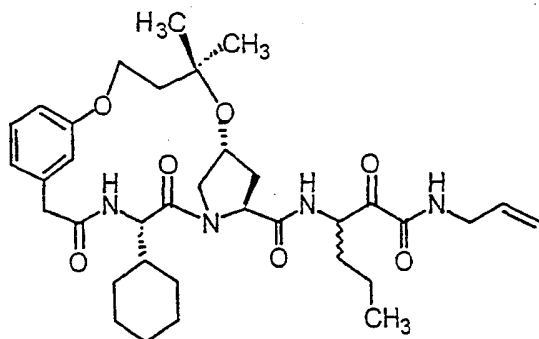


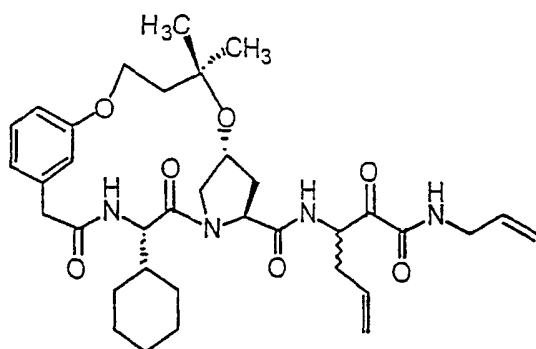
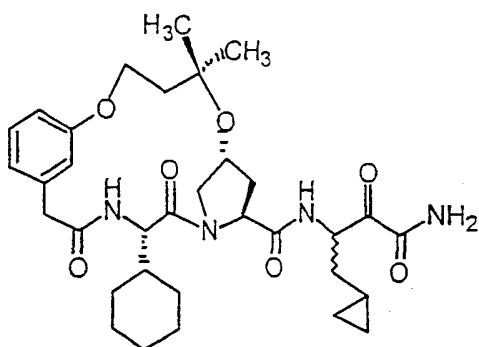
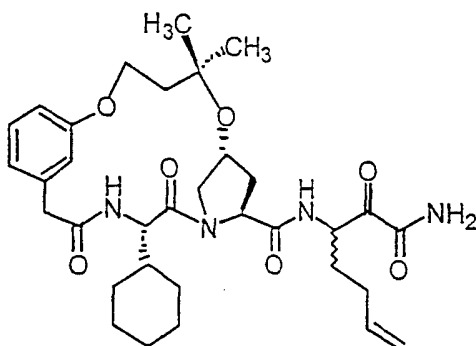
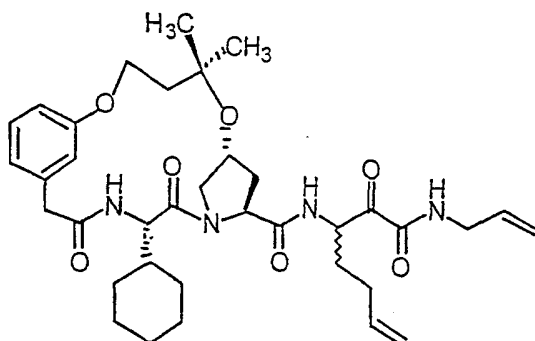


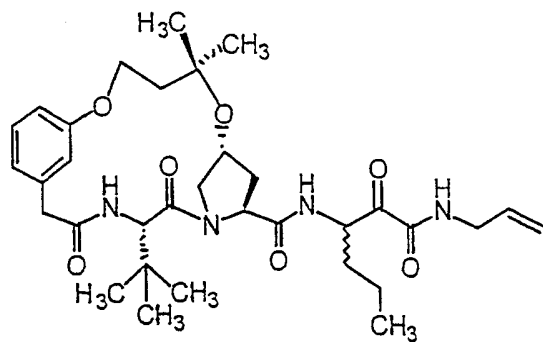
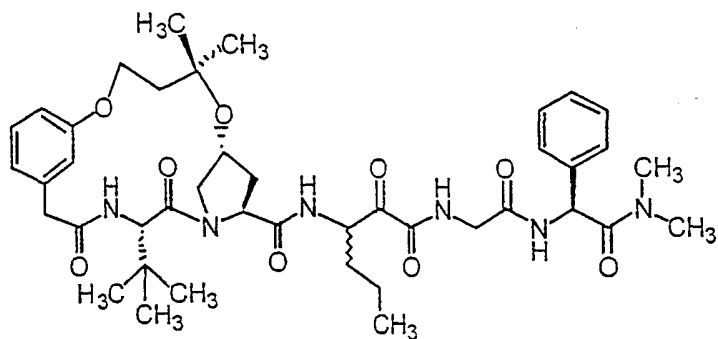
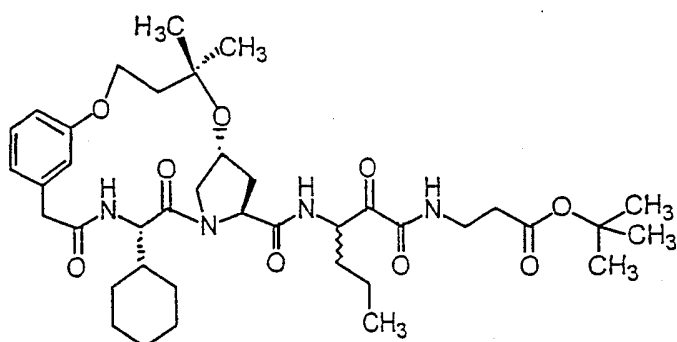
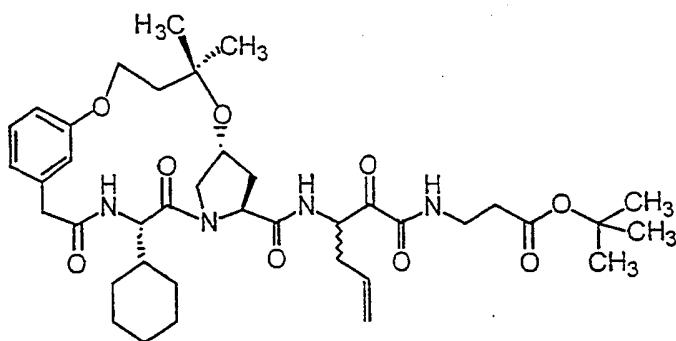


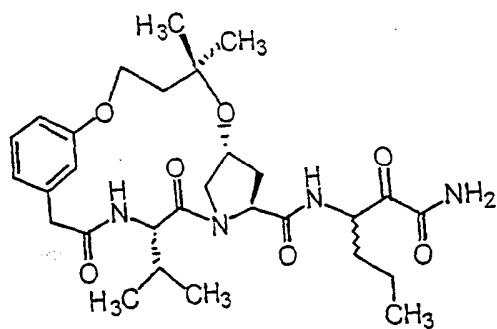
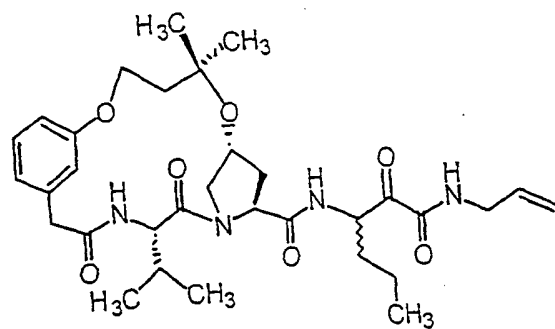
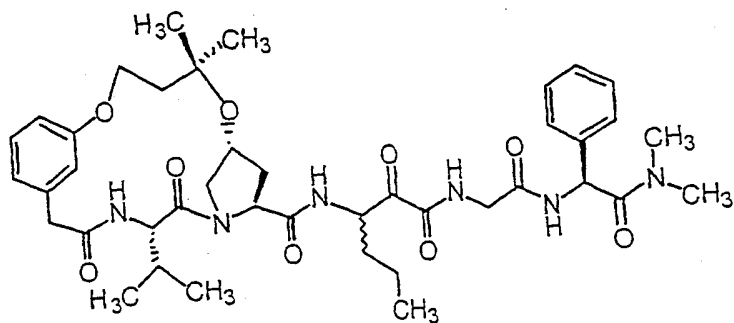
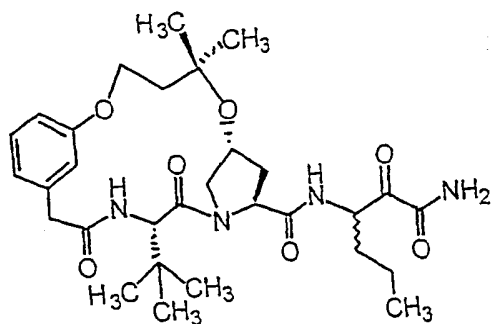


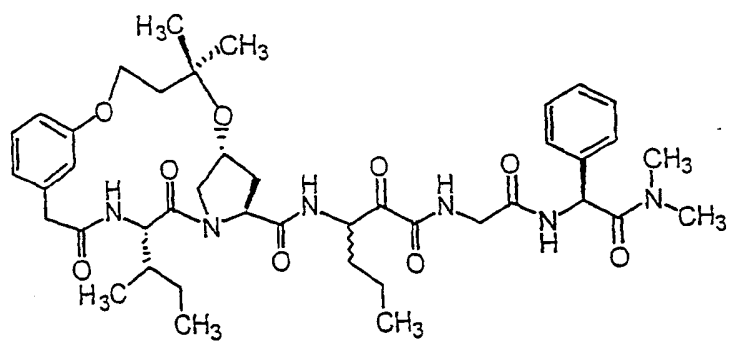
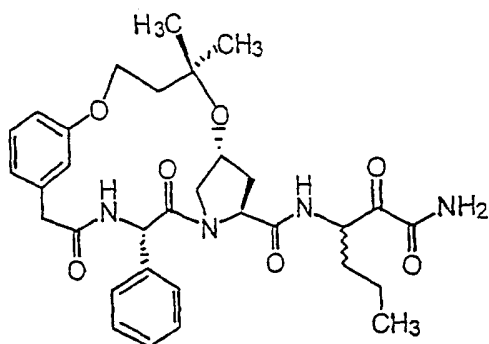
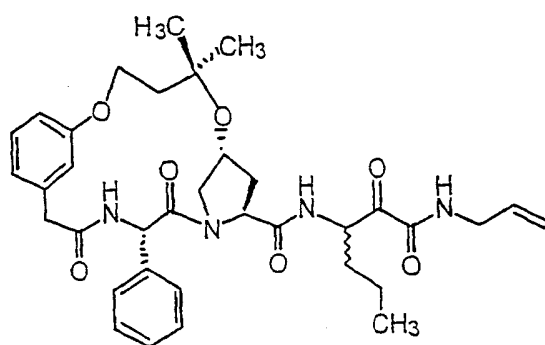
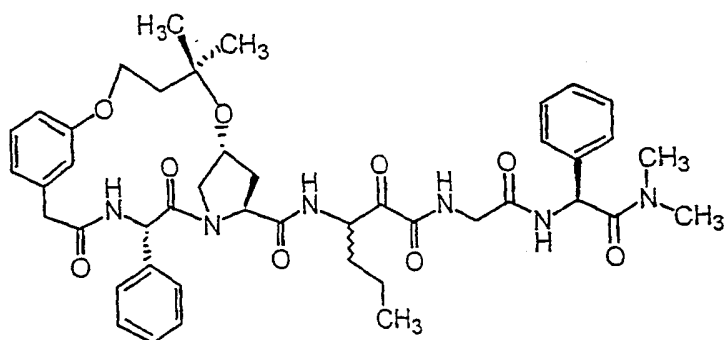


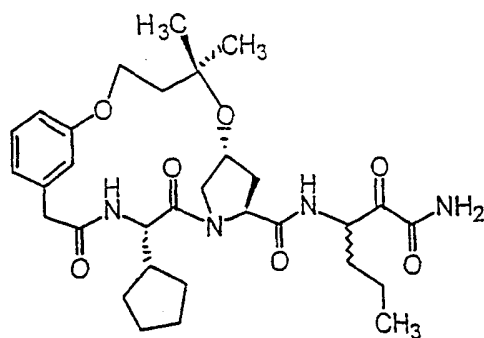
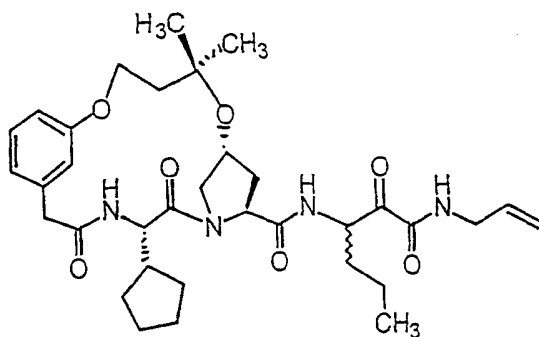
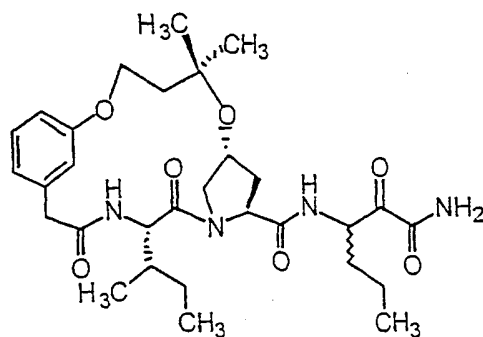
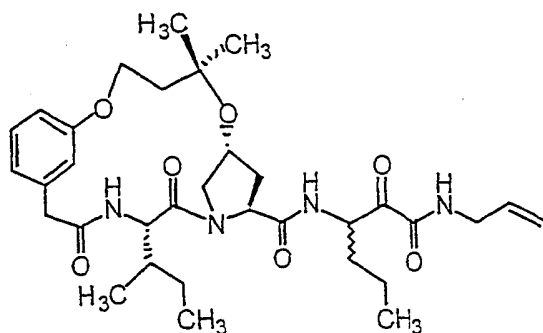


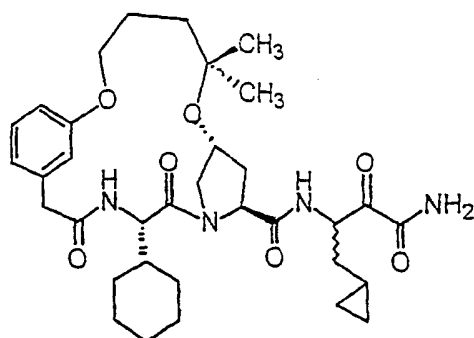
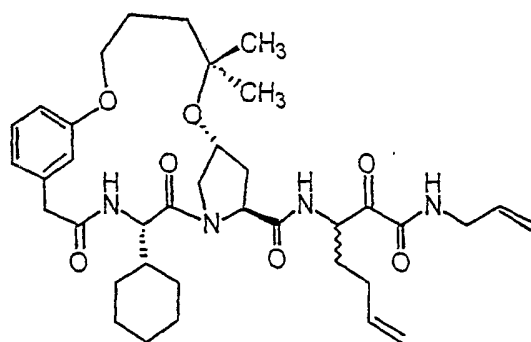
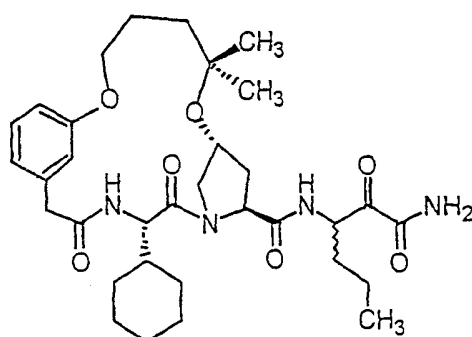
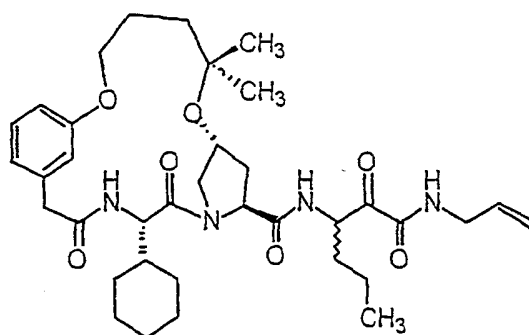


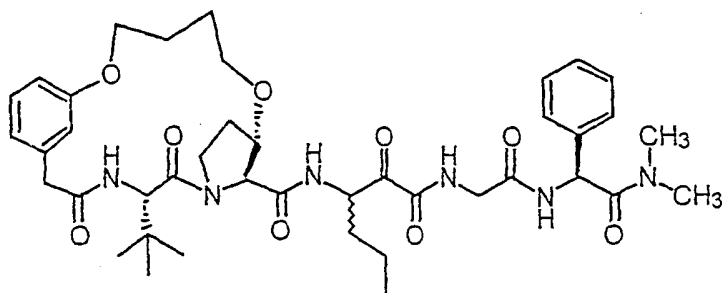
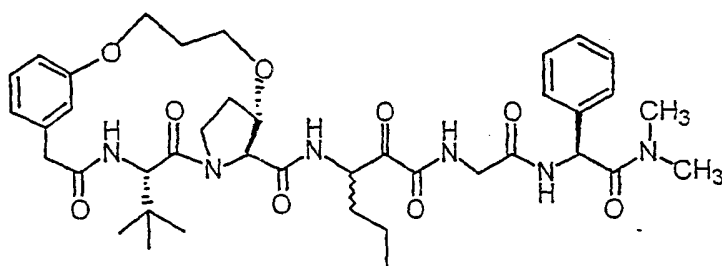












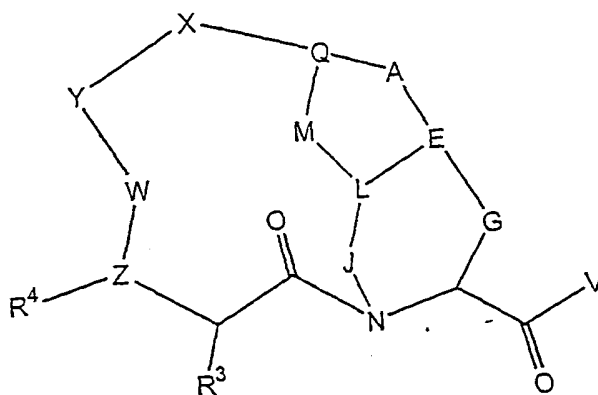
32. Farmaceutický prostředek pro léčení onemocnění souvisejících s proteázou HCV, vyznačující se tím, že obsahuje terapeuticky účinné množství jedné nebo více sloučenin uvedených v nároku 31 a farmaceuticky přijatelný nosič.

33. Farmaceutický prostředek podle nároku 32, vyznačující se tím, že navíc obsahuje antivirový prostředek.

34. Farmaceutický prostředek podle nároku 32 nebo 33, vyznačující se tím, že ještě dále obsahuje interferon.

35. Farmaceutický prostředek podle nároku 34, vyznačující se tím, že antivirový prostředek je ribavirin a interferon je α -interferon.

5



10

Zastupuje: