

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

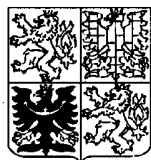
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1938-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19. 12. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.12.95, 13.03.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/577951, 96/615760**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 10. 98**
(Věstník č. 10/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/19603**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/23478**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 07 D 401/04

C 07 D 401/14

C 07 D 401/12

A 61 K 31/44

A 61 K 31/495

(71) Přihlášovatel:

SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ,
US;

(72) Původce:

Doll Ronald J., Maplewood, NJ, US;
Kelly Joseph M., Parlin, NJ, US;
Njoroge F. George, Union, NJ, US;
Mallams Alan K., Hackettstown, NJ, US;
Remiszewski Stacy W., Washington
Township, NJ, US;
Taveras Arthur G., Rockaway, NJ, US;

(74) Zástupce:

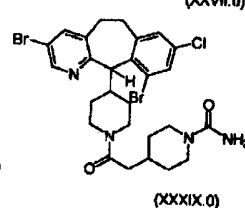
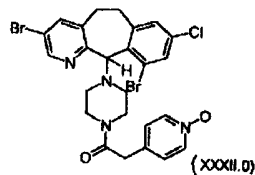
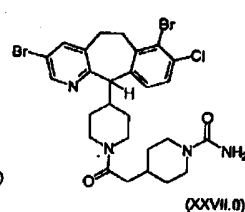
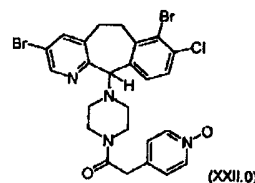
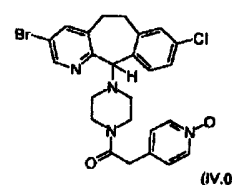
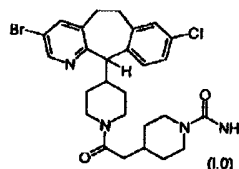
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Tricyklické amidy, které se používají
pro inhibici G-proteinové funkce
a k léčení proliferativních onemocnění**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce /I.O/, /IV.O/,
/XXII.O/, /XXVII.O/, /XXXII.O/ a /XXXIX.O/,
způsoby pro inhibici abnormálního růstu
buněk, pro inhibici farnesyl protein transferá-
sy a způsoby léčení rakovin za použití nových
sloučenin.



Tricyklické amidy, které se používají pro inhibici G-proteinové funkce a k léčení proliferativních onemocnění

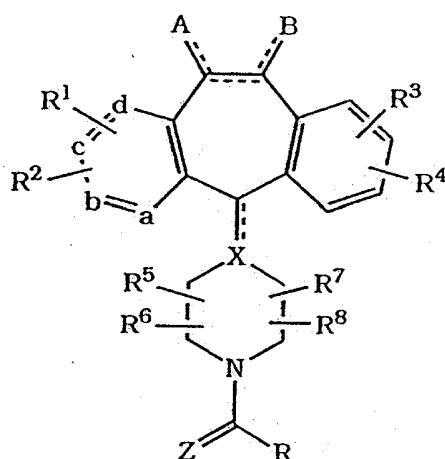
Oblast techniky

Vynález se týká tricyklických amidů, které jsou užitečné pro inhibici G-proteinové funkce a k léčení proliferativních onemocnění. Zároveň se týká způsobů jejich přípravy a přípravy farmaceutických prostředků

Dosavadní stav techniky

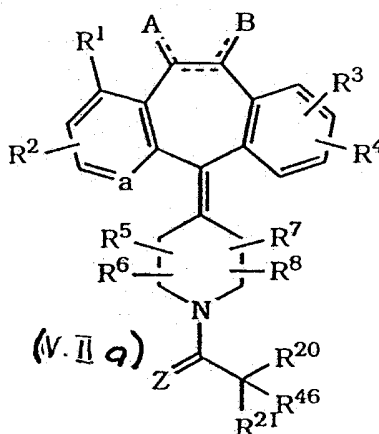
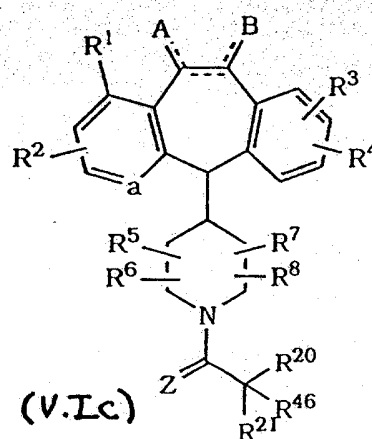
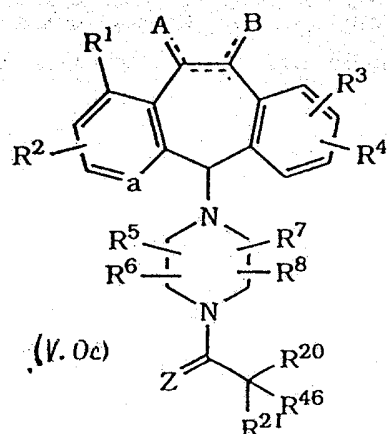
Biologický význam Ras onkogenu a úloha jak Ras, tak enzymu, který je známý jako farnesyl protein transferáza, v konverzi normálních buněk na rakovinné buňky, je popsána v PCT mezinárodní přihlášce č. W095/00497 a W095/10516. Každá z těchto publikací také popisuje rozdílnou třídu sloučenin, které inhibují aktivitu enzymu farnesyl protein transferázy a tím také inhibují farnesylation Ras proteinu.

PCT mezinárodní přihláška č. W095/10516 se týká tricyklických sloučenin amidu a močoviny obecného vzorce (I.0),



(I.0)

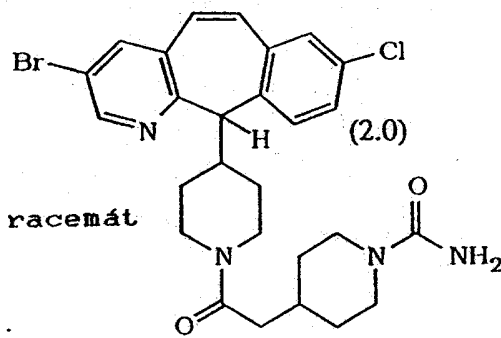
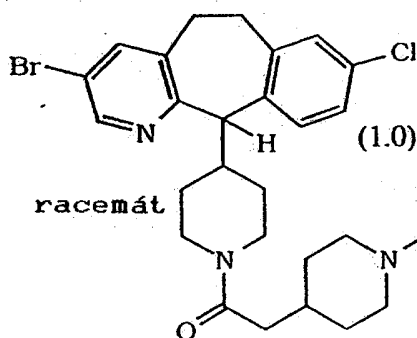
a jejich využití v metodě pro inhibici Ras funkce a abnormálního růstu buněk. Je popsáno množství sub-generických tříd sloučenin vzorce (I.0). Popis zahrnuje sloučeniny vzorců (V.0c), (V.1c) a (V.11a)



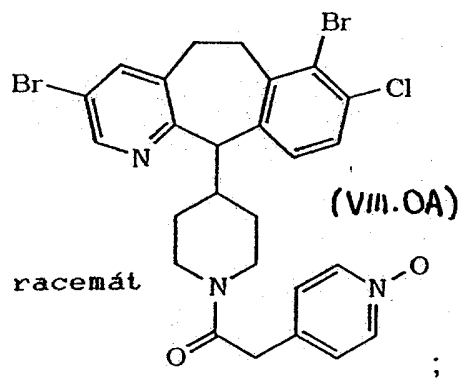
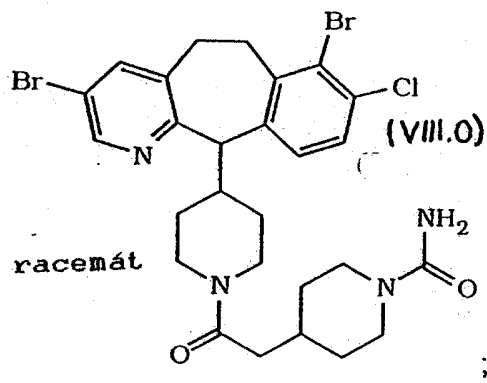
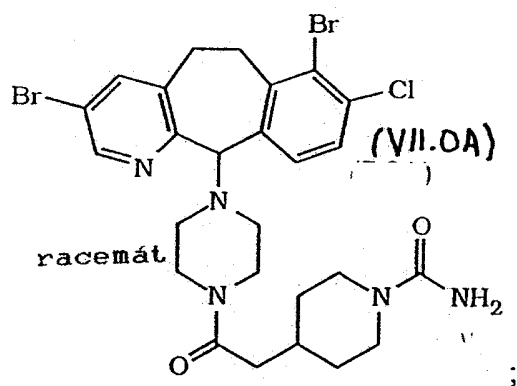
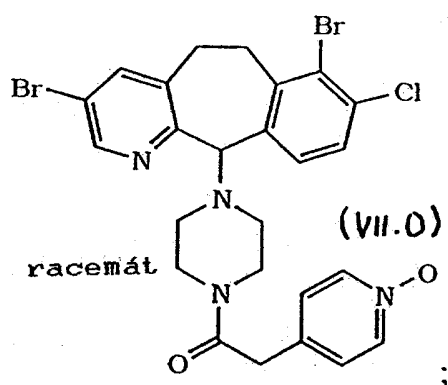
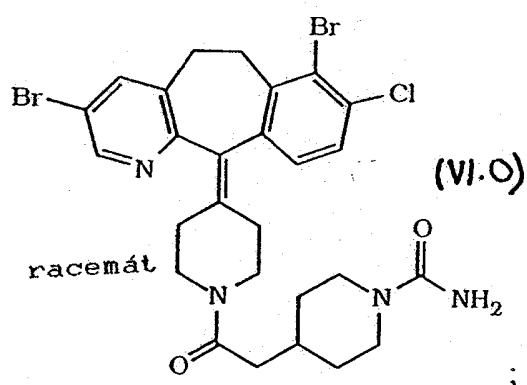
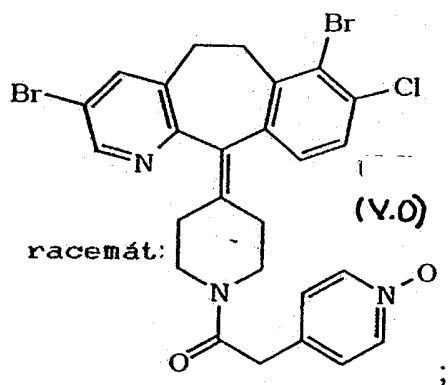
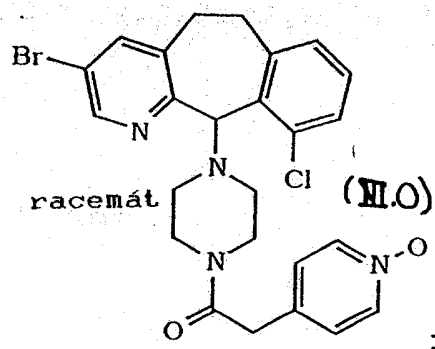
a také 11-R-isomer a 11-S-isomer sloučenin (V.0c) a (5.Ic). Je popsáno množství specifických sloučenin, které spadají do takových sub-generických sloučenin. Je zde také popsána biologická aktivita těchto sloučenin.

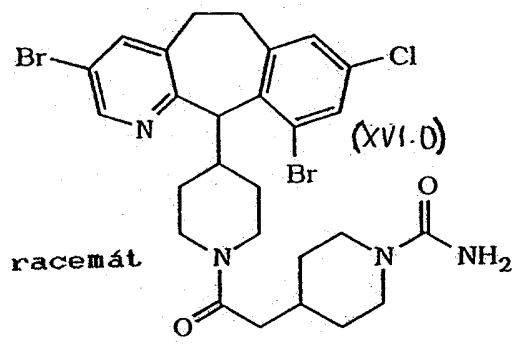
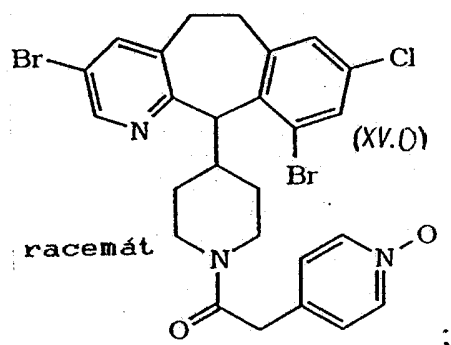
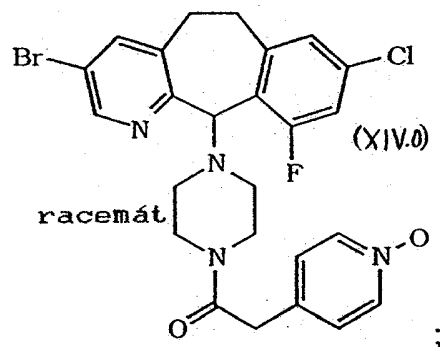
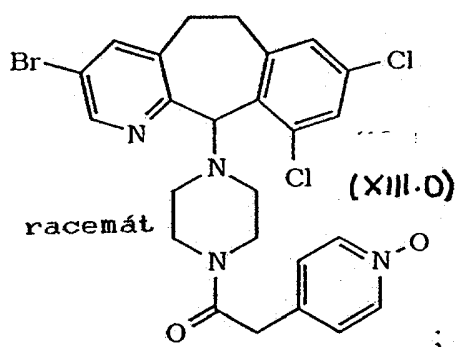
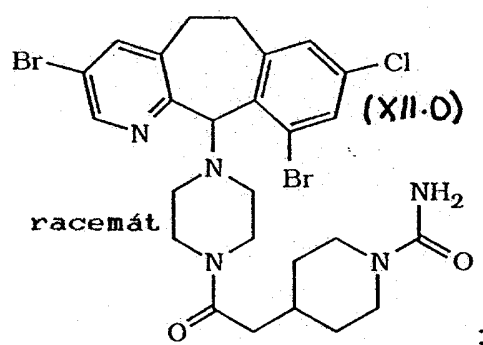
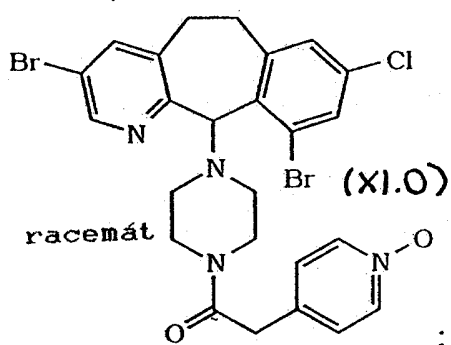
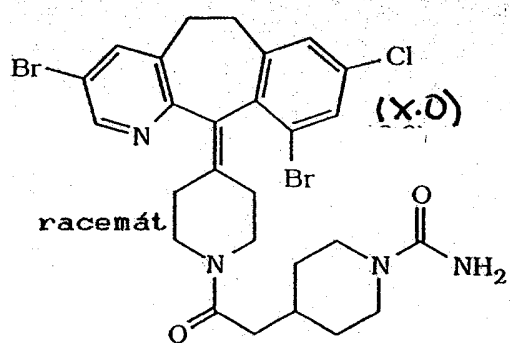
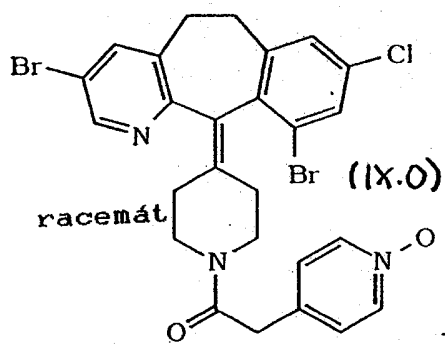
Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje nové tricyklické amidové sloučeniny, které jsou vybrány ze skupiny, která se skládá z:

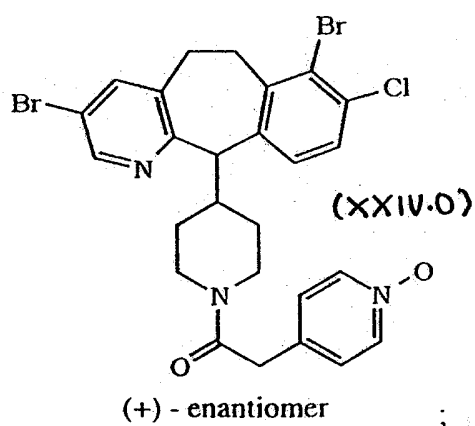
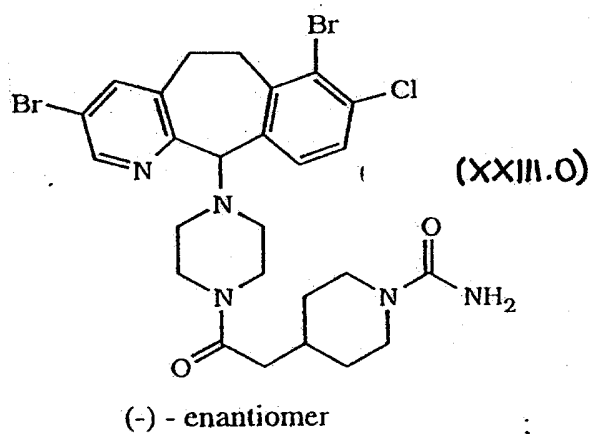
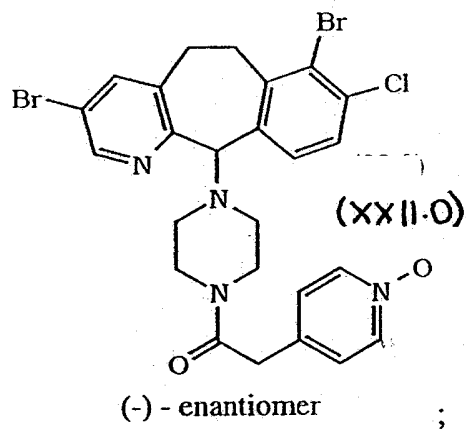
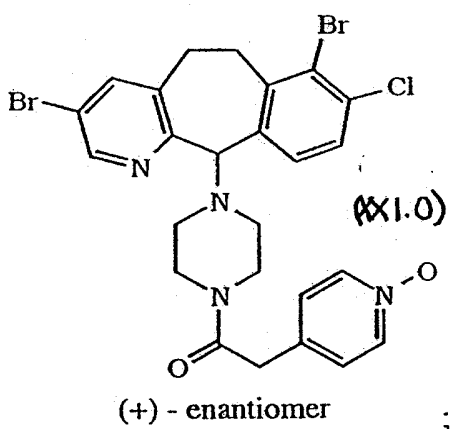
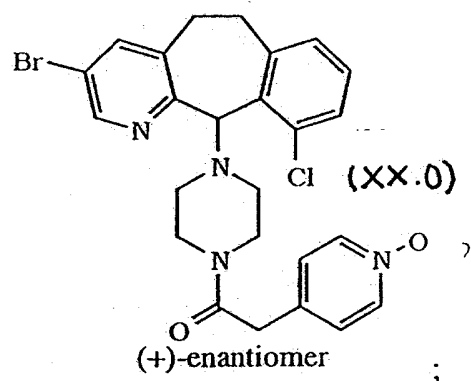
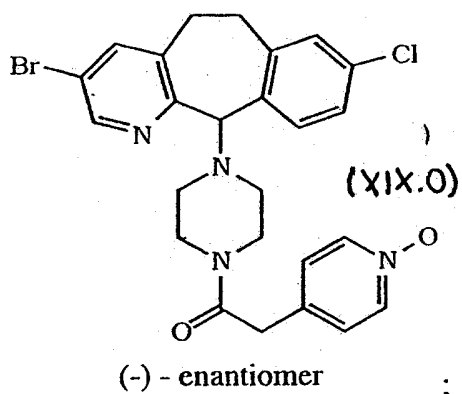
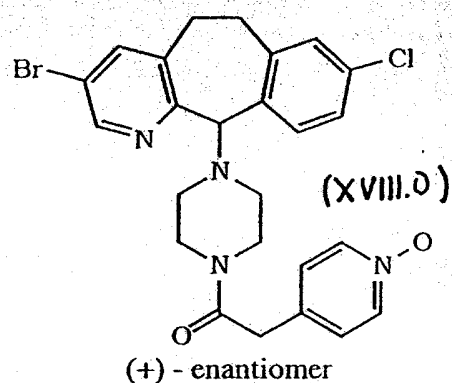
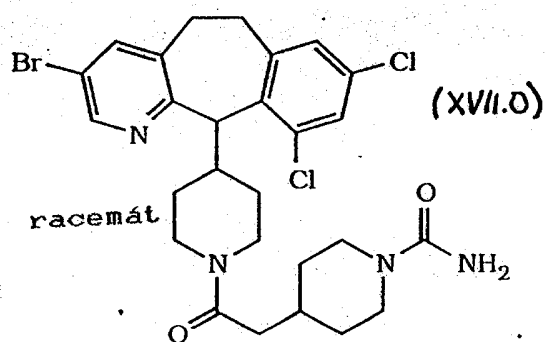


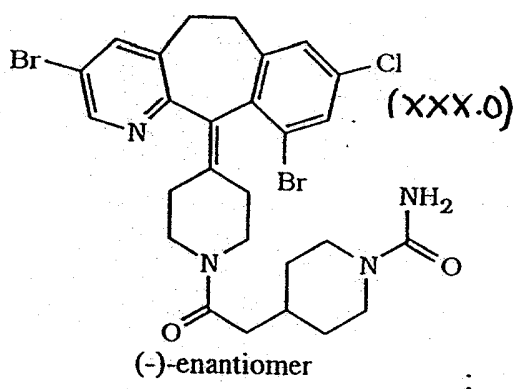
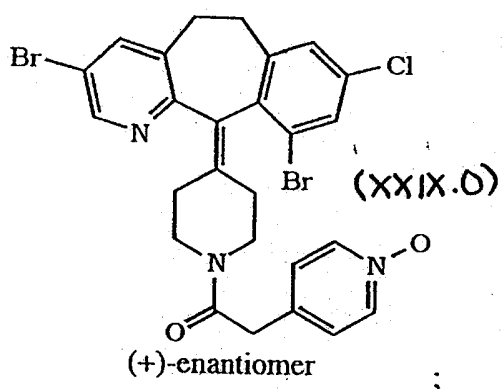
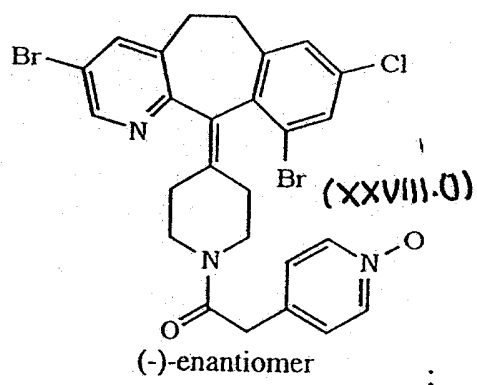
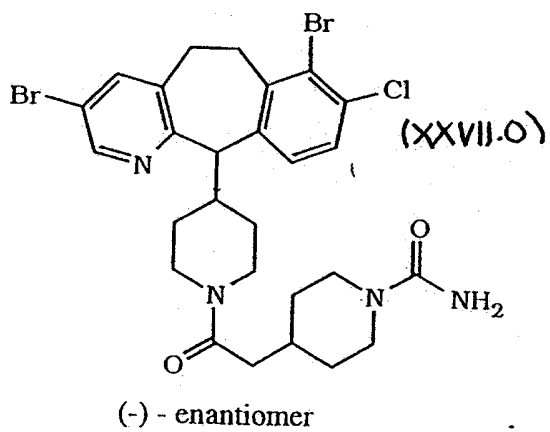
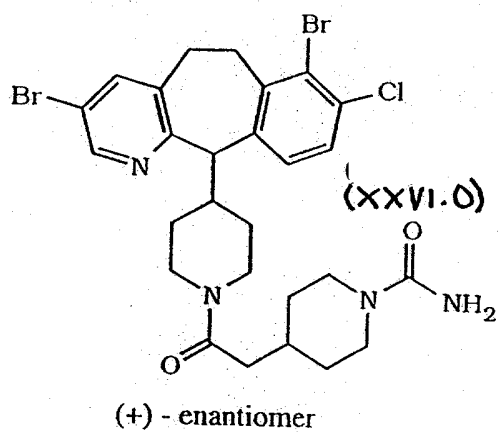
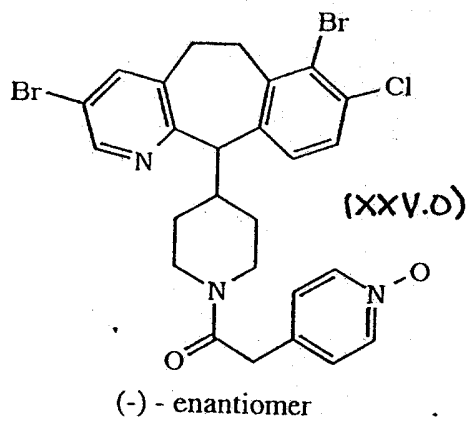
14.08.98

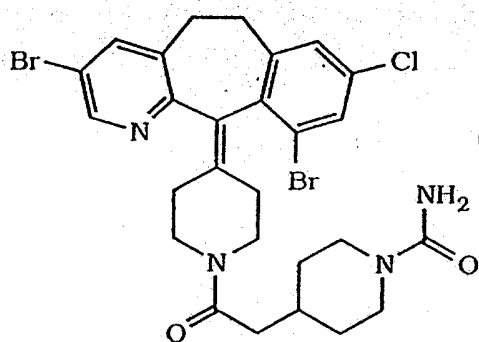




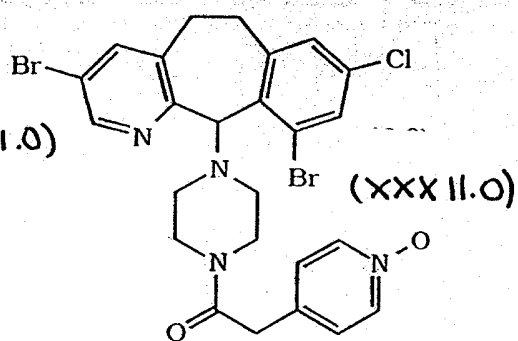
14.08.98



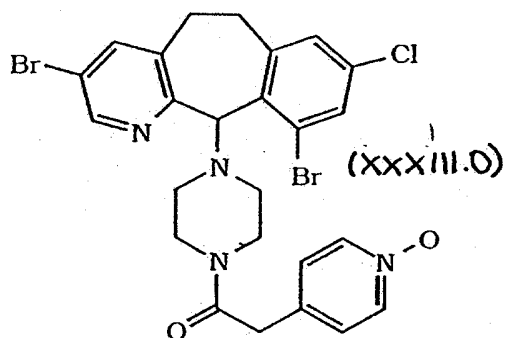




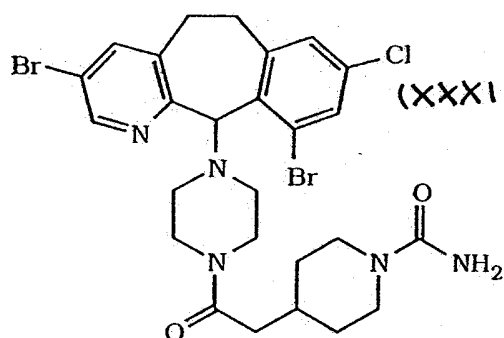
(XXXI.0)



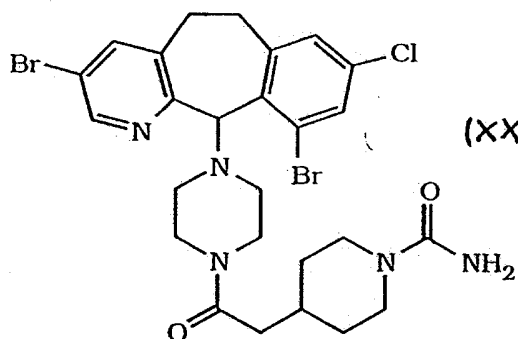
(XXXII.0)



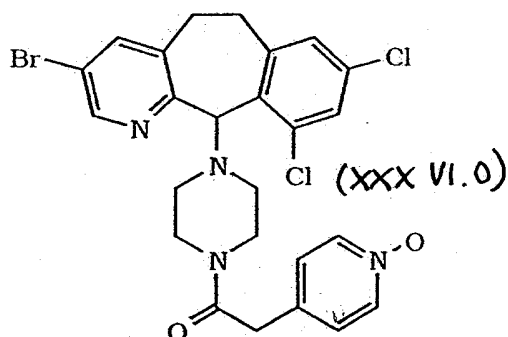
(XXXIII.0)



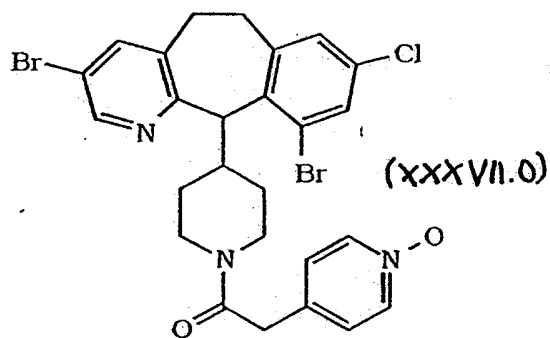
(XXXIV.0)



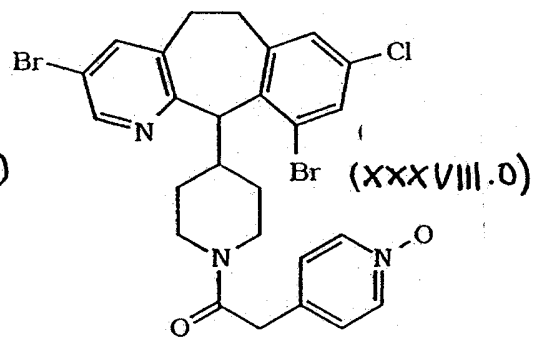
(XXXV.0)



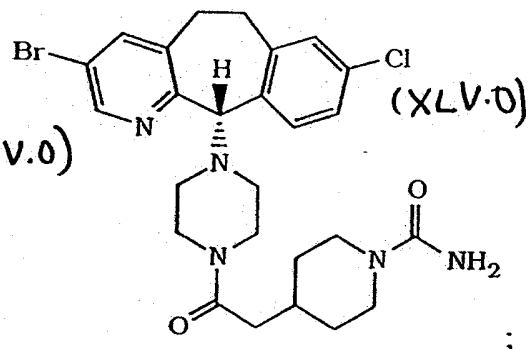
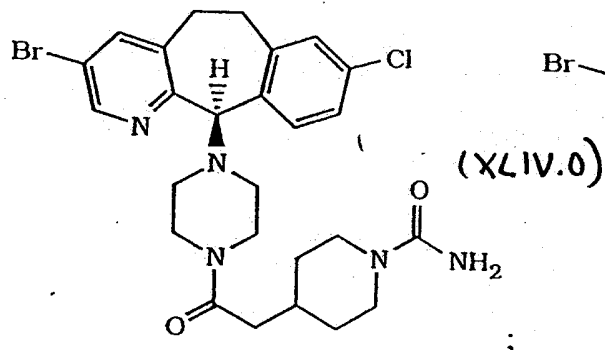
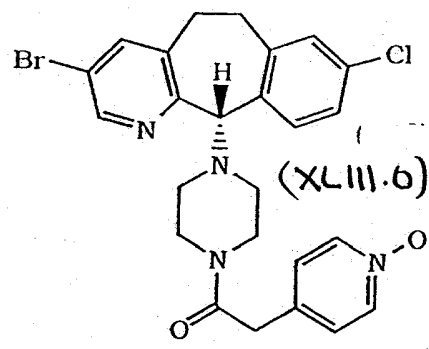
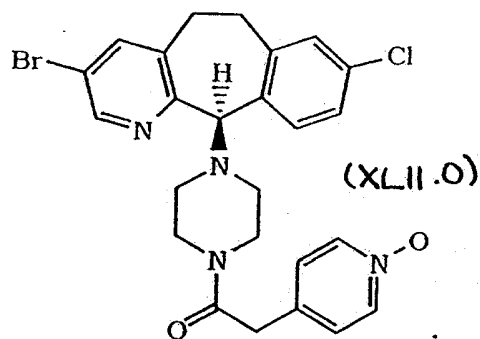
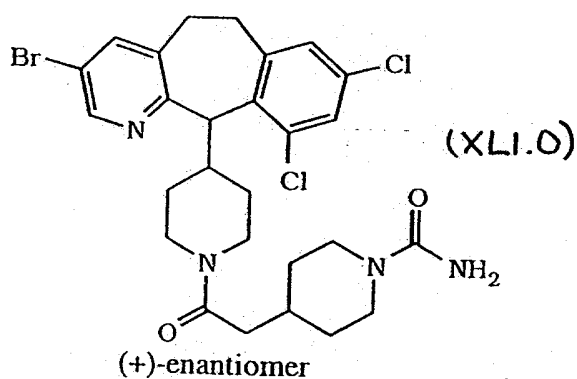
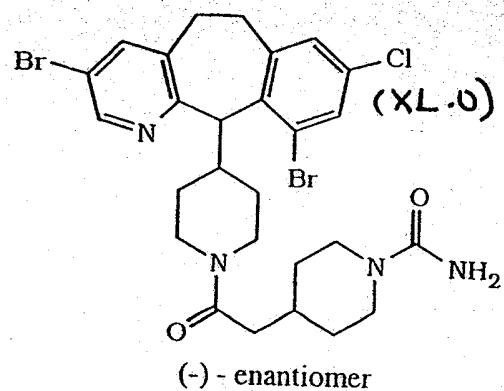
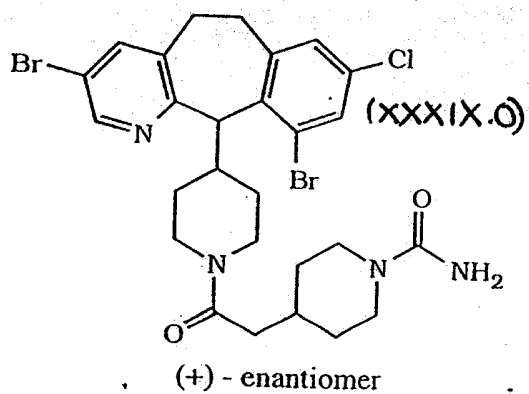
(XXXVI.0)

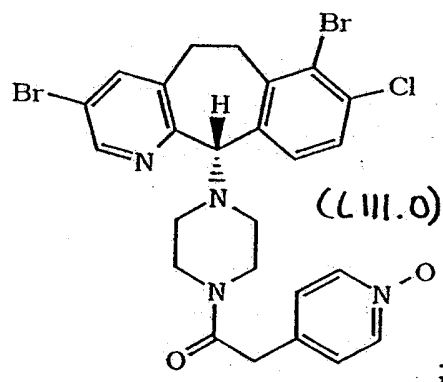
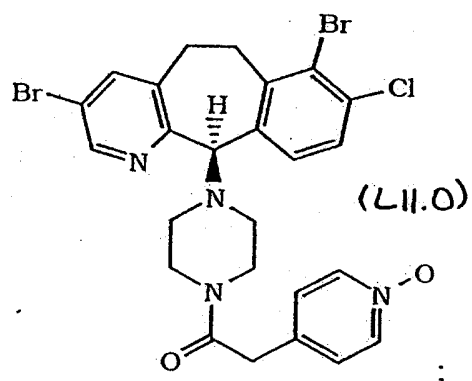
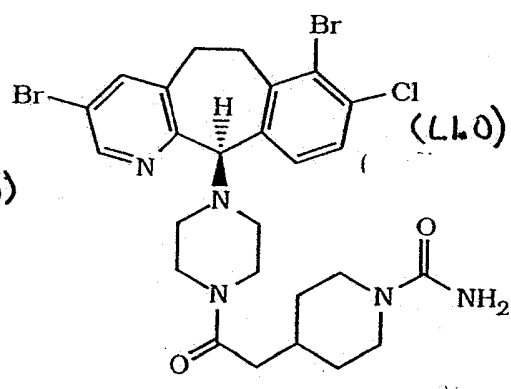
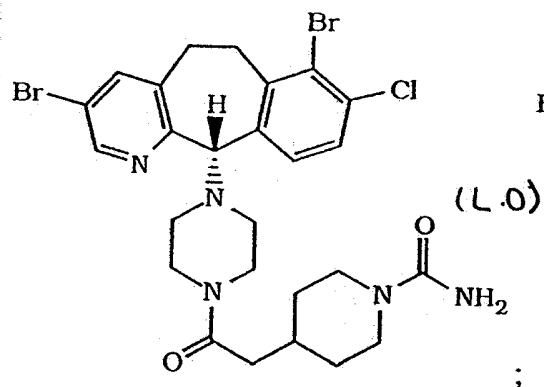
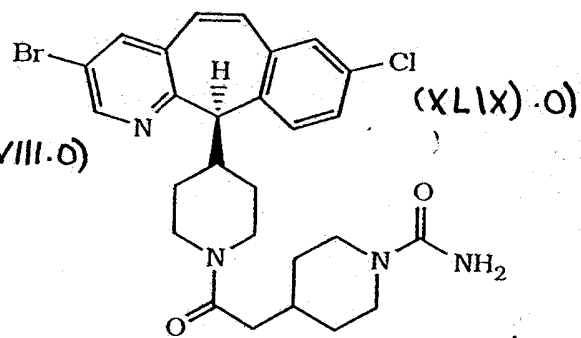
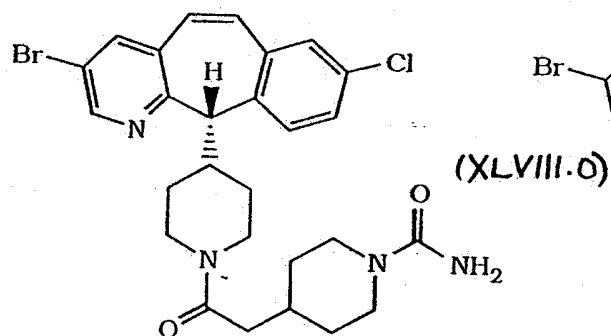
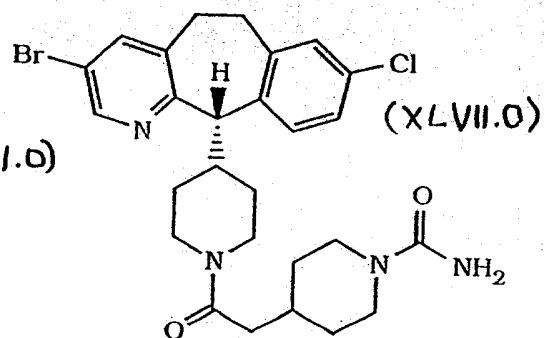


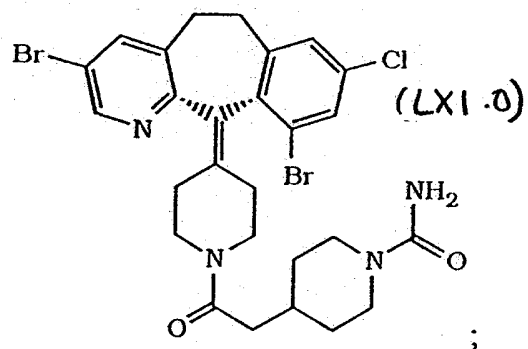
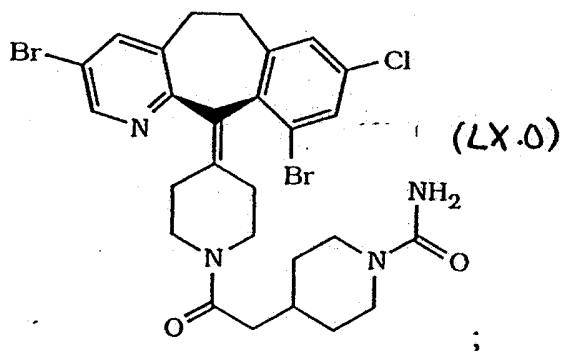
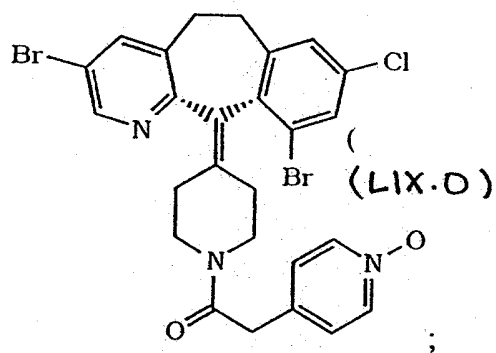
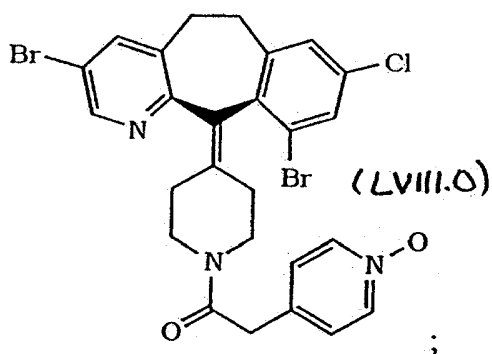
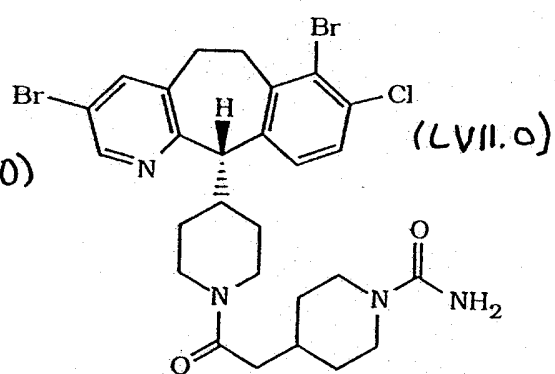
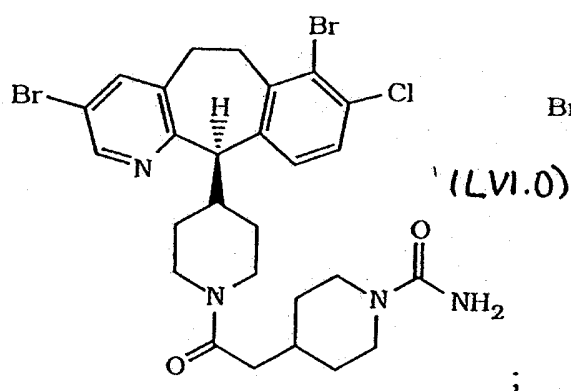
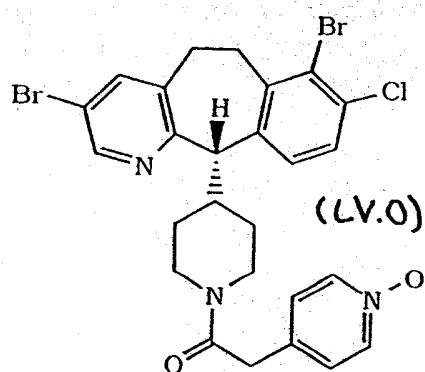
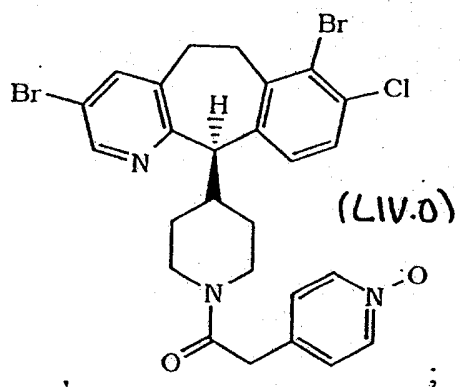
(XXXVII.0)



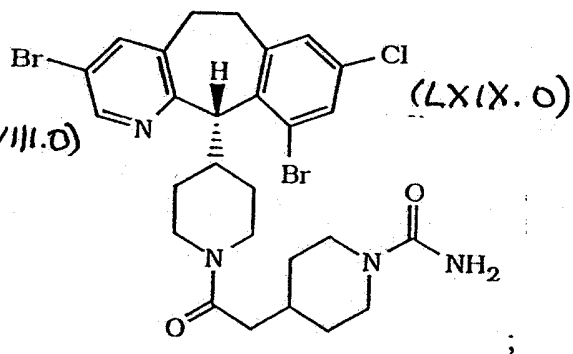
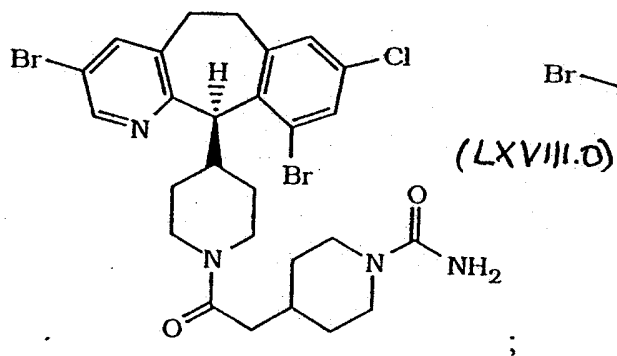
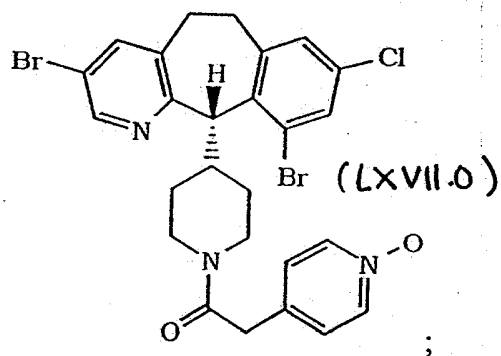
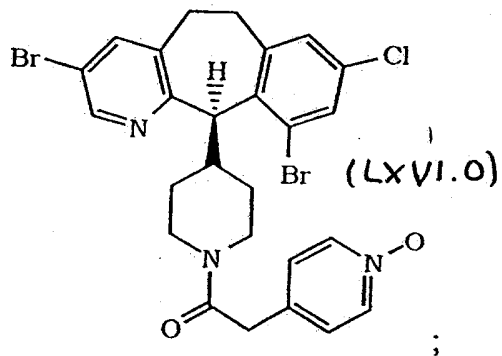
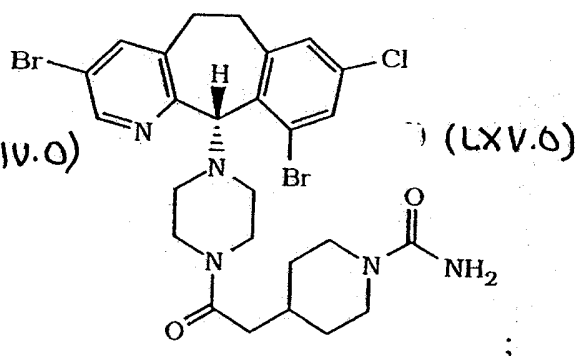
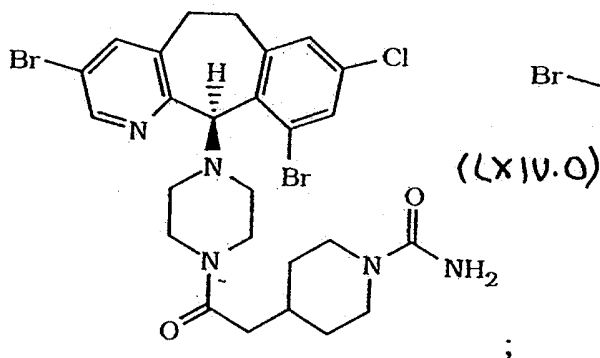
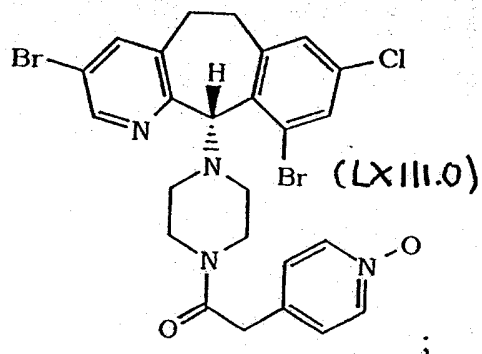
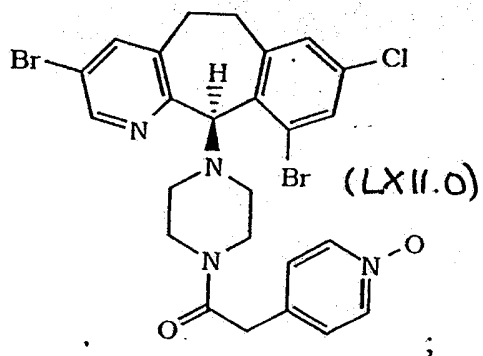
(XXXVIII.0)



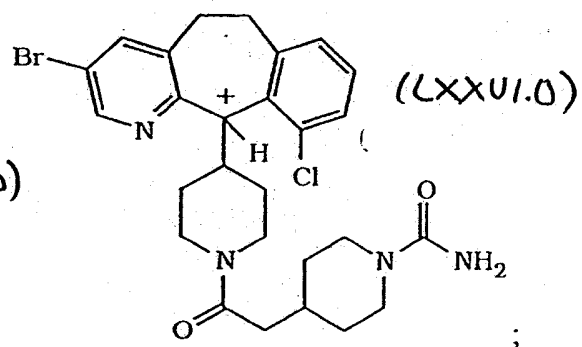
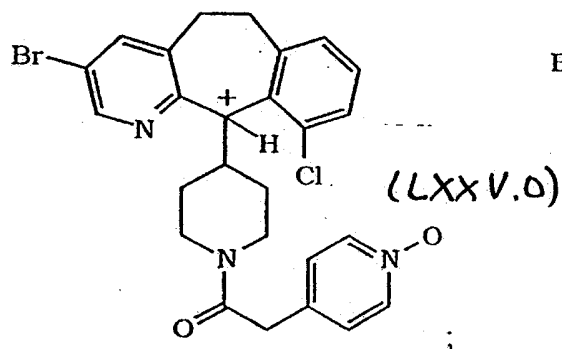
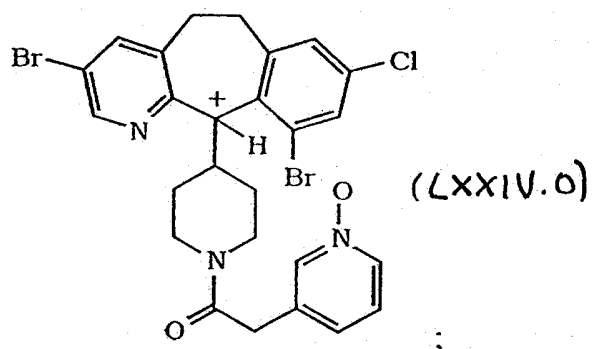
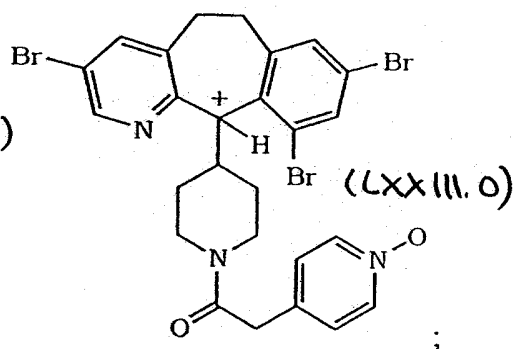
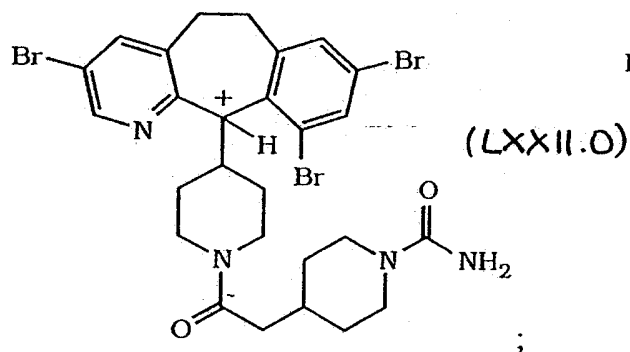
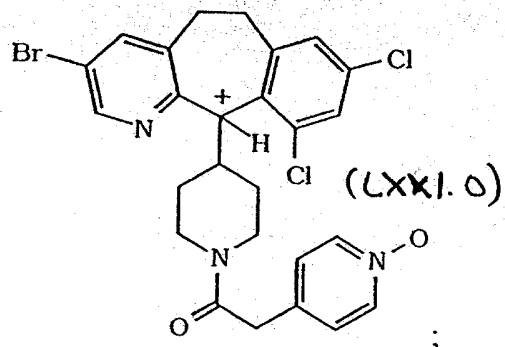
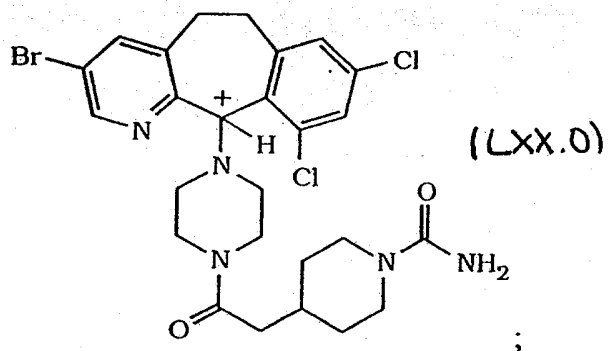




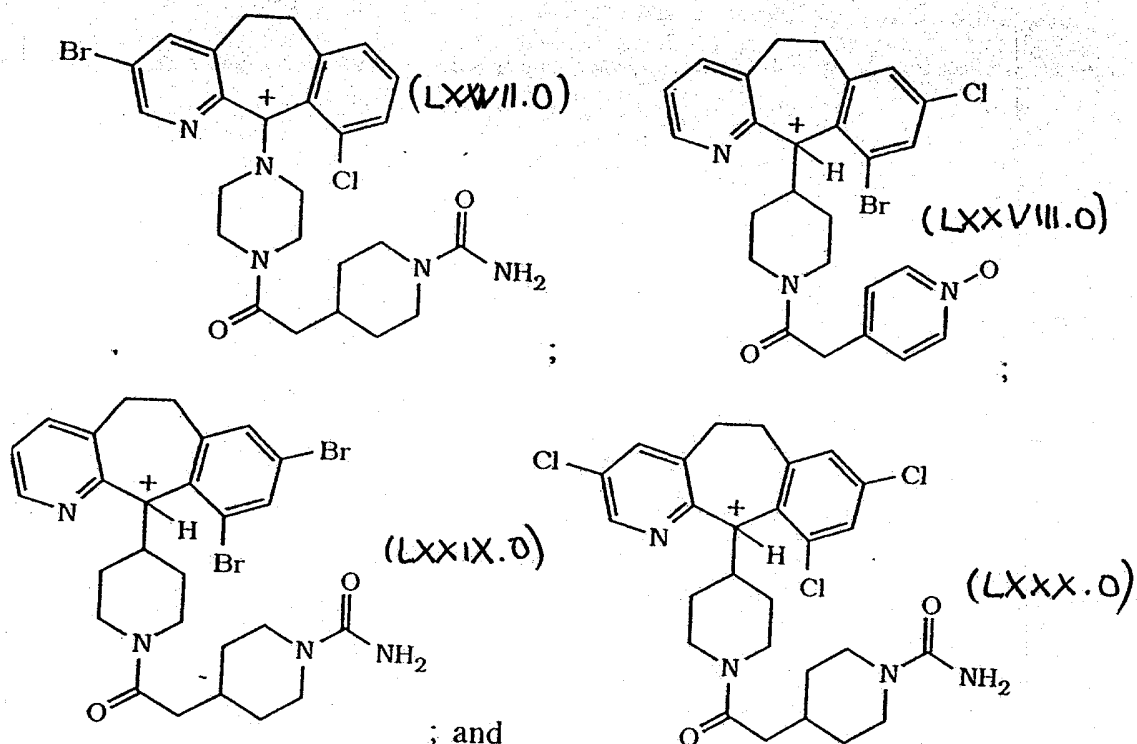
14.03.93



14.08.98



14.08.99



nebo z jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Optické otáčivosti sloučenin ((+) nebo (-)) jsou měřeny v methanolu nebo v ethanolu při 25°C.

Tento vynález zahrnuje výše uvedené sloučeniny v amorfním stavu nebo v krystalickém stavu.

Sloučeniny z tohoto vynálezu zahrnují sloučeniny, které jsou vybrány ze skupiny, která se skládá z: sloučenin I.0, II.0, III.0, V.0, VI.0, VII.0, VII.0A, VIII.0, VIII.0A, IX.0, X.0, XI.0, XII.0, XIII.0, XIV.0, XV.0, XVI.0 a XVII.0 nebo z jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde tyto sloučeniny jsou definované výše.

Sloučeniny z tohoto vynálezu také zahrnují sloučeniny, které jsou vybrány ze skupiny, která se skládá z: sloučenin XVIII.0, XIX.0, XX.0, XXI.0, XXII.0, XXIII.0, XXIV.0, XXV.0, XXVI.0, XXVII.0, XXVIII.0, XXIX.0, XXX.0, XXXI.0, XXXII.0, XXXIII.0, XXXIV.0, XXXV.0, XXXVI.0, XXXVII.0, XXXVIII.0, XXXIX.0, XL.0, a XLI.0 nebo z jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde tyto sloučeniny jsou definované výše.

Sloučeniny z tohoto vynálezu také zahrnují sloučeniny, které jsou vybrány ze skupiny, která se skládá z: (+)-enantiomerů sloučenin LXX.0, LXXI.0, LXXII.0, LXXIII.0, LXXIV.0, LXXV.0, LXXVI.0, LXXVII.0, LXXVIII.0, LXXIX.0, a LXXX.0 nebo z jejich

farmaceuticky přijatelných solí, kde tyto sloučeniny jsou definované výše.

Sloučeniny z tohoto vynálezu také zahrnují sloučeniny, které jsou vybrány ze skupiny, která se skládá z: sloučenin XLII.0, XLIII.0, XLIV.0, XLV.0, XLVI.0, XLVII.0, XLVIII.0, XLIX.0, L.0, LI.0, LII.0, LIII.0, LIV.0, LV.0, LVI.0, LVII.0, LVIII.0, LIX.0, LX.0, LXI.0, LXII.0, LXIII.0, LXIV.0, LXV.0, LXVI.0, LXVII.0, LXVIII.0, a LXIX.0, nebo z jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde tyto sloučeniny jsou definované výše.

Preferované sloučeniny zahrnují 3,7,8-trihalogensloučeniny, které mají optickou otáčivost (-). Například sloučeniny XXII.0, XXIII.0, XXV.0 a XXVII.

Preferované sloučeniny také zahrnují 3,8,10-trihalogensloučeniny, které mají optickou otáčivost (+). Například sloučeniny XXIX.0, XXXI.0, XXXII.0, XXXIV.0, XXXVI.0, XXXVII.0, XXXIX.0 a XLI.0.

Preferované sloučeniny také zahrnují 3,10-dihalogensloučeniny, které mají optickou otáčivost (+), například sloučeninu XX.0.

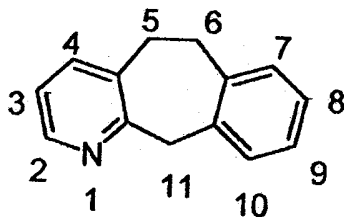
Preferované sloučeniny zahrnují také 3,10-dibrom-8-chlor-sloučeniny, které mají S konfiguraci v poloze C-11. Například sloučeniny L.0, LIII.0, LV.0, LVII.0.

Preferované sloučeniny také zahrnují 3,10-dibrom-8-chlorsloučeniny, které mají R konfiguraci v poloze C-11. Například sloučeniny LXII.0, LXIV.0, LXVI.0 a LXVIII.0.

Preferované sloučeniny také zahrnují sloučeniny XVI.0, XVII.0, XXXIX.0, XL.0, XLI.0, LXVIII.0 a LXIX.0.

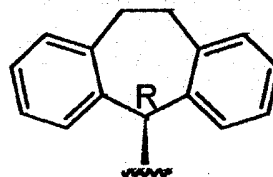
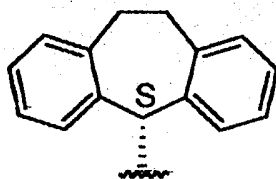
Více se dává přednost sloučeninám XVI.0, XXXIX.0, XL.0, LXVIII.0 a LXIX.0. Ještě více se dává přednost sloučeninám XVI.0, XXXIX.0, a LXVIII.0 a nejvíce se dává přednost sloučeninám XXXIX.0 nebo LXVIII.0.

Odborníkovi v oboru je zřejmé, že tricyklický systém je očíslován:



Odborníkovi v oboru je také zřejmé, že S a R konfigurace

vazby v poloze C-11 je:



Inhibice farnesyl protein transferázy tricyklickými sloučeninami z tohoto vynálezu nebyla dříve popsána.

Proto tento vynález poskytuje způsob pro inhibici farnesyl protein transferázy za použití tricyklických sloučenin z tohoto vynálezu které:

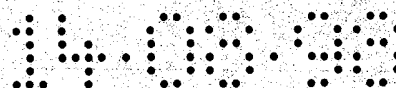
- (i) silně inhibují farnesyl protein transferázu, ale ne geranylgeranyl protein transferázu I, in vitro
- (ii) blokují fenotypovou změnu indukovanou formou transformujícího se Ras, který je akceptor farnesylu, ale ne změnu indukovanou formou transformujícího se Ras, který je akceptor geranylgeranyl zbytku
- (iii) blokují intrabuněčný vývoj Ras, který je akceptorem farnesylu, ale ne Ras, který je konstruován jako geranylgeranyl akceptor
- (iv) blokují abnormální růst buněk v kultuře, který je indukovaný transformujícím se Ras.

Ukazuje se, že sloučeniny z tohoto vynálezu vykazují protinádorovou aktivitu na zvířecích modelech.

Tento vynález poskytuje způsob pro inhibici abnormálního růstu buněk, který zahrnuje transformované buňky, podáváním účinného množství sloučeniny z tohoto vynálezu. Abnormální růst buněk se týká růstu buněk, který je závislý na normálních regulačních mechanismech (např. ztrátě kontaktní inhibice). Toto zahrnuje abnormální růst:

- (1) nádorových buněk (nádorů), které se vyznačují aktivovaným Ras onkogenem
- (2) nádorových buněk, ve kterých je Ras protein aktivován jako výsledek onkogenní mutace jiného genu
- (3) benigní a maligní buňky jiných proliferativních onemocnění, ve kterých se nenormální aktivace Ras vyskytuje.

Tento vynález se také týká způsobu inhibice růstu nádoru podáváním účinného množství tricyklické sloučeniny, která je zde popsána, savcům (např. lidem), kteří takovou léčbu



potřebují. Zejména tento vynález poskytuje způsob inhibice růstu nádorů, které se vyznačují aktivovaným Ras onkogenem, podáváním účinného množství výše popsaných sloučenin. Příklady nádorů, které lze inhibovat zahrnují, ale nevymezují: rakovinu plic (např. adenokarcinom plic), rakovinu pankreatu (např. karcinom pankreatu jako je exokrinní karcinom pankreatu), rakovinu tračníku (kolorektální karcinomy jako je např. adenokarcinom tračníku a adenom tračníku), myeloidní leukemie (například akutní myelogenní leukemii (AML)), thyroideální karcinom folikula, myelodysplastický syndrom (MDS), karcinom močového měchýře, epidermální karcinom, rakovinu prsu a prostaty.

Tento vynález také poskytuje způsob pro inhibici proliferativních onemocnění, jak benigních, tak maligních, kde jsou Ras proteiny nenormálně aktivovány jako výsledek onkogenní mutace jiných genů- t.j. Ras protein sám není aktivován mutací na onkogenní formu. Tato inhibice je prováděna podáváním účinného množství tricyklických sloučenin, které jsou zde popsány, savcům (např. lidem), kteří takovou léčbu potřebují. Například benigní proliferativní onemocnění neurofibromatosa, nebo nádor, ve kterém je Ras aktivován kvůli mutaci nebo přeznačení onkogeny tyrasin kinasy (např. neu, src, abl, lek, a fyn) lze inhibovat tricyklickými sloučeninami, které jsou zde popsány.

Sloučeniny z tohoto vynálezu inhibují farnesyl protein transferázu a farnesylovaný onkogenního proteinu Ras. Tento vynález dále poskytuje způsob inhibování Ras farnesyl protein transferázy u savců, zvláště u lidí, podáváním účinného množství tricyklických sloučenin, které jsou popsány výše. Podávání sloučenin z tohoto vynálezu pacientům, aby se inhibovala farnesyl protein transferáza, je užitečné v léčbě nádorů, které jsou popsány výše.

Tricyklické sloučeniny z tohoto vynálezu se používají ve způsobech z tohoto vynálezu, které inhibují abnormální růst buněk. Bez podložení teorií se uvažuje, že tyto sloučeniny mohou fungovat přes inhibici G-proteinové funkce, jako je ras p21, tím že blokuje isoprenylaci G-proteinu. Proto jsou užitečné při léčbě proliferativních onemocnění jako je růst nádoru nebo rakovina. Bez podložení teorií se uvažuje, že tyto sloučeniny inhibují ras farnesyl protein transferázu a právě

proto vykazují antiproliferativní aktivitu proti buňkám transformovaným ras.

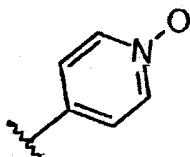
Příklady provedení vynálezu

Následující termíny, které jsou zde použity, jsou definovány níže, jestliže není jinak uvedeno.

M^+ odpovídá molekulárnímu iontu molekuly v hmotovém spektru.

MH^+ představuje molekulární ion plus atom vodíku v hmotovém spektru.

Pyridyl N-oxidy jsou zde representovány skupinou



Následující rozpouštědla a činidla jsou zde uvedena pod dále uvedenými zkratkami: tetrahydrofuran (THF), ethanol (EtOH), methanol (MeOH), kyselina octová (HOAc nebo AcOH), ethylacetát (EtOAc), N,N-dimethylformamid (DMF), kyselina trifluoroctová (TFA), anhydrid kyseliny trifluoroctové (TFAA), 1-hydroxybenzotriazol (HOBT), kyselina m-chlorperbenzoová (MCPBA), triethylamin (Et_3N), diethylether (Et_2O), chlormravenčan ethylnatý ($ClCO_2Et$), hydrochlorid 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimidu (DEC), diisobutylaluminium hydrid (DIBAL), isopropyl alkohol (iPrOH), dimethylsulfoxid (DMSO).

Určité sloučeniny z tohoto vynálezu existují v rozdílných isomerních formách (t.j. jako enantiomery nebo diastereomery), které zahrnují atropoisomery (t.j. sloučeniny, kde 7-členný kruh je ve fixní konformaci tak, že uhlíkový atom v poloze 11 je umístěn nad a nebo pod rovinu připojených benzenových kruhů kvůli přítomnosti brom substituentu v poloze 10). Vynález uvažuje všechny takové isomery, jak v čisté formě, tak ve směsích, které zahrnují i racemické směsi.

Určité základní tricyklické sloučeniny tvoří také farmaceuticky přijatelné soli, např. soli s kyselinami. Například pyrido-dusíkové atomy mohou tvořit sole se silnými kyselinami. Příklady vhodných kyselin pro tvorbu solí jsou kyseliny chlorovodíková, sírová, fosforečná, octová, citronová, šťavelová, malonová, salicylová, jablečná, fumarová, jantarová, askorbová, maleinová, methansulfonová a další minerální

a karboxylové kyseliny, které jsou v tomto oboru známe. Soli se připravují běžným způsobem smísením sloučeniny ve formě volné báse s dostatečným množstvím požadované kyseliny, tak aby vznikla sůl. Volná báse může být opět uvolněna ze soli působením vhodného zředěného vodného roztoku alkálie jako je zředěný vodný roztok hydroxidu sodného, uhličitanu draselného, hydroxidu amonného, hydrogenuhličitanu sodného. Formy volné báse se liší od odpovídajících solí v určitých fyzikálních vlastnostech jako je rozpustnost v polárních rozpouštědlech. Ale kyselé i zásadité soli jsou ekvivalentní s odpovídajícími formami volné báse pro účely tohoto vynálezu.

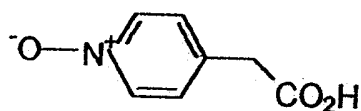
Všechny tyto sole jsou uvažovány, že jsou farmaceuticky přijatelné v rozsahu tohoto vynálezu a všechny jsou považovány za ekvivalentní k odpovídajícím formám volné báse sloučenin pro účely tohoto vynálezu.

Sloučeniny z tohoto vynálezu se připravují způsoby popsány níže.

Sloučenina z příkladu 10 je získána v krystalickém stavu. Odborník si uvědomí, že sloučeniny, které se získají v amorfním stavu se mohou převést do stavu krystalického dobře známými způsoby krystalizace amorfních materiálů z rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel jako je aceton, diethylether, ethylacetát, ethanol, 2-propanol, terc.butylether, voda a tak podobně.

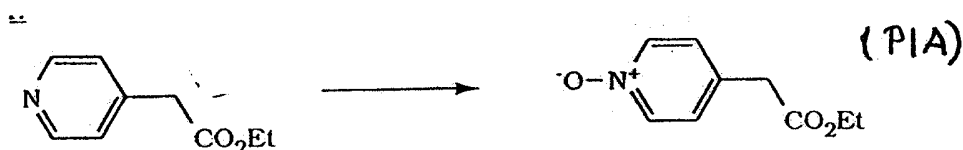
Odborník si uvědomí, že racemická směs sloučeniny VII.OA se připraví podle způsobu popsaného níže. Například meziprodukt z preparativního příkladu 6 se využije pro přípravu sloučeniny VII.OA.

Preparativní příklad 1



(PI)

Krok A:



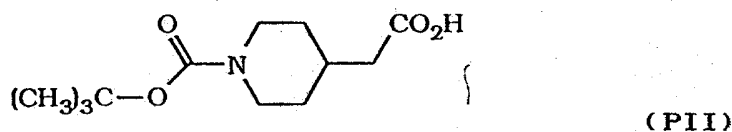
10g (60,5 mmol) ethyl 4-pyridylacetátu (PI) se smísí se 120ml suchého CH_2Cl_2 při -20°C , přidá se 10,45 g (60,5 mmol) MCPBA a míchá se při -20°C 1 hodinu a pak při 25°C 67 hodin. Pak se přidá dalších 3,48g (20,2 mmol) MCPBA a míchá se 24 hodin při 25°C . Reakční směs se zředí CH_2Cl_2 a promyje se nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 a vodou. Suší se MgSO_4 , zkoncentruje se ve vakuu do sucha a odparek se chromatografuje (silikagel 2%-5,5%, (10% NH_4OH v $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) a získá se 8,12g produktu PIA. Hmotové spektrum $\text{MH}^+ = 182, 15$.

Krok B:



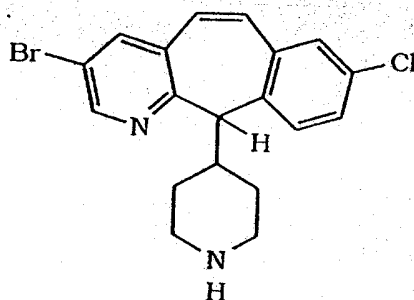
Smíchá se 3,5 g (19,3 mmol) produktu z kroku A (PIA), 17,5 ml EtOH a 96,6 ml 10% NaOH (vodného) a směs se zahřívá při 67°C 2 hodiny. pH se upraví 2N HCl (vodnou) na 2,37 a reakční směs se zkoncentruje ve vakuu do sucha. Přidá se 200ml suchého EtOH , zfiltruje se přes celit, filtrační koláč se promyje suchým EtOH (2x50ml). Spojené filtráty se zkoncentrují ve vakuu a poskytnou 2,43 g požadované sloučeniny (PI).

Preparativní příklad 2



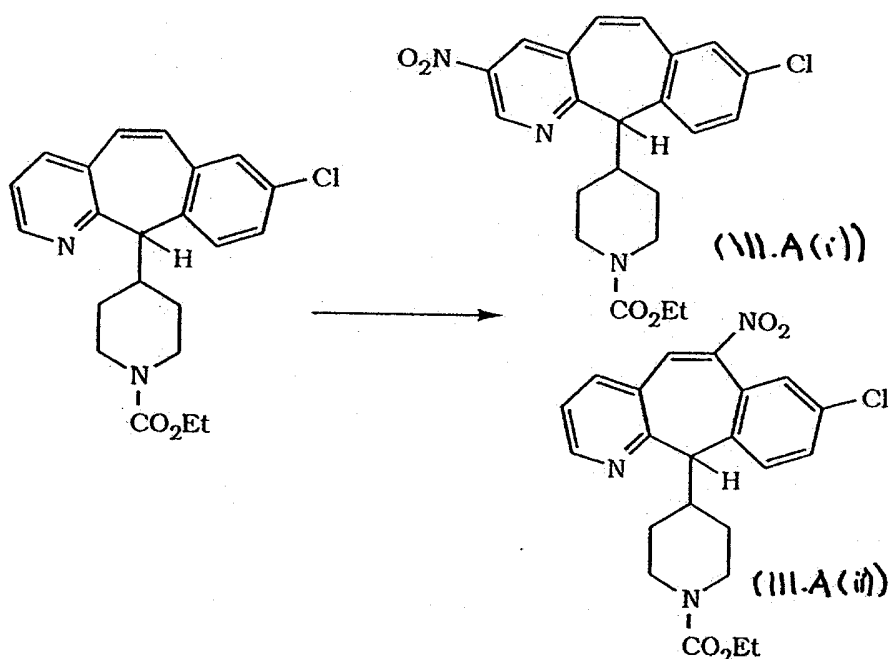
Požadovaná sloučenina PII se připravuje způsobem popsáním v PCT mezinárodní přihlášce č. W095/10516.

Preparativní příklad 3



(PIII)

Krok A:



14,95g

(39

mmol)

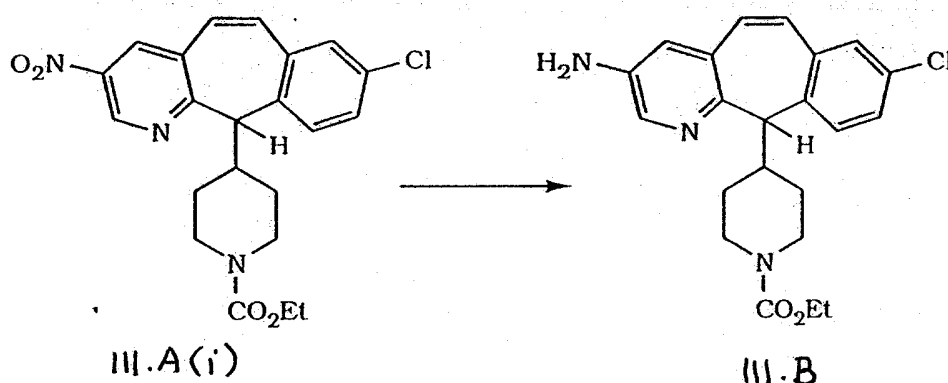
8-chlor-11-(1-ethoxykarbonyl-4-piperidiny)-11H-benzo[5,6]cyklohepta[1,2-b]pyridinu (III) se smísí se 150 ml CH_2Cl_2 , pak se přidá 13,07g (42,9 mmol) $(\text{nBu})_4\text{NNO}_3$ a směs se ochladí na 0°C . Pomalu po kapkách se během 1,5 hodiny přidá roztok 6,09 ml (42,9 mmol) TFAA v 20 ml CH_2Cl_2 . Směs se udržuje při 0°C přes noc, pak se opatrně promyje nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 , vodou a solankou. Organická fáze se suší Na_2SO_4 , zkoncentruje se ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, EtOAc/hexan, gradient) poskytne dva produkty, 4,32g sloučeniny IIIA(i) a 1,90g sloučeniny IIIA(ii).

Hmotové spektrum pro sloučeninu IIIA(i) $\text{MH}^+ = 428,2$

IIIA(ii) $\text{MH}^+ = 428,3$.

14.08.98

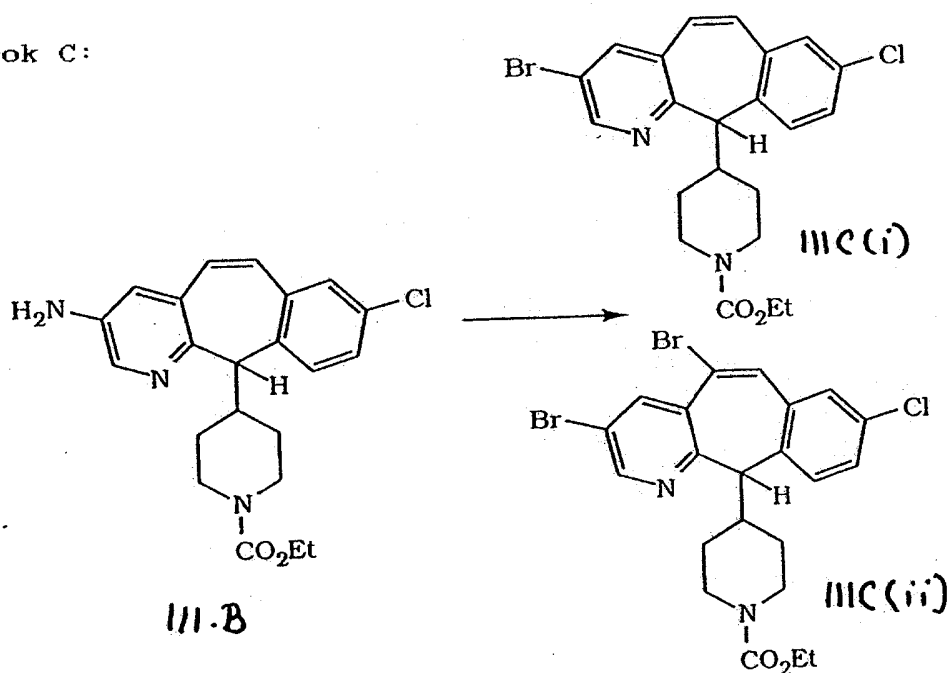
Krok B:



22,0 g (51,4 mmol) produktu IIIA(i) z kroku A se smísí se 150 ml 85% vodného EtOH, 25,85 g (0,463 mol) práškového železa a 2,42 g (21,8 mmol) CaCl₂ a zahřívá se k refluxu přes noc. Přidá se 12,4 g (0,222 mol) práškového železa a 1,2 g (10,8 mmol) CaCl₂ a reakční směs se zahřívá k refluxu ještě 2 hodiny. Horká reakční směs se zfiltruje přes Celit, celit se promyje 50 ml horkého EtOH a filtrát se zkoncentruje ve vakuu do sucha. Přidá se 100 ml bezvodého EtOH, zkoncentruje se do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, MeOH/CH₂Cl₂, gradient) poskytne 16,47 g produktu (IIIB).

MH⁺ = 398.

Krok C:

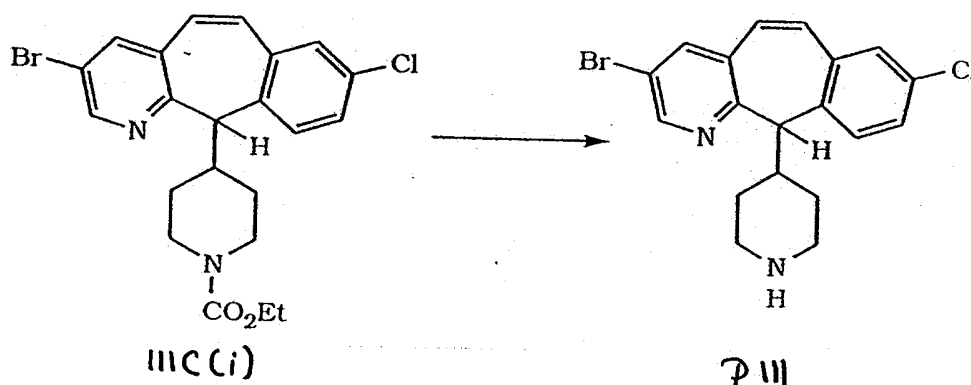


16,47 g (41,4 mmol) produktu z kroku B (IIIB) se smísí se 150 ml 48% HBr (vodného) a ochladí na -3°C . Pomalu se přidá (po kapkách) 18 ml bromu, pak se pomalu (po kapkách) přidá roztok 8,55 g (0,124 mol) NaNO_2 v 85 ml vody. Reakční směs se míchá 45 min při teplotě od -3°C do 0°C , pak se upraví pH na hodnotu 10 přidávkem 50% vodného roztoku NaOH. Extrahuje se EtOAc, extrakty se promyjí solankou a suší se Na_2SO_4 . Zkoncentrují se do sucha a chromatografují (silikagel, EtOAc/hexan, gradient). Získají se dva produkty, 10,6 g sloučeniny IIIC(i) a 3,28 g sloučeniny IIIC(ii).

Hmotová spektra pro sloučeninu IIIC(i) $\text{MH}^+ = 461,2$

IIIC(ii) $\text{MH}^+ = 539$.

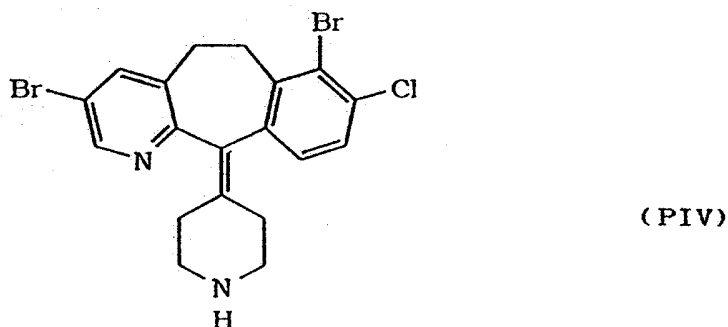
Krok D:



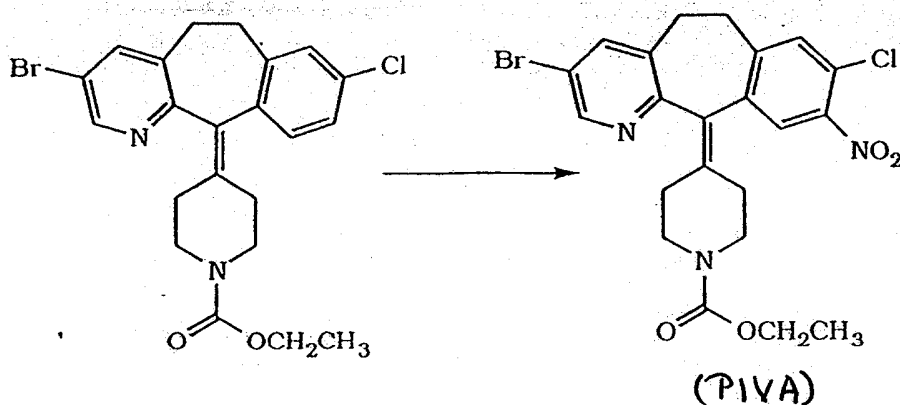
Produkt IIIC(i) z kroku C se hydrolyzuje rozpouštěním v koncentrované HCl a zahříváním na teplotu 100°C po dobu 16 hodin. Směs se ochladí, pak se zneutralizuje 1M vodným roztokem NaOH. Směs se extrahuje CH_2Cl_2 , extrakty se suší MgSO_4 , zfiltrují se a zkoncentrují ve vakuu na požadovanou sloučeninu (PIII).

Hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 466,9$.

Preparativní příklad 4



Krok A:



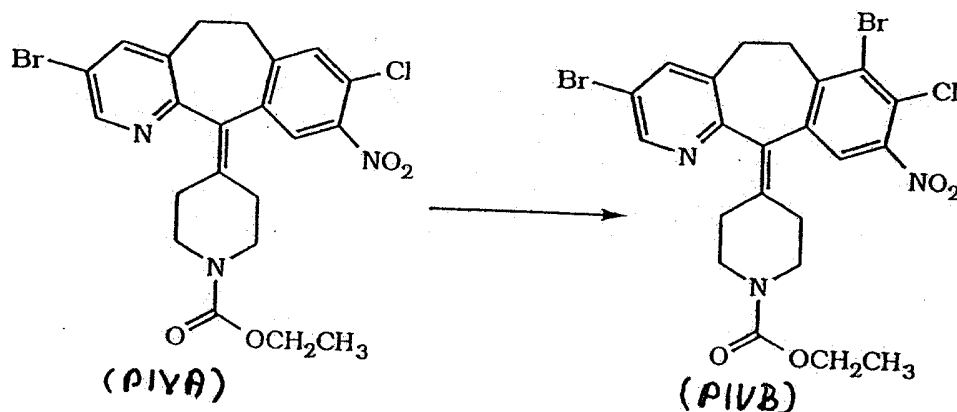
25,86 g (55,9 mmol) ethylesteru 4-(8-chlor-3-brom-5,6-dihydro-11Hbenzo[5,6]cyklohepta[1,2]pyridin-11-yliden)-1-piperidin-1-karboxylové kyseliny (IV) se smísí s 250 ml koncentrované H_2SO_4 při -5°C , pak se přidá 4,8 g (56,4 mmol) NaNO_3 a míchá se 2 hodiny. Směs se nalije na 600 g ledu a zalkalizuje koncentrovaným vodným roztokem NH_4OH . Směs se zfiltruje, promyje 300 ml vody, pak se extrahuje 500 ml CH_2Cl_2 . Extrakt se promyje 200 ml vody, suší se MgSO_4 , pak se zfiltruje a zkoncentruje ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 10% $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) poskytne 24,4 g (86 %) produktu (PIVA).

t.t. = $165-167^\circ\text{C}$

Hmotové spektrum $\text{MH}^+ = 506$ (CI)

Elementární analýza: vypočteno: C 52,13, H 4,17, N 8,29
nalezeno : C 52,18, H 4,51, N 8,16

Krok B:



20 g (40,5 mol) produktu z kroku A (PIVA) a 200 ml koncentrované H_2SO_4 se smísí při 20°C . Pak se směs ochladí na

0°C. Do směsi se přidá 7,12 g (24,89 mmol) 1,3-dibrom-5,5-dimethylhydantoinu a míchá se 3 hodiny při 20°C. Reakční směs se ochladí na 0°C a přidá se další 1,0 g (3,5 mmol) dibromhydantoinu a míchá se při 20°C 2 hodiny. Směs se nalije na 400 g ledu, zalkalizuje se koncentrovaným vodným roztokem NH_4OH při 0°C. Výsledná pevná látka se spojí filtrací. Pevná látka se promyje 300 ml vody, rozmíchá se ve 200 ml acetonu na kaši a zfiltruje se. Získá se 19,79 g (85,6%) produktu (PIVB).

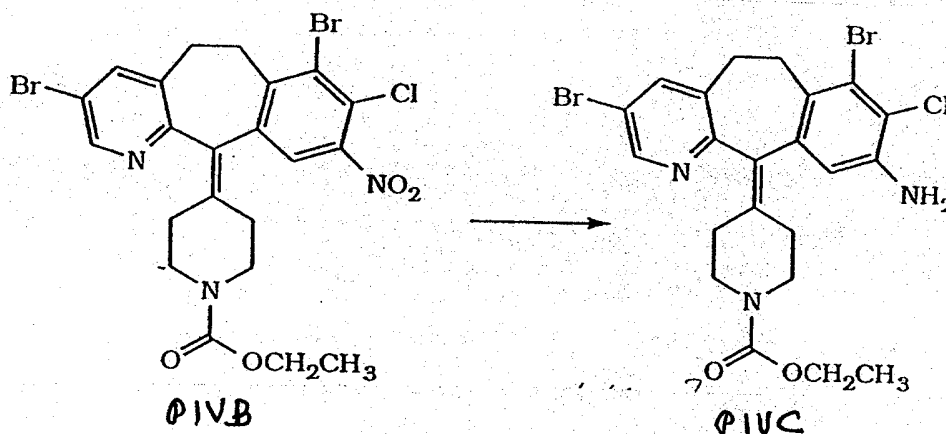
t.t. = 236-237°C

Hmotové spektrum MH^+ = 584 (CI)

Elementární analýza: vypočteno: C 45,11, H 3,44, N 7,17

nalezeno: C 44,95, H 3,57, N 7,16.

Krok C:



25 g (447 mmol) železných pilin se smísí s 10 g (90 mmol) CaCl_2 a suspenzí 20 g (34,19 mmol) produktu z kroku B (PIVB) v 700 ml 90:10 EtOH/voda při 50°C. Směs se zahřívá k refluxu přes noc, zfiltruje se přes celit, filtrační koláč se promyje 2x 200 ml horkého EtOH. Filtráty a proplachy se spojí a koncentrují ve vakuu do sucha. Odparek se extrahuje 600 ml CH_2Cl_2 , promyje 300 ml vody a suší se MgSO_4 . Zfiltruje se a zkoncentruje se ve vakuu do sucha. Pak se chromatografuje (silikagel, 30% EtOAc/ CH_2Cl_2) a získá se 11,4 g (60%) produktu (PIVC).

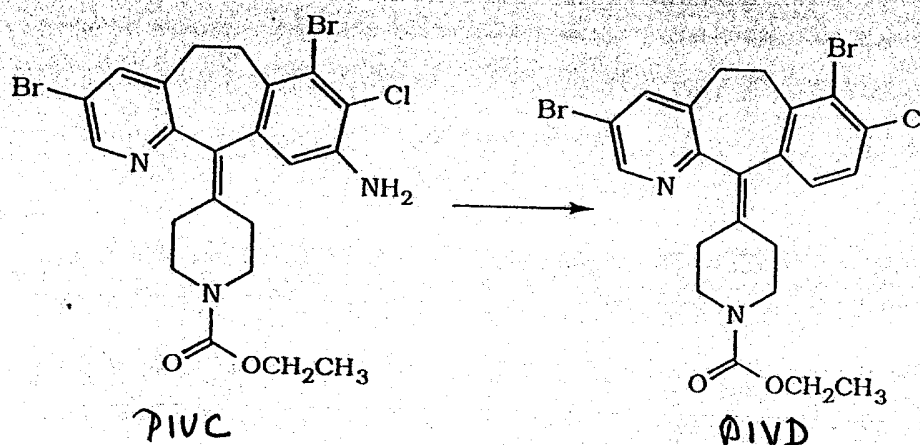
t.t. = 211-212°C

Hmot. spek.: MH^+ = 554 (CI)

Elementární analýza: vypočteno: C 47,55, H 3,99, N 7,56

nalezeno: C 47,45 H 4,31, N 7,49.

Krok D:



Pomalů (po částech) se přidá při -10°C 20 g (35,9 mmol) produktu z kroku C (PIVC) do roztoku 8 g (116 mmol) NaNO_2 ve 120 ml koncentrované vodné HCl . Výsledná směs se míchá při 0°C po 2 hodiny. Pak se pomalu (po kapkách) při 0°C přidává 150 ml (1,44 mol) 50% H_3PO_2 po dobu 1 hodiny. Míchá se při 0°C 3 hodiny, pak se nalije na 600 g ledu a zalkalizuje se koncentrovaným vodným NH_4OH . Extrahuje se 2x300 ml CH_2Cl_2 , extrakty se suší MgSO_4 . Zfiltrují se a zkoncentrují ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 25% EtOAc /hexan) poskytne 13,67 g (70%) produktu PIVD).

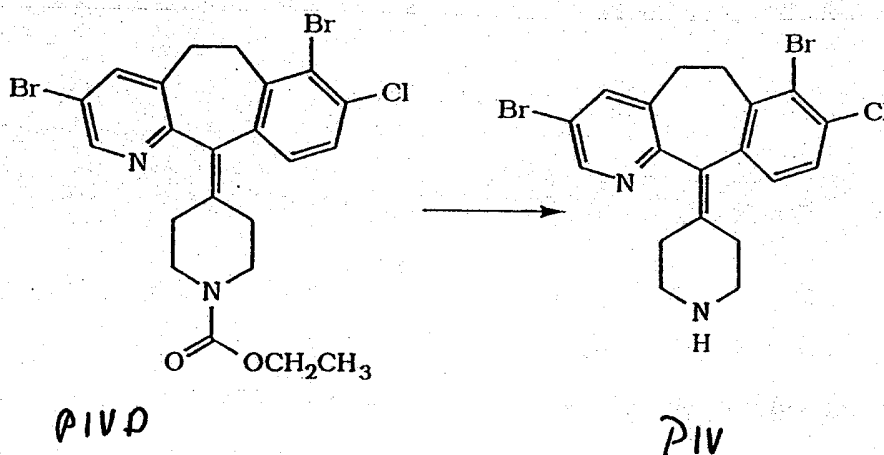
t.t. = $163-165^{\circ}\text{C}$

Hmot. spek.: $\text{MH}^+ = 539$ (CI)

Elementární analýza: vypočteno: C 48,97, H 4,05, N 5,22

nalezeno: C 48,86, H 3,91, N 5,18

Krok E:



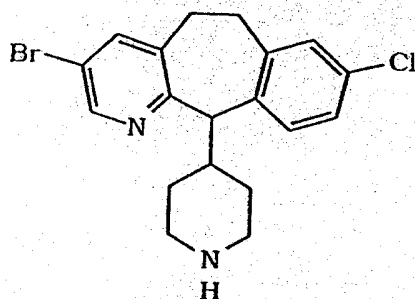
6,8 g (12,59 mmol) produktu z kroku D (PIVD) se smísí se 100 ml koncentrované vodné HCl a míchá při 85°C přes noc. Směs se

ochladí a nalije na 300 g ledu, zalkalizuje se koncentrovaným vodným roztokem NH_4OH . Extrahuje se 2 x 300 ml CH_2Cl_2 , extrakty se pak suší MgSO_4 . Zfiltrují se, zkoncentrují ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 10% MeOH/EtOAc + 2% NH_4OH (vodný)) poskytne 5,4 g (92%) požadované sloučeniny (PIV).
t.t. = 172-174°C

Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 467$

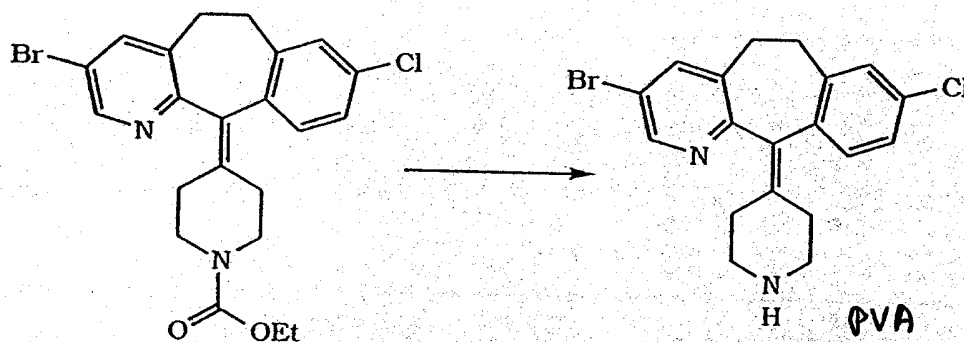
Elementární analýza: vypočteno: C 48,69, H 3,65, N 5,97
nalezeno: C 48,83, H 3,80, N 5,97

Preparativní příklad 5



(PV)

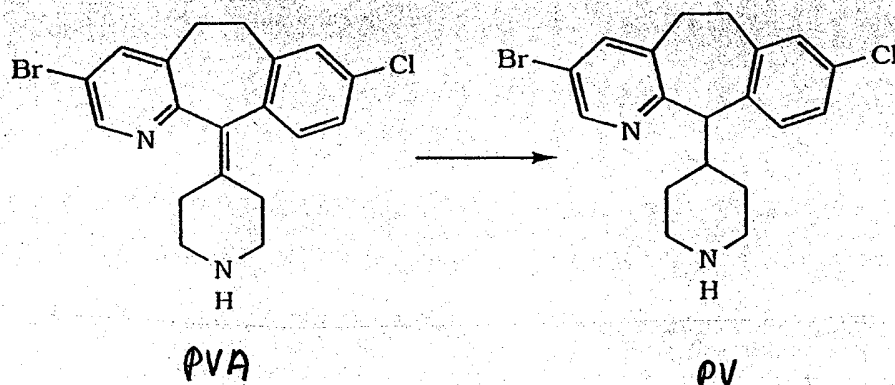
Krok A:



2,42 g ethylesteru kyseliny 4-(8-chlor-3-brom-5,6-dihydro-11H-benzo[5,6]cyklohepta[1,2-b]pyridin-11-yliden)-1-piperidinkarboxylové se hydrolyzuje stejným způsobem, který je popsán v preparativním příkladu 3, krok D a poskytne 1,39 g (69%) produktu (PVA).

$\text{MH}^+ = 389$.

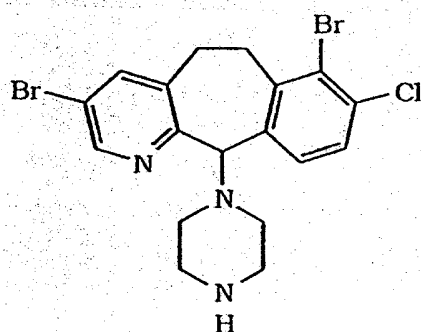
Krok B:



1g (2,48 mmol) produktu z kroku A (PVA) se smíchá s 25 ml suchého toluenu, přidá se 2,5 ml 1M DIBAL v toluenu a směs se zahřeje k refluxu. Po 0,5 hodině se přidá dalších 2,5 ml 1M DIBAL v toluenu a zahřívá se k refluxu 1 hodinu. (Reakce je sledována TLC za použití 50% MeOH/CH₂Cl₂ + NH₄OH(vodný).) Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti, přidá se 50 ml 1N HCl (vodný) a míchá se 5 minut. Přidá se 100 ml 1N NaOH (vodný) a pak se extrahuje EtOAc (3 x 150 ml). Extrakty se suší MgSO₄, zfiltrují se a zkoncentrují ve vakuu do sucha. Získá se 1,1g požadované sloučeniny (PV).

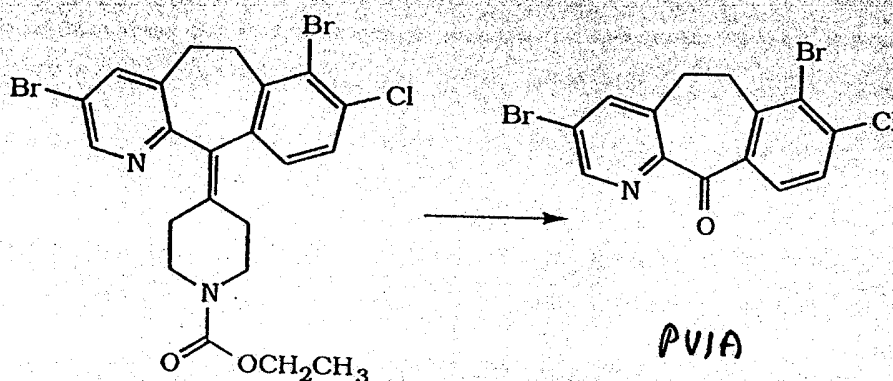
MH⁺ = 391.

Preparativní příklad 6



(PVI)

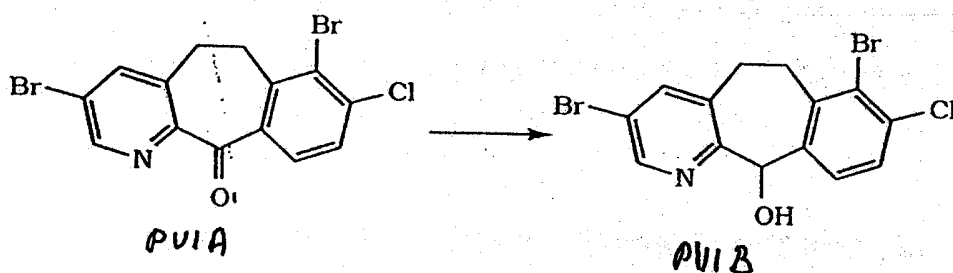
Krok A:



16,6 g (0,03 mol) produktu z preparativního příkladu 4, krok D (PIVD) se smísí s 3:1 roztokem CH_3CN a vody (212,65 ml CH_3CN a 70,8 ml vody) a výsledná kaše se míchá přes noc při teplotě místnosti. Přidá se 32,833 g (0,153 mol) NaIO_4 a pak 0,31 g (2,30 mmol) RuO_2 a pak se míchá při teplotě místnosti (přídavek RuO_2 je spojen s exotermní reakcí, teplota směsi vzroste z 20°C na 30°C). Směs se míchá 1,3 hodiny (teplota klesne zpět na 25°C během 30 minut). Reakční směs se zfiltruje, aby se odstranila pevná fáze. Pevná fáze se promyje CH_2Cl_2 . Filtrát se zkoncentruje ve vakuu do sucha a odparek se rozpustí v CH_2Cl_2 . Zfiltruje se, aby se odstranily nerozpouštěné částice, které se promyjí CH_2Cl_2 . Filtrát se promyje vodou, zkoncentruje na objem 200 ml a promyje bělidlem a pak vodou. Extrahuje se 6N HCl (vodnou). Vodný podíl se ochladí na 0°C a pomalu se přidává 50% vodný roztok NaOH , kterým se upraví $\text{pH} = 4$. Teplota při přidávání se udržuje pod 30°C . Pak se 2 x extrahuje CH_2Cl_2 , extrakty se suší MgSO_4 a zkoncentrují ve vakuu do sucha. Odparek se rozmíchá na kaši v 20 ml EtOH a ochladí na 0°C . Výsledná pevná látka, která se spojí na filtru, se suší ve vakuu. Získá se 7,95 g produktu (PVIA).

^1H MNR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,7(s, 1H), 7,85(m, 6H), 7,5(d, 2H), 3,45(m, 2H), 3,15(m, 2H).

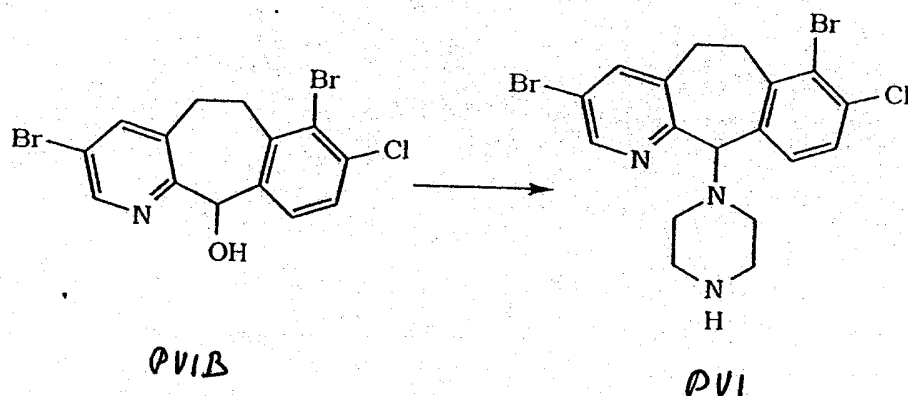
Krok B:



21,58 g (53,75 mmol) produktu z kroku A (PVIA) se smíchá s 500 ml bezvodé 1:1 směsí EtOH a toluenu, přidá se 1,43 g (37,8 mmol) NaBH₄ a směs se zahřívá k refluxu 10 min. Směs se ochladí na 0°C, přidá se 100 ml vody a pH se upraví na 4-5 1M HCl (vodnou), zatímco se teplota udržuje pod 10°C. Přidá se 250 ml EtOAc a vrstvy se oddělí. Organická vrstva se promyje solankou (3 x 50ml), pak se suší Na₂SO₄. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha (24,01g). Chromatografie odparku (silikagel, 30% hexan/CH₂Cl₂) poskytne produkt. Čisté frakce byly čištěny opakovanou chromatografií. Celkově bylo získáno 18,57 g produktu (PVIB).

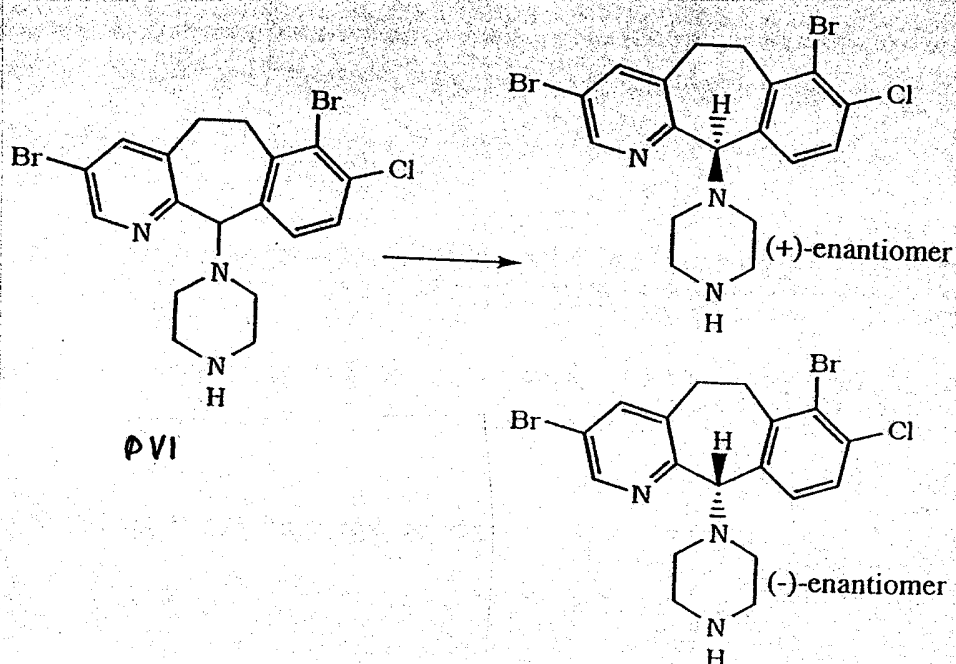
¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): 8,5 (s, 1H), 7,9 (s, 1H), 7,5 (dd, 2H), 6,2 (s, 1H), 6,1 (s, 1H), 3,5 (m, 1H), 3,4 (m, 1H), 3,2 (m, 2H).

Krok C:



18,57 g (46,02 mmol) produktu z kroku B (PVIB) se smísí s 500 ml CHCl₃, pak se přidá 6,70 ml (91,2 mmol) SOCl₂ a směs se míchá při teplotě místnosti 4 hodiny. Během 5 minut se přidá roztok 35,6 g (0,413 mol) piperazinu v 800 ml THF a reakční směs se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti. Směs se zahřívá k refluxu přes noc, pak se ochladí na teplotu místnosti a zředí se 1000 ml CH₂Cl₂. Roztok se promyje vodou (5 x 200ml), vodný podíl se extrahuje CHCl₃ (3 x 100 ml). Všechny organické podíly se spojí a promyjí solankou (3 x 200 ml) a suší se MgSO₄. Ve vakuu se zkoncentrují do sucha a chromatografie (silikagel, gradient 5%, 7,5% a 10% MeOH/CH₂Cl₂ + NH₄OH) poskytne 18,49 g požadované sloučeniny (PVI), což je racemická směs.

Krok D - dělení enantiomerů:



Racemická směs sloučeniny z kroku C (PVI) je dělena chirální chromatografií (Chiralpack AD, kolona 5 cm x 50 cm, průtok 100 ml/min, 20% iPrOH/hexan + 0,2% diethylaminu). Bylo získáno 9,14 g (+) enantiomeru a 9,30 g (-)-enantiomeru.

Fyzikální data pro (+)-enantiomer:

t.t. = 74,5-77,5°C

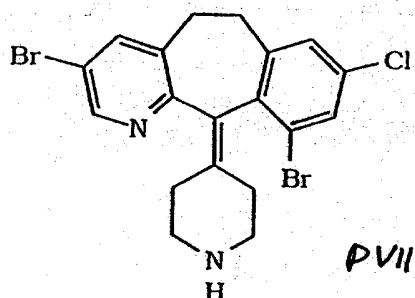
hmot. spek. $MH^+ = 471,9$, $[\alpha]_D^{25} = +97,4^\circ$ (8,32 mg/2ml MeOH).

Fyzikální data pro (-)-enantiomer:

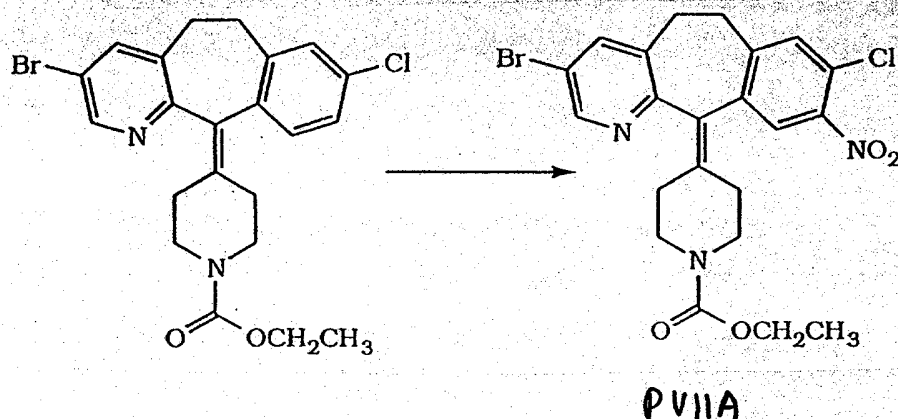
t.t. = 82,9-84,5°C

hmot. spek. $MH^+ = 471,8$, $[\alpha]_D^{25} = -97,4^\circ$ (8,32 mg/2ml MeOH).

Preparativní příklad 7



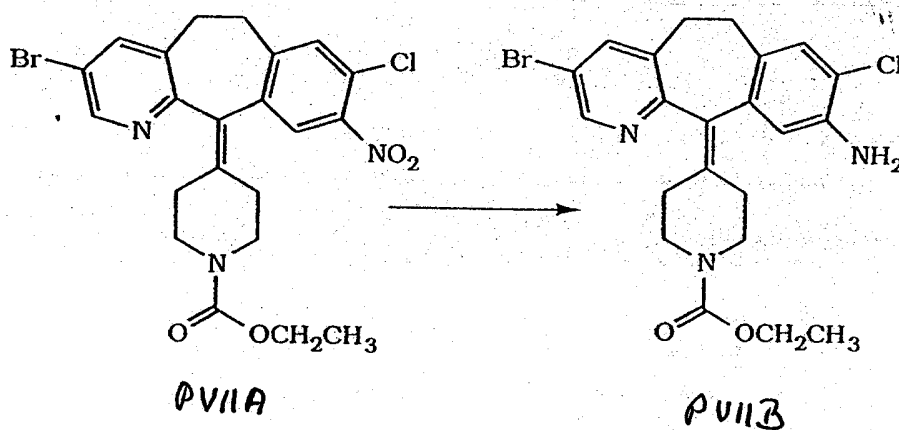
Krok A:



15 g (38,5 mmol) ethylesteru kyseliny 4-(8-chlor-3-brom-5,6-dihydro-11H-benzo[5,6]cyklohepta[1,2-b]pyridin-11-yliden)-1-piperidin-1-karboxylové (VII) se smísí se 150 ml koncentrované H_2SO_4 při -5°C , pak se přidá 3,89 g (38,5 mmol) KNO_3 a míchá se 4 hodiny. Reakční směs se nalije na 3000 ml ledu a zalkalizuje 50% vodným roztokem NaOH . Extrahuje se CH_2Cl_2 a suší MgSO_4 . Pak se zfiltruje a zkoncentruje ve vakuu do sucha. Odparek se rekrystaluje z acetonu a získá se 6,69 g produktu (PVIIA).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,5(s, 1H), 7,75(s, 1H), 7,6(s, 1H), 7,35(s, 1H), 4,15(q, 2H), 3,8(m, 2H), 3,5-3,1(m, 4H), 3,0-2,8(m, 2H), 2,6-2,2(m, 4H), 1,25(t, 3H). $\text{MH}^+ = 506$.

Krok B:

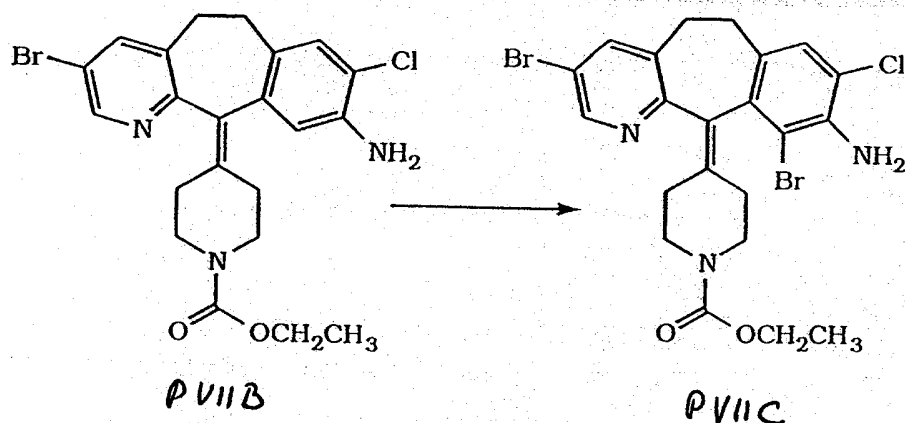


6,69 g (13,1 mmol) produktu z kroku A (PVIIA) se smísí s 100 ml 85% EtOH/voda, pak se přidá 0,66 g (5,9 mmol) CaCl_2 a 6,56

g (117,9 mmol) železa a reakční směs se zahřívá k refluxu přes noc.. Horká reakční směs se zfiltruje přes Celit a filtrační koláč se propláchne horkým EtOH. Filtrát se zkoncentruje ve vakuu a získá se 7,72 g produktu (PVIIB).

Hmot. spek. $MH^+ = 476,0$.

Krok C:

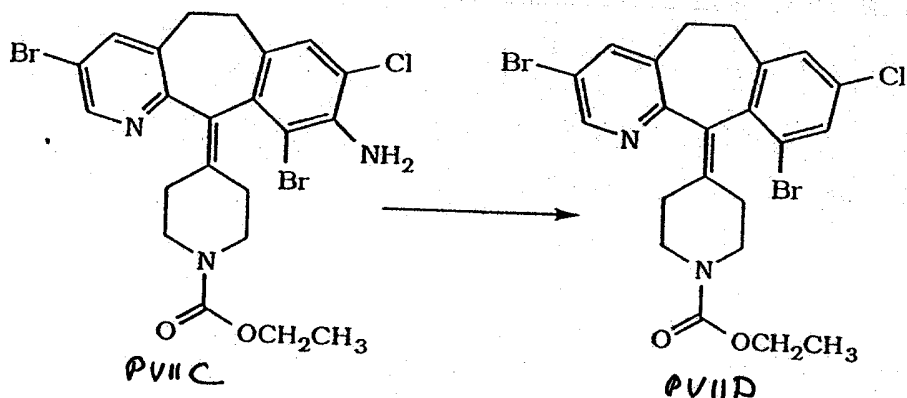


7,70 g produktu z kroku B (PVIIB) se smísí s 35 ml HOAc, pak se přidá 45 ml roztoku bromu v AcOH a reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Přidá se 300 ml 1N vodného roztoku NaOH, Pak 75 ml 50% vodného roztoku NaOH a extrahuje se EtOAc. Extrakty se vysuší $MgSO_4$ a zkoncentrují se ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 20-30% EtOAc/hexan) poskytne 3,47 g produktu (PVIIC) (spolu s dalšími 1,28 g částečně vyčištěného produktu).

Hmot. spek. $MH^+ = 554$

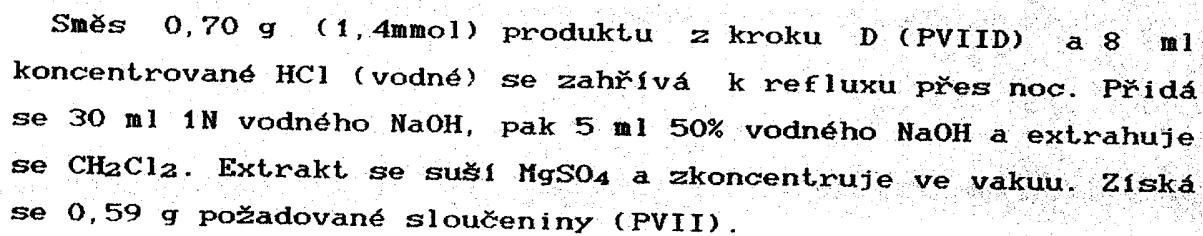
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8,5(s, 1H), 7,5(s, 1H), 7,15(s, 1H), 4,5(s, 2H), 4,15(m, 3H), 3,8(br s, 2H), 3,4-3,1(m, 4H), 9-2,75(m, 1H), 2,7-2,5(m, 2H), 2,4-2,2(m, 2H), 1,25(m, 3H).

Krok D:



Hmot. spek. $MH^+ = 539,0$

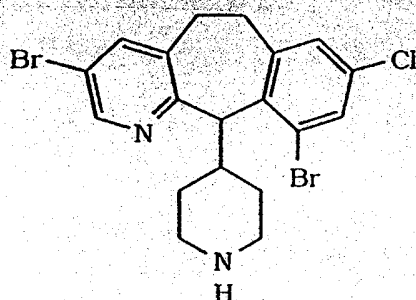
Krok E:



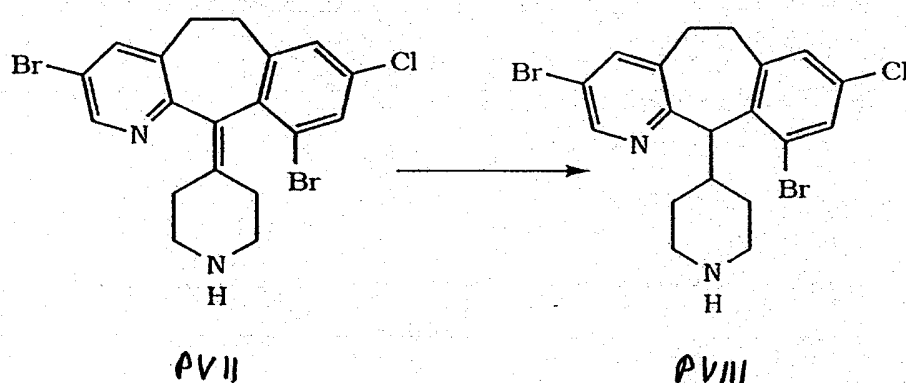
Hmot. spek. $MH^+ = 467$, t. t. = 123,9 - 124,2°C.

14.08.98

Preparativní příklad 8



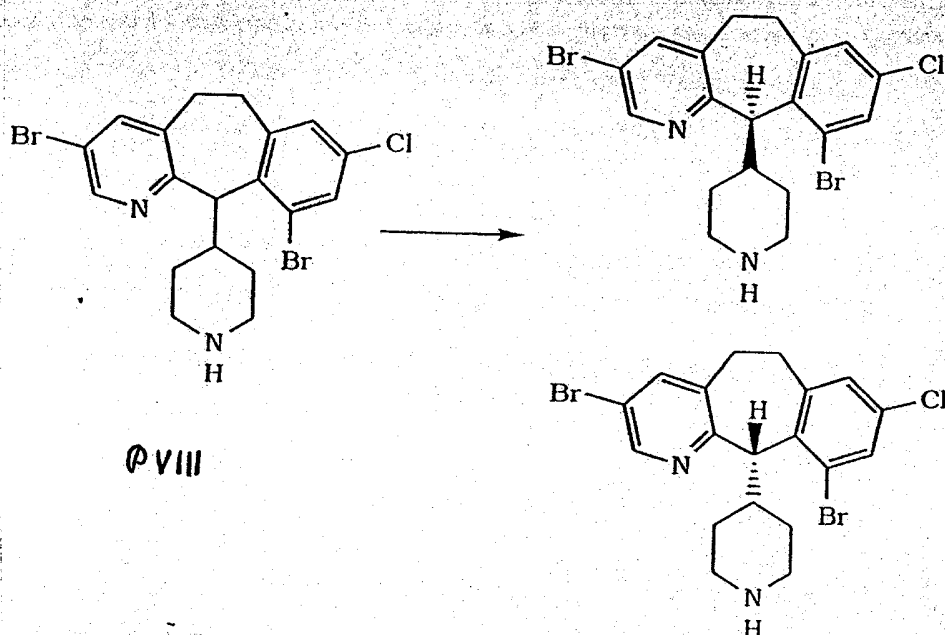
Krok A:



Připraví se roztok 8,1 g sloučeniny z preparativního příkladu 7 (PVII) v toluenu a přidá se 17,3 ml 1M roztoku DIBAL v toluenu. Reakční směs se zahřeje k refluxu a pomalu (po kapkách) se přidá dalších 21 ml 1M DIBAL/toluen roztoku během 40 minut. Reakční směs se ochladí na 0°C a přidá se 700 ml 1M HCl(vodné). Organická fáze se oddělí a odstraní. Vodná fáze se promyje CH₂Cl₂, extrakt se odstraní a vodná fáze se zalkalizuje přídavkem 50% vodného roztoku NaOH. Vodná fáze se pak extrahuje CH₂Cl₂, extrakt se vysuší MgSO₄ a zkoncentruje ve vakuu. Získá se 7,30 g požadované sloučeniny (PVIII), což je racemická směs enantiomerů.

MH⁺ = 469.

Krok B: Dělení enantiomerů



Racemická sloučenina z kroku A (P VIII) je dělena chirální chromatografií (Chiralpack AD, kolona 5 cm x 50 cm za použití 20% iPrOH/hexan + 0,2% diethylaminu). Získá se (+)-enantiomer a (-)-enantiomer požadované sloučeniny.

Fyzikálně-chemická data pro (+)-enantiomer:

t. t. = 148,8°C, hmot. spek. MH^+ = 469

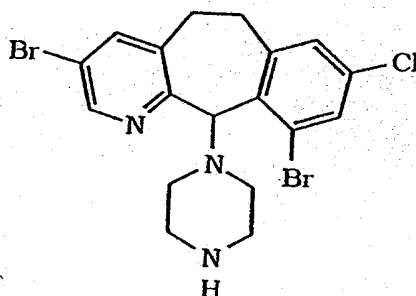
$[\alpha]_D^{25} = +65,6$ (12,93 mg/2ml MeOH).

Fyzikálně-chemická data pro (-)-enantiomer:

t. t. = 112°C, hmot. spek. MH^+ = 469

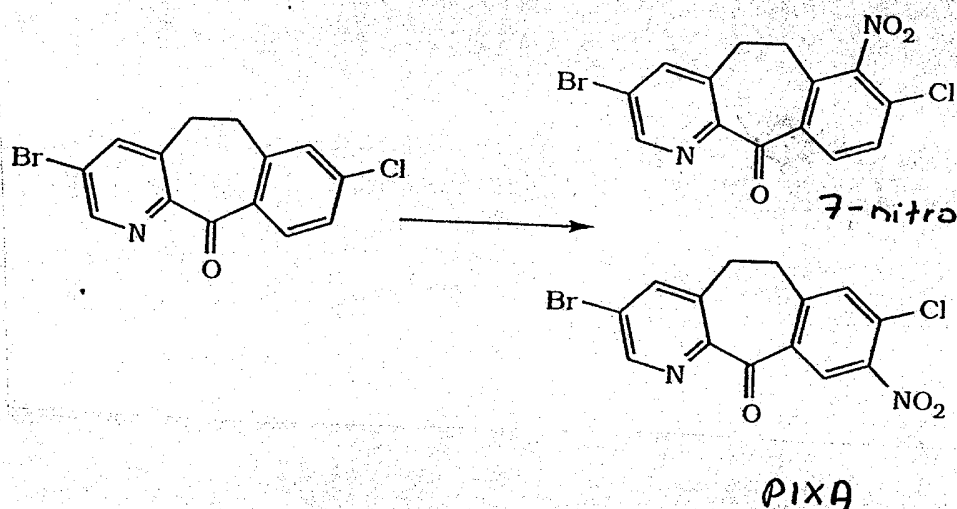
$[\alpha]_D^{25} = -65,2$ (3,65 mg/2ml MeOH).

Preparativní příklad 9



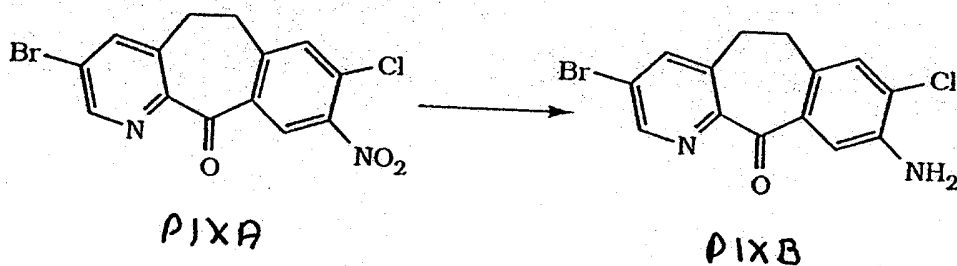
14.08.98

Krok A:



40,0 g (0,124 mol) výchozího ketonu (IX) se smíchá s 200 ml H_2SO_4 a ochladí na 0°C . Pomalu během 1,5 hodiny se přidá 13,78 g (0,136 mol) KNO_3 . Pak se reakční směs zahřeje na teplotu místnosti a míchá se přes noc. Reakční směs se zpracovává za použití v podstatě stejného způsobu, který je popsán pro preparativní příklad 4, krok A. Chromatografie (silikagel, 20%, 30%, 40%, 50% EtOAc/hexan, pak 100% EtOAc) poskytne 28 g 9-nitroproduktu (PIXA) spolu s malým množstvím 7-nitroproduktu a 19 g směsi 7-nitro a 9-nitro sloučenin. MH^+ (9-nitro) = 367.

Krok B:

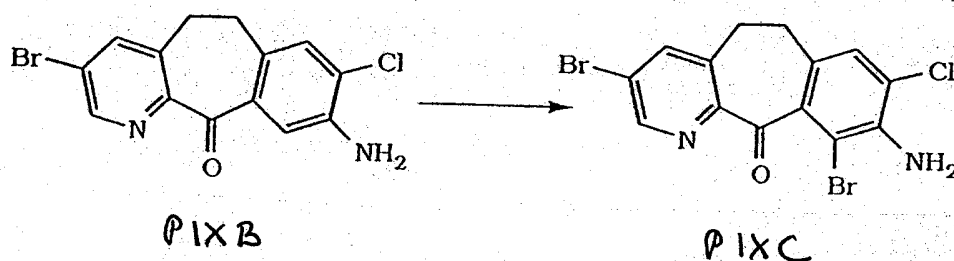


Reakce 28 g (76,2 mmol) 9-nitroproduktu z kroku A (PIXA), 400 ml 85% EtOH/voda, 3,8 g (34,3 mmol) CaCl_2 a 38,28 g (0,685 mol) železa probíhá stejným způsobem, který je popsán

v preparativním příkladu 4, krok C. Získá se 24 g produktu (PIXB).

$MH^+ = 337$.

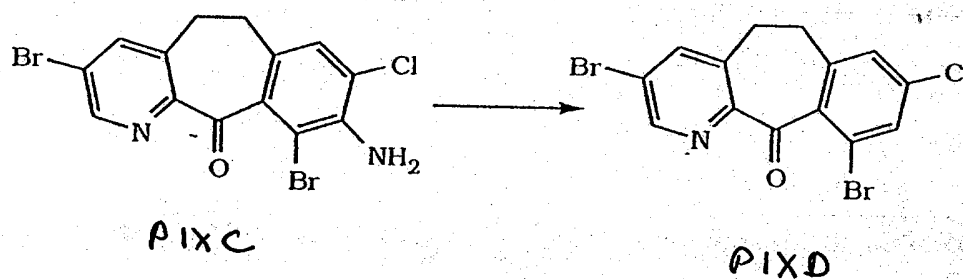
Krok C:



13g (38,5 mmol) produktu z kroku B (PIXB) se smísí se 140 ml AcOH a pak se pomalu během 20 minut přidá roztok 2,95 ml (57,8 mmol) bromu v 10 ml AcOH. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti, pak se zkoncentruje ve vakuu do sucha. Přidá se CH_2Cl_2 a voda, pak se upraví pH na 8-9 50% vodným roztokem NaOH. Organická fáze se promyje vodou, pak solankou a suší se Na_2SO_4 . Zkoncentruje se ve vakuu a poskytne 11,3 g produktu (PIXC).

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): 8,73 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,14 (s, 1H), 4,63 (s, 2H), 3,23-3,15 (m, 2H) a 3,07-2,98 (m, 2H).

Krok D:



100 ml koncentrované vodné HCl se ochladí na $0^\circ C$, pak se přidá 5,61 g (81,4 mmol) $NaNO_2$ a míchá se 10 minut. Pomalu (po částech) se přidá 11,3 g (27,1 mmol) produktu z kroku C (PIXC) a reakční směs se míchá 2,25 hodiny při $0-3^\circ C$. Pomalu (po kapkách) se přidá 180 ml 50% H_3PO_2 (vodné) a reakční směs se ponechá stát při $0^\circ C$ přes noc. Pak se pomalu během 30 min (po

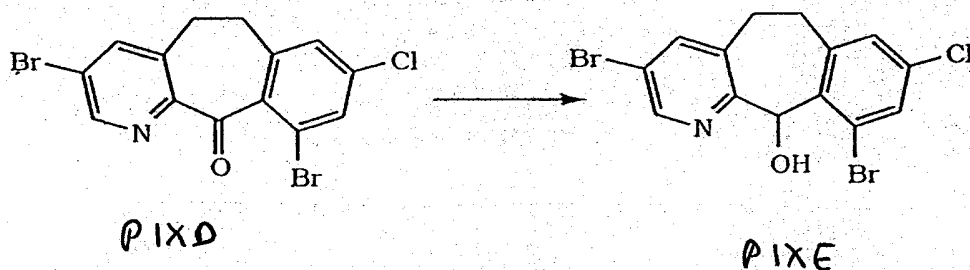
14.09.99

kapkách) přidá 150 ml 50% NaOH, aby se pH upravilo na 9. Pak se reakční směs extrahuje CH_2Cl_2 . Extrakt se promyje vodou, pak solankou a suší se Na_2SO_4 . Zkoncentruje se ve vakuu do sucha a chromatografie odparku (silikagel, 2% EtOAc/ CH_2Cl_2) poskytne 8,6 g produktu (PIXD).

$\text{MH}^+ = 399,9$.

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,75(d, 1H), 7,77(d, 1H), 7,56(d, 1H), 7,21(d, 1H) a 3,3-3,0(m, 4H).

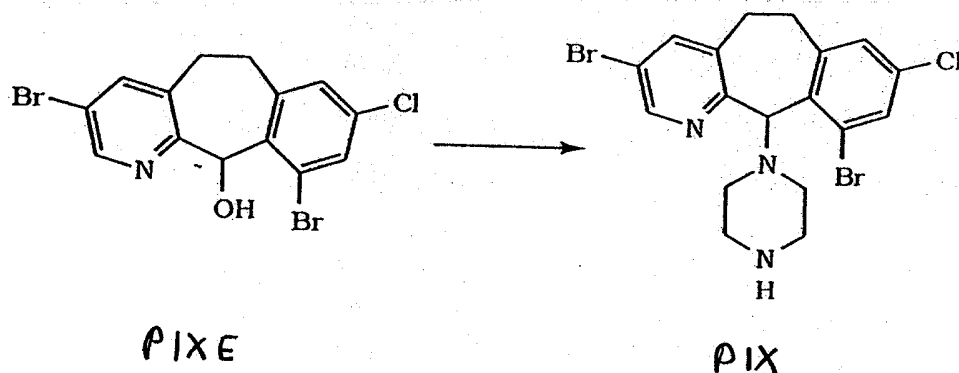
Krok E:



8,6 g (21,4 mmol) produktu z kroku D (PIXD) se smíchá s 300 ml MeOH a ochladí na 0-2°C. Přidá se 1,21 g (32,1 mmol) NaBH_4 a reakční směs se míchá při -0°C 1 hodinu. Přidá se další 0,121 g (3,21 mmol) NaBH_4 a míchá se 2 hodiny při 0°C. Pak se ještě ponechá stát při 0°C přes noc. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha a pak se odparek rozdělí mezi CH_2Cl_2 a vodu. Organická fáze se oddělí a zkoncentruje ve vakuu (50°C) a získá se 8,2 g produktu (PIXE).

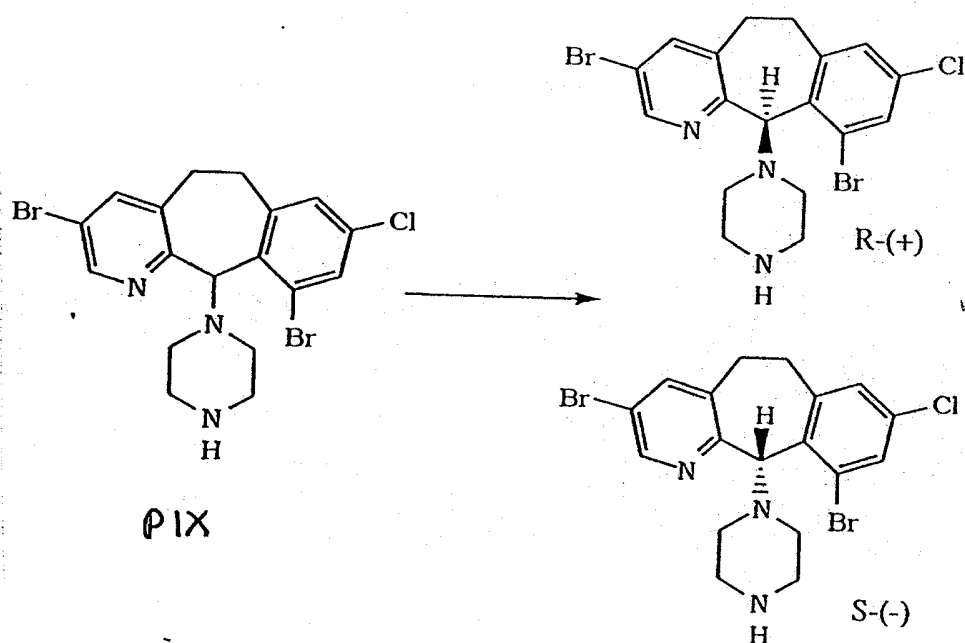
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,44(d, 1H), 7,63(d, 1H), 7,47(d, 1H), 7,17(d, 1H), 6,56(d, 1H), 4,17-4,0(m, 1H), 7,39(d, 1H), 3,46-3,3(m, 1H), 3,05-2,74(m, 2H).

Krok F:



8,2 g (20,3 mmol) produktu z kroku E (PIXE) se smíchá s 160 ml CH_2Cl_2 a ochladí se na 0°C . Pak se pomalu (po kapkách) během 30 minut přidá 14,8 ml (203 mmol) SOCl_2 . Reakční směs se ohřeje na teplotu místnosti a míchá se při této teplotě 4,5 hodiny. Pak se zkoncentruje ve vakuu do sucha, přidá se CH_2Cl_2 . Promyje se 1 N NaOH (vodným), pak solankou a suší se Na_2SO_4 . Zkoncentruje se ve vakuu do sucha, pak se přidá suchý THF a 8,7 g (101 mmol) piperazinu a míchá se při teplotě místnosti přes noc. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha, přidá se CH_2Cl_2 . Promyje se s 0,25 N NaOH (vodným), vodou a pak solankou. Suší se Na_2SO_4 a zkoncentruje se ve vakuu. Získá se 9,46 g surového produktu. Jeho chromatografie (silikagel, 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{NH}_3$) poskytne 3,59 g požadované sloučeniny (PIX) jako racemát. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,43 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,11 (d, 1H), 5,31 (s, 1H), 4,86-4,65 (m, 1H), 3,57-3,40 (m, 1H), 2,98-2,55 (m, 6H), 2,45-2,20 (m, 5H). $\text{MH}^+ = 470$.

Krok G: Dělení enantiomerů



Racemická sloučenina z kroku F (PIX) (5,7 g) je dělena chromatograficky jak je popsáno v preparativním příkladu 6, krok D. Byl použit 30% $i\text{PrOH}/\text{hexan} + 0,2\%$ diethylenamin. Bylo

14.05.99

získáno 2,88 g R-(+)-enantiomeru a 2,77 g S-(-)-enantiomeru.

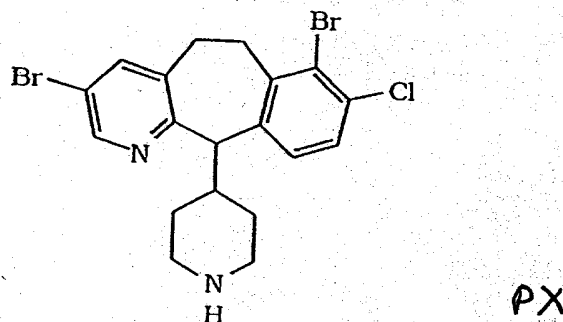
Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer:

Hmot. spek. $MH^+ = 470$, $[\alpha]_D^{25} = +12,1^\circ$ (10,9 mg/2ml MeOH)

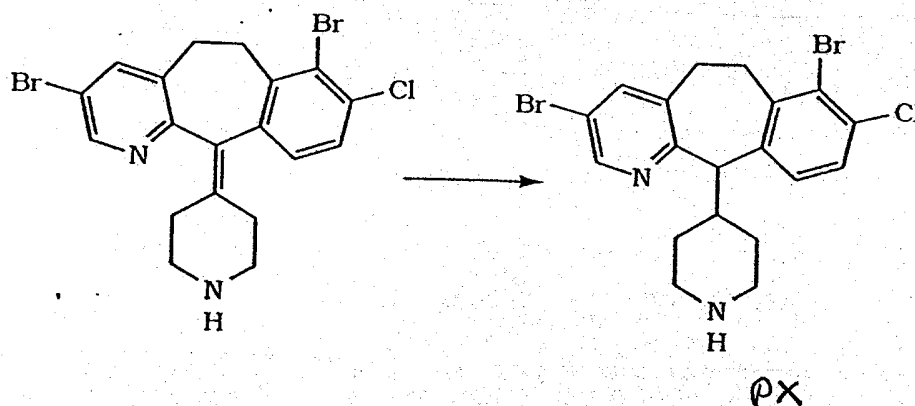
Fyzikálně-chemická data pro S-(-)-enantiomer: Hmot. spek.

$MH^+ = 470$, $[\alpha]_D^{25} = -13,2^\circ$ (11,51 mg/2ml MeOH).

Preparativní příklad 10



Krok A:

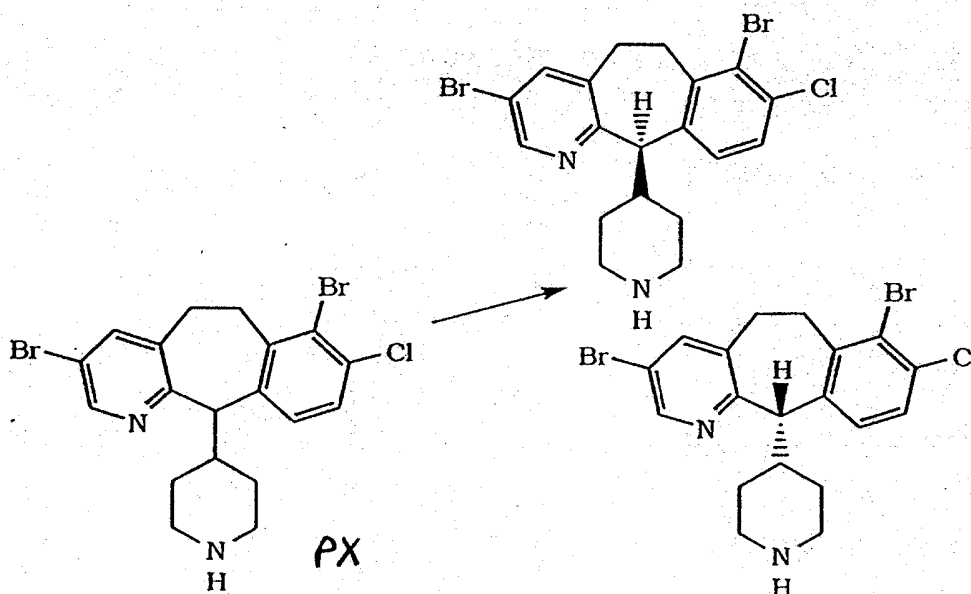


13 g (33,3 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 4, krok D se smíchá s 300 ml toluenu při 20°C, pak se přidá 32,5 ml (32,5 mmol) 1M roztoku DIBAL v toluenu. Reakční směs se zahřívá k refluxu 1 hodinu. Ochladí se na 20°C a přidá se dalších 32,5 ml 1M roztoku DIBAL a směs se opět zahřívá 1 hodinu k refluxu. Směs se ochladí na 20°C a nalije do směsi 400g ledu, 500 ml EtOAc a 300 ml 10% NaOH (vodného). Vodná vrstva se extrahuje CH_2Cl_2 (3 x 200ml), organické vrstvy se suší $MgSO_4$, pak se zkoncentrují ve vakuu do sucha. Chromatografie (silikagel, 12% MeOH, CH_2Cl_2 + 4% NH_4OH) poskytne 10,4 g požadované sloučeniny jako racemát (PX).

Hmot. spek. $MH^+ = 469$ (FAB)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s, 1H), 7,57(s, 1H), 7,27(d, 1H), 7,06(d, 1H), 3,95(d, 1H).

Krok B: Dělení enantiomerů



Racemická sloučenina z kroku A (PX) je dělena preparativní chirální chromatografií (Chiralpack AD, kolona 5 cm x 50 cm za použití 5% iPrOH/hexan + 0,2% diethylaminu). Získá se (+)-enantiomer a (-)-enantiomer požadované sloučeniny.

Fyzikálně-chemická data pro (+)-enantiomer:

Hmot. spek. $MH^+ = 469$ (FABS), $[\alpha]_D^{25} = +43,5^\circ$ ($c=0,402$, EtOH)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s, 1H), 7,57(s, 1H), 7,27(d, 1H), 7,05(d, 1H), 3,95(d, 1H).

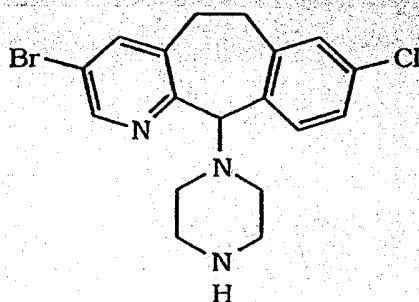
Fyzikálně-chemická data pro (-)-enantiomer:

Hmot. spek. $MH^+ = 469$ (FABS), $[\alpha]_D^{25} = -41,8^\circ$ ($c=0,328$, EtOH)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s, 1H), 7,57(s, 1H), 7,27(d, 1H), 7,05(d, 1H), 3,95(d, 1H).

14.08.99

Preparativní příklad 11



PXI

Ethylester kyseliny

4-(8-chlor-3-brom-5,6-dihydro-11H-benzo[5,6]cyklohepta[1,2-b]pyridin-11-yliden)-1-piperidin-1-karboxylové reaguje stejným způsobem jako je popsán v preparativní příkladu 6, kroky A-D. Získá se produkt jako v kroku C PXI), což je racemát a dále se získají jako produkty v kroku D R-(+)-enantiomer a S-(-)-enantiomer požadované sloučeniny.

Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer:

^{13}C NMR (CDCl_3): 155,8(C), 146,4(CH), 140,5(CH), 140,2(C), 136,2(C), 135,3(C), 133,4(C), 132,0(CH), 129,9(CH), 125,6(CH), 119,3(C), 79,1(CH), 52,3(CH_2), 52,3(CH_2), 45,6(CH_2), 45,6(CH_2), 30,0(CH_2), 29,8(CH_2).

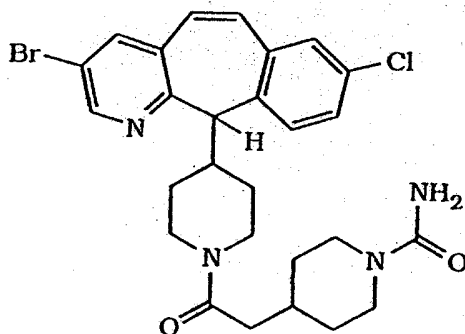
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +25,8^\circ$ (8,46 mg/2ml MeOH).

Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer:

^{13}C NMR (CDCl_3): 155,9(C), 146,4(CH), 140,5(CH), 140,2(C), 136,2(C), 135,3(C), 133,3(C), 132,0(CH), 129,9(CH), 125,5(CH), 119,2(C), 79,1(CH), 52,5(CH_2), 52,5(CH_2), 45,7(CH_2), 45,7(CH_2), 30,0(CH_2), 29,8(CH_2).

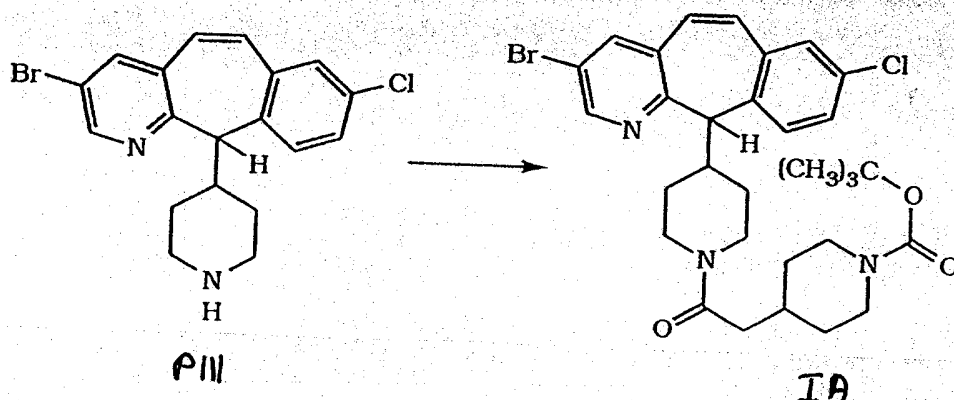
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -27,9^\circ$ (8,90 mg/2ml MeOH).

Příklad 1



I

Krok A:

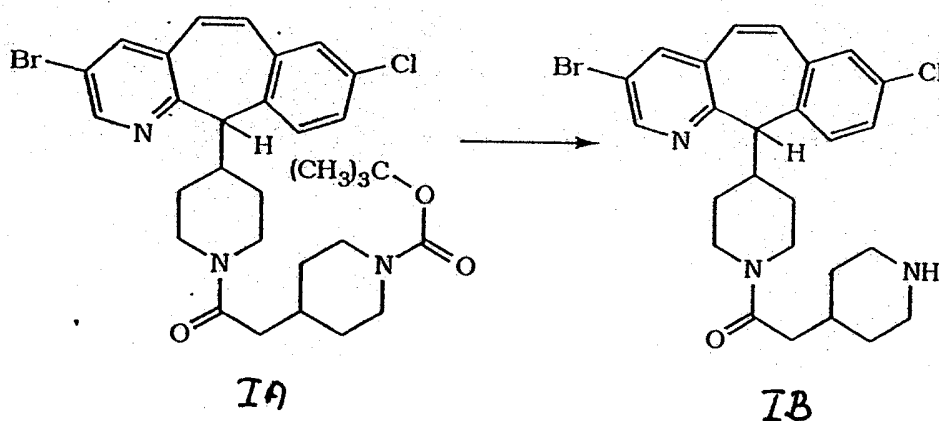


1,160 g (2,98 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 3 (PIII) se rozpustí v 20 ml DME, míchá se za teploty místnosti. Pak se přidá 0,3914 g (3,87 mmol) 4-methylmorfolinu, 0,7418 g (3,87 mmol) DEC, 0,5229 g (3,87 mmol) HOBt a 0,8795 g (3,87 mmol) 1-N-t-butoxykarbonyl-piperidiny-4-octové kyseliny. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 2 dny. Pak se zkoncentruje ve vakuu do sucha a odparek se rozdělí mezi CH_2Cl_2 a vodu. Organická fáze se opatrně promyje nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 , 10% vodným NaH_2PO_4 a solankou. Suší se MgSO_4 , zfiltruje se a zkoncentruje ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{NH}_3$) poskytne 1,72 g produktu (IA).

t.t. = 94,0-94,5°C, hmot.spek. $\text{MH}^+ = 614$

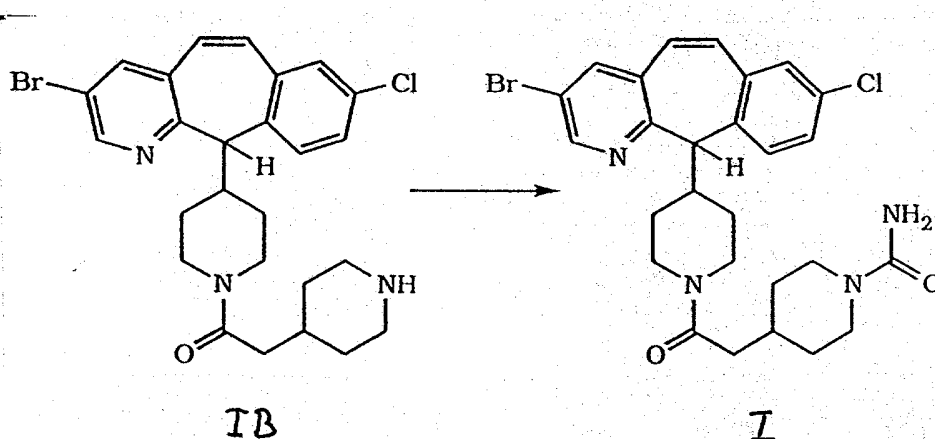
Elementární analýza: vypočteno- C 60,54, H 6,06, N 6,83
nalezeno- C 59,93, H 6,62, N 7,45

Krok B:



1,67 g (2,7 mmol) produktu z kroku A (IA) se smíchá s 20 ml CH_2Cl_2 a míchá při 0°C . Přidá se TFA, směs se míchá 2 hodiny. Pak se reakční směs zalkalizuje 1N NaOH (vodným). Extrahuje se CH_2Cl_2 . Organická fáze se suší MgSO_4 , zfiltruje se a zkoncentruje ve vakuu. Získá se 1,16 g produktu (IB).
t.t. = $140,2-140,8^\circ\text{C}$, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 514$.

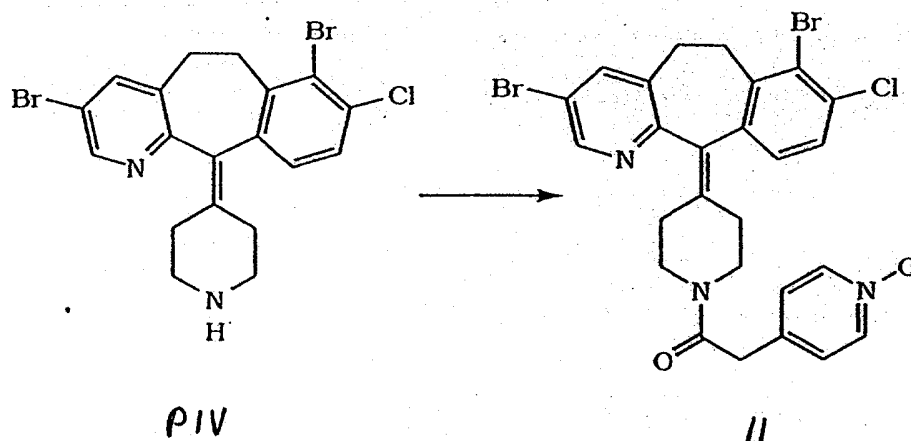
Krok C:



0,5 g produktu z kroku B (IB) se smíchá s 20 ml CH_2Cl_2 a 4,5 ekvivalenty $(\text{CH}_3)_3\text{SiNCO}$ a míchá se při teplotě místnosti 3 hodiny. Reakční směs se extrahuje nasyceným vodným NaHCO_3 a organická fáze se suší MgSO_4 . Zfiltruje se a zkoncentruje ve vakuu. Získá se 0,8 g surového produktu. Chromatografie surového produktu (silikagel, 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{NH}_3$) poskytne 0,26 g produktu (I).

t.t. = $170,2-170,5^\circ\text{C}$, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 557$.

Příklad 2



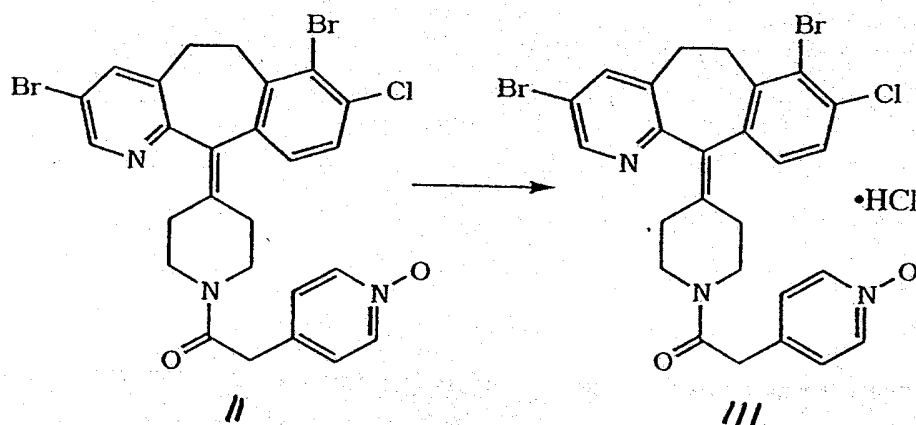
0,5 g (1,06 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 4 (PIV) se smíchá při 0°C s 0,4 g (2,61 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI), 5 ml suchého DMF a 0,5 ml (4,53 mmol) 4-methylmorfolinu. Pak se přidá 0,6 g (3,12 mmol) DEC a 0,4 g (2,96 mmol) HOBT a reakční směs se míchá při 20°C přes noc. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha a odparek se extrahuje CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). Extrakty se promyjí 25 ml vody, suší MgSO₄, pak se zkoncentrují ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 10%MeOH/EtOAc + 2% NH₄OH (vodný)) poskytne 0,6 g (93,7%) požadované sloučeniny (II).

Hmot. spek. MH⁺ = 602 (FABS)

částečné ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8,48(s, 1H), 8,16(d, 2H), 7,61(s, 1H), 7,29(m, 1H), 7,18(d, 2H), 7,04(d, 1H), 3,71(s, 2H).

Elementární analýza: vypočteno- C 48,81, H 4,10, N 6,57
nalezeno - C 49,10, H 3,79, N 6,74

Příklad 3



5,9 (9,78 mmol) sloučeniny z příkladu 2 (II) se rozpustí v 300 ml 1:5 CH₂Cl₂/EtOAc při 0°C. Pomalu se přidá (po kapkách) 3 ml 4N HCl (vodné) a reakční směs se míchá při 0°C 5 min. Přidá se 200 ml Et₂O, výsledná pevná látka se spojí filtrací a pevná látka se promyje 50 ml Et₂O. Pevná látka se pak suší při teplotě 20°C a tlaku 27 Pa (0,2 mm Hg) a získá se 5,9 g (96%) požadované sloučeniny (III).

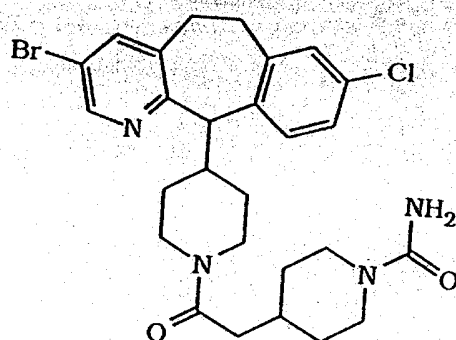
Hmot. spek. MH⁺ = 602 (FAB)

částečné ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 8,66(d, 2H), 8,51(s, 1H), 7,95(s, 1H), 7,67(d, 2H), 7,47(m, 1H), 7,15(m, 1H), 3,99(s, 2H).

Elementární analýza: vypočteno- C 48,77, H 3,62, N 6,56
nalezeno- C 48,34, H 3,95, N 6,84.

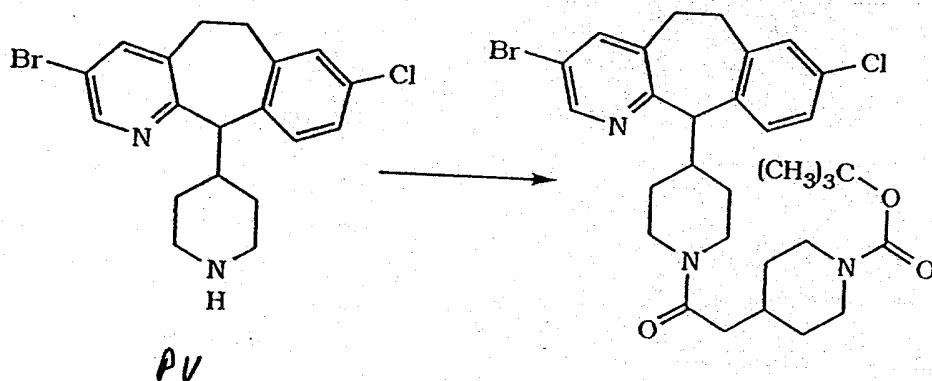
14.05.99

Příklad 4



IV

Krok A:

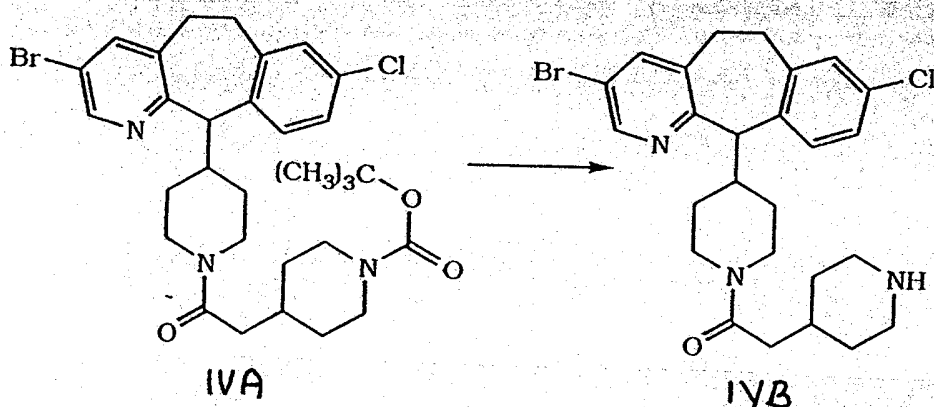


IVA

0,501 g (1,28 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 5 (PV) se smíchá s 20 ml suchého DMF, pak se přidá 0,405 g (1,664 mmol) 1-N-t-butoxykarbonylpiperidiny-4-octové kyseliny, 0,319 g (1,664 mmol) DEC, 0,225 g (1,664 mmol) HOBt a 0,168 g (1,664 mmol) 4-methylmorfolinu. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha. Odparek se rozdělí mezi 150 ml CH_2Cl_2 a 150 ml nasyceného roztoku NaHCO_3 (vodného). Vodná fáze se extrahuje dalšími 150 ml CH_2Cl_2 . Organická fáze se suší MgSO_4 a zkoncentruje se ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 500 ml hexanu, 1000 ml 1% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 0,1% NH_4OH (vodný)) poskytne 0,575 g produktu (IVA).

t.t. = 115-125°C, hmot. spek. MH^+ = 616.

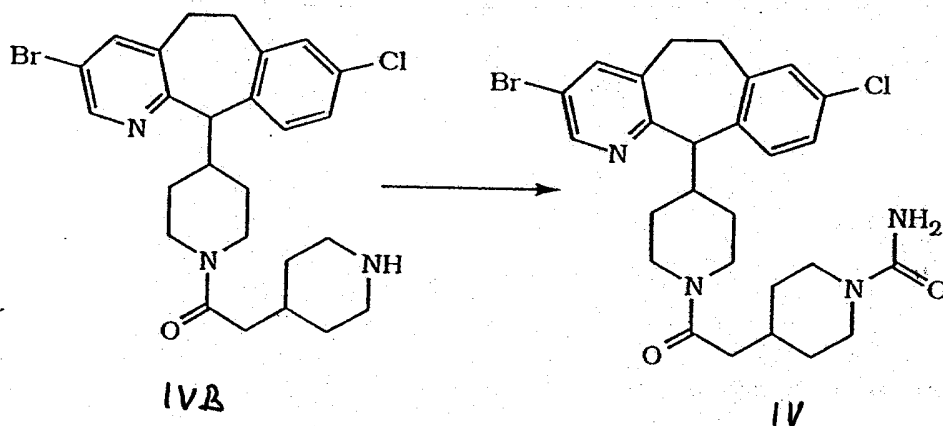
Krok B:



0,555 g (0,9 mmol) produktu z kroku A (IVA) se smíchá s 15 ml CH_2Cl_2 a směs se ochladí na 0°C . Přidá se 15 ml TFA a míchá se při 0°C 2 hodiny. Reakční směs se při $40-45^\circ\text{C}$ zkoncentruje ve vakuu do sucha, pak se odparek rozdělí mezi 150 ml CH_2Cl_2 a 100 ml nasyceného vodného NaHCO_3 . Vodná fáze se extrahuje 100 ml CH_2Cl_2 . Spojené extrakty se suší MgSO_4 . Zkoncentrují se ve vakuu a získá se 0,47 g produktu (IVB).

t.t. = $140-150^\circ\text{C}$, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 516$.

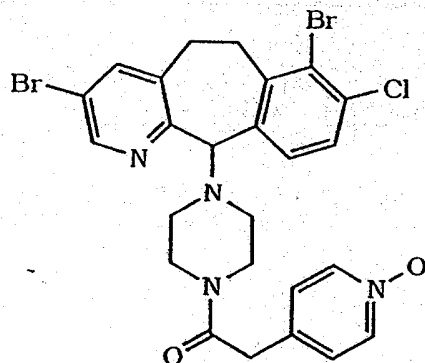
Krok C:



0,449 g (0,87 mmol) produktu z kroku B (IVB) se smíchá s 20 ml CH_2Cl_2 a 0,501 g (0,59 mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SiNCO}$ a míchá se při teplotě místnosti přes noc. Pak se přidá 50-75 ml nasyceného vodného NaHCO_3 a míchá se 0,5 hodiny. Reakční směs se zředí CH_2Cl_2 , vrstvy se oddělí a vodná vrstva se extrahuje 2 x 100 ml CH_2Cl_2 . Spojené CH_2Cl_2 extrakty se suší MgSO_4 a zkoncentrují se ve vakuu do sucha. Chromatografie odparku (silikagel, 500 ml CH_2Cl_2 , 1000 ml 1% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 0,1% NH_4OH (vodný), 1000 ml 2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 0,2% NH_4OH a nakonec 3% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 0,3%

NH_4OH) poskytne 0,33 g požadované sloučeniny (IV).
t.t. = 145-155°C, hmot. spek. MH^+ = 559.

Příklad 5



(-)-enantiomer

V

3,0 g (6,36 mmol) (-)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 6, krok D se smíchá se 70 ml suchého DMF. Přidá se 3,84 ml (34,94 mmol) N-methylmorfolinu, 3,28 g (17,11 mmol) DEC, 2,23 g (16,52 mmol) HOBt a 2,09 g (13,55 mmol) N-oxidu 4-pyridyloctové kyseliny z preparativního příkladu 1 (PI). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Zkoncentruje se ve vakuu, aby se odstranil DMF, přidá se 100 ml nasyceného vodného NaHCO_3 a 10 ml CH_2Cl_2 a míchá se 15 minut. Reakční směs se extrahuje CH_2Cl_2 (2 x 500 ml). Extrakty se suší MgSO_4 a zkoncentrují se ve vakuu do sucha. Odparek se chromatografuje (500 g reversní fáze C18 silica, gradient 75%, 80% a pak 85% MeOH/voda + 0,1% AcOH). Požadované frakce se zkoncentrují ve vakuu, aby se odstranil MeOH a přidá se 50 ml 1M NaOH (vodného). Míchá se 15 minut, pak se extrahuje CH_2Cl_2 (2 x 500 ml). Extrakt se suší MgSO_4 a zkoncentruje se ve vakuu. Získá se 3,5 g požadované sloučeniny (V).

t.t. = 148,9-150,5°C, hmot. spek. MH^+ = 605

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -56,37^\circ$ (9,4 mg/2ml MeOH).

Sloučeninu z příkladu 5 lze izolovat také jako hydrochlorid reakcí roztoku produktu (V) v HCl a CH_2Cl_2 při teplotě místnosti. Dále se reakční směs zkoncentruje ve vakuu a poskytne hydrochlorid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -31,9^\circ$ (4,80 mg/ 2 ml MeOH + 1 ml vody)

Při použití (+)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 6 se stejným způsobem, jako je popsán výše pro příklad

5, připraví analogický (+)-enantiomer (příklad 5A), t.j. enantiomer sloučeniny z příkladu 5.

t.t. = 149,0-150,5°C, hmot. spek. $MH^+ = 605$

$[\alpha]_D^{25} = +67,1^\circ$ (7,0 mg/2ml MeOH).

Sloučeninu z příkladu 5A lze izolovat jako hydrochlorid stejným způsobem jako je popsán pro příklad 5.

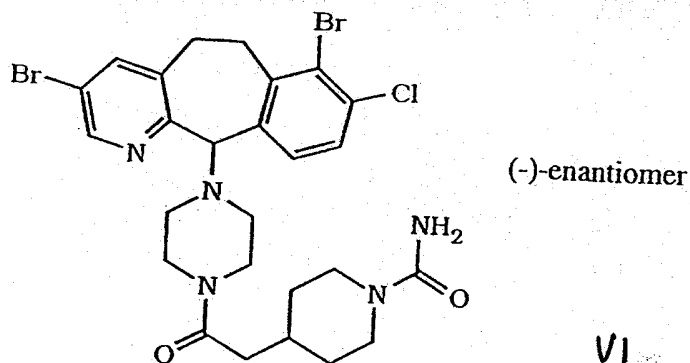
t.t. = 152,9°C

$[\alpha]_D^{25} = +41,7^\circ$ (2 ml MeOH + 1 ml vody).

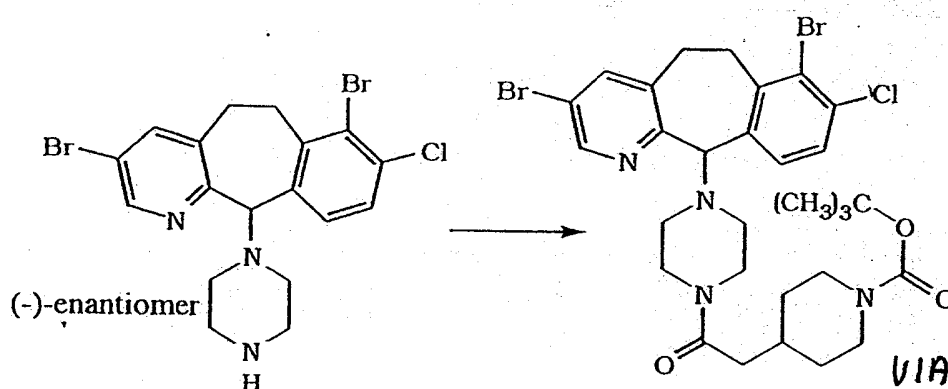
Při použití racemické sloučeniny z preparativního příkladu 6, krok C (PVIC) se stejnou procedurou jako je popsána výše pro příklad 5 připraví racemát (Příklad 5B).

t.t. = 84,3-85,6°C, hmot. spek. $MH^+ = 607$.

Příklad 6



Krok A:



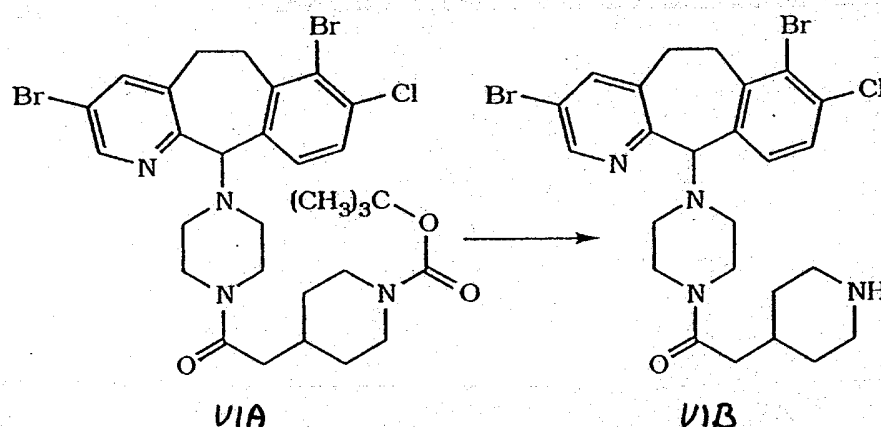
3,21 g (6,80 mmol) (-)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 6 se smíchá se 150 ml bezvodého DMF. Přidá se 2,15 g (8,8 mmol) 1-N-t-butoxykarbonylpiperidiny-4-octové kyseliny, 1,69 g (8,8 mmol) DEC, 1,19 g (8,8 mmol) HOBt a 0,97 ml (8,8 mmol) N-methylmorpholinu. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Pak se zkoncentruje ve vakuu, aby se

odstraní DMF a přidá se 50 ml nasyceného vodného NaHCO_3 . Extrahuje se CH_2Cl_2 (2 x 250 ml), extrakty se promyjí 50 ml solanky a suší MgSO_4 . Zkoncentrují se ve vakuu do sucha a chromatografie (silikagel, 2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 10% NH_4OH) poskytne 4,75 g produktu (VIA).

t.t. = 75,7-78,5°C, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 695$

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5,5^\circ$ (6,6 mg/2 ml MeOH).

Krok B

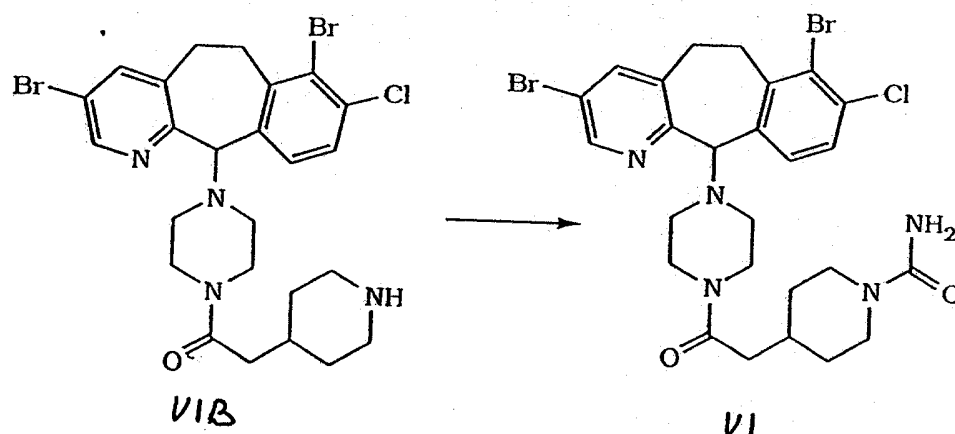


4,70 g (6,74 mmol) produktu z kroku A (VIA) se smíchá s 50 ml MeOH, pak se přidá během 1 hodiny 50 ml 10% H_2SO_4 /dioxan po 10 ml podílech. Reakční směs se nalije do 50 ml vody a přidá se 15 ml 50% NaOH (vodného), aby se pH upravilo 10-11. Směs se zfiltruje, aby se odstranila vzniklá pevná látka a filtrát se extrahuje CH_2Cl_2 (2 x 250 ml). Vodná vrstva se zkoncentruje ve vakuu, aby se odstraní MeOH a opět se extrahuje 250 ml CH_2Cl_2 . Spojené extrakty se suší MgSO_4 a zkoncentrují se vakuu do sucha. Získá se produkt (VIB).

t.t. = 128,1-131,5°C, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 595$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6,02^\circ$ (9,3 mg/2 ml MeOH).

Krok C:

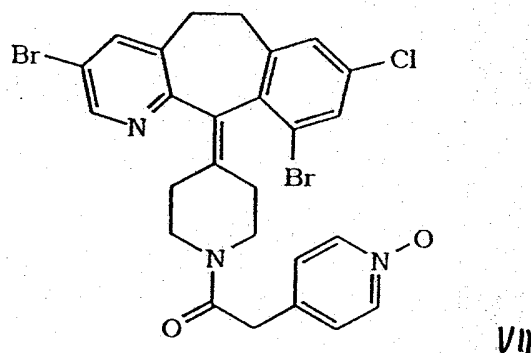


3,64 g (5,58 mmol) produktu z kroku B (VIB) se smíchá s 30 ml CH_2Cl_2 , pak se přidá 6,29 ml (44,64 mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SiNCO}$. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 2 dny. Přidá se 25 ml NaHCO_3 (vodného), pak se extrahuje CH_2Cl_2 (2 x 250 ml). Extrakty se promyjí 25 ml solanky a suší MgSO_4 . Zkoncentrují se ve vakuu do sucha a chromatografují (silikagel, gradient 2,5%, 5,0% pak 7,5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 10% NH_4OH). Získá se požadovaná sloučenina (VI).

t.t. = 150,5-153,0°C, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 638$

$[\alpha]_D^{25} = -61,4^\circ$ (8,18 mg/2 ml MeOH).

Příklad 7

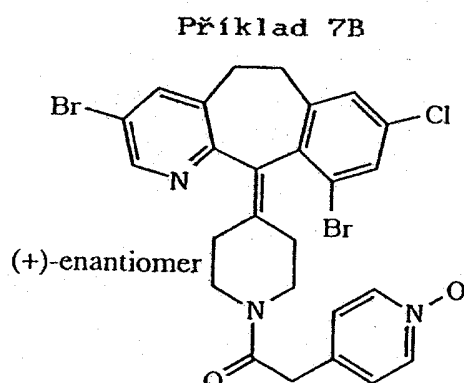
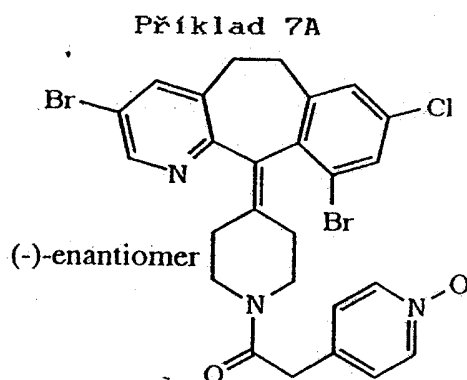


Sloučenina z preparativního příkladu 7 (PVII) reaguje se sloučeninou z preparativního příkladu 1 (PI) stejným způsobem jako je popsáno pro příklad 2. Získá se 0,25 g požadované sloučeniny (VII), což je racemická směs atropoisomerů.

Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 602$, t.t. = 167,2-167,8°C.

Hydrochlorid sloučeniny z příkladu 7 se připravuje mícháním s $\text{HCl}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ po dobu 1 hodiny. Pak se reakční směs odpaří ve vakuu a získá se sůl.

Příklady 7A & 7B

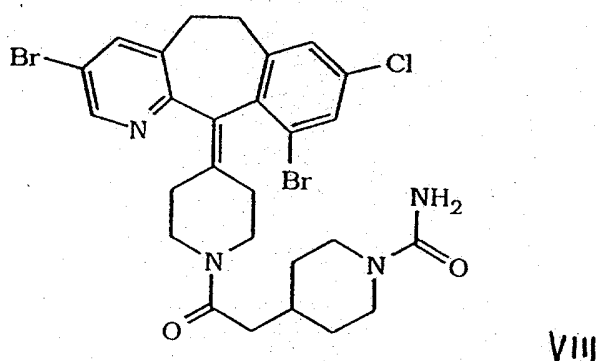


Sloučenina z příkladu 7 (VII) je racemická směs atropoisomerů. Tyto atropoisomery jsou děleny preparativní chromatografií (HPLC) s použitím kolony Chiralpack AD (5 cm x 50 cm) a 40% iPrOH/hexan + 0,2% diethylaminu jako mobilní fáze. Získají se (+)- a (-)-enantiomery, příklady 7A a 7B.

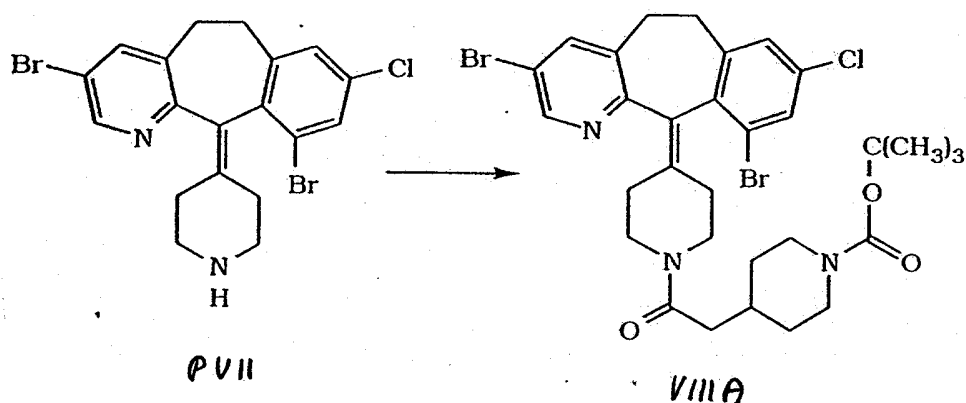
Fyzikálně-chemická data pro (-)-enantiomer, příklad 7A
t.t. = 114,2-114,8°C, $[\alpha]_D^{25} = -154,6^\circ$ (8,73 mg/2ml MeOH)

Fyzikálně-chemická data pro (+)-enantiomer, příklad 7B
t.t. = 112,6-113,5°C, $[\alpha]_D^{25} = +159,7^\circ$ (10,33 mg/2ml MeOH).

Příklad 8



Krok A:

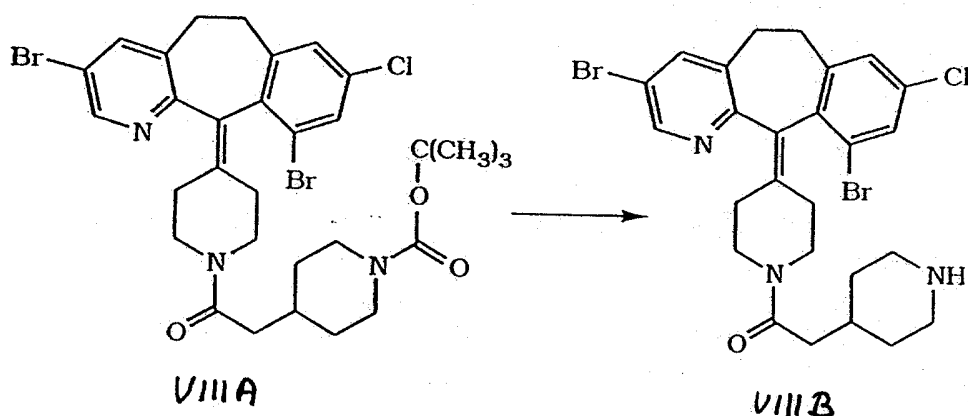


6,0 g (12,8 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 7 (PVII) se ponechá reagovat s 3,78 g (16,6 mmol) 1-N-t-butoxykarbonylpiperidiny-4-octové kyseliny stejným způsobem jako je popsán pro příklad 6, krok A. Získá se 8,52 g produktu (VIHA).

Hmot. spek. $MH^+ = 692$ (FAB)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,5(d, 1H), 7,5(d, 2H), 7,2(d, 1H), 4,15-3,9(m, 3H), 3,8-3,6(m, 1H), 3,5-3,15(m, 3H), 2,9(d, 2H), 2,8-2,5(m, 4H), 2,4-1,8(m, 6H), 1,8-1,6(br d, 2H), 1,4(s, 9H), 1,25-1,0 (m, 2H).

Krok B

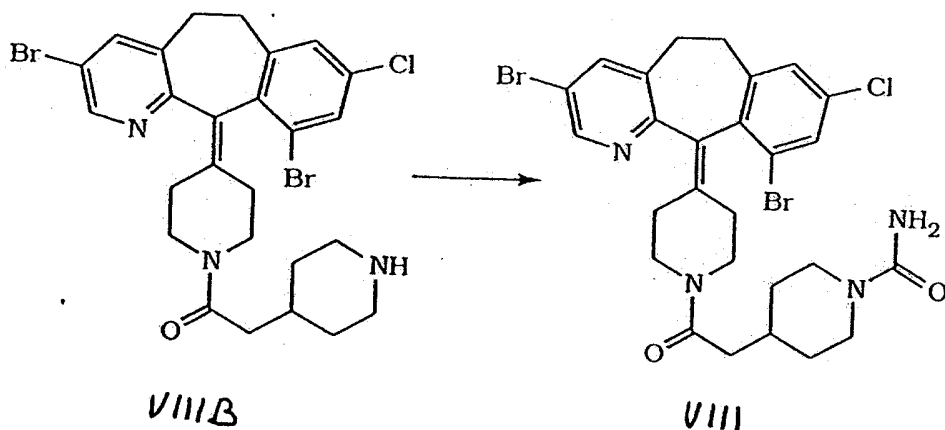


8,5 g produktu z kroku A (VIII A) se smíchá s 60 ml CH_2Cl_2 a ochladí se na 0°C . Pak se přidá 55 ml TFA. Reakční směs se míchá 3 hodiny při 0°C . Pak se přidá 500 ml 1N NaOH (vodného) a dále 30 ml 50% NaOH (vodného). Extrahuje se CH_2Cl_2 . Extrakt se suší MgSO_4 a zkoncentruje ve vakuu. Získá se 7,86 g produktu VIII B).

Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 592(\text{FAB})$.

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,51(d, 1H), 7,52(dd, 2H), 7,20(d, 1H), 4,1-3,95(m, 2H), 3,8-3,65(m, 2H), 3,5-3,05(m, 5H), 3,0-2,5(m, 6H), 2,45-1,6(m, 6H), 1,4-1,1(m, 2H).

Krok C:

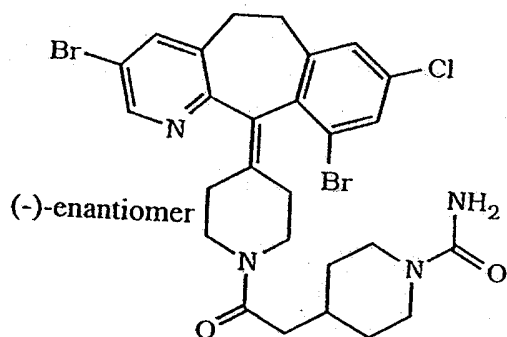


7,80 g (13,1 mmol) produktu z kroku B (VIII B) se ponechá reagovat s 12,1 g (105 mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SiNCO}$ stejným způsobem jako je popsán v příkladu 6, krok C. Získá se 5,50 g požadované sloučeniny (VIII), která je racemickou směsí atropoisomerů.

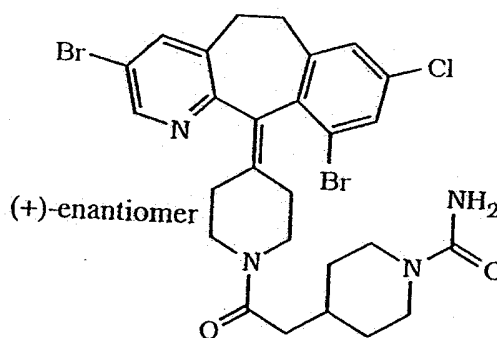
t.t. = 163,6-164,0°C, hmot. spek. $\text{MH}^+ = 635$ (FAB).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,5(d, 1H), 7,52(d, 1H), 7,48(d, 1H), 7,21(d, 1H), 4,54(s, 2H), 4,1-3,6(m, 4H), 3,45-3,15(m, 4H), 3,0-2,5(m, 5H), 2,45-1,6(m, 7H), 1,4-1,0(m, 2H).

Příklady 8A & 8B



Příklad 8A



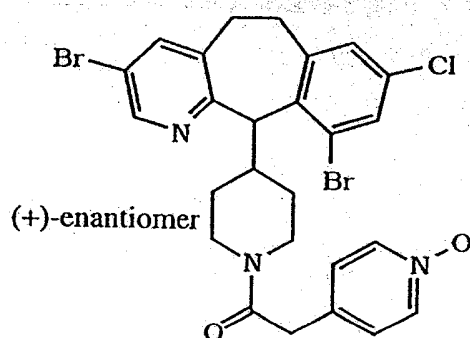
Příklad 8B

Sloučenina z příkladu 8 (VIII) je racemická směs atropoisomerů. Tyto atropoisomery jsou děleny preparativní chromatografií (HPLC) za použití kolony Chiralpack AD (5 cm x 50 cm) a 20% iPrOH/hexan + 0,2% ethylaminu jako mobilní fáze. Průtok byl nízký 100 ml/min. Získá se (+)- a (-)-enantiomery, příklady 8B a 8A.

Fyzikálně-chemická data pro (-)-enantiomer, příklad 8A
t.t. = 142,9-143,5°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -151,7^\circ$ (11,06 mg/2ml MeOH)

Fyzikálně-chemická data pro (+)-enantiomer, příklad 8B
t.t. = 126,5-127,0°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +145,6^\circ$ (8,38 mg/2ml MeOH).

Příklad 9



IX

3,32 g (+)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 8, krok B (PVIIB) se smíchá s 2,38 g sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI), 1,92 g HOBt, 2,70 g DEC, 1,56 ml N-methylmorfolinu a 50 ml suchého DMF. Míchá se při 25°C 24 hodin. Zkoncentruje se ve vakuu, pak se odparek zředí CH₂Cl₂. Promyje se 1N NaOH (vodným), pak nasyceným roztokem NaH₂PO₄ (vodným) a suší se MgSO₄. Zkoncentruje se ve vakuu do sucha a chromatografie odparku (silikagel, 2% MeOH/CH₂Cl₂ + NH₄OH) poskytne 3,82 g požadované sloučeniny (IX).

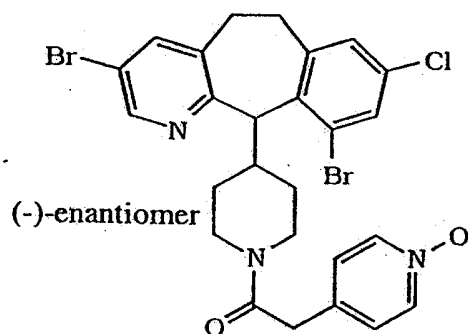
Hmot. spek. MH⁺ = 604 (FAB).

Sůl hydrochloridu byla připravena rozpuštěním sloučeniny z příkladu 9 v dichlormethanu, který byl nasycen chlorovodíkem. Po zkoncentrování ve vakuu bylo získáno sloučenina z příkladu 9 jako HCl sůl.

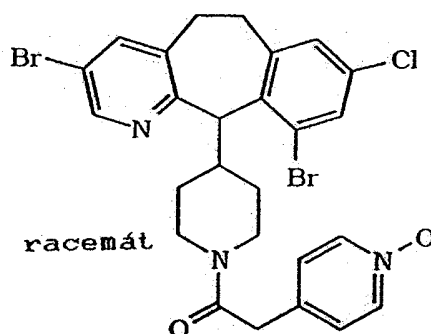
t.t. = 166,5°C.

[α]_D²² = +70,8° (9,9 mg/2ml MeOH).

Příklady 9A & 9B



Příklad 9A



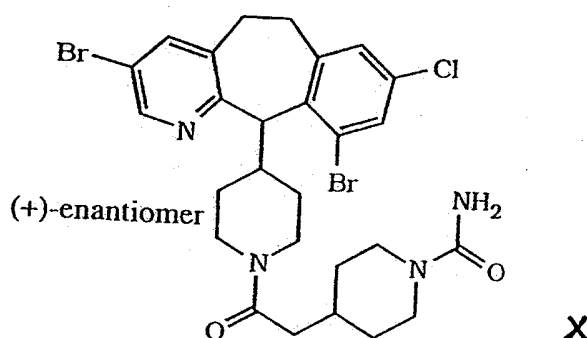
Příklad 9B

(-)-enantiomer sloučeniny z preparativního příkladu 8, krok B (3,38 g) je ponecháno reagovat s 2,20 g sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI) stejným způsobem jako je popsán v příkladě 9. Získá se 3,58 g sloučeniny z příkladu 9A.

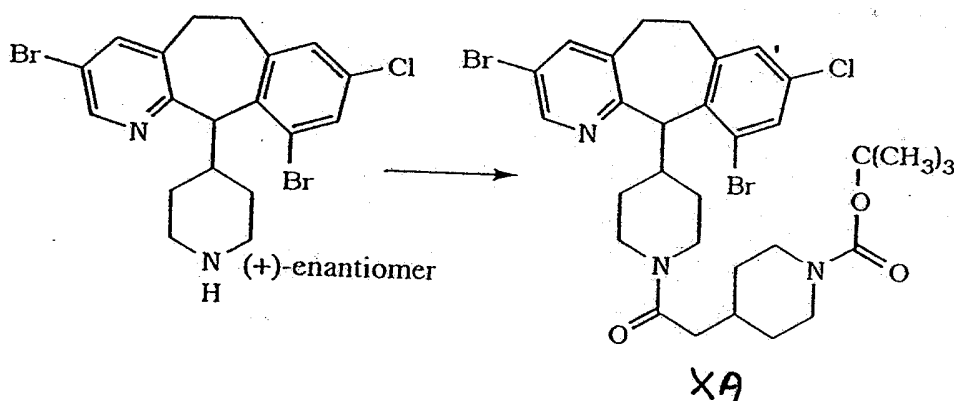
HCl sůl sloučeniny z příkladu 9A je připravena rozpuštěním této sloučeniny v CH_2Cl_2 . Pak se k roztoku přidá 6M HCl (g) v CH_2Cl_2 . Pak se roztok zkoncentruje ve vakuu a poskytne sůl.
t.t. = 129°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -72,3^\circ$ (3,32 mg/2ml MeOH).

Racemát sloučeniny z preparativního příkladu 8, krok A (PVIIIA), je ponechán reagovat se sloučeninou z preparativního příkladu 1 (PI) stejným způsobem jako je popsán v příkladu 9. Získá se sloučenina z příkladu 9B.
t.t. = $145,0^\circ\text{C}$.

Příklad 10



Krok A



1,33 g (+)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 8, krok B se nechá reagovat s 1,37 g 1-N-t-butoxykarbonylpiperidinyli-4-octové kyseliny způsobem, který je popsán pro příklad 6, krok A. Získá se 2,78

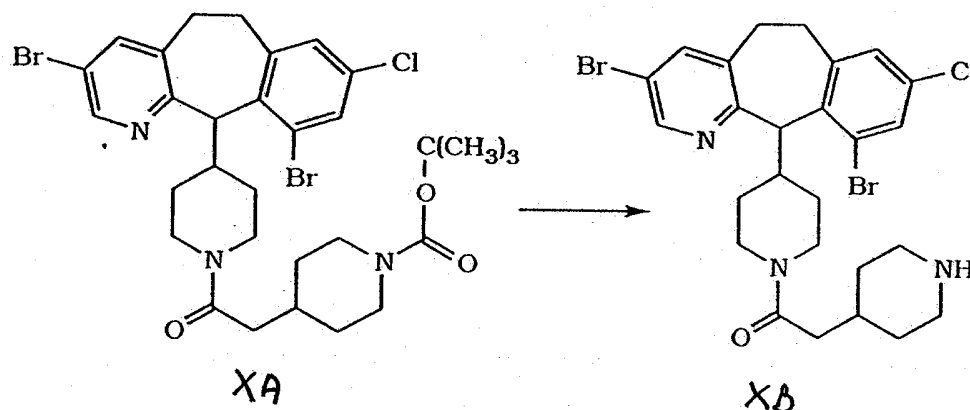
14.08.98

g produktu (XA).

Hmot. spek. $\text{NH}^+ = 694,0$ (FAB)

$[\alpha]_D^{25} = +34,1^\circ$ (5,45 mg/2ml MeOH).

Krok B

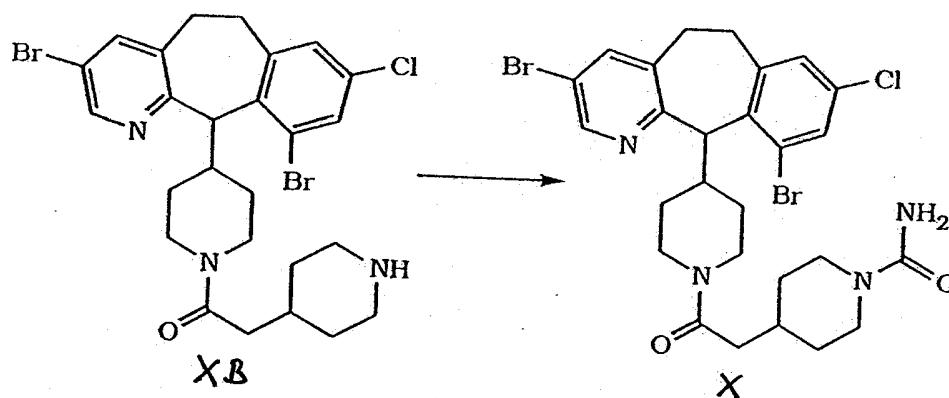


2,78 g produktu z kroku A (XA) se ponechá reagovat způsobem, který je popsán v příklad 8, krok B. Získá se 1,72 g produktu (XB).

t. t. = $104,1^\circ\text{C}$. hmot. spek. $\text{MH}^+ = 594$

$[\alpha]_D^{25} = +53,4^\circ$ (11,42 mg/2ml MeOH).

Krok C:



1,58 g produktu z kroku B (XB) reaguje s 6 ml $(\text{CH}_3)_3\text{SiNCO}$ způsobem, který je popsán pro příklad 6, krok C. Získá se 1,40 g požadované sloučeniny (X).

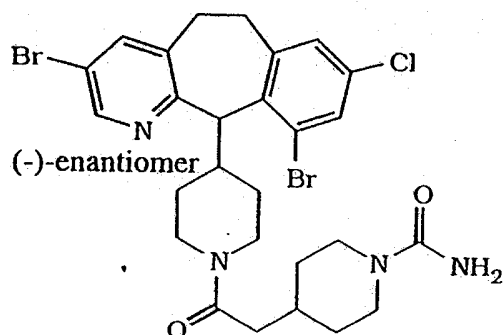
t. t. = 140°C

Hmot. spek. $\text{NH}^+ = 637$

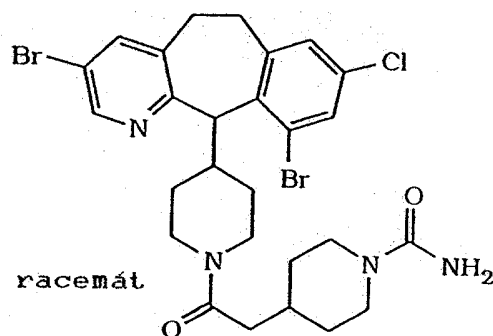
$[\alpha]_D^{25} = +49,1^\circ$ (4,24 mg/2ml MeOH).

Rekrystalizací z acetonu se získá požadovaná látka jako pevná látka. t. t. = $214,5-215,9^\circ\text{C}$.

Příklady 10A & 10B



Příklad 10A



Příklad 10B

(-)-enantiomer sloučeniny z preparativního příkladu 8, krok B, je převeden na požadovanou sloučeninu (příklad 10A) v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 10, kroky A-C. Získá se sloučenina, příklad 10A.

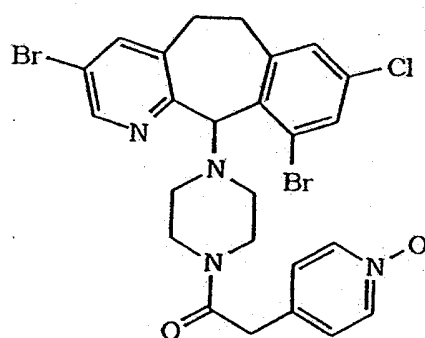
t.t. = 152°C, hmot. spek. MH^+ = 637

$[\alpha]_D^{25} = -62,5^\circ$ (1,12 mg/2ml MeOH).

Racemická sloučenina z preparativního příkladu 8, krok A, je převedena na požadovanou sloučeninu (příklad 9B) v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 10, kroky A-C. Získá se sloučenina, příklad 10B.

t.t. = 111,2°C.

Příklad 11



XI

Požadovaná sloučenina (XI) je připravena z racemické sloučeniny z preparativního příkladu 9, krok F v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 2.

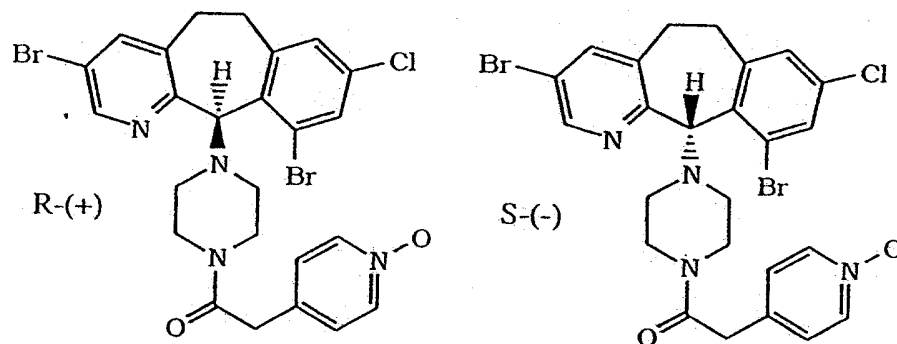
1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,44(d, 1H), 8,14(d, 2H), 7,58(d, 1H), 7,47(d, 1H), 7,14(m, 3H), 5,32(s, 1H), 4,65-4,57(m, 1H), 3,68(s, 2H), 3,65-3,39(m, 4H), 2,91-2,87(m, 1H), 2,69-2,63(m, 1H),

14.03.99

2, 45-2, 33(m, 4H).

 $MH^+ = 605$.

Příklady 11A & 11B



Příklad 11A

Příklad 11B

Z R(+)- nebo S(-)- enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 9, krok G, je připraven R(+)-enantiomer (příklad 11A) a S(-)-enantiomer (příklad 11B) v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 2.

Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer, příklad 11A:

t.t. = 167,0-167,8°C, $[\alpha]_D^{25} = +32,6^\circ$ (c = 1, MeOH).

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,44(d, 1H), 8,14(d, 2H), 7,58(d, 1H), 7,47(d, 1H), 7,14(m, 3H), 5,32(s, 1H), 4,65-4,57(m, 1H), 3,68(s, 2H), 3,65-3,39(m, 4H), 2,91-2,87(m, 1H), 2,69-2,63(m, 1H), 2,45-2,33(m, 4H).

$MH^+ = 605$.

Fyzikálně-chemická data pro S(-)-enantiomer, příklad 11B:

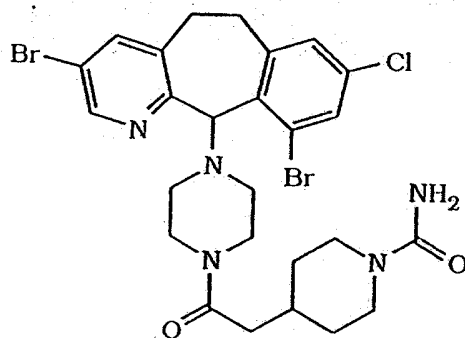
$[\alpha]_D^{25} = -38,2^\circ$ (14,67mg/2 ml MeOH).

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,44(d, 1H), 8,14(d, 2H), 7,58(d, 1H), 7,47(d, 1H), 7,14(m, 3H), 5,32(s, 1H), 4,64-4,57(m, 1H), 3,67(s, 2H), 3,70-3,34(m, 4H), 2,95-2,87(m, 1H), 2,69-2,63(m, 1H), 2,45-2,31(m, 4H).

$MH^+ = 605$.

14.08.98

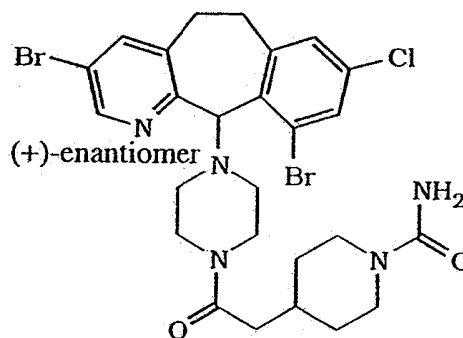
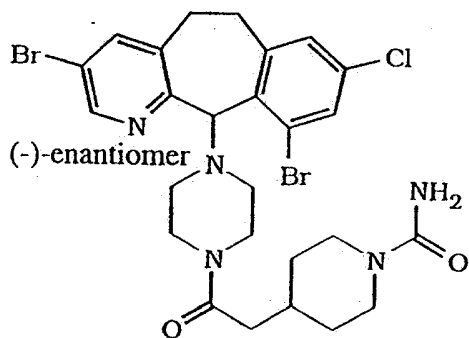
Příklad 12



XII

Požadovaná sloučenina z příkladu 12 (XII) je připravena z racemické sloučeniny z preparativního příkladu 9, krok F v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 8, kroky A-C. Sloučenina XII je racemát.

Příklady 12A & 12B.



Příklad 12A

Sloučenina z příkladu 12 je racemická směs. Chromatografie 2,45 g sloučeniny z příkladu 12 za použití kolony Chiralpack AD, 20% iPrOH/hexan + 0,2% diethylamin jako mobilní fáze při nízké průtokové rychlosti 100ml/min, poskytne 0,970 g (+)-enantiomeru (příklad 12B) a 0,982 g (-)-enantiomeru (příklad 12A).

Fyzikálně-chemická data pro (-)-enantiomer, příklad 12A:

$[\alpha]_D^{25} = -31,2^\circ$ ($c = 0,453$, MeOH).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,43(d, 1H), 7,58(d, 1H), 7,48(d, 1H), 7,14(m, 1H), 5,32(s, 1H), 4,5-4,75(m, 1H), 4,4(s, 2H), 3,9(d, 2H), 3,2-3,7(m, 5H), 2,52-3,05(m, 4H), 1,85-2,5(m, 6H),

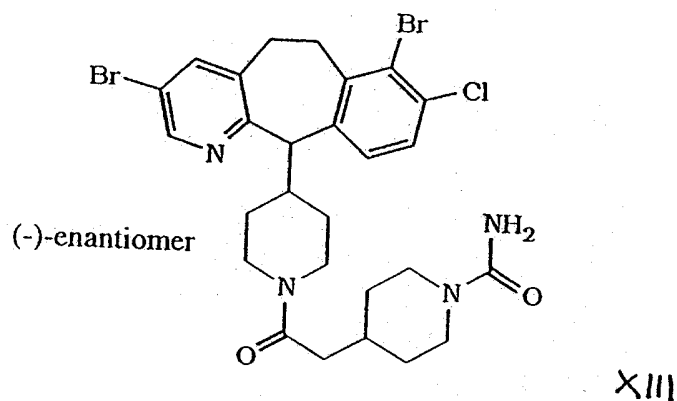
1,5-1,85(m,4H), 1,0-1,4(m,1H).

Fyzikálně-chemická data pro (+)-enantiomer, příklad 12B:

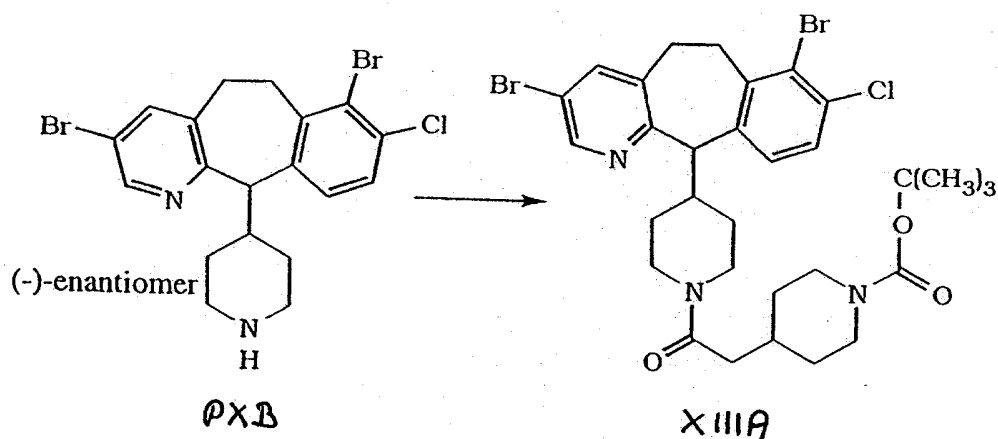
$[\alpha]_D^{25} = +29,8^\circ$ ($c = 0,414$, MeOH)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8,43(d,1H), 7,58(d,1H), 7,48(d,1H), 7,14(d,1H), 5,32(s,1H), 4,5-4,75(m,1H), 4,4(s,2H), 3,9(d,2H), 3,2-3,7(m,5H), 2,52-3,05(m,4H), 1,85-2,5(m,6H), 1,5-1,85(m,4H), 1,0-1,4(m,1H).

Příklad 13



Krok A:



1,35 g (-)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 10, krok B (PXB), je ponecháno reagovat s 1,4 g 1-N-t-butoxykarbonylpiperidiny-4-octové kyseliny v podstatě stejným způsobem, který je popsán pro příklad 6, krok A. Získá se 2,0 g produktu (XIII A).

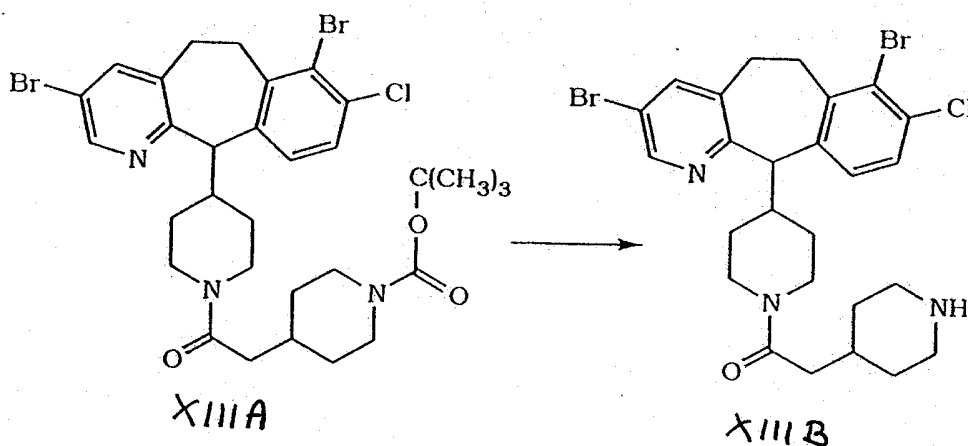
Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 694$ (FAB)

částečné ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 8,38(s,1H), 7,60(s,1H),

14.08.98

7,25(d, 1H), 7,05(m, 1H), 1,45(s, 9H).

Krok B:

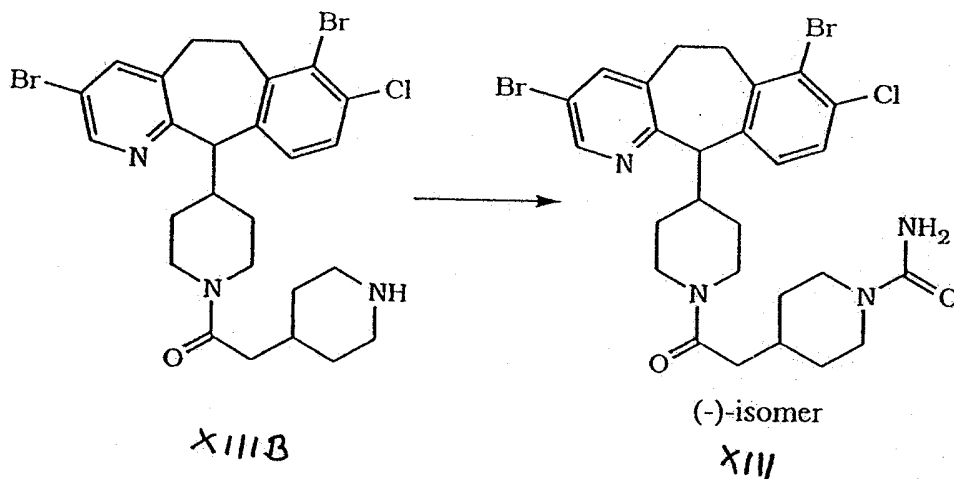


1,95 g produktu z kroku A (XIII A) je ponecháno reagovat způsobem, který je popsán pro příklad 8, krok B. Získá se 1,63 g produktu (XIII B).

Hmot. spek. $MH^+ = 594$ (FAB)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8,38(s, 1H), 7,60(s, 1H), 7,25(d, 1H), 7,03(m, 1H), 4,64(d, 1H), 3,90(m, 2H).

Krok C:



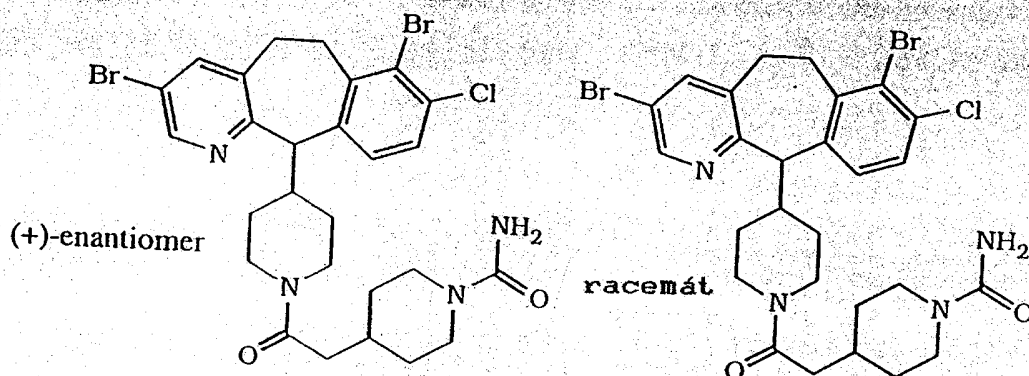
1,6 g produktu z kroku B (XIII B) je ponecháno reagovat s 1,3 ml $(CH_3)_3SiNCO$ stejným způsobem jako je popsán pro příklad 6, krok C. Získá se 1,27 g produktu (XIII).

Hmot. spek. $MH^+ = 637$ (FAB)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s, 1H), 7,59(s, 1H), 7,25(d, 1H), 7,04(m, 1H), 4,60(d, 1H), 4,41(s, 2H).

$[\alpha]_D^{25} = -33,1^\circ$ ($c = 0,58$, EtOH).

Příklady 13A & 13B



Příklad 13A

(+)-enantiomer sloučeniny z preparativního příkladu 10, krok B, (2,1 g), je převedeno na požadovanou sloučeninu stejným způsobem jako je popsán pro příklad 10, kroky A-C. Získá se sloučenina, příklad 13A.

Hmot. spek. $MH^+ = 637$ (FABS), $[\alpha]_D^{25} = +32,4^\circ$ ($c=0,57$, EtOH)

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,39(s, 1H), 7,59(s, 1H), 7,25(d, 1H), 7,04(m, 1H), 4,60(d, 1H), 4,41(s, 2H),

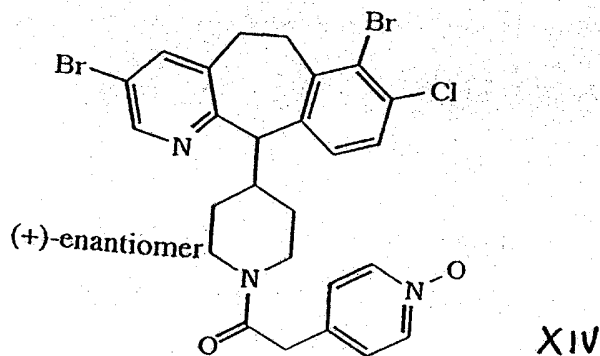
částečné 1H NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz): 8,42(s, 1H), 7,88(s, 1H), 7,41(d, 1H), 7,29(m, 1H), 5,85(s, 2H), 4,20(d, 1H).

Racemická sloučenina z preparativního příkladu 10, krok A, je převedena na racemickou sloučeninu, příklad 13B, analogickým způsobem.

částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s, 1H), 7,59(s, 1H), 7,25(d, 1H), 7,04(m, 1H), 4,60(d, 1H), 4,41(s, 2H),

částečné 1H NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz): 8,42(s, 1H), 7,88(s, 1H), 7,41(d, 1H), 7,29(d, 1H), 5,85(s, 2H), 4,20(d, 1H).

Příklad 14



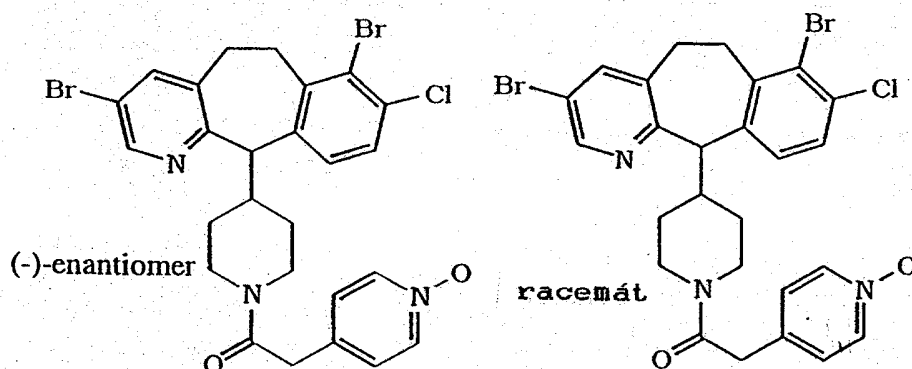
2,6 g (+)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 10, krok B, je ponecháno reagovat s 1,68 g sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI), analogickým způsobem jako je popsán pro příklad 9. Získá se 2,10 g požadované sloučeniny (XIV).

Hmot. spek. $MH^+ = 604$ (FAB), $[\alpha]_D^{25} = +34,1^\circ$ (10,98mg/2ml EtOH)
 částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 8,38(s,1H), 8,15(d,2H), 7,58(s,1H), 7,26(d,1H), 7,15(d,2H), 7,03(d,1H), 4,57(d,1H).

HCl sůl sloučeniny z příkladu 14 se připraví rozpuštěním 700 mg sloučeniny (XIV) ve 4 ml CH_2Cl_2 . Přidají se 4 ml Et_2O , ochladí na $0^\circ C$ a pomalu (po kapkách se přidá 1 ml HCl(g) v dioxanu. Přidají se 2 ml Et_2O a reakční směs se míchá při $0^\circ C$ 7 minut. Pak se zředí 30 ml Et_2O , pevný produkt se spojí na filtru a promyje 30 ml Et_2O . Pevný produkt se suší ve vakuu a získá se 0,836 g HCl soli sloučeniny z příkladu 14.

$[\alpha]_D^{25} = +64,8^\circ$ (9,94mg/2ml EtOH).

Příklady 14A & 14B



Příklad 14A

Příklad 14B

0,6 g (+)-enantiomeru sloučeniny z preparativního příkladu 10, krok B, je ponecháno reagovat s 0,39 g sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI), analogickým způsobem jako je popsán pro příklad 9. Získá se 0,705 g požadované sloučeniny.

Hmot. spek. $MH^+ = 604$ (FABS), $[\alpha]_D^{25} = -41,8^\circ$ (EtOH)
 částečné 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8,38(s,1H), 8,15(d,2H), 7,58(s,1H), 7,26(d,1H), 7,15(d,2H), 7,03(d,1H), 4,57(d,1H).

HCl sůl sloučeniny z příkladu 14A se připraví stejným způsobem, který je popsán pro příklad 14.

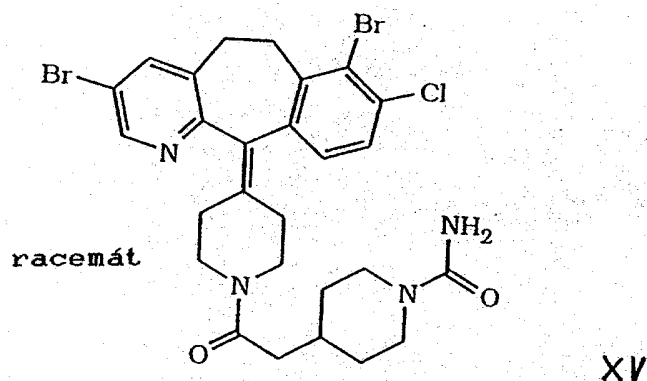
$[\alpha]_D^{25} = -63,2^\circ$ (EtOH).

Racemická sloučenina z preparativního příkladu 10, Krok A, je převedena na racemickou sloučeninu z příkladu 14B stejným způsobem jako je popsán pro příklad 9.

částečné ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 8,38 (s, 1H), 8,15(d, 2H), 7,58(s, 1H), 7,26(d, 1H), 7,15(d, 2H), 7,03(d, 1H), 4,57(d, 1H).

částečné ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): 8,77(d, 2H), 8,47(s, 1H), 7,95(s, 1H), 7,74(d, 2H), 7,43(m, 1H), 7,27(d, 1H), 4,35(d, 1H).

Příklad 15

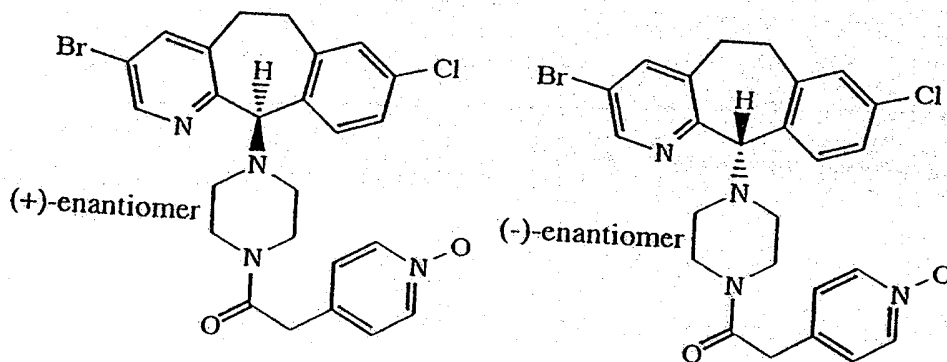


Sloučenina z preparativního příkladu 4 reaguje stejnými způsoby, které jsou popsány pro příklad 8, kroky A-C. Získá se požadovaná sloučenina (XV), která je racemát.

Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 635$ (FAB)

částečné ^1H NMR (CDCl_3): 8,45 (s, 1H), 7,60(s, 1H), 7,35(d, 1H), 7,05(d, 1H), 4,45(s, 1H).

Příklady 16A & 16B



Příklad 16A

Příklad 16B

R(+)-enantiomer nebo S(-)-enantiomer sloučeniny z preparativního příkladu 11 je převeden stejným způsobem, který

je popsán pro příklad 2. Získá se R-(+)-enantiomer, příklad 16A a S-(-)-enantiomer, příklad 16B, požadované sloučeniny.

Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer:

^{13}C NMR (CDCl_3): 166,5(C), 154,8(C), 146,6(CH), 140,8(CH), 140,4(C), 138,5(CH), 138(CH), 136,3(C), 134,6(C), 133,8(C), 133,6(C), 132,0(CH), 130,0(CH), 126,3(CH), 126,3(CH), 125,8(CH), 119,6(C), 78,4(CH), 51,1(CH_2), 50,6(CH_2), 45,4(CH_2), 41,5(CH_2), 38,0(CH_2), 30,1(CH_2), 30,0(CH_2).

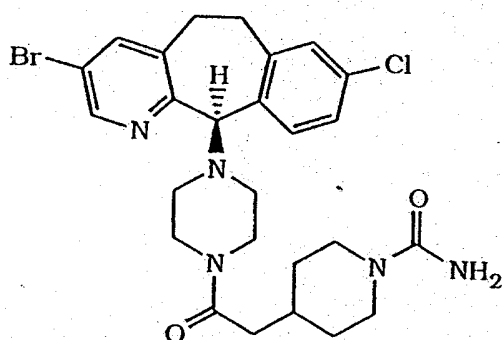
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +30,7^\circ$ (10,35 mg/2ml MeOH).

Fyzikálně-chemická data pro S-(-)-enantiomer:

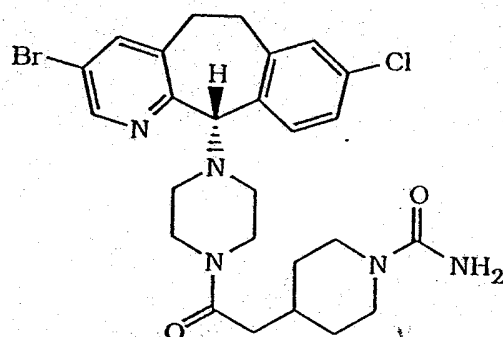
^{13}C NMR (CDCl_3): 166,5(C), 154,8(C), 146,6(CH), 140,8(CH), 140,4(C), 138,5(CH), 138,5(CH), 136,3(C), 134,6(C), 133,8(C), 133,6(C), 132,0(CH), 130,0(CH), 126,3(CH), 126,3(CH), 125,8(CH), 119,6(C), 78,4(CH), 51,1(CH_2), 50,6(CH_2), 45,4(CH_2), 41,5(CH_2), 38,0(CH_2), 30,1(CH_2), 29,9(CH_2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -30,9^\circ$ (9,70 mg/2ml MeOH).

Příklady 17 & 17A



Příklad 17



Příklad 17A

(+)-enantiomer nebo (-)-enantiomer sloučeniny z preparativního příkladu 11 se zpracovává stejným způsobem, který je popsán pro příklad 1, kroky A-C. Získá se R-(+)-enantiomer, příklad 17 a S-(-)-enantiomer, příklad 17A, požadované sloučeniny.

Fyzikálně-chemická data pro R-(+)-enantiomer:

^{13}C NMR (CDCl_3): 169,3(C), 157,5(C), 155,0(C), 146,6(CH), 140,8(CH), 140,4(C), 136,3(C), 134,8(C), 133,7(C), 132,0(CH), 130,0(CH), 125,8(CH), 119,6(C), 78,5(CH), 51,4(CH_2), 50,9(CH_2), 45,2(CH_2), 43,9(CH_2), 43,9(CH_2), 38,8(CH_2), 32,5(CH_2), 31,5(CH_2), 31,5(CH_2), 30,1(CH_2), 30,0(CH_2).

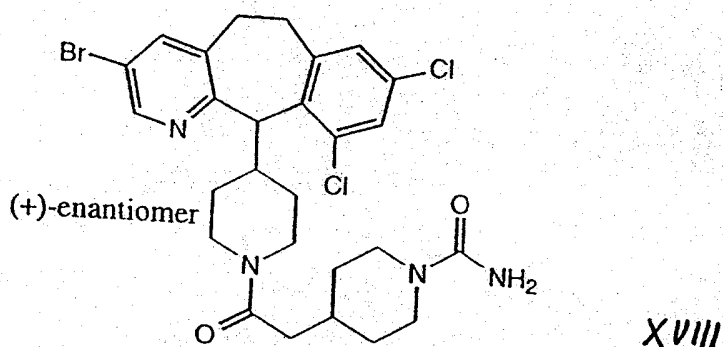
$[\alpha]_D^{24,8} = +28,7^\circ$ (10,1 mg/2ml MeOH).

Fyzikálně-chemická data pro S-(-)-enantiomer:

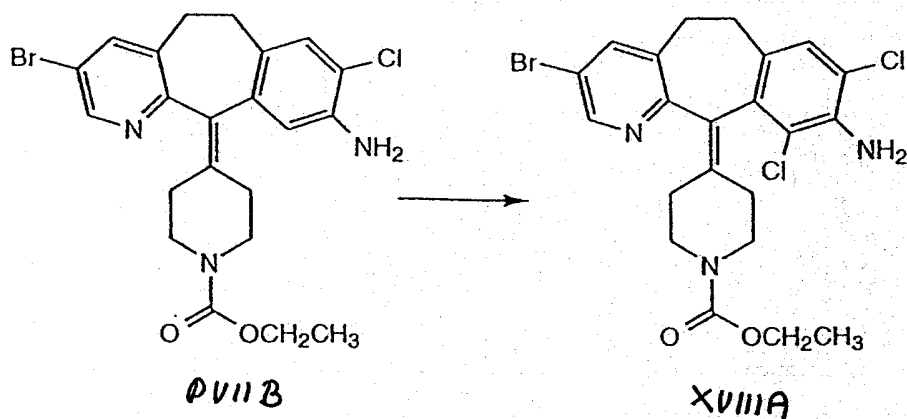
^{13}C NMR (CDCl_3): 169,3(C), 157,6(C), 155,0(C), 146,6(CH), 140,8(CH), 140,4(C), 136,3(C), 134,8(C), 133,7(C), 132,0(CH), 130,0(CH), 125,8(CH), 119,6(C), 78,5(CH), 51,4(CH_2), 50,9(CH_2), 45,2(CH_2), 43,9(CH_2), 43,9(CH_2), 38,8(CH_2), 32,5(CH_2), 31,5(CH_2), 31,5(CH_2), 30,1(CH_2), 30,0(CH_2).

$[\alpha]_D^{24,8} = -28,5^\circ$ (10,1 mg/2ml MeOH).

Příklad 18



Krok A:



9,90 g (18,9 mmol) produktu z preparativního příkladu 7, krok B (PVIIB), se rozpustí ve 150 ml CH_2Cl_2 a 200 ml CH_3CN a zahřeje se na 60°C . Přidá se 2,77 g (20,8 mmol) N-chlorsuccinimidu a zahřívá se k refluxu po dobu 3 hodin. Reakce se monitoruje TLC (30% EtOAc/voda). Přidá se dalších 2,35 g (10,4 mmol) N-chlorsuccinimidu a zahřívá se k refluxu dalších 45 minut. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a extrahuje se 1N NaOH a CH_2Cl_2 . CH_2Cl_2 vrstva se suší MgSO_4 ,

$t.t. = 193-195, 4^{\circ}\text{C}.$

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound XVIII A to XVIII B. XVIII A is a complex molecule with a brominated pyridine ring, a chlorinated benzene ring with an amino group, and a piperidine ring with an ethyl ester group. XVIII B is the same molecule but with the amino group removed. An arrow points from XVIII A to XVIII B.

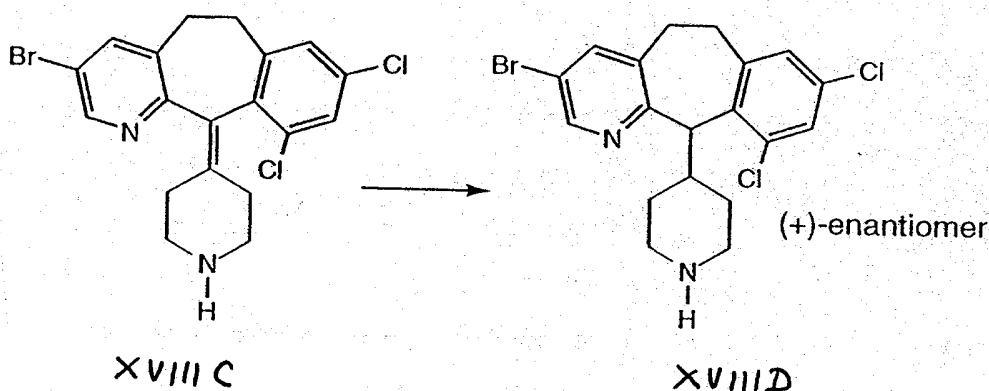
Hmot. spek. $MH^+ = 495$.

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound XVIII B to XVIII C. XVIII B is a complex molecule with a brominated pyridine ring, a chlorinated benzene ring, and a piperidine ring substituted with an ethyl ester group. XVIII C is the same molecule but with the ester group removed, leaving a secondary amine.

3,9 g produktu z kroku B (XVIII B) se rozpustí ve 100 ml koncentrované HCl a zahřívá se k refluxu přes noc. Reakční směs se ochladí, zalkalizuje 50% NaOH a výsledná směs se extrahuje CH_2Cl_2 . CH_2Cl_2 vrstva se suší MgSO_4 , za vakua se odpaří rozpouštědlo a produkt se usuší. Získá se 3,09g požadovaného produktu (XVIII C).

Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 423$.

Krok D:



Za použití způsobu, který je podobný způsobu, který je popsán v preparativním příkladě 6, se získá 1,73 g požadovaného produktu (XVIII D).

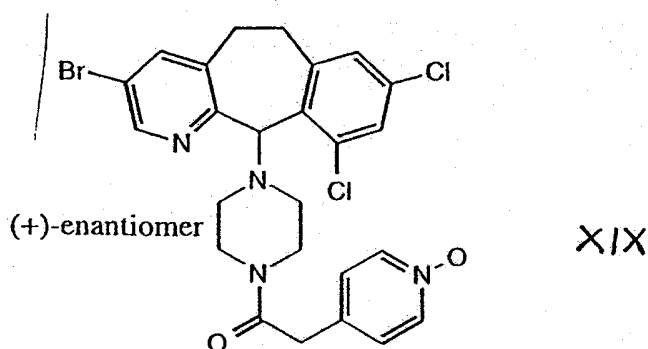
t.t. = 169,8-170,1°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +48,2^\circ (c=1, \text{MeOH})$, $\text{MH}^+ = 425$.

Krok E:

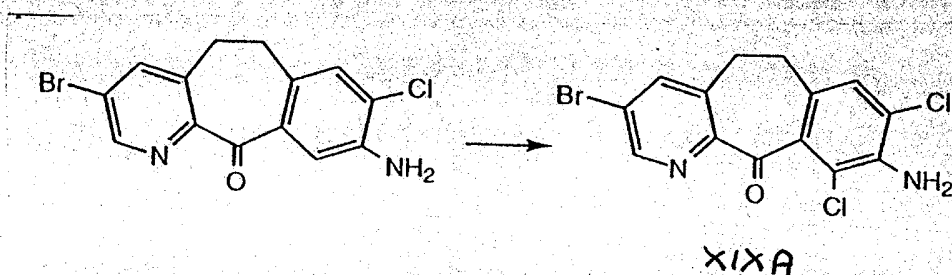
Za použití způsobu, který je podobný způsobu, který je popsán v příkladu 4, se z výchozí látky, produktu z kroku D (XVIII D), získá požadovaná sloučenina (XVIII).

t.t. = 152,3-153,3°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +53,0^\circ (c=1, \text{MeOH})$, $\text{MH}^+ = 593$.

Příklad 19



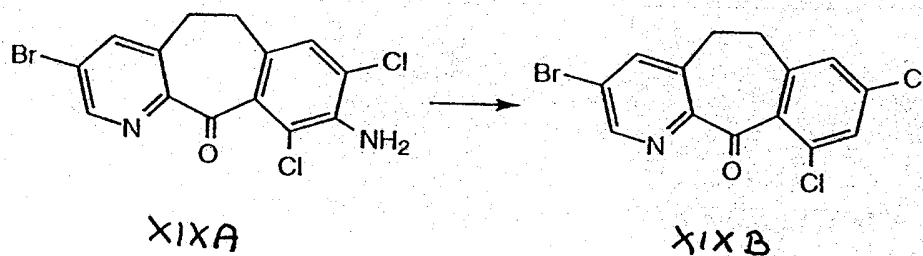
Krok A:



15,0 (44,4 mmol) produktu z preparativního příkladu 9, krok B, se ponechá reagovat s 6,52 g (48,9 mmol) N-chlorsuccinimidu způsobem, který je podobný tomu, který je popsán v příkladu 18, krok A. Extrahuje se, jak je popsáno a získá se 16,56 g požadovaného produktu (XIXA).

t.t. = 234,7-235,0°C, $MH^+ = 370$.

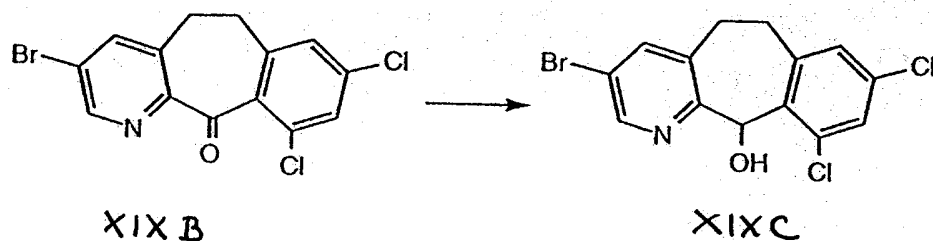
Krok B:



16,95 g (45,6 mmol) produktu z kroku A (XIXA) se ponechá reagovat způsobem popsáným v příkladu 18, krok B a získá se 13,07 g požadovaného produktu (XIXB).

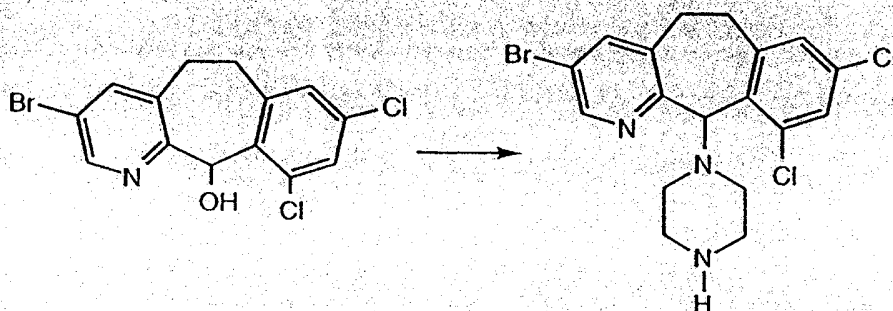
t.t. = 191,7-192,1°C. $MH^+ = 356$.

Krok C:



10,0 g (28,0 mmol) produktu z kroku B (XIXB) se ponechá reagovat s $NaBH_4$ způsobem, který je popsán v preparativním příkladě 9, krok B. Získá se požadovaný produkt (XIXC), který se použije v následujícím kroku bez dalšího čištění.

Krok D:



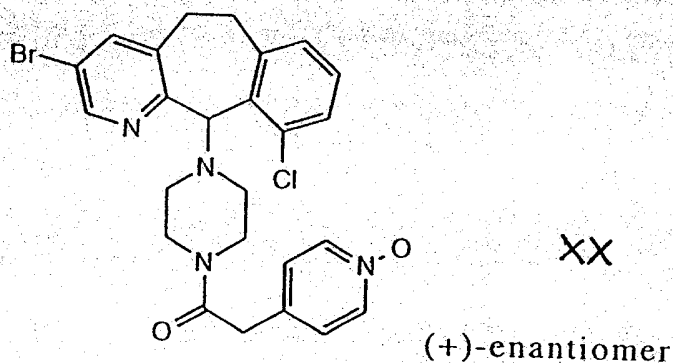
10,0 g (27,9 mmol) produktu z kroku C (XIXC) se rozpustí pod dusíkem v 200 ml CH_2Cl_2 za míchání a při teplotě místnosti. Reakční směs se ochladí na 0°C a přidá se 2,63 g triethylaminu a 4,80 g (41,9 mmol) methansulfonylchloridu. K výslednému roztoku se při 0°C přidá roztok 16,84 g (19,6 mmol) piperazinu a 100 ml THF a dále se bez prodlení přidá 100 ml DMF. Míchá se při teplotě místnosti přes noc. Odpaří se rozpouštědlo a výsledný zbytek se extrahuje s CH_2Cl_2 a nasyceným roztokem NaHCO_3 . CH_2Cl_2 vrstva se suší MgSO_4 , filtruje se a koncentruje, aby se získal surový produkt. Chromatografie surového produktu (1200 ml silikagelu, eluce 5% MeOH (nasycený NH_3)/ CH_2Cl_2) se získá racemická směs. Racemická sloučenina se dělí chirální chromatografií na koloně Chiralpack AD (5 cm x 50 cm) eluce 30% iPrOH/ hexan + 0,2% diethylaminu. Hmot. spek. $\text{MH}^+ = 426$. Požadovaný isomer je (+)-enantiomer.

Krok E:

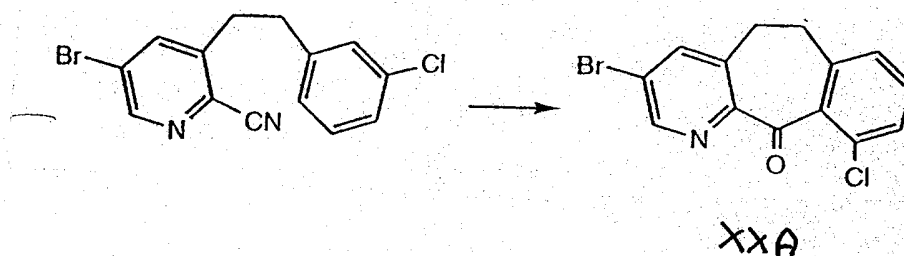
2,0 g (4,7 mmol) produktu z kroku D se míchá v 40 ml DMF pod dusíkem, směs se ochladí na 0°C a přidá se 0,615 g (6,1 mmol) N-methylmorpholinu, 1,1668 g (6,1 mmol) DEC, 0,8225g (6,1 mmol) HOBt a 1,6042 g (6,1 mmol) produktu z preparativního příkladu 1 (PI). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Odpaří se rozpouštědlo a výsledný zbytek se extrahuje CH_2Cl_2 , který se promyje vodou, nasyceným NaHCO_3 , 10% NaH_2PO_4 a solankou. Oddělí se CH_2Cl_2 vrstva, suší se MgSO_4 , zfiltruje se a zkoncentruje do sucha. Odparek se čistí flash chromatografií (400 ml silikagelu, eluce 5% MeOH/ NH_3 - CH_2Cl_2). Získá se 2,43 g požadovaného produktu (XIX).

t.l. = 145,3-146,1 $^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +33,6^\circ$ (c=1, MeOH). $\text{MH}^+ = 561$.

Příklad 20

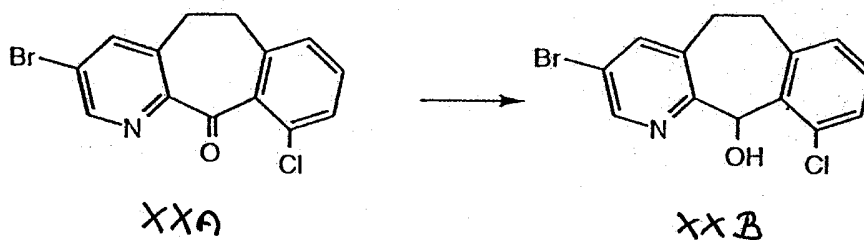


Krok A:



200 mg výchozí kyanosloučeniny se zahřívá v 17 g kyseliny polyfosforečné při teplotě 190-200°C 45 minut. Výsledná směs se nalije na led, přidá se 30% HCl a míchá se 30 minut. Reakční směs se extrahuje CH_2Cl_2 , promyje solankou a suší Na_2SO_4 . Extrakt se zfiltruje a zkoncentruje. Čistí se preparativní TLC (eluze $\text{EtOAc}/\text{hexan}$) a získá se 21 mg požadované sloučeniny (XXA) (také se získá 59 mg 10-chlorproduktu).

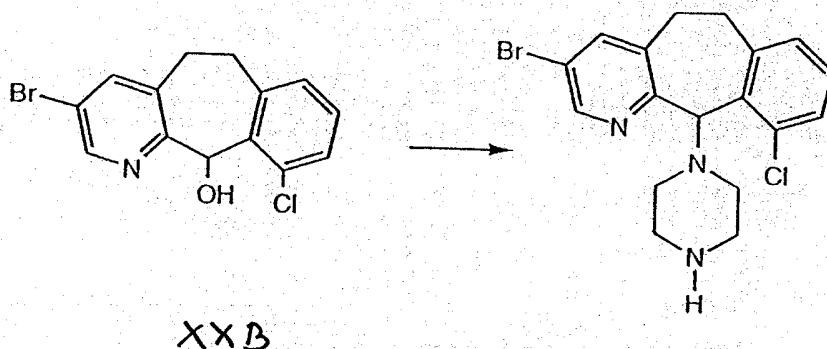
Krok B:



Způsobem, který je popsán v preparativním příkladě 9, krok

E. se ponechá reagovat 1,75 g (5,425 mmol) produktu z kroku A (XXA) s NaBH_4 a získá se požadovaný produkt (XXB).

Krok C:



Látka získaná v kroku B (XXB) se při teplotě místnosti rozpustí v 50 ml CH_2Cl_2 , přidá se 3,95 ml (5,425 mmol) SOCl_2 a míchá se při teplotě místnosti přes noc. Za vakua se odstraní přebytek SOCl_2 a rozpouštědlo. Odparek se rozpustí v CH_2Cl_2 , promyje nasyceným roztokem NaHCO_3 a solankou. Suší se Na_2SO_4 , zfiltruje se a koncentruje. K vzniklé látce se přidá 25 ml THF a 2,33 g (27,125 mmol) piperazinu a míchá se při teplotě místnosti přes noc. Rozpouštědlo se odpaří, přidá se CH_2Cl_2 . Promyje se nasyceným roztokem NaHCO_3 a solankou. Suší se Na_2SO_4 , zfiltruje se a zkoncentruje. Výsledná látka se čistí chirální chromatografií za použití kolony Chiralpack AD, eluce 20% iPrOH/hexan s 0,2% diethylaminu.

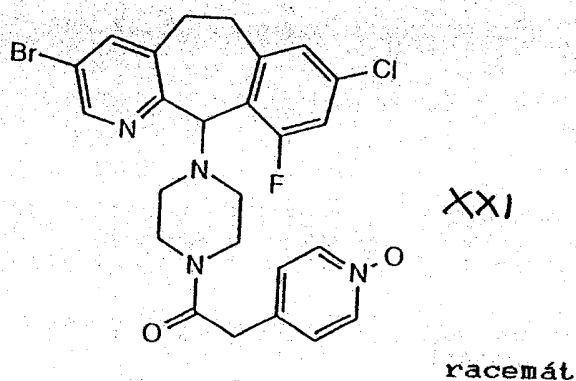
Hmot. spek.: $\text{MH}^+ = 392$.

Požadovaný isomer je (+)-enantiomer.

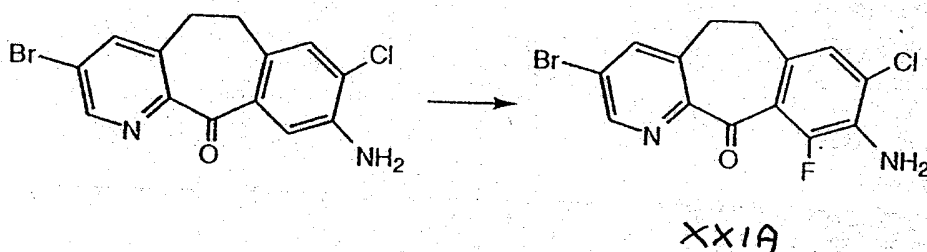
Krok D:

770 mg (1,960 mmol) produktu z kroku C se smíchá s 323 μl (2,548 mmol) N-methylmorpholinu, 344 mg (2,548 mmol) HOBt, 487 mg (2,548 mmol) DEC, 390 mg (2,548 mmol) sloučeniny z preparativního příkladu 1 (PI) a 8 ml DMF. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Rozpouštědlo se odpaří, přidá se EtOAc, promyje se nasyceným roztokem NaHCO_3 , vodou a solankou. Suší se Na_2SO_4 . Produkt se čistí flash chromatografií na silikagelu, eluce EtOAc až gradient 10, 12% (10% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeOH}/\text{EtOAc}$). Dále se čistí preparativní TLC (silikagel 1000 μ) a získá se 750 mg požadované sloučeniny (XX). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23,3^\circ$ ($c = 0,332$, MeOH).

Příklad 21

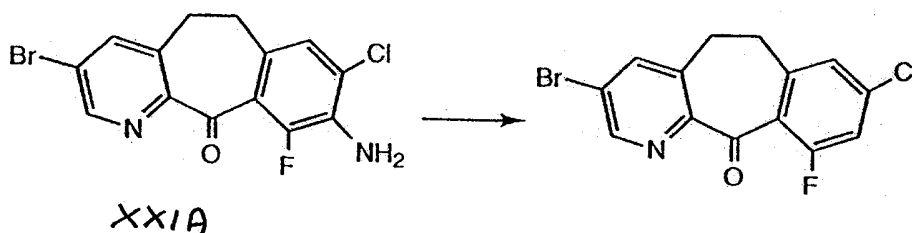


Krok A



10,0g (29,6 mmol) produktu z preparativního příkladu 9, krok B, se rozpustí v 150 ml CH_2Cl_2 a 200 ml CH_3CN při teplotě místnosti. Směs se zahřeje na 60°C , přidá se 10,45 g (32,6 mmol) 1-fluor-4-hydroxy-1,4-diazoniabicyklo[2,2,2]oktan bistetrafluoroboritanu a zahřívá se k refluxu 4 hodiny. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti, extrahuje se CH_2Cl_2 a 1 N NaOH. CH_2Cl_2 vrstva se suší MgSO_4 , zfiltruje se a zkoncentruje do sucha. Výsledná látka se čistí flash chromatografií za použití 1400 ml silikagelu s normální fází, eluce 10% $\text{EtOAc}-\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 2$ kapky NH_4OH . Získá se 2,00 g produktu (XXIA).
t.t. = $103,2-103,5^\circ\text{C}$, $\text{MH}^+ = 355$.

Krok B:



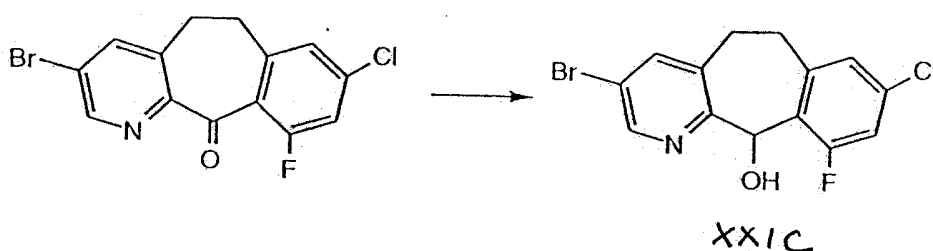
Způsobem, který je popsán v preparativním příkladě 9, krok D, se ponechá reagovat 1,80 g (5,1 mmol) produktu z kroku

14.08.98

A (XXIA). Surový produkt se čistí flash chromatografií za použití 200 ml silikagelu s normální fází, eluce 20% EtOAc/hexan.

Hmot. spek.: $MH^+ = 339$.

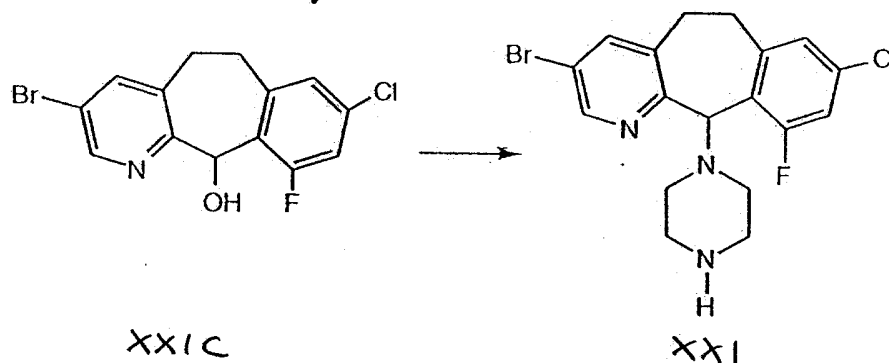
Krok C:



Způsobem, který je popsán v preparativním příkladě 9, krok E, se ponechá reagovat 0,47 g (1,4 mmol) produktu z kroku B s $NaBH_4$. Získá požadovaný produkt (XXIC).

Hmot. spek.: $MH^+ = 342$.

Krok D:



0,37 g (1,1 mmol) produktu z kroku C (XXIC) se rozpustí v 20 ml toluenu pod dusíkovou atmosférou a ochladí se z teploty místnosti na $0^\circ C$. Přidá se 0,3855 g (3,2 mmol) $SOCl_2$ a míchá se při teplotě místnosti, pak se přidá 10 ml $CHCl_3$ a míchá se 3 hodiny. Rozpouštědlo se odpaří a výsledná látka se extrahuje 1N $NaOH-CH_2Cl_2$. CH_2Cl_2 vrstva se suší $MgSO_4$, zfiltruje se a zkoncentruje do sucha. Výsledná látka se rozpustí v 10 ml THF v atmosféře dusíku, přidá se 0,465 g (5,4 mmol) piperazinu, 10 ml THF a míchá se při teplotě místnosti přes noc. Znovu se zopakuje extrakce a získá se požadovaný produkt.

Hmot. spek.: $MH^+ = 410$.

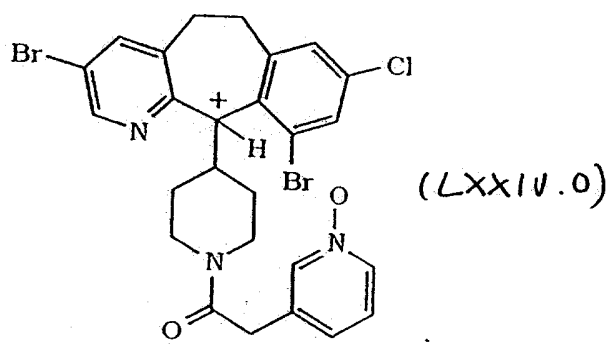
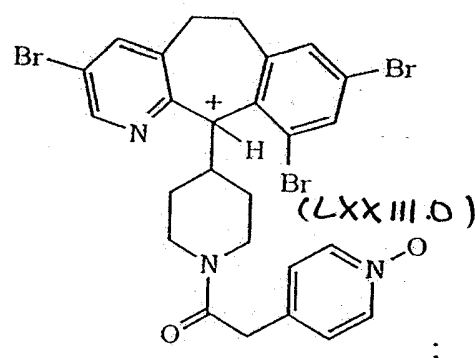
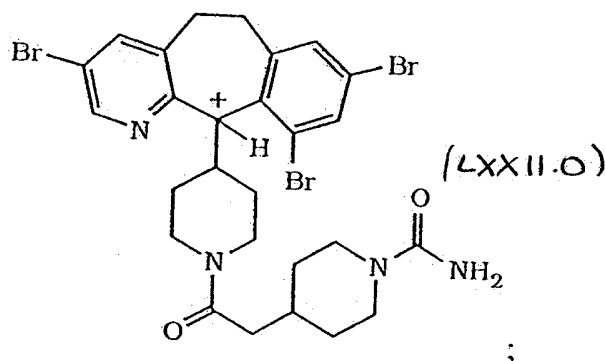
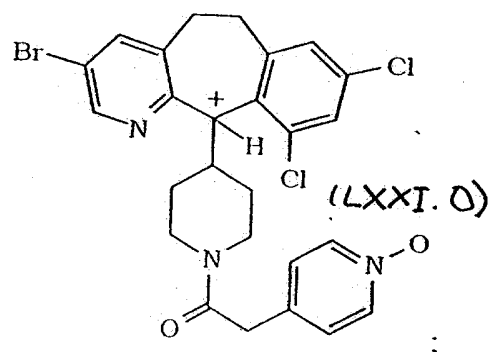
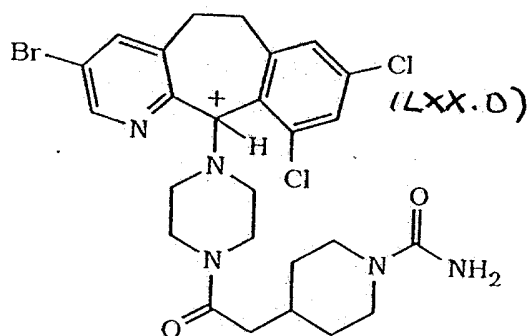
Krok E:

0,44 g (1,1 mmol) produktu z kroku D se ponechá reagovat s N-methylmorfolinem, N-oxidem kyseliny 4-pyridyloctové, DEC a HOBT v DMF způsobem, který je popsán v příkladu 5. Odpaří se rozpouštědlo a výsledná látka se extrahuje CH_2Cl_2 -voda, nasyceným roztokem NaHCO_3 , 10% NaH_2PO_4 a solankou. CH_2Cl_2 vrstva se suší MgSO_4 , filtruje se a koncentruje do sucha. Výsledná látka se čistí flash chromatografií na 150 ml silikagelu s normální fází, eluce 5% $\text{MeOH}/\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{Cl}_2$. Získá se 0,41 g požadované sloučeniny (XXI).

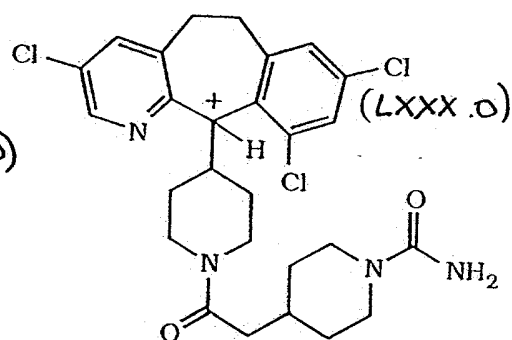
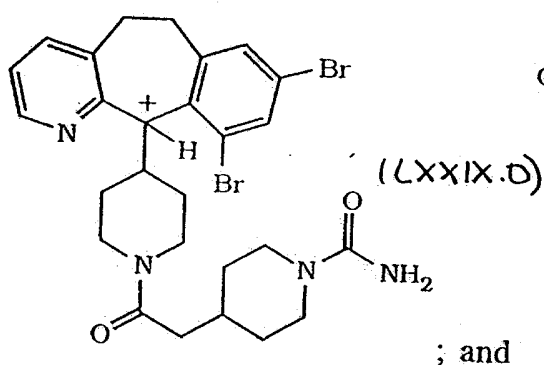
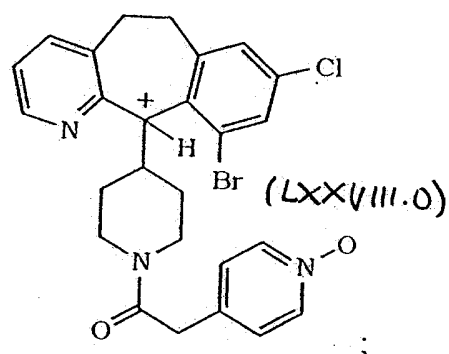
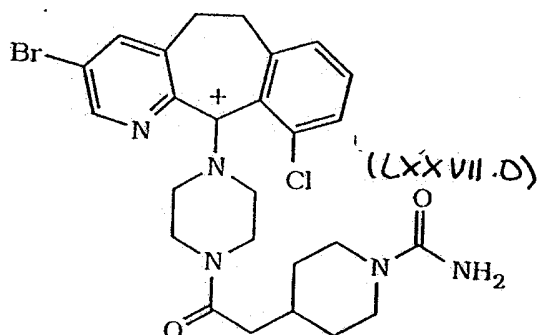
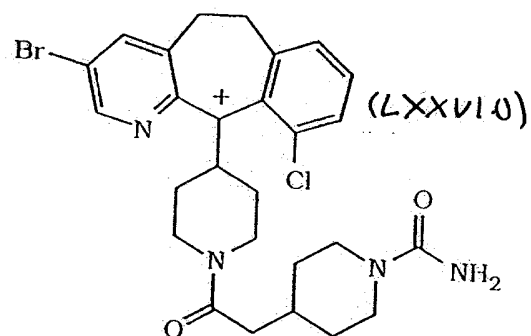
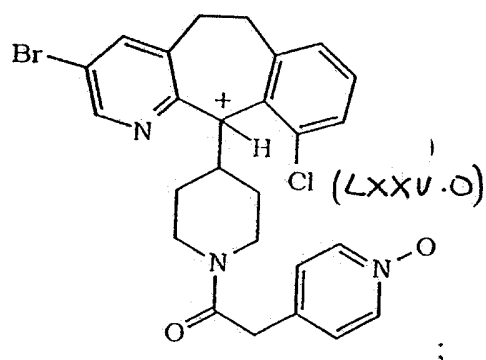
t.l. = 155,0-155,6°C.

Hmot. spek.: $\text{MH}^+ = 545$.

Následující sloučeniny se připraví z odpovídajících výchozích sloučenin a způsoby, které jsou popsány výše:



14.08.98



; and

Stanovení

1. In vitro stanovení enzymů: Inhibice farnesylprotein transferázy a geranylgeranyl protein transferázy.

Jak farnesylprotein transferáza (FPT), tak geranylgeranyl protein transferáza (GGPT) byly částečně čištěny z krysího mozku za pomoci frakcionace síranem amonným a následnou aniontově-výměnnou chromatografií na Q-Sepharose (Pharmacia, Inc.), jak je popsána Yokoyamou a kol. (Yokoyama a kol., (1991), A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain:

Implications for protein prenylation specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88 5302-5306. Lidská farnesyl protein transferáza byla také vyznačena v *E. coli* za použití cDNA klonů, které kódovaly jak, a tak b subjednotky. Tyto použité metody byly podobné metodám, které byly publikovány (C.Omer a kol., (1993), Charakterization of recombinant human farnesyl protein transferase : Cloning, expression, farnesyl diphosphate binding, and functional homology with yeast prenyl-protein transferases, *Biochemistry* 32:5167-5176). Lidská farnesyl protein transferáza byla částečně čistěna z rozpustné proteinové frakce *E. Coli*, jak bylo popsáno výše. Tricyklické inhibitory farnesyl protein transferázy, které jsou zde popsány, inhibují jak lidský, tak krysí enzym s podobnou účinností. Byly připraveny dvě formy val¹²-Ha-Ras proteinu jako substráty pro tyto enzymy. Tyto formy se liší ve svých karboxy terminálních sekvencích. Jedna forma je ukončena cystein-valin-leucin-serin sekvencí (Ras-CVLS) a druhá sekvencí cystein-valin-leucin-leucin (Ras-CVLL). Ras-CVLS je substrát pro farnesyl protein transferázu, zatímco Ras-CVLL je substrát pro geranylgeranyl protein transferázu I. cDNA, které kodují tyto proteiny, byly konstruovány tak, že tyto proteiny obsahují amino-terminální extenzi 6-histidinových zbytků. Oba proteiny byly vyznačeny v *Escherichia coli* a čištěny za použití afinitní chromatografie s chetáty kovu. Radioznačené isoprenyl pyrofosfátové substráty, [³H]farnesylpyrofosfát a [³H]geranylgeranylpyrofosfát byly získány od DuPont/New England Nuclear.

Několik metod pro měření aktivity farnesyl protein transferázy je popsáno v (Reiss a kol., 1990, *Cell* 62: 81, Schaber a kol., 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 14701, Manne a kol., 1990, *PNAS* 87: 7541 a Barbacid a Manne 1993, US patent č.5,185,428). Aktivita byla stanovována měřením přenosu [³H]farnesylu z [³H]farnesylpyrofosfátu na Ras-CVLS za podmínek, které jsou podobné podmínkám, které jsou popsány v Reiss a kol., 1990 (*Cell* 62: 81). Reakční směs obsahovala 40 mM Hepes, pH 7,5, 20 mM chloridu bořečnatého, 5 mM dithiothreitolu, 0,25 μM [³H]farnesylpyrofosfátu, 10 ml farnesyl protein transferázy, která byla čistěna přes Q-Sepharose. Dále obsahovala indikovanou koncentraci tricyklické sloučeniny nebo dimethylsulfoxid jako slepý pokus

s nosičem (5% DMSO konečného) a 5 mM Ras-CVLS v celkovém objemu 100 ml. Reakce byla ponechána probíhat při teplotě místnosti 30 minut a pak byla zastavena 0,5 ml 4% dodecylsírany sodného (SDS). Pak se přidalo 0,5 ml chladné 30% TCA. Vzorky byly ponechány stát v ledu 45 minut a sraženina Ras- proteinu byla pak spojena na GE/C filtračním papíru za použití Brandelova sběrače buněk. Povlaky na filtru byly promyty pouze 6% TCA, 2% SDS a radioaktivita byla měřena ve Wallac 1204 Betaplate BS kapalném scintilačním počítadle. Procenta inhibice byla vypočtena relativně k DMSO jako slepému pokusu s nosičem.

Stanovení geranylgeranyl protein transferázy I bylo identické ke stanovení farnesyl protein transferázy, které je popsáno výše, se dvěma výjimkami:

Farnesylproteinpyrofosfát jako donor isoprenoidu byl nahrazen [^3H]geranylgeranylpyrofosfátem a Ras-CVLL byl akceptor proteinu. Toto stanovení je podobné stanovení, které je popsáno Casey a kol. (P.J. Casey a kol., (1991), Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8631-8635.

2. Stanovení založené na buňkách: Přechodná vyznačení val 12 -Ha-Ras-CVLS a val 12 -Ha-Ras-CVLL v COS v buňkách z opičích ledvin: Vliv inhibitorů farnesyl protein transferázy na průběh množství Ras a chorobný růst buněk indukovaný transformujícím se Ras.

Buňky v opičích ledvinách byly přeneseny elektroporací s epizomem pSV-SPORT (Gibco/BRL), který obsahuje cDNA štěp, který je kódovaný buď Ras-CVLS nebo Ras-CVLL. To vede k přechodnému přeznačení Ras substrátu pro farnesyl protein transferázu nebo geranylgeranyl protein transferázu I (viz výše).

Po elektroporaci byly buňky rozprostřeny do misek s šesti otvory s tkáňovou kulturou, které obsahovaly 1,5 ml Dulbecco modifikované Eagleovy kultivační půdy (GIBCO, Inc.), která byla opatřena 10% zárodečným telecím serem a odpovídajícími inhibitory farnesyl protein transferázy. Po 24 hodinách byla kultivační půda odstraněna a čerstvá kultivační půda, která obsahovala odpovídající látky byla znovu přidána.

48 hodin po elektroporaci byly buňky zkoumány pod mikroskopem, aby byl monitorován chorobný růst buněk indukovaný transformujícím se Ras. Buňky, které se vyznačují

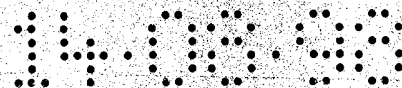
transformujícím se Ras, jsou okrouhlejší, refraktilní a přerůstají monovrstvu, která vypadá jako transformovaný fenotyp. Buňky byly pak fotografovány, promyty dvakrát 1 ml chladného fyziologického roztoku, který byl pufrován fosforečnanem (PBS), a byly odstraněny z misky seškrabáním do 1 ml pufru, který obsahoval 25 mM Tris, pH 8.0, 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, 1 mM fenylmethylsulfonyl fluoridu, 50 mM leupeptinu a 0,1 mM pepstatinu. Buňky byly štěpeny na homogenizát a buněčná tkáň byla odstraněna centrifugací při 2000 x g po dobu 10 minut.

Buněčný protein byl sražen přidavkem ledem chlazené kyseliny trifluoroctové a znovu rozpuštěn v 100 ml SDS-pufru pro elektroforézu. Vzorky (5-10 ml) byly naneseny na 14% polyakrylamidové minigely (Novex, Inc.) a elektroforéza probíhala až do té doby, kdy se pás barviva přiblížil ke dnu gelu. Proteiny dělené na gelu byly elektronaneseny na nitrocelulosové membrány pro imunodetekci.

Membrány byly vyvíjeny přes noc při 4°C v PBS, který obsahoval 2,5% sušeného mléka a 0,5% Tween-20 a pak byly inkubovány s Ras specifickou monoklonální protilátkou, Y13-259 (M.E. Furth a kol., (1982): Monoclonal antibodies to the p21 products of transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular ras gene family, J. Virol. 43: 294-304), v PBS, který obsahoval 1% zárodečného telecího sera po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Po promytí byly membrány inkubovány 1 hodinu při teplotě místnosti s sekundární protilátkou králíčí anti-rat IgG při zředění 1:5000, která je konjugována s křenovou peroxidásou. Inkubace probíhala v PBS, který obsahoval 1% zárodečného telecího séra. Přítomnost zreagovaného a nezreagovaného Ras-CVLS nebo Ras-CVLL byly detekovány za použití kolorimetrického peroxidásového činidla (4-chlor-naftol), jak je popsáno výrobcem (Bio-Rad).

3. Stanovení buněčného povlaku

Normální lidské fibroblasty byly rozprostřeny v 3,5 cm miskách při hustotě 5×10^4 buněk/misku v 2 ml růstové kultivační půdy. Byly inkubovány 3-5 dní až se dosáhlo sbíhání. Kultivační půda byla odsáta z každé misky a na vršek fibroblastové monovrstvy při hustotě 2×10^3 buněk na misku v 2 ml růstové kultivační půdy, byl umístěn indikátor rakovinných buněk T24-BAG4, lidské buňky z karcinomu močového



měchýře, který se vyznačuje aktivovaným H-ras genem. Vzorek byl ponechán přes noc. Sloučeninou indukovaná inhibice kolonie byla stanovena přidávkem postupně zředované sloučeniny přímo do kultivační půdy 24 hodin po umístění nádorových buněk. Buňky byly inkubovány dalších 14 dní, aby se kolonie vytvořila. Stanovení byla ukončena vymácháním monovrstev dvakrát ve fyziologickém roztoku, který byl pufrován fosforečnanem (PBS). Monovrstvy byly fixovány 1% roztokem glutaraldehydu v PBS. Pak byly nádorové buňky zviditelněny obarvením X-Gal (J.Price a kol., Lineage analysis in vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 156-160 (1987)). Při stanovení inhibice kolonie byly sloučeniny hodnoceny na základě dvou IC_{50} hodnot: koncentrace látky nutná k zabránění růstu 50% množství nádorových buněk (tIC_{50}) koncentrace látky nutná k snížení hustoty buněk, které obsahují buněčný povlak o 50% (mIC_{50}). Obě IC_{50} hodnoty byly získány určením hustoty nádorových buněk a mrtvých buněk vizuálním pozorováním pod mikroskopem. Terapeutický index sloučeniny byl kvantitativně vyjádřen jako poměr mIC_{50}/tIC_{50} , s hodnotami většími než je hodnota cílové specifikace nádoru.

Další stanovení byly prováděny následujícím v podstatě stejným způsobem jako je popsán výše, pouze s náhradou indikačních nádorových buněčných řad na místo T24-BAG buněk. Stanovení byla vedena s použitím DLD-1-BAG lidských nádorových buněk tračníku, označující se jako K-ras gen nebo SW620-BAG lidskými nádorovými buňkami tračníku vyznačujícími se aktivovaným K-ras genem. Při použití jiných nádorových buněčných řad, které jsou v tomto oboru známy, může být aktivita sloučenin z tohoto vynálezu demonstrována proti jiným typům rakovinných buněk (takových jaké jsou vyjmenovány zde na straně 15 a 16).

4. Jemné agarové stanovení

Na podkladu závislý růst je charakteristika tumorigenních buněčných řad. Lidské nádorové buňky byly suspendovány v růstové kultivační půdě, která obsahovala 0,3% agarosy a indikovanou koncentraci inhibitoru farnesyl transferázy. Roztokem je převrstvena kultivační půda zahuštěná 0,6% agarosy a která obsahuje tutéž koncentraci inhibitoru farnesyl

transferázy jako vrchní vrstva. Pak byla vrchní vrstva zahuštěna, plátky byly inkubovány 10-16 dní při 37°C pod atmosférou 5% CO₂, aby se kolonie rozrostla. Po inkubaci jsou kolonie obarveny převrstvením agarů roztokem MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu (thiazolylová modř) (1mg/ml v PBS). Kolonie byly spočteny a hodnoty IC₅₀ určeny.

Inhibice růstu lidských nádorových buněk jemným agarovým stanovením

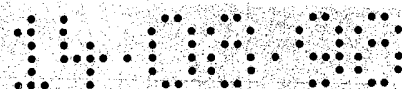
Jemné agarové stanovení bylo prováděno se sloučeninou vzorku 10 a následujícími nádorovými buněčnými řadami: K ras NIH 3T3, H ras NIH 3T3, HTB 177 (NSCLC) K ras mutace, HTB 173 (NCIH146) (SCLC) ras mutac. neurčena, A549 (plíce) K ras mutace, HTB 175 (SCLC) ras mutace neurčena, HTB 119 (NCI H69) (SCLC), HTB 183 (NCI H661) (NSCLC) ras mutace neurčena, HPAF II (pancreas) K ras mutace, MCF-7 (prs) ras mutace neurčena, HBL 100 (prs) ras mutace neurčena, Du4475 (prs) ras mutace neurčena, MDA MB 468 (prs) ras mutace neurčena, DU 145 (prostata) ras mutace neurčena, MDA MB453 (prs), BT474 (prs), PC3 (prostata), DLD 1 (tračník) K ras mutace a AsPc-1 (pancreas) K ras mutace. Ras mutace byla určena ELISA (oncogene Science). IC₅₀ (μM) pro každou buněčnou řadu byl v rozsahu 0,04 až 3,0.

Jemné agarové stanovení bylo prováděno se sloučeninou vzorku 18 a následujícími buněčnými řadami: K ras NIH 3T3, H ras NIH 3T3, HBT 177 (NSCLC) K ras mutace, A549 (plíce) K ras mutace a HTB 175 (SCLC) ras mutace neurčena. Ras mutace byla určována ELISA (Oncogene Science). IC₅₀ (μM) pro každou buněčnou řadu bylo v rozmezí 0,175 až 0,8.

Výsledky:

1. Enzymologie

Data demonstrují, že sloučeniny z tohoto vynálezu jsou inhibitory Ras-CVLS farnesylace částečně čištěnou farnesyl protein transferásou z krysího mozku (FPT). Data také ukazují, že tyto sloučeniny je možné považovat za velmi účinné (IC₅₀ << 0,1 μM) inhibitory Ras-CVLS farnesylace částečně



čištěným krysím mozkem FPT.

Data také demonstrují, že sloučeniny z tohoto vynálezu jsou horší inhibitory geranylgeranyl protein transferázy (GGPT), stanoveny za použití Ras-CVLL jako akceptoru isoprenoidu. Tato selektivita je důležitá pro terapeutický účinek sloučenin použitých ve způsobech z tohoto vynálezu. Roste možnost, že sloučeniny budou mít vlastnosti jako selektivní inhibitory růstu proti buňkám transformovaným Ras.

2. Stanovení COS buněk založené na buňkách

Analýza Ras proteinu vyznačeného v COS buňkách, které jsou transformované Ras a následující působení tricyklických inhibitorů farnesyl protein transferázy indikuje, že tyto látky inhibují vývoj Ras-CVLS, což vede k akumulaci nezreagovaného Ras (viz Tabulka 3). Sloučenina z příkladu 2, například, inhibuje vývoj Ras-CVLS s IC_{50} hodnotami $0,025 \mu M$, ale neblokuje geranylgeranylation Ras-CVLL při koncentracích až do $33 \mu M$.

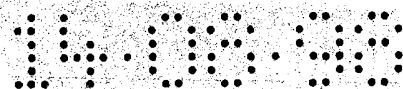
Tyto výsledky poskytují důkaz pro specifickou inhibici farnesyl protein transferázy, ale ne geranylgeranyl transferázy I sloučeninami z tohoto vynálezu v neporušených buňkách. Také indikují možnost, že tyto látky přicházejí v úvahu k blokování buněčných transformací aktivovanými Ras onkogeny.

3. Stanovení buněčného povlaku založené na buňkách

Tricyklické inhibitory farnesyl protein transferázy z tohoto vynálezu také inhibují růst nádorových buněk transformovaných Ras ve stanovení povlaku bez vykazování cytotoxické aktivity proti normální monovrstvě.

In vivo anti-tumor studie

Nádorové buňky (od 5×10^5 do 8×10^6) DLD-1 (lidské nádorové buňky tračníku), ATCC CCL 221) byly naočkovány podkožně do slabin 5-6 týdních o,d athymických nu/nu myší (sanic). Zvířata, která nesla nádor, byla vybrána a randomizována, když byl nádor potvrzen. Zvířata byla léčena pouze nosičem (beta-cyklodextrin pro i.p. nebo kukuřičný olej pro p.o.) nebo nosičem se sloučeninou z tohoto vynálezu čtyřikrát denně (QID) po 7 dní v týdnu 4 týdny. Procenta inhibice růstu nádoru byla



určena relativně k působení nosiče měření nádoru.

Průměrná % inhibice nádoru pro každou sloučeninu z příkladů 1, 2, 4, 5, 6, 7, 7A, 8B, 9, 10, 11A, 11B, 12B, 13, 14A, 16B a 18 byla v rozmezí od 7 do 50% pro dávku 10 mg/kg p.o. a v rozmezí od 35,4 do 83 pro dávku 50 mg/kg p.o.

Pro přípravu farmaceutických prostředků ze sloučenin z tohoto vynálezu se používají inertní, farmaceuticky přijatelné nosiče, které jsou buď tuhé nebo kapalné. Pevná forma prostředků zahrnuje prášky, tablety, disperzibilní granule, kapsle, oplatky a čípky. Prášky a tablety obsahují od 5 do 70% aktivní složky. Vhodné tuhé nosiče, které jsou v tomto oboru známy, jsou např. uhličitán hořečnatý, stearan hořečnatý, talek, cukr, laktosa. Tablety, prášky, oplatky a kapsle se používají jako pevné dávkovací formy vhodné pro orální podávání.

Pro přípravu čípků se používá nízkotající vosk, stejně jako směs glyceridů mastných kyselin nebo kakaové máslo. Tyto složky se nejprve taví, pak se v nich za míchání homogenně disperguje aktivní složka. Roztavená homogenní směs se pak nalije do forem běžné velikosti a zde se nechá ztuhnout.

Kapalné formy prostředků zahrnují roztoky, suspenze a emulze. Jako příklad uveďme vodu nebo roztoky voda-propylenglykol pro parenterální injekce.

Kapalné formy prostředků zahrnují také roztoky pro intranasální podávání.

Aerosolové prostředky vhodné pro inhalaci zahrnují roztoky nebo tuhousložku ve formě prášku, které jsou v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem jako je inertní stlačený plyn.

Dále jsou zde zahrnuty tuhé formy prostředků, které se krátce před použitím převádějí na kapalnou formu prostředků pro orální nebo parenterální podávání. Takové kapalné formy zahrnují roztoky, suspenze a emulze.

Sloučeniny z tohoto vynálezu jsou také aplikovány transdermálně. Transdermální prostředky jsou ve formě krémů, mlék, aerosolů a/nebo emulzí. Lze je transdermálně aplikovat z matrice nebo z typu zásobníku, který je běžný v tomto oboru pro dané účely.

S výhodou jsou sloučeniny podávány orálně.

S výhodou je farmaceutický prostředek v jednotkové dávkové

formě. V takové formě, že prostředek je rozdělen na jednotkové dávky, které obsahují dostačující množství aktivní složky, t.j. účinné množství, kterým se dosáhne požadovaného účelu.

Množství aktivní sloučeniny v jednotkové dávce prostředku může být různé nebo je nastaveno od 0,1 mg do 1000 mg, výhodněji od 1 mg do 300 mg, podle aplikace.

Aktuální dávka je různá v závislosti na požadavcích pacienta a na vážnosti stavu, který je léčen. Určení správné dávky pro určitou situaci je odborníkovi v tomto oboru zřejmé. Obecně se léčení začíná s menšími dávkami, které jsou menší než optimální dávka sloučeniny. Potom se dávka zvyšuje po malých přírůstcích až do optimálního účinku za daných okolností. Výhodně je celková denní dávka rozdělena a podávána po částech během dne, je-li potřeba.

Množství a frekvence podávání sloučenin z tohoto vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelných solí je regulováno podle úvahy ošetřujícího lékaře vzhledem k takovým faktorům, jako je věk, kondice a velikost pacienta stejně jako vážnost symptomů, které jsou léčeny. Typický doporučený dávkový režim je orální podávání od 10 mg do 2000 mg/den, s výhodou od 10 do 1000 mg/den ve dvou nebo čtyřech dávkách, aby se zablokoval růst nádoru. Sloučeniny jsou netoxické, jestliže se podávají v tomto rozmezí dávek.

Následují příklady farmaceutických dávkových forem, které obsahují sloučeninu z tohoto vynálezu. Rozsah vynálezu zahrnuje aspekt farmaceutický prostředek, který není vymezen poskytnutými příklady.

Farmaceutické dávkové formy - příklady

Příklad A

Tablety

č.	Složky	mg/tableta	mg/tableta
1.	aktivní složka	100	500
2.	laktosa USP	122	113
3.	kukuřičný škrob, potravní	30	40
	kvalita jako 10% pasta		
	v čištěné vodě		

4.	kukuřičný škrob	45	40
	potrav. kvalita		
5.	stearan hořečnatý	3	7
Celkově		300	700

Způsob přípravy

Složky číslo 1 a 2 se mísí ve vhodném mísiči 10-15 minut. Složkou č. 3 se směs granuluje. Vlhké granule se rozdrtí přes hrubé česle (např. 1/4", 0,63 cm), je-li potřeba. Vlhké granule se suší. Sušené granule se třídí, jestliže je potřeba, a mísí se složkou č.4. Mísí se 10-15 minut. Přidá se složka č. 5 a mísí se 1-3 minuty. Směs se stlačí na vhodnou velikost a zpracuje na vhodném tabletovacím stroji.

Příklad B

Kapsle

č.	Složka	mg/kapsle	mg/kapsle
1.	aktivní sloučenina	100	500
2.	laktosa USP	106	123
3.	kukuřičný škrob	40	60
	potrav. kvalita		
4.	stearan hořečnatý NF	7	7
Celkově		253	700

Způsob přípravy

Složky č. 1, 2 a 3 se mísí ve vhodném mísiči 10-15 minut. Přidá se složka č.4 a mísí se 1-3 minuty. Směs se naplní do vhodných dvoudílných tvrdých želatinových kapslí na vhodném stroji na výrobu kapslí.

Protože tento vynález byl popsán ve shodě se specifickými složeními, které jsou uvedené výše, odborníkoví je zřejmě množství alternativ, modifikací a variací. Všechny takové alternativy, modifikace a variace jsou uvažovány, že spadají do rozsahu tohoto vynálezu.

Tabulka 1 - inhibice FPT

VZOREK	FPT IC ₅₀ (mM)	VZOREK	FPT IC ₅₀ (mM)
1	<0.034	2	0.010
			0.016
4	0.046	16A	0.026
			0.032
16B	0.038	11B	>0.095
	0.023		
15	0.022	7	0.012
8	0.021	11A	0.0018
			0.0021
5	0.0023	12B	0.0025
9	0.0013	10	0.0019
7B	<0.003	8B	0.013
14A	0.0026	14	0.062
13A	0.078	13	0.005
5A	>0.099	7A	>0.1
8A	>0.094	10A	>0.094
9A	>0.088	6	0.0031
11	0.002	5B	0.003
12A	>0.094	13B	0.005
14B	0.005	5.HCl sůl	0.0038
14A.HCl sůl	<0.0031	9B	0.003
10B	0.003	17	0.043
17A	0.048	18	0.0031
19	<0.0038	20	0.0062
21	0.0084		

14.08.99

Tabulka 2
Srovnání FPT inhibice a GCPT inhibice

VZOREK	INHIBICE enzymu FPT IC ₅₀ mM	INHIBICE enzymu GCPT IC ₅₀ mM
2	0.010 0.016	>300
4	0.046	>35.7
5B	0.003	>300
16A	0.032 0.026	>38
16B	0.038 0.023	>76
7	0.012	>300
11A	0.0018 0.0021	>66
9	0.0013	>59
5	0.0023	>66
14A	0.0026	>62
13	0.005	>63
7B	<0.003	>66
8B	0.013	>60
18	0.0031	>50
20	0.0062	>38

14.08.98

Tabulka 3
Aktivita v COS buňkách

Vzorek	Inhibice vývoje Ras IC ₅₀ (μM)	Vzorek	Inhibice vývoje Ras IC ₅₀ (μM)
8	<0.25	2	0.25
1.5	0.60	16A	0.5
7	0.125	11	<0.25
10	<0.025	10A	2.0
12B	<0.025	12A	0.95
11A	<0.025	11B	2.25
5	0.098	14A.HCl	0.015
13	0.420	9	0.010
7B	0.025	8B	0.280
9A	0.85	5.HCl	0.010
5A	5.0	14A	0.480
	1.0		
14	>1.0	13A	>1.0
7A	>1.0	8A	>1.0
17	0.350	17A	0.500
14B	0.045	6	0.040
18	0.025	19	0.045
20	0.030	21	0.42

14.08.98

Tabulka 4
Inhibice růstu nádorových buněk
Stanovení buněčného povlaku

Vzorek	Nádor (T-24) IC ₅₀ (μM)	Nádor (DLD-1) IC ₅₀ (μM)	Nádor (SW620) IC ₅₀ (μM)	Normální IC ₅₀ (μM)
1	<1.6	--	--	>25
4	3.1	--	--	>25
7	<1.6	<1.6	6.25	>25
5B	<1.6	3.1	10	>25
13B	<1.6	3.1	>3.1	25
11B	<1.6	8	18	>25
9A	<1.6	12.5	12.5	18
10A	<1.6	2.0	1.6	8
5	<1.6	3.1	6.25	>25
14A	<1.6	6.25	12.5	>25
13A	3.1	6.25	6.25	>25
7B	<1.6	1.6	3.1	>25
8A	<1.6	<1.6	3.1	>25
2	<1.6	6.25	6.25	>25
16B	<1.6	6.25	25	>25
8	<1.6	3.1	3.1	>25
15	3.1	6.25	>6.25	>25
11A	<1.6	<1.6	>6.25	>25
9	<1.6	<1.6	6.25	>25
10	<1.6	<1.6	3.1	>25
12A	<1.6	2.0	4	>25
5A	12.5	12.5	>25	>25
14	<1.6	6.25	>12.5	>25
13	<1.6	3.1	>1.6	>25
8B	<1.6	<1.6	3.1	>25
17	1.6	6.25	25	>25
17A	3.1	4	18	>25
10B	<1.6	1.6	1.6	>25
12B	<1.6	3.1	6.25	>25
7A	<1.6	1.6	3.1	>25
6	<1.6	4.0	6.24	--
19	<1.6	<1.6	6.25	>25

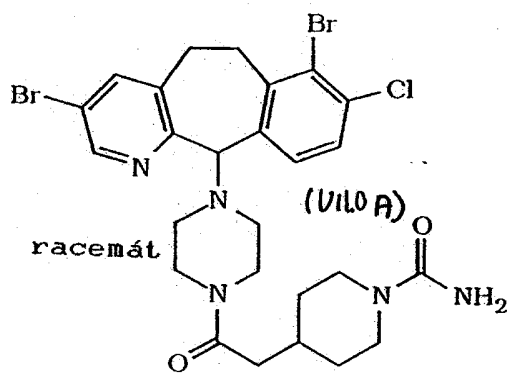
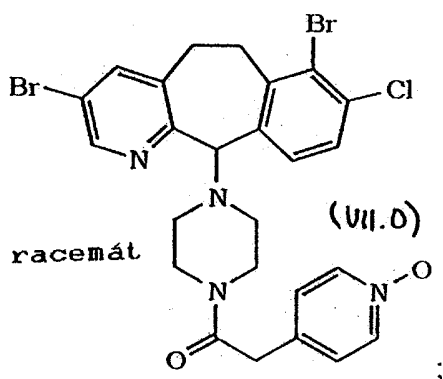
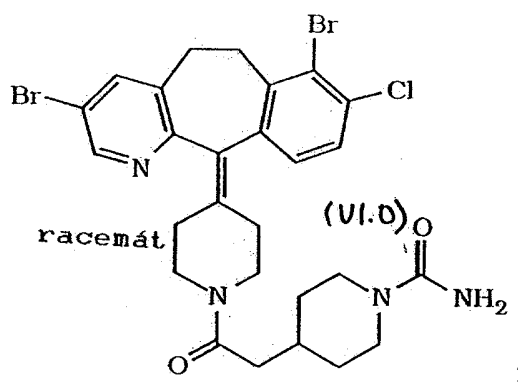
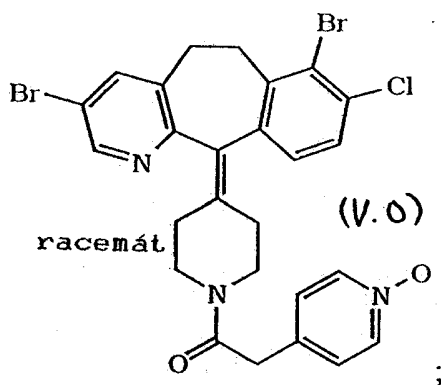
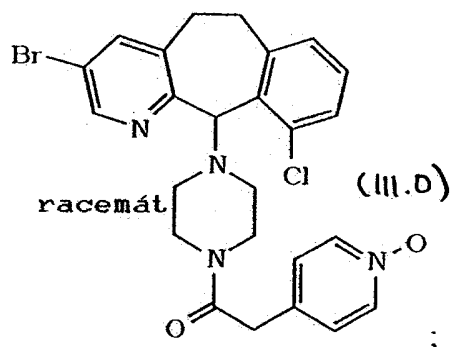
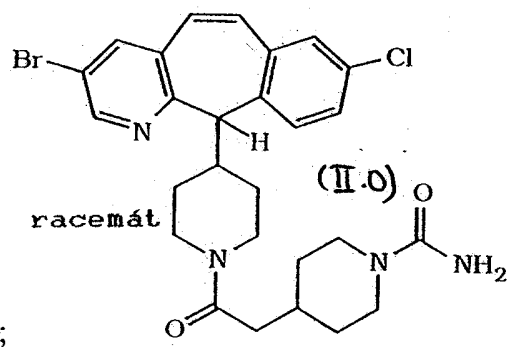
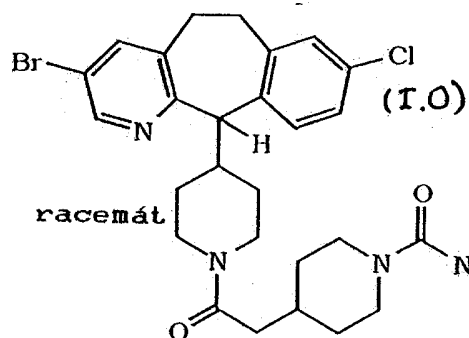
14.08.98

Průmyslová využitelnost:

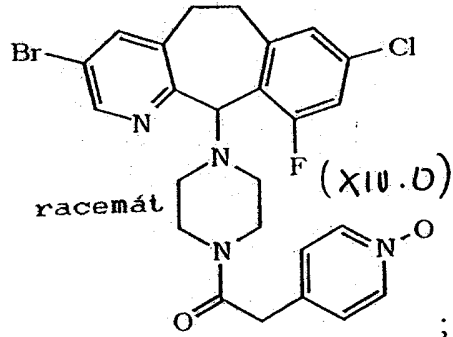
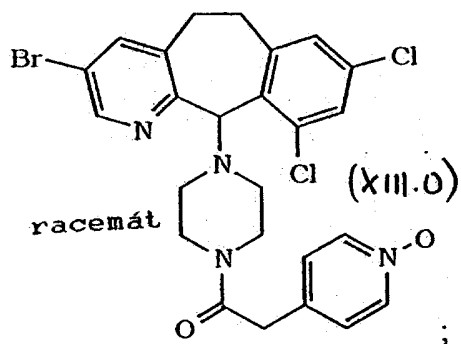
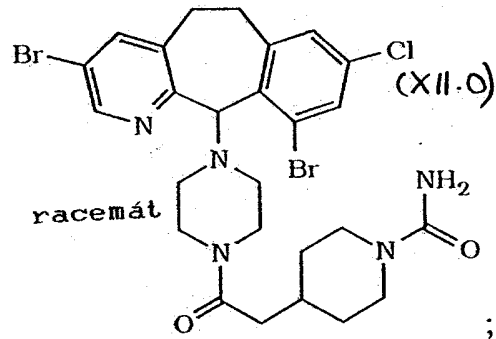
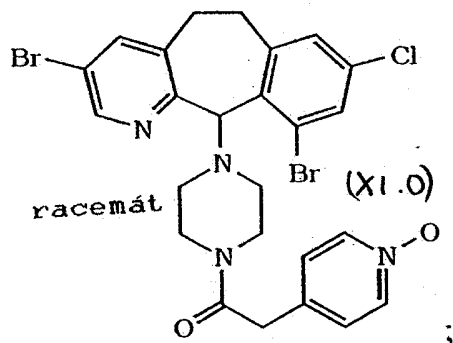
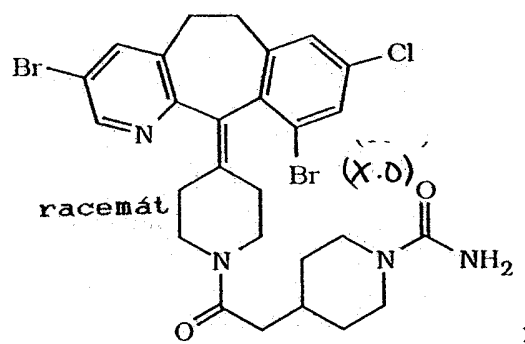
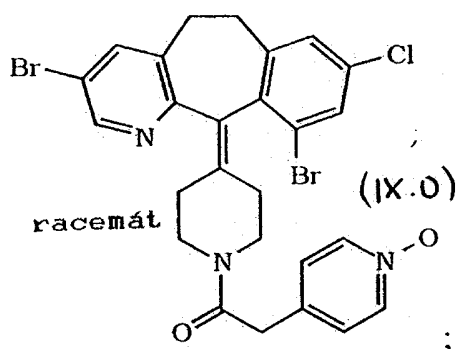
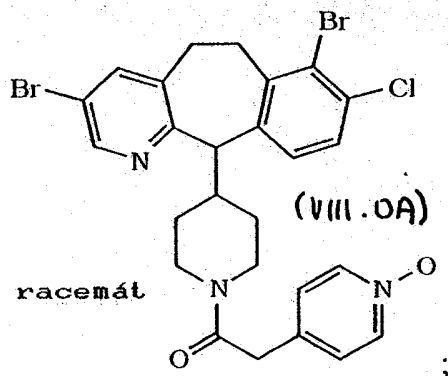
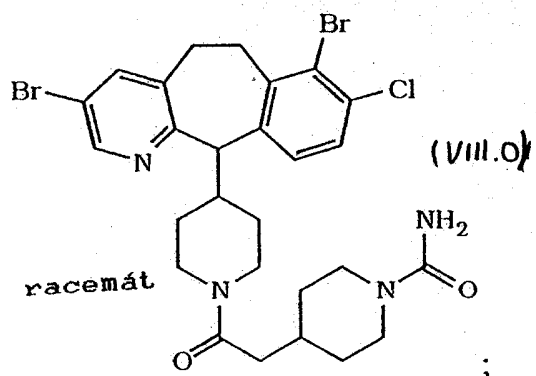
Sloučeniny z tohoto vynálezu se používají v farmaceutických prostředcích pro léčbu proliferativních chorob a nádorových onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

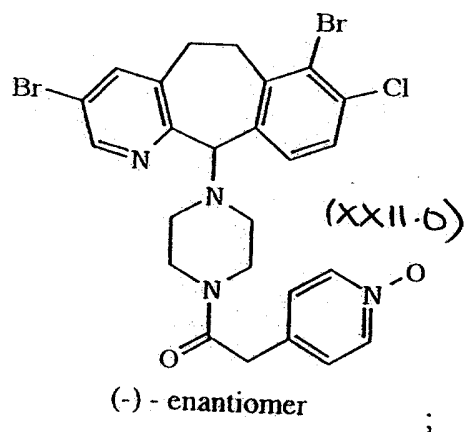
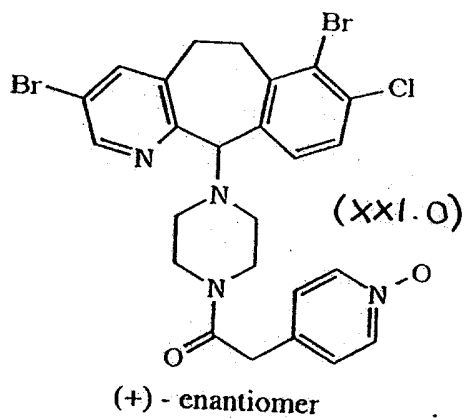
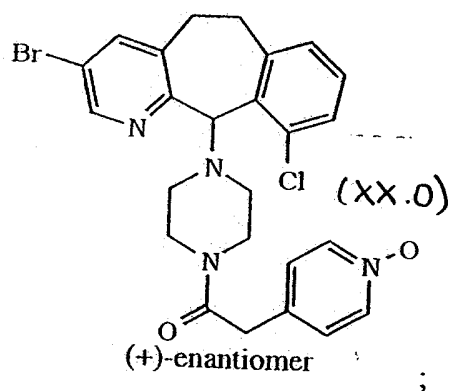
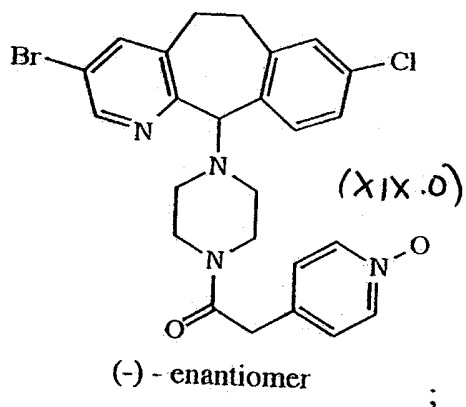
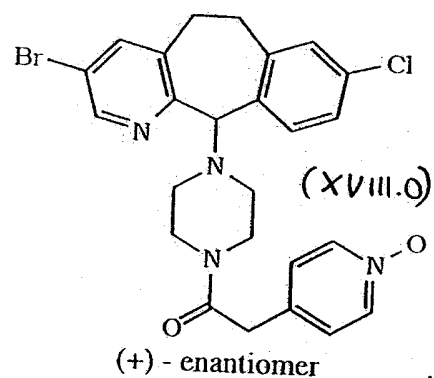
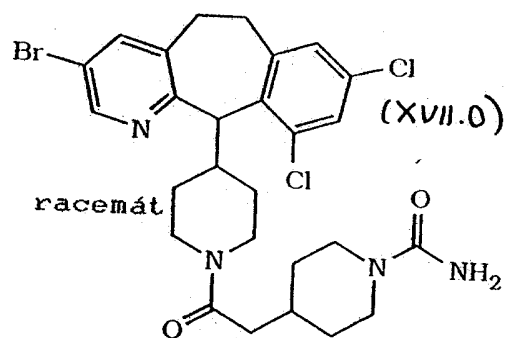
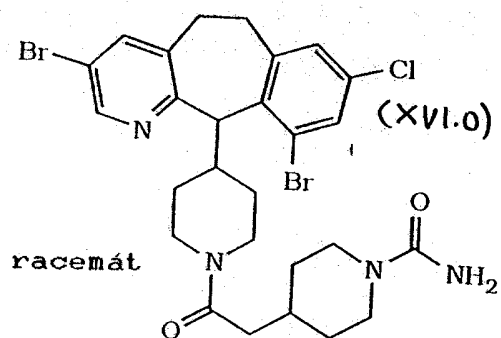
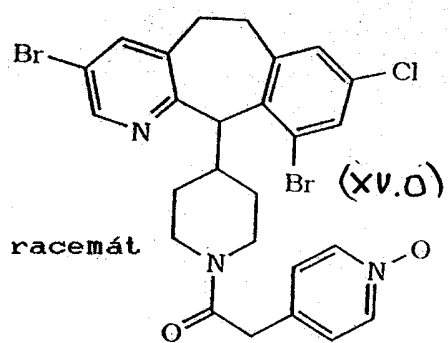
1. Sloučenina, která je vybraná ze skupiny, která se skládá z:

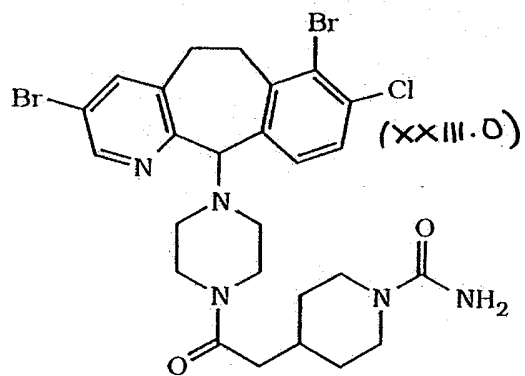


14.03.93

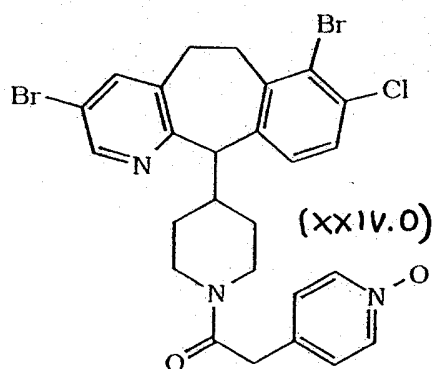


14.08.98

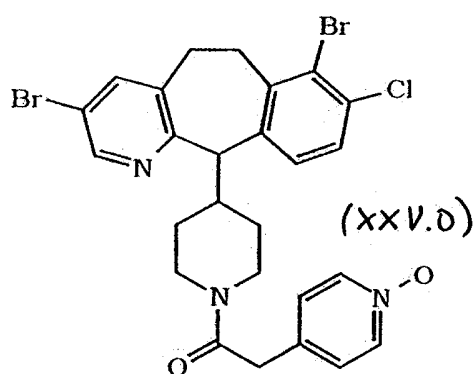




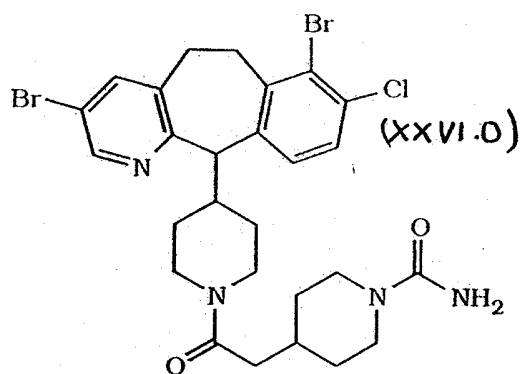
(-) - enantiomer



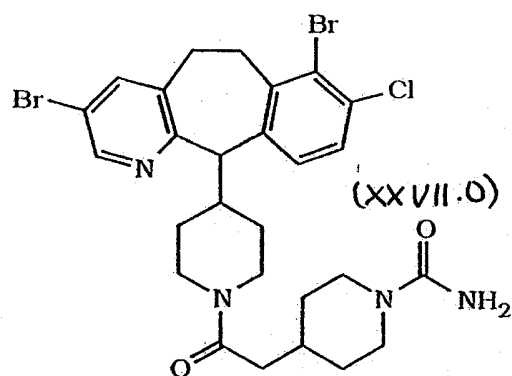
(+) - enantiomer



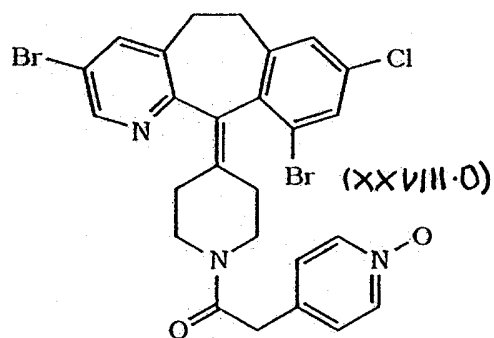
(-) - enantiomer



(+) - enantiomer

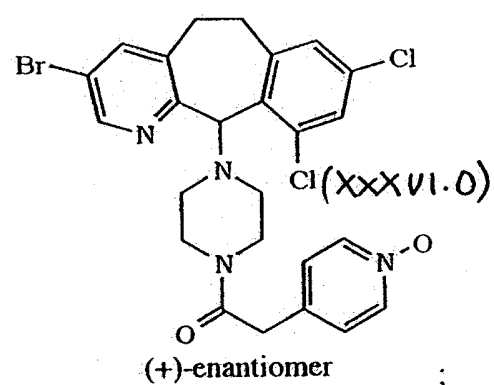
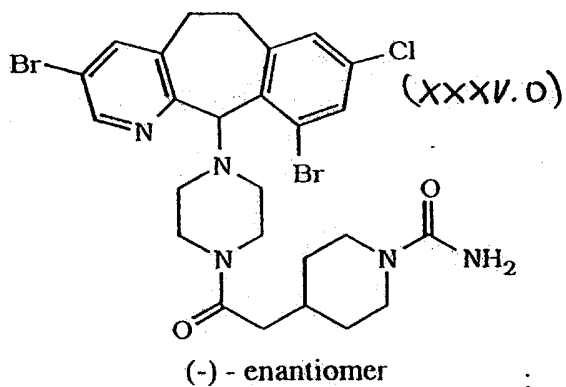
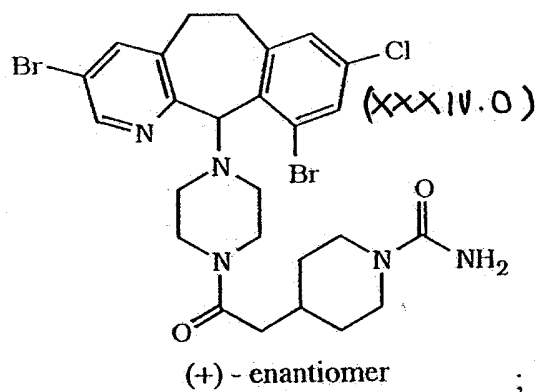
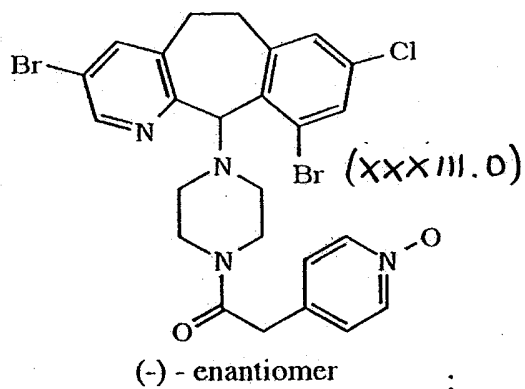
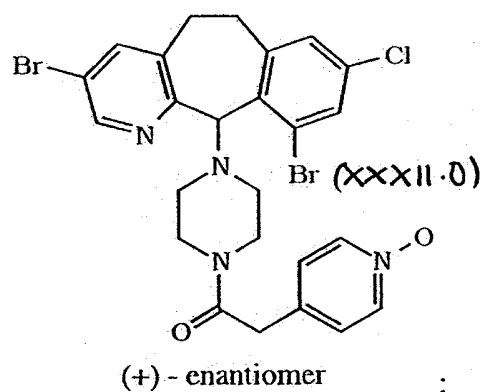
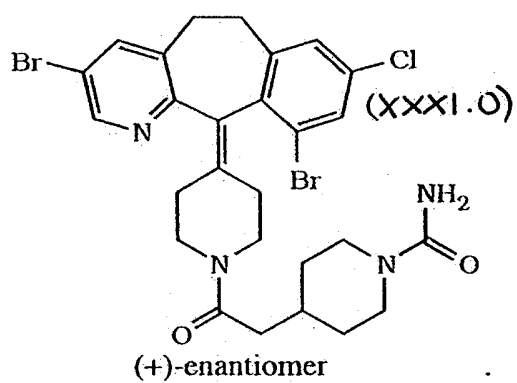
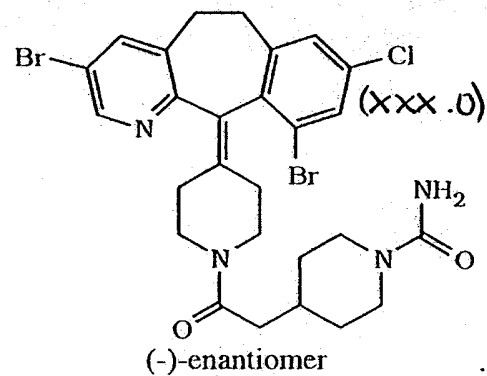
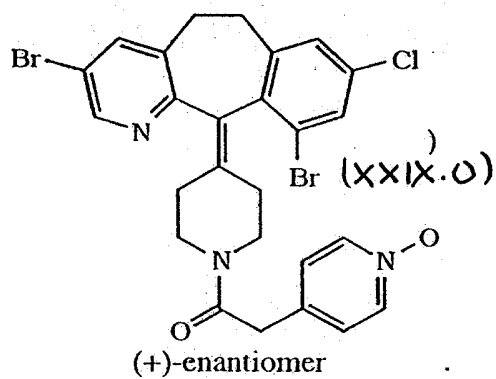


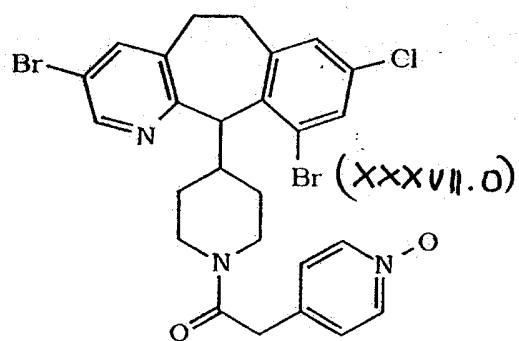
(-) - enantiomer



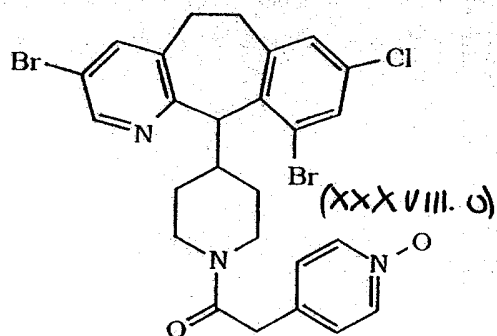
(-) - enantiomer

14.08.98

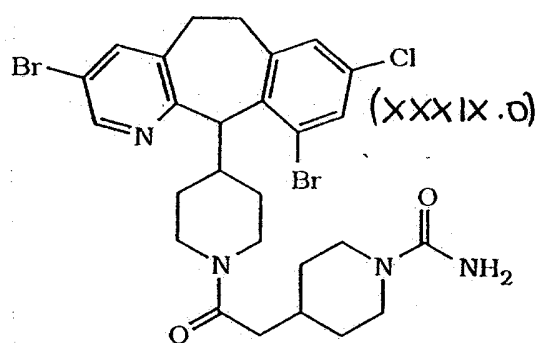




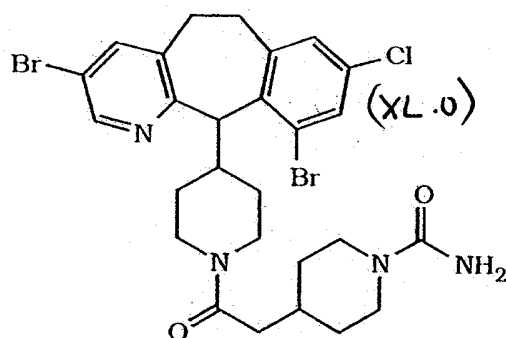
(+) - enantiomer ;



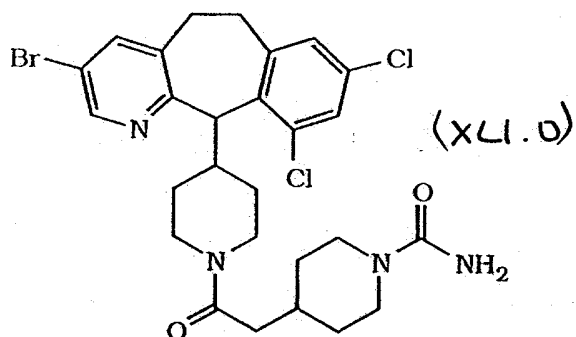
(-) - enantiomer ;



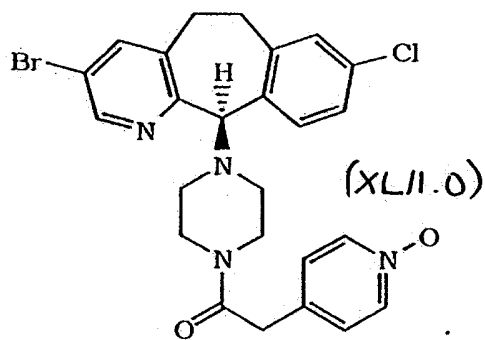
(+) - enantiomer ;



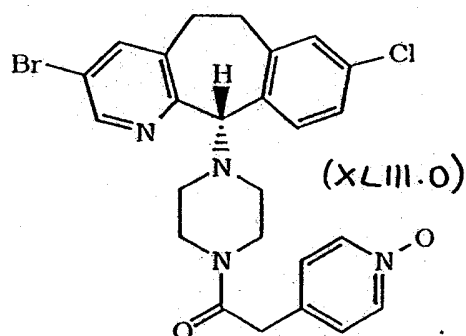
(-) - enantiomer ;



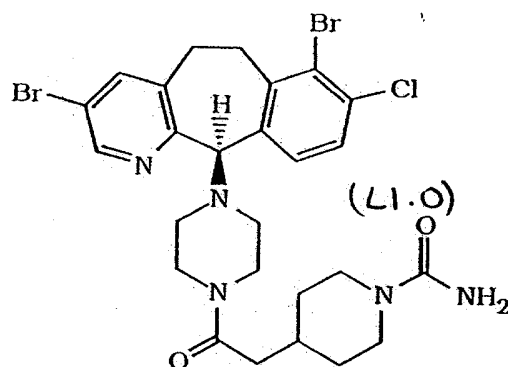
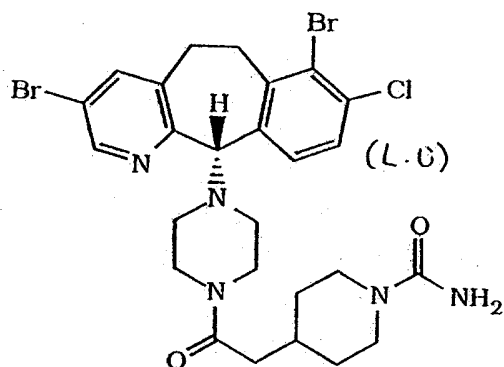
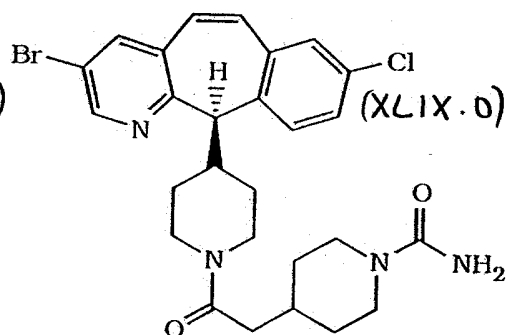
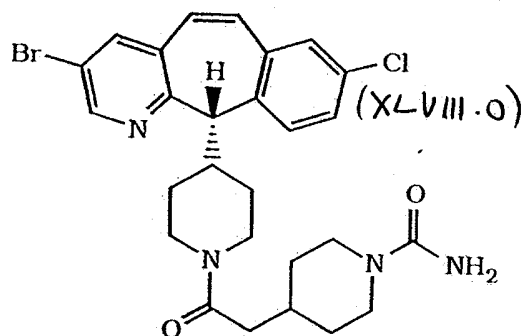
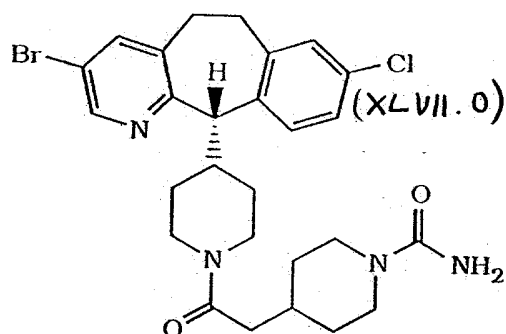
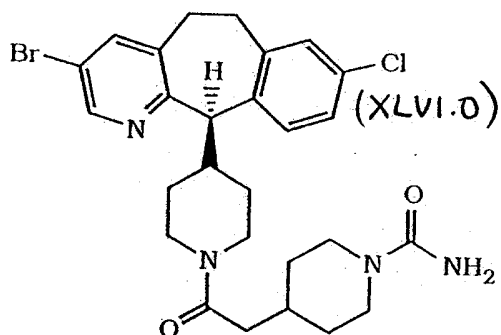
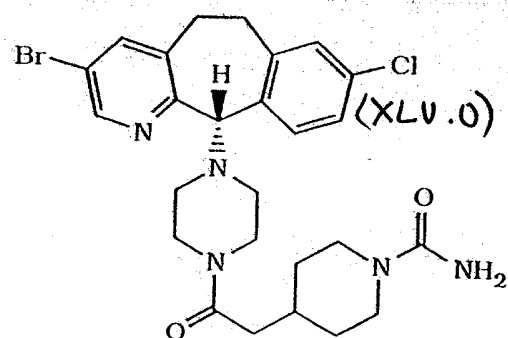
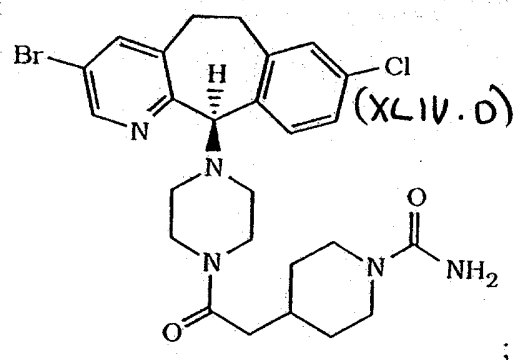
(+) - enantiomer ;



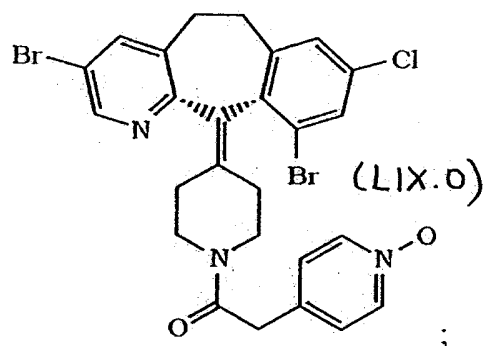
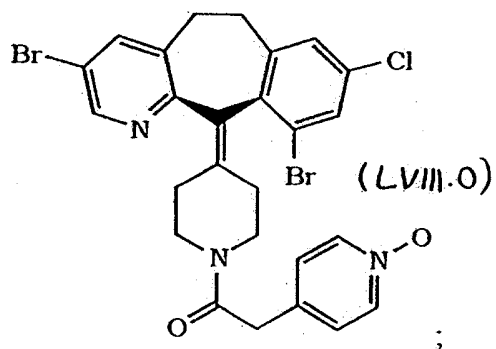
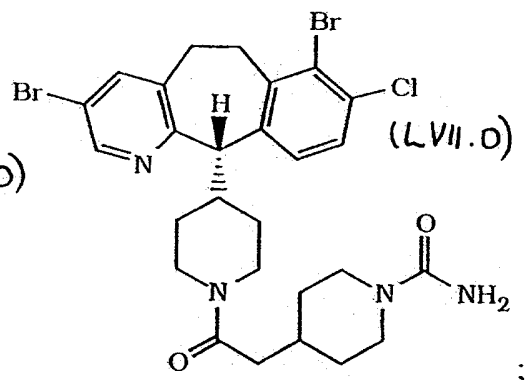
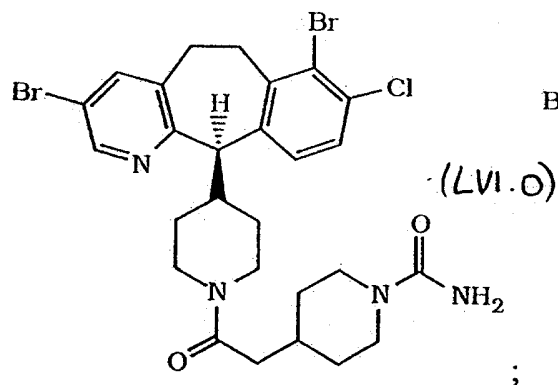
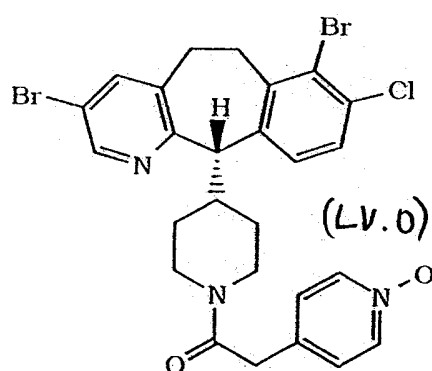
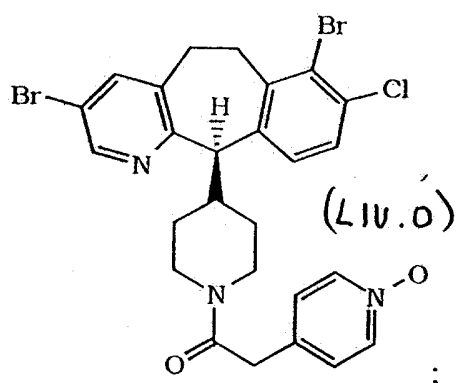
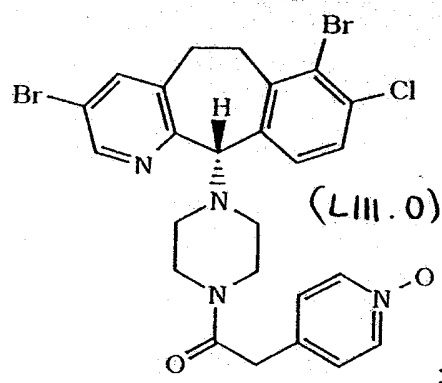
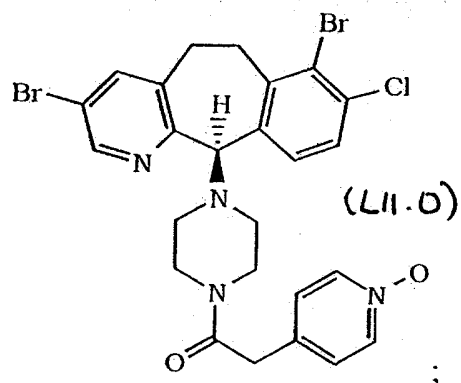
;



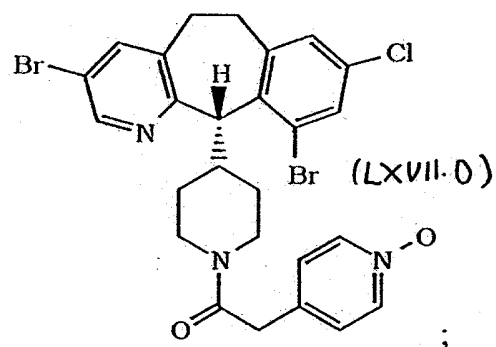
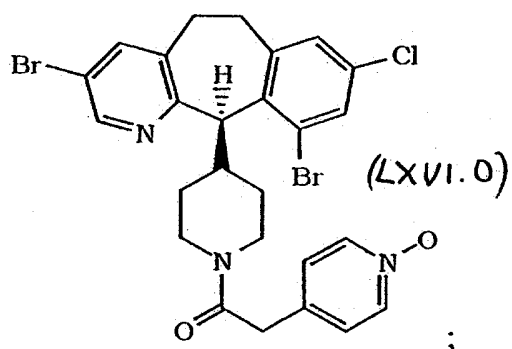
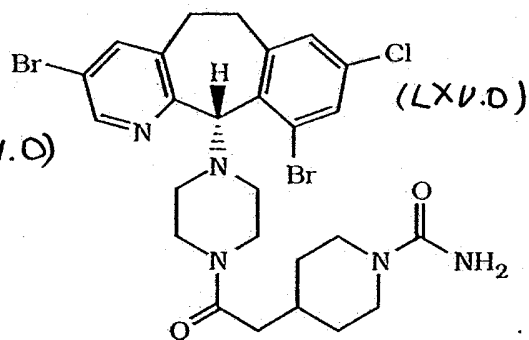
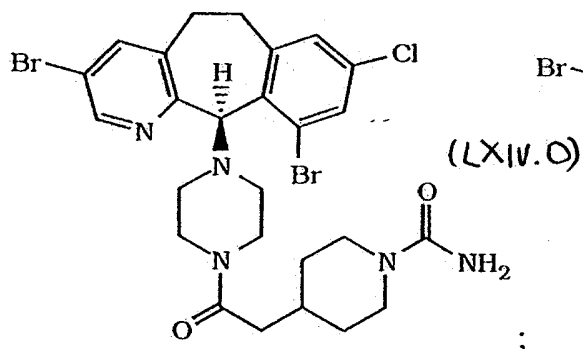
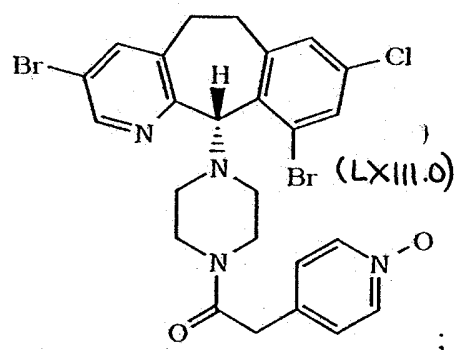
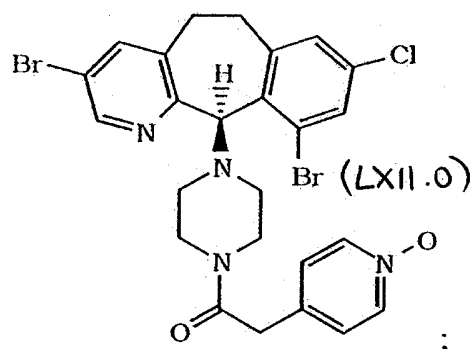
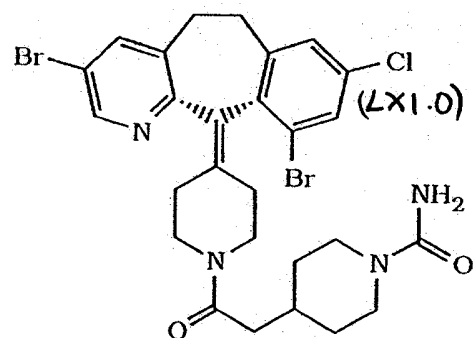
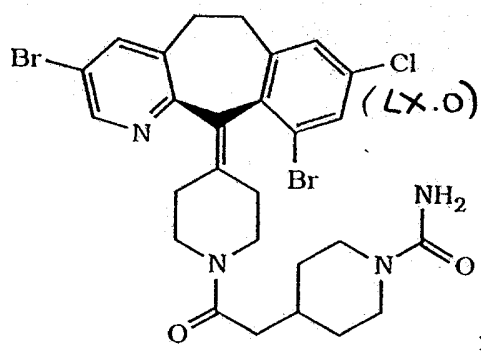
;



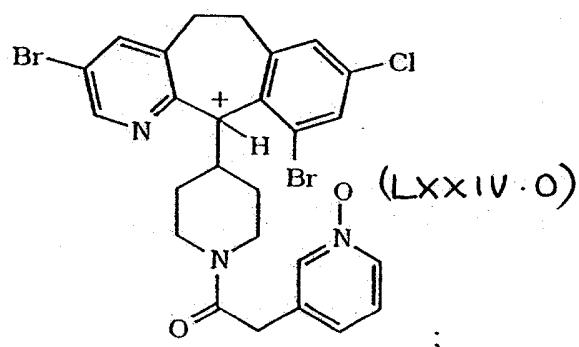
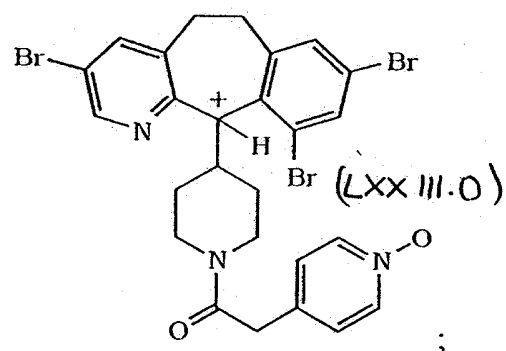
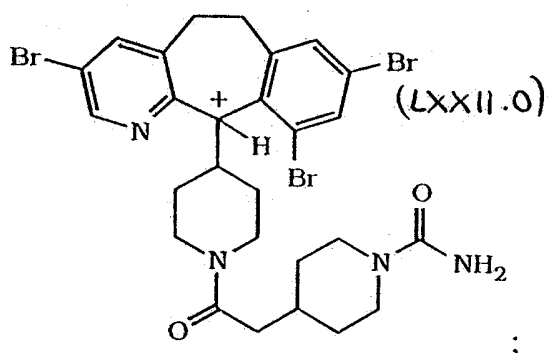
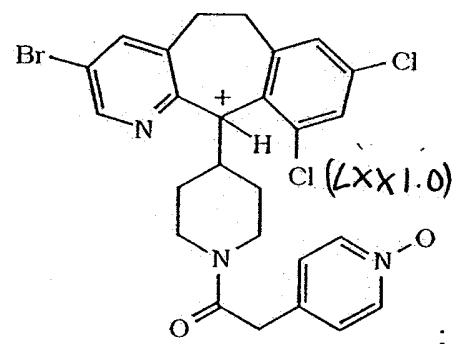
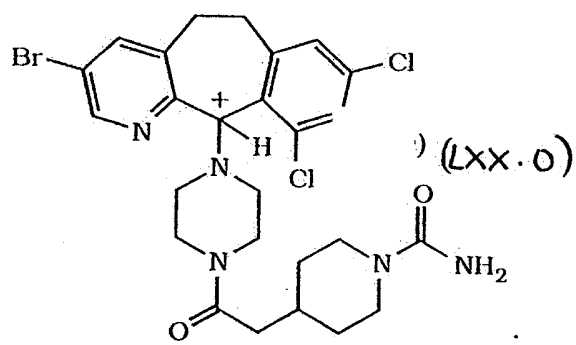
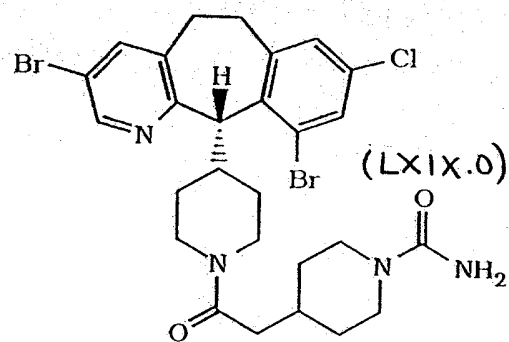
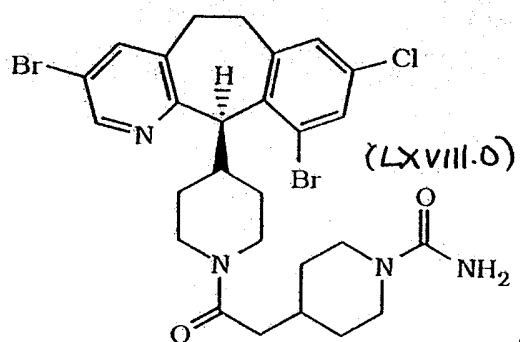
14.03.95



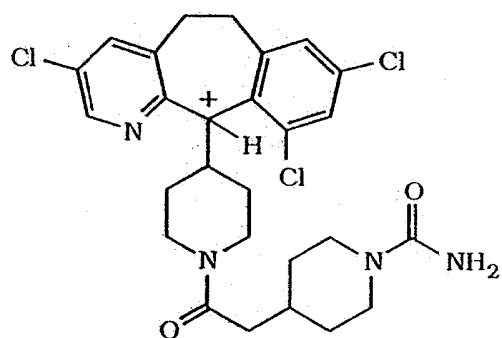
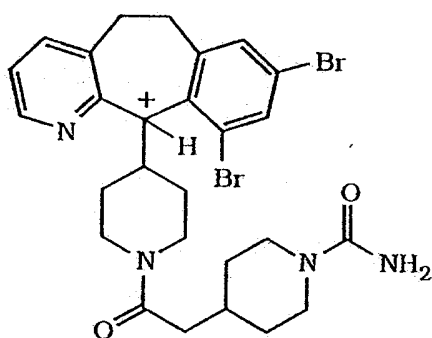
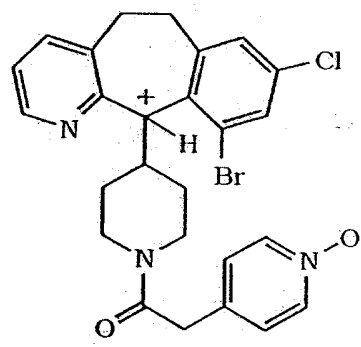
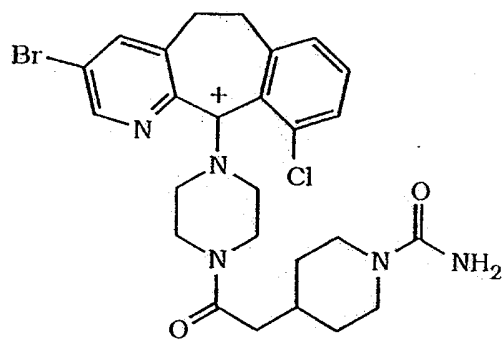
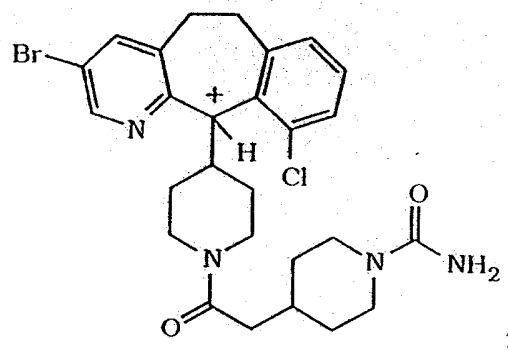
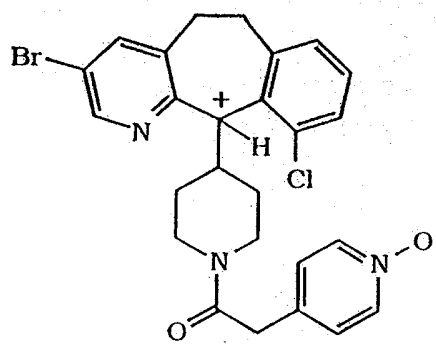
14.03.93



14-08-98

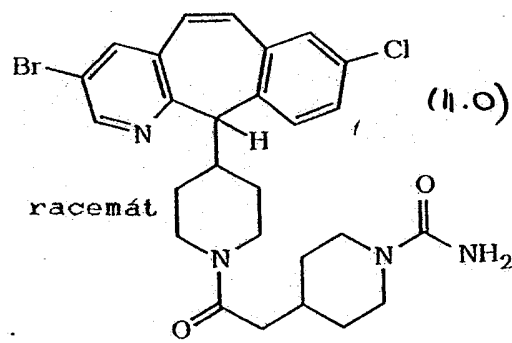
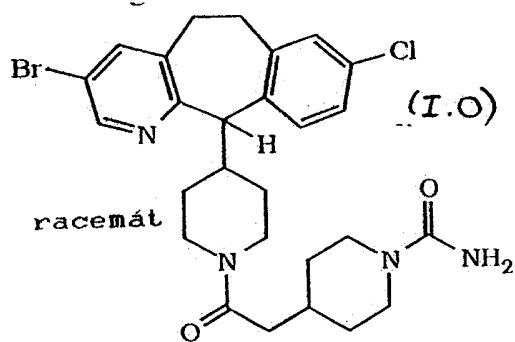


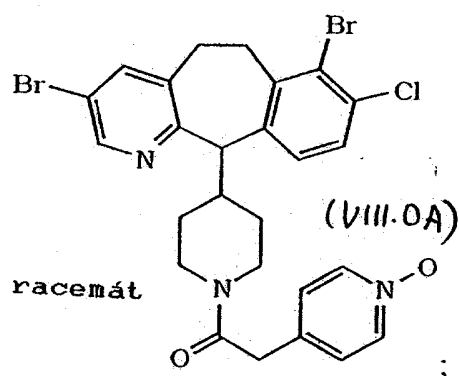
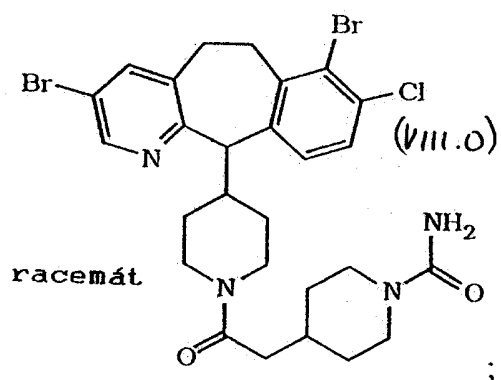
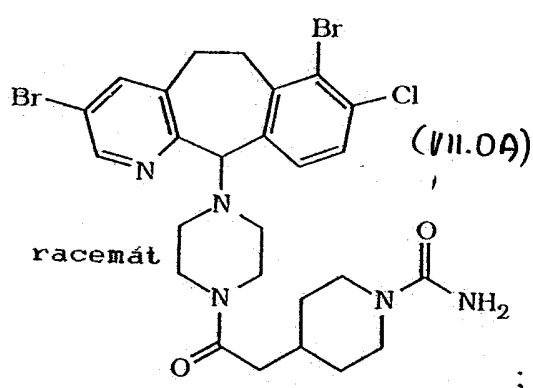
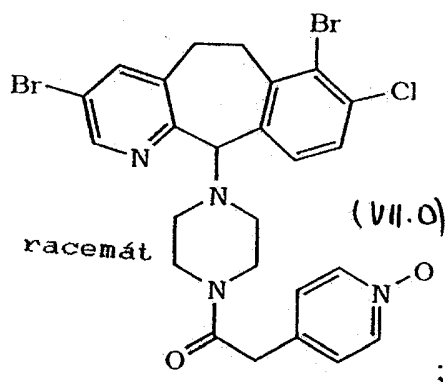
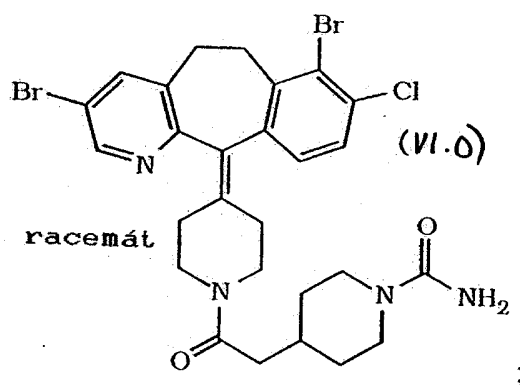
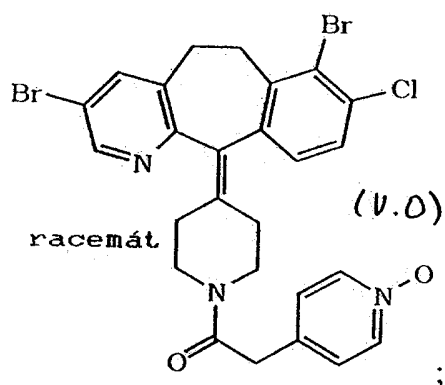
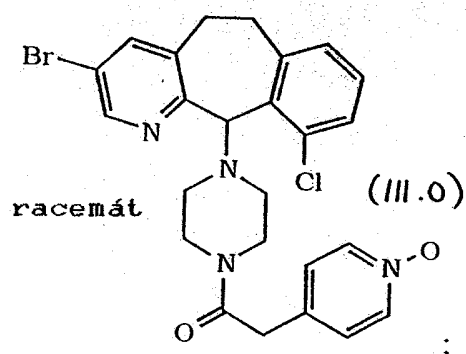
14.08.98

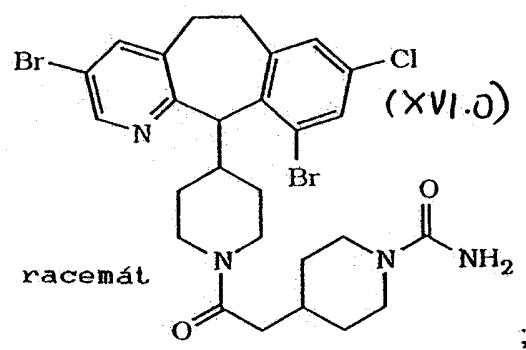
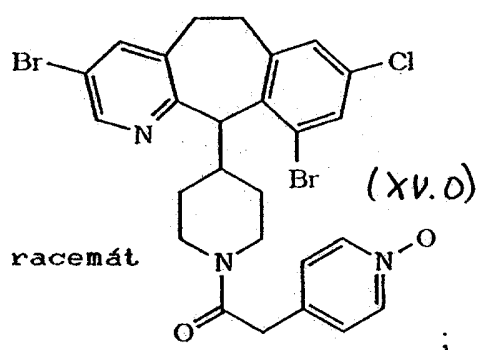
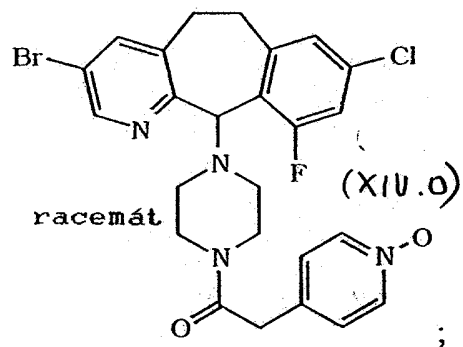
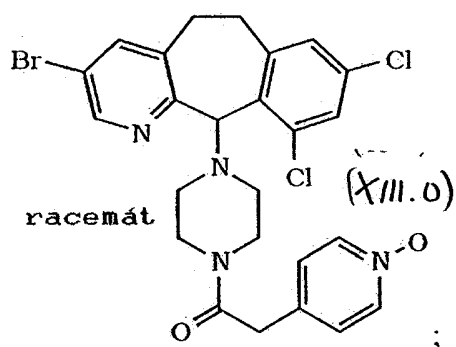
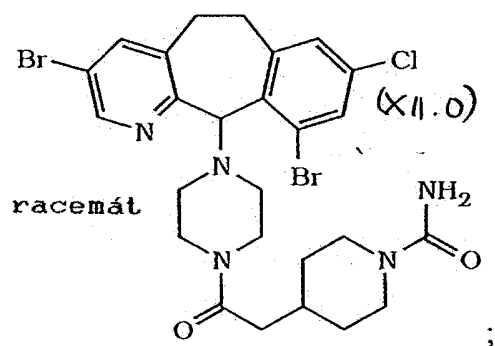
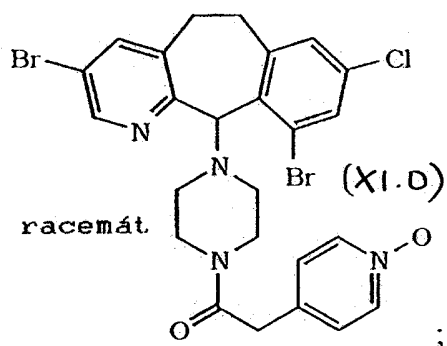
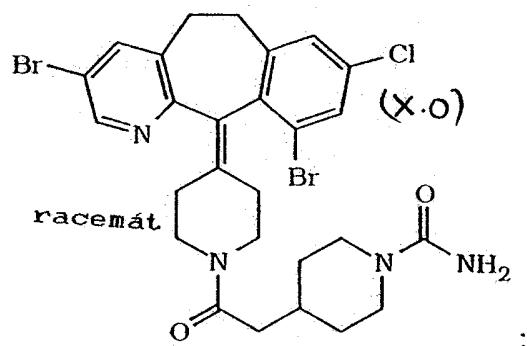
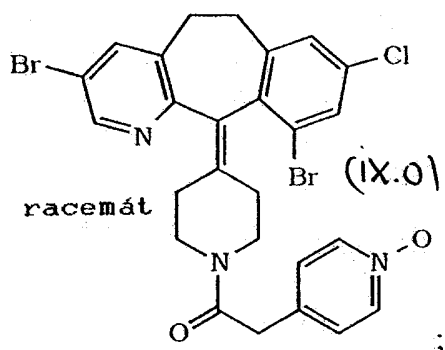


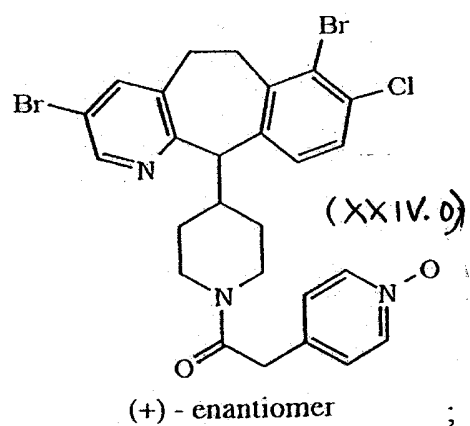
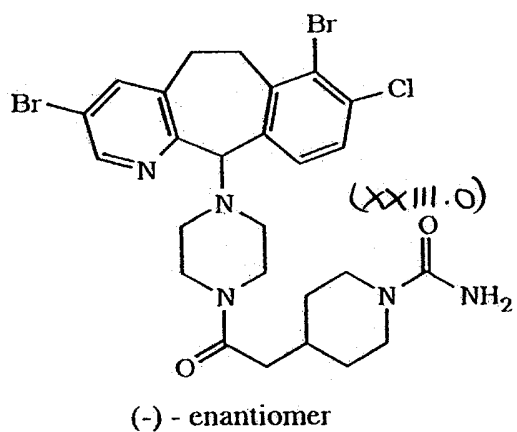
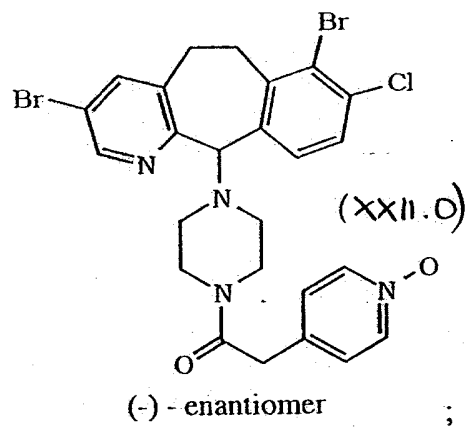
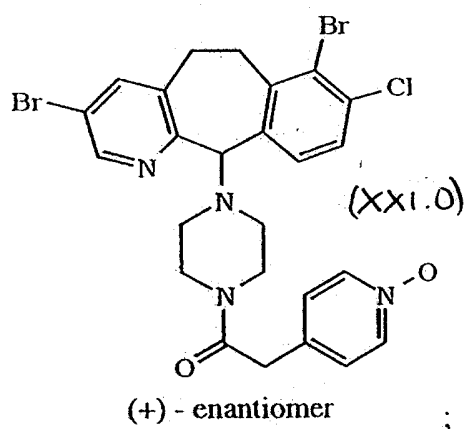
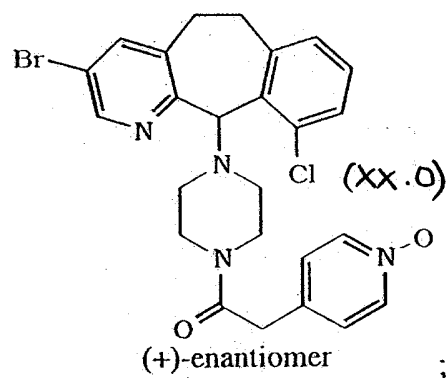
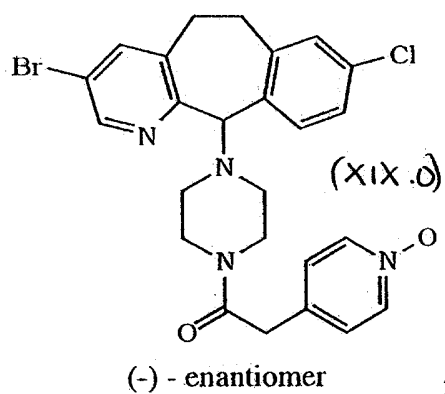
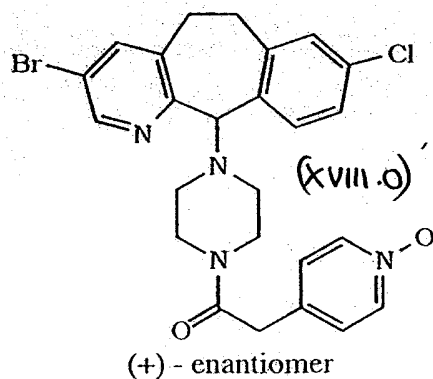
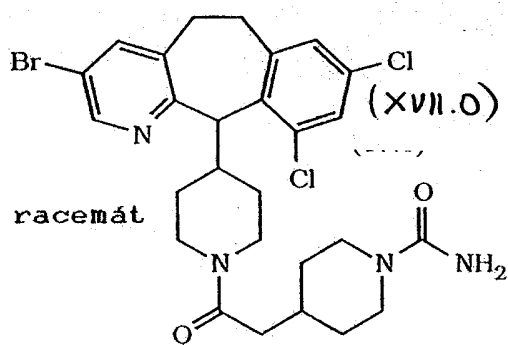
nebo farmaceuticky přijatelných solí těchto sloučenin

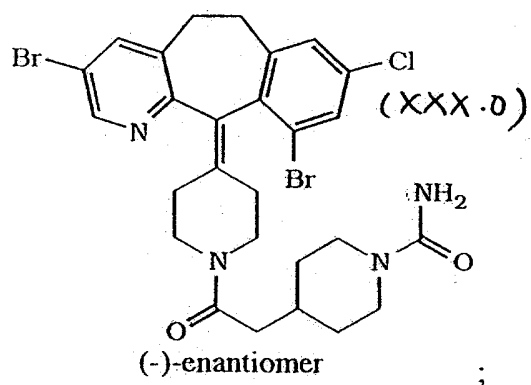
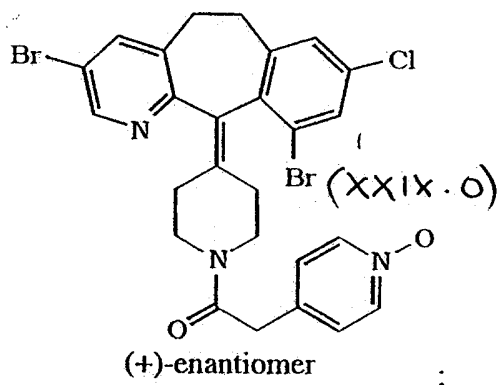
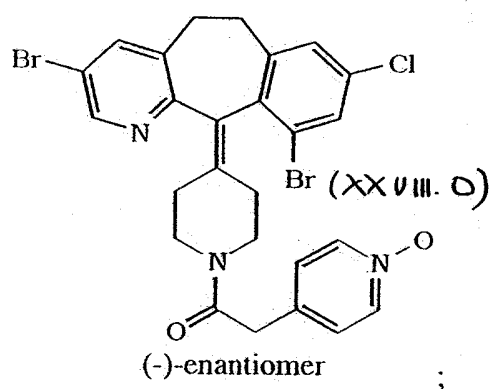
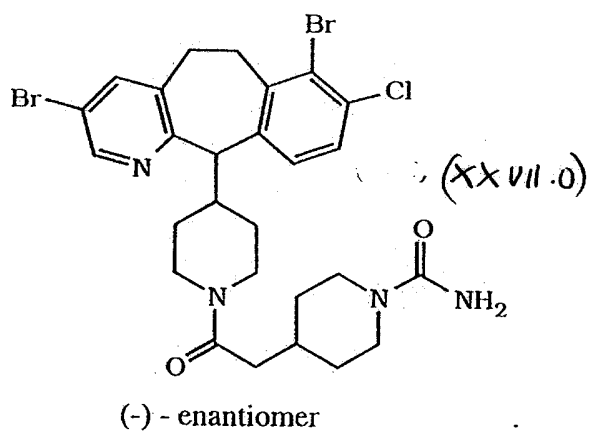
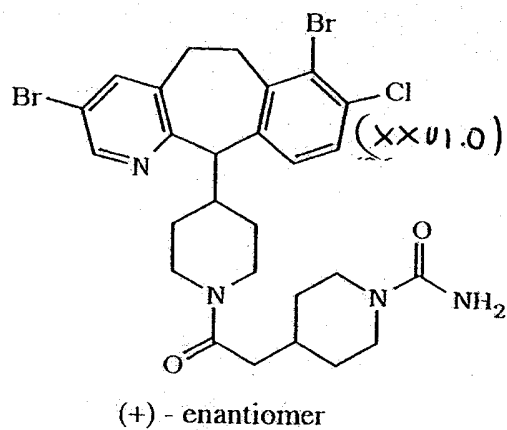
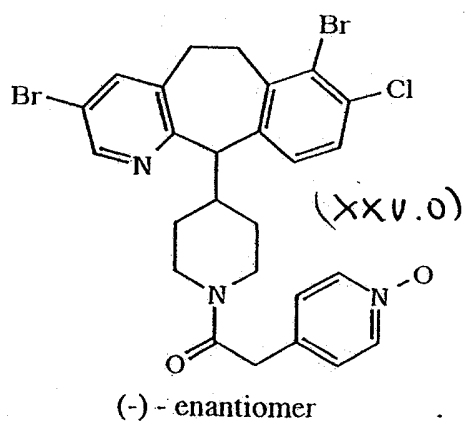
2. Sloučenina podle nároku 1, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:

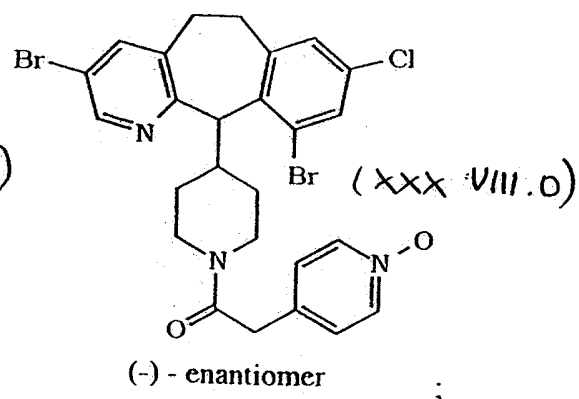
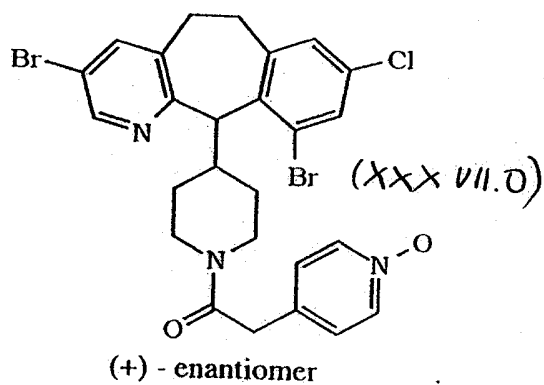
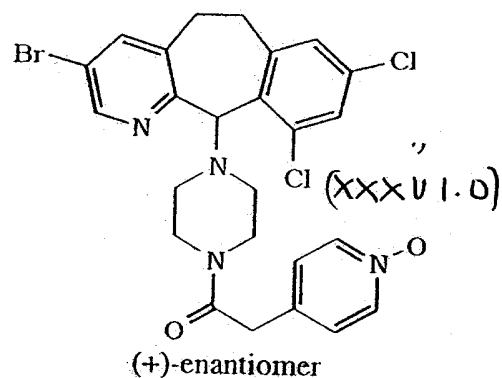
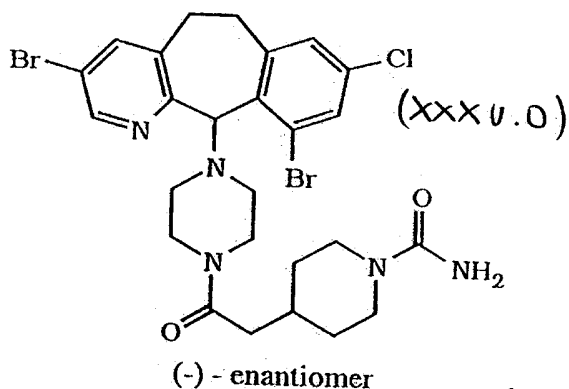
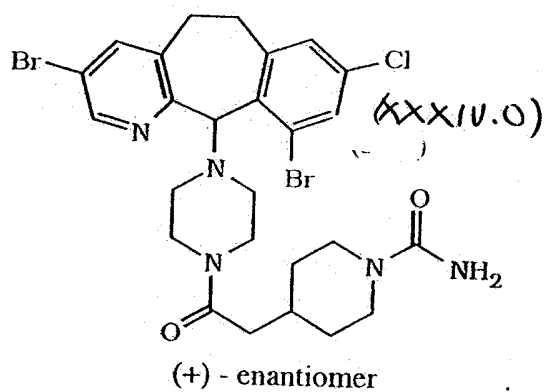
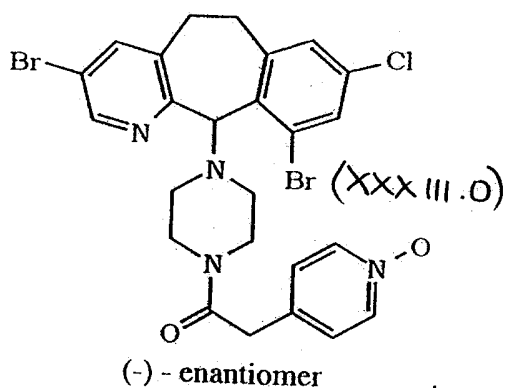
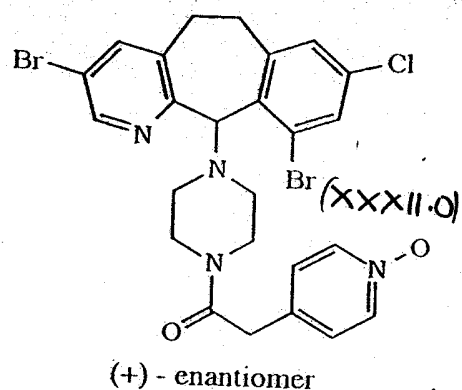
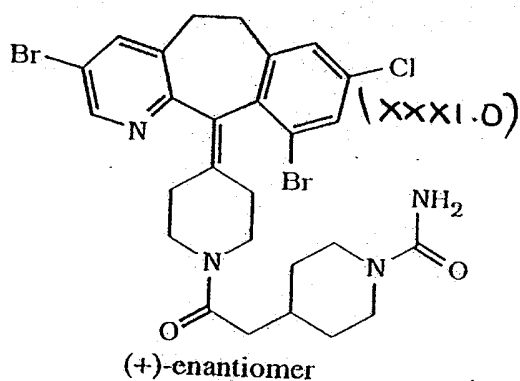




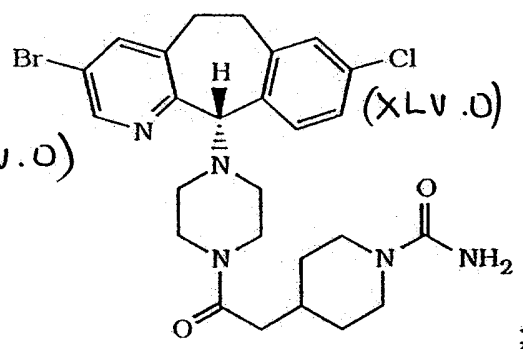
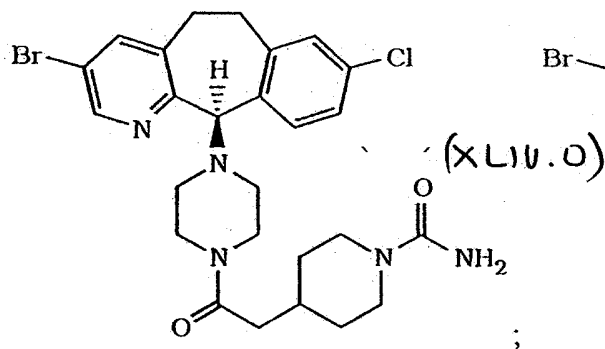
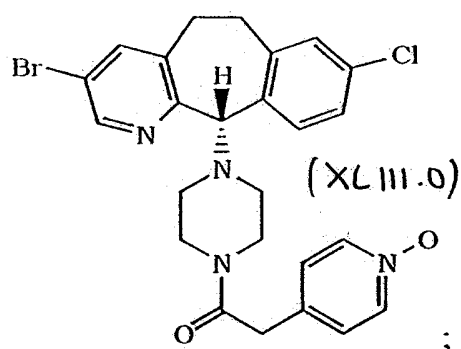
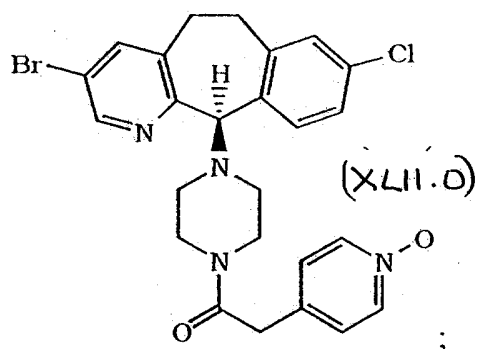
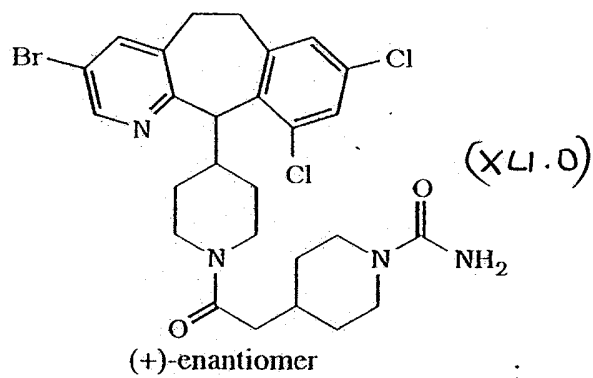
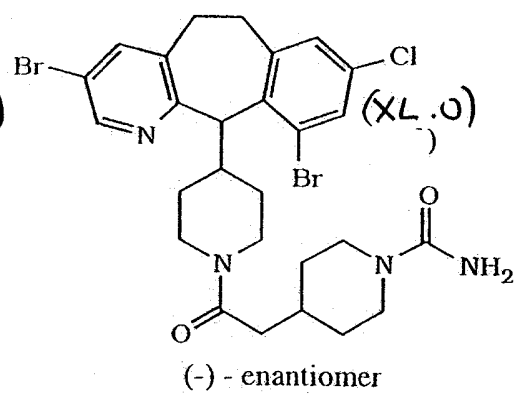
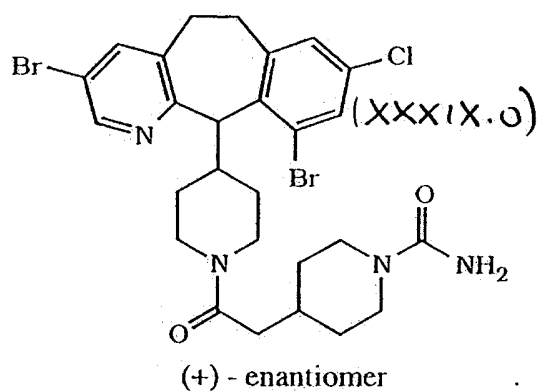




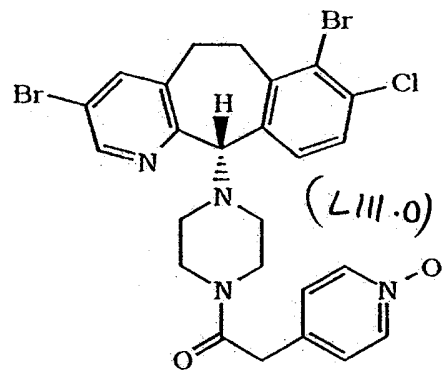
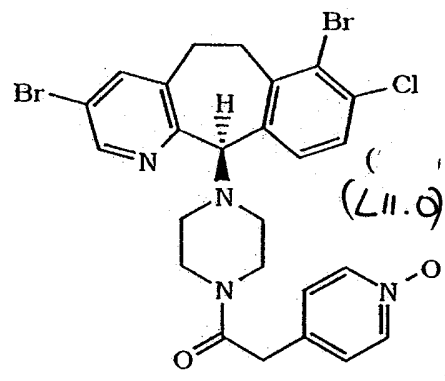
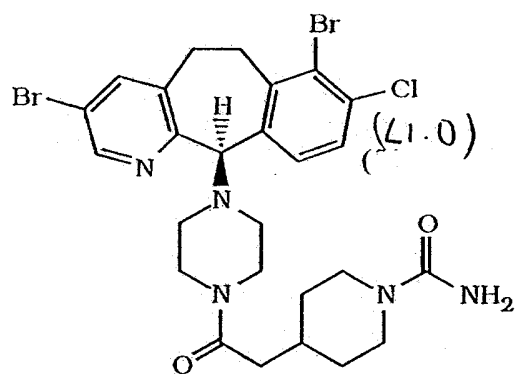
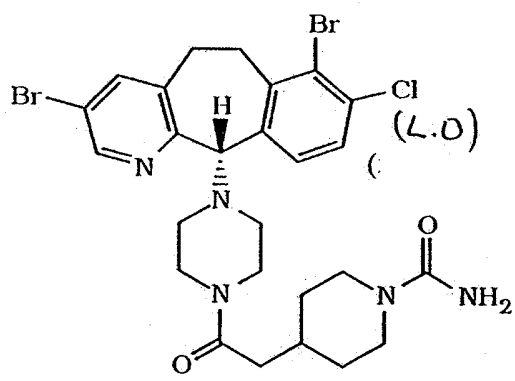
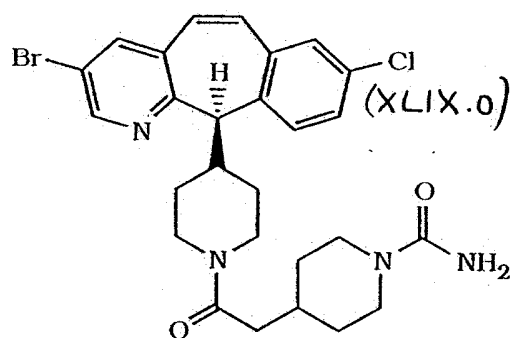
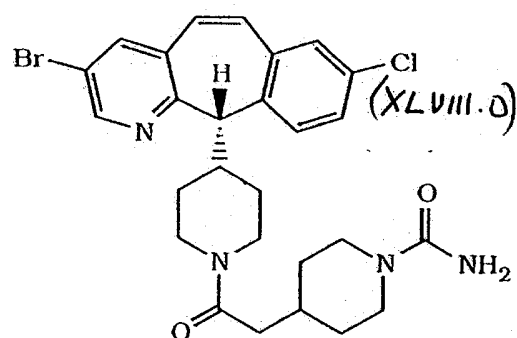
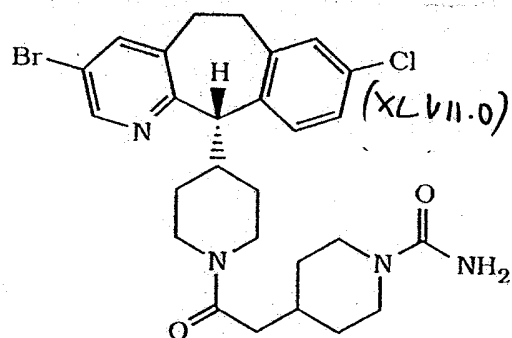
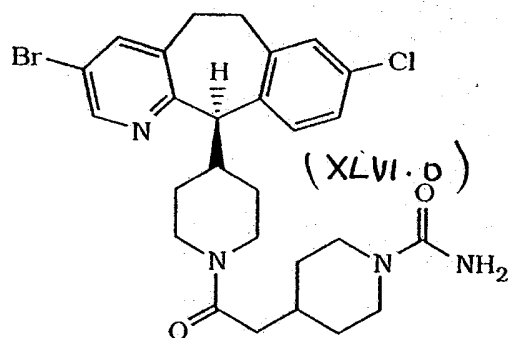




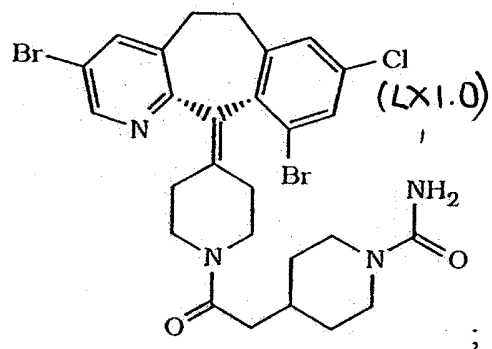
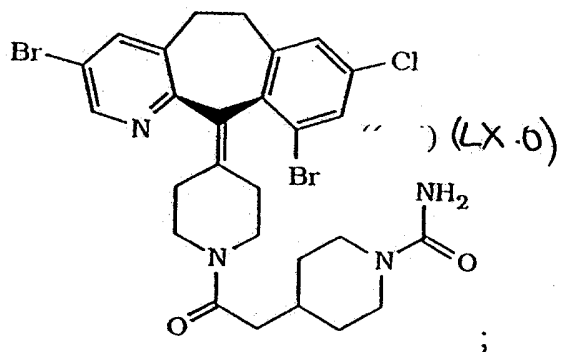
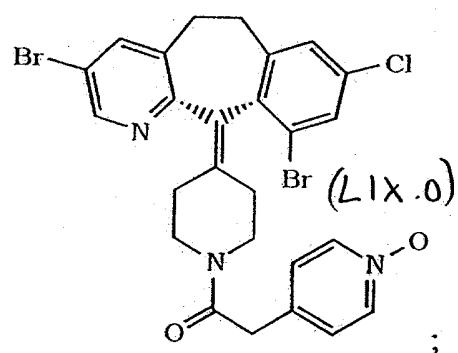
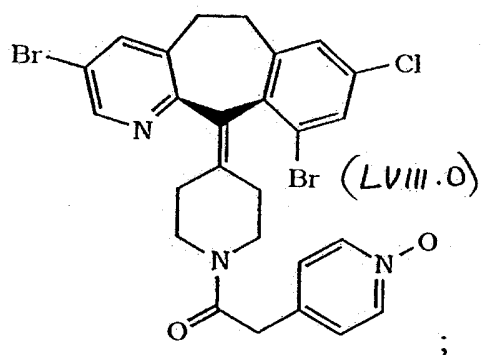
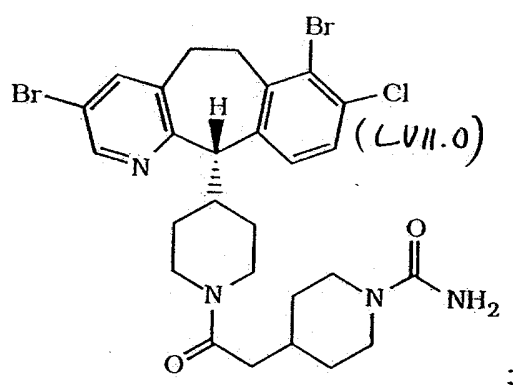
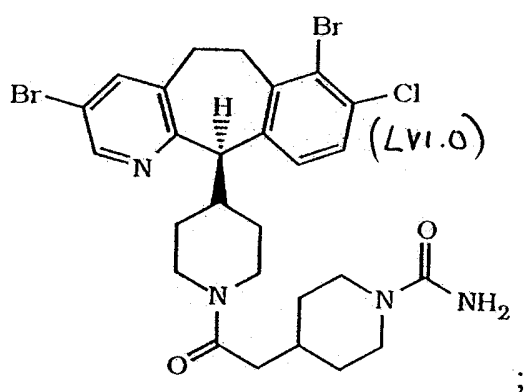
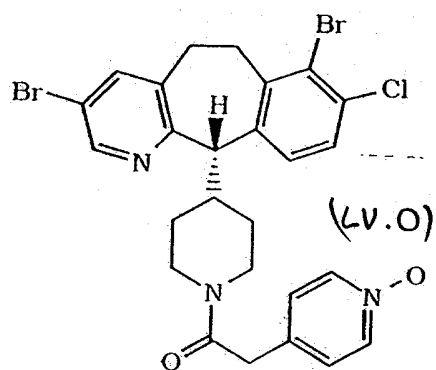
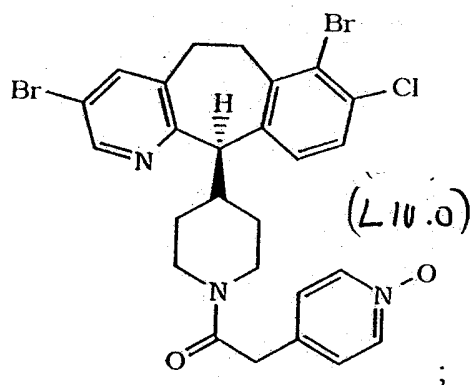
14.08.98



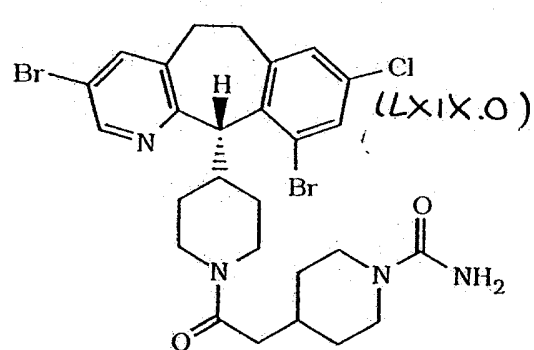
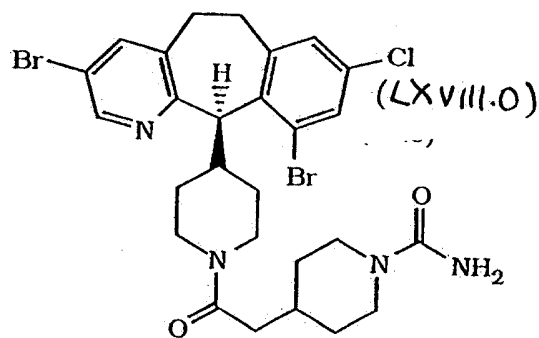
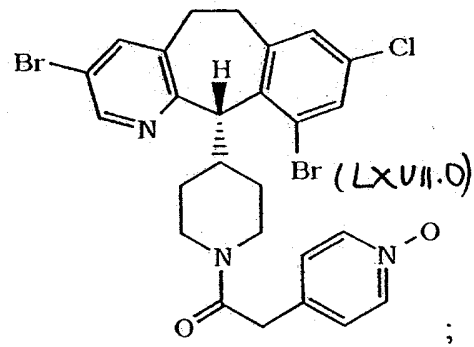
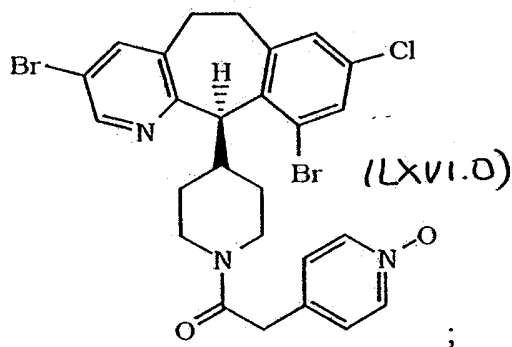
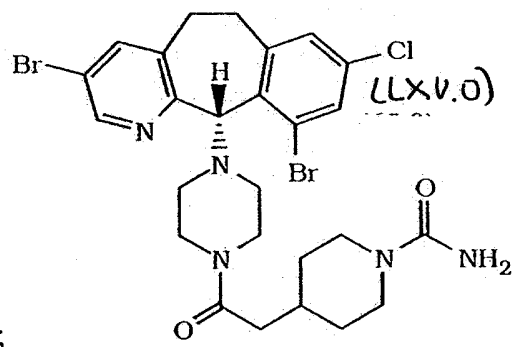
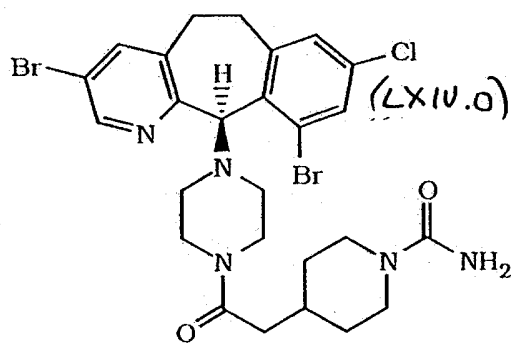
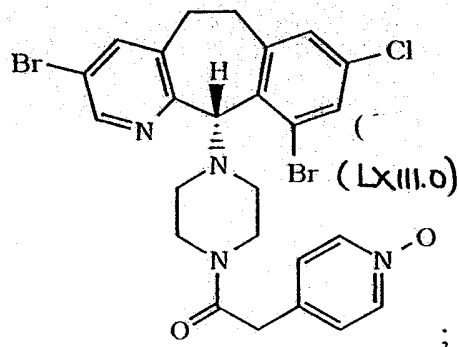
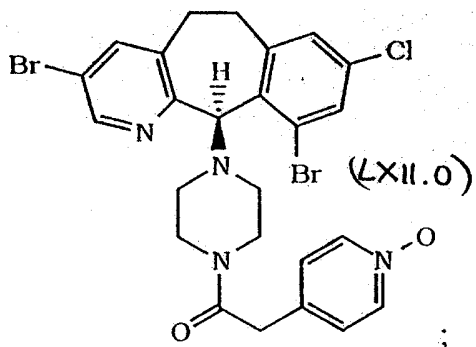
14.08.98



14.08.98

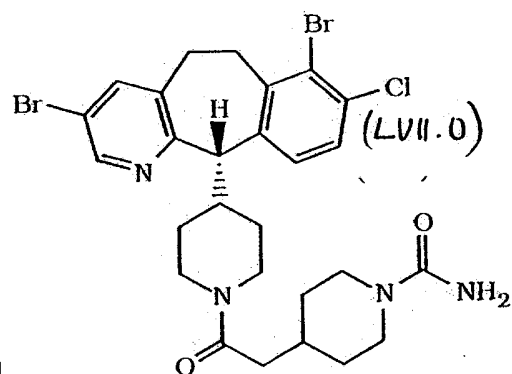
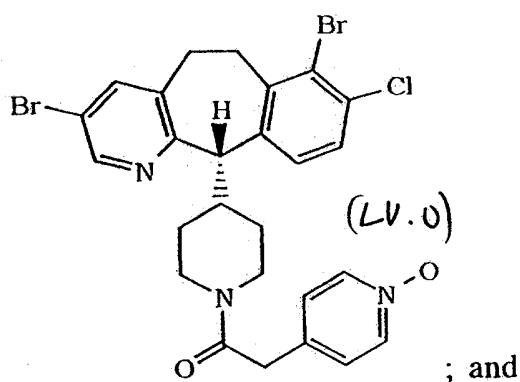
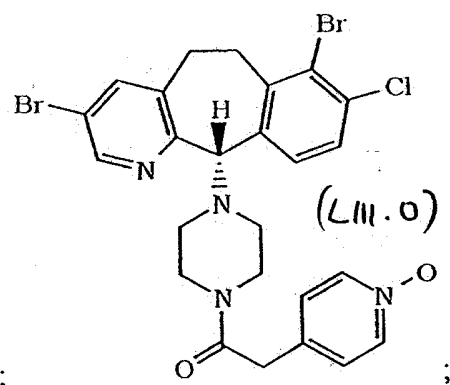
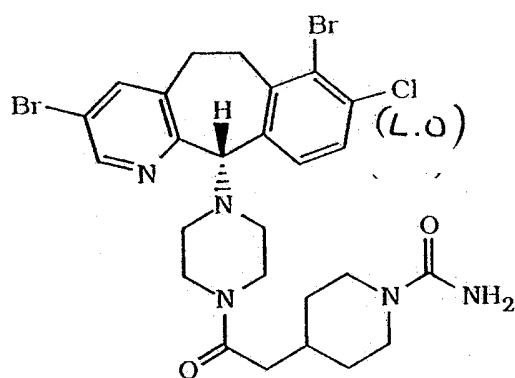
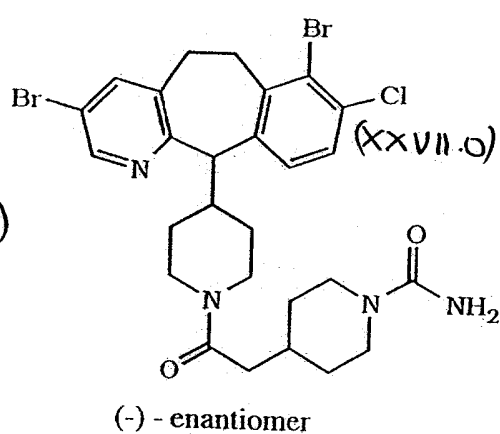
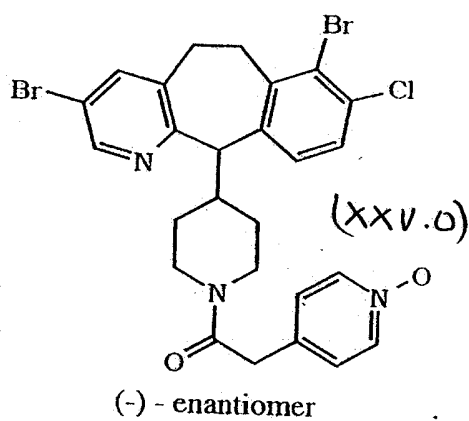
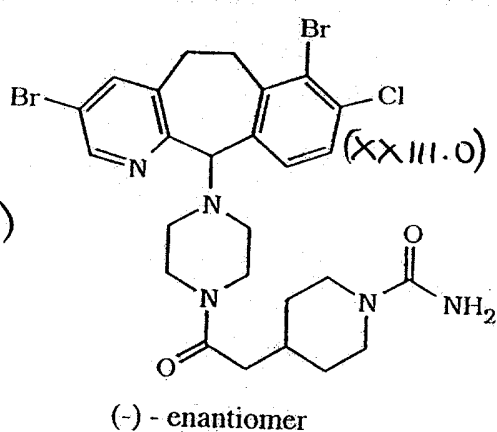
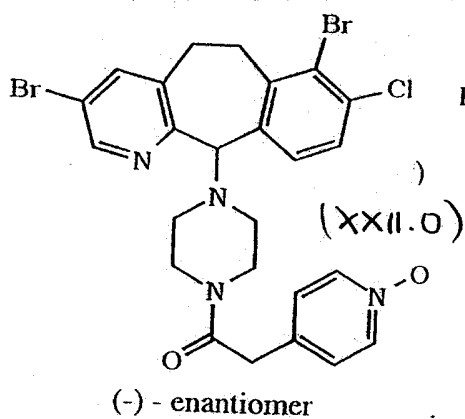


14.08.98



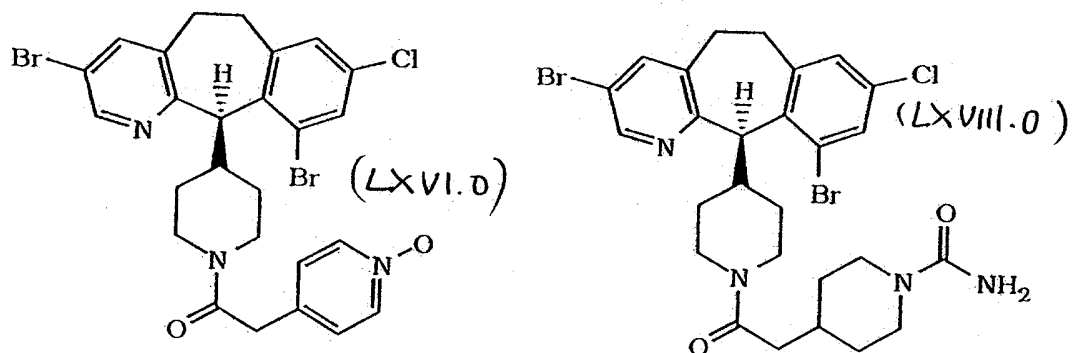
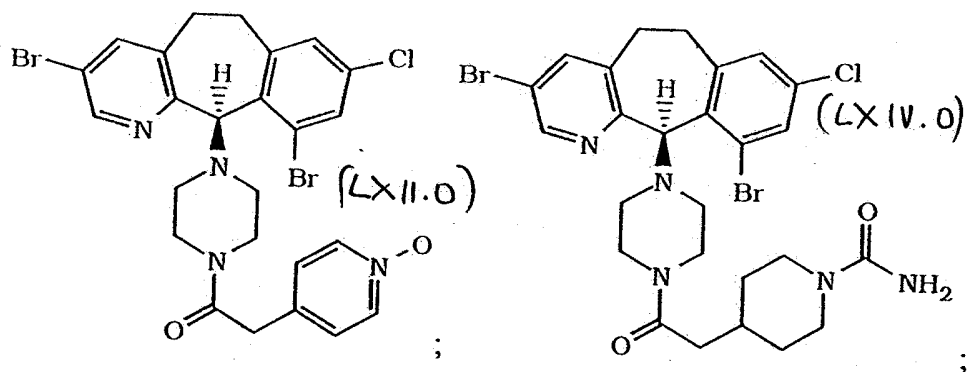
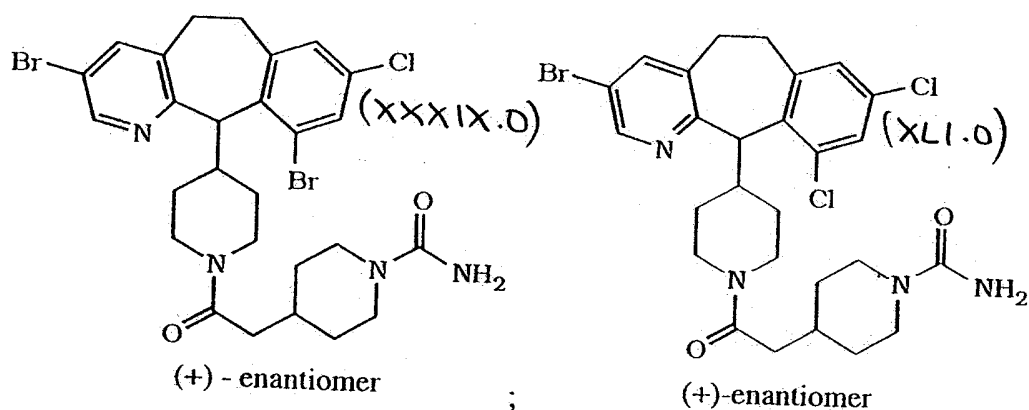
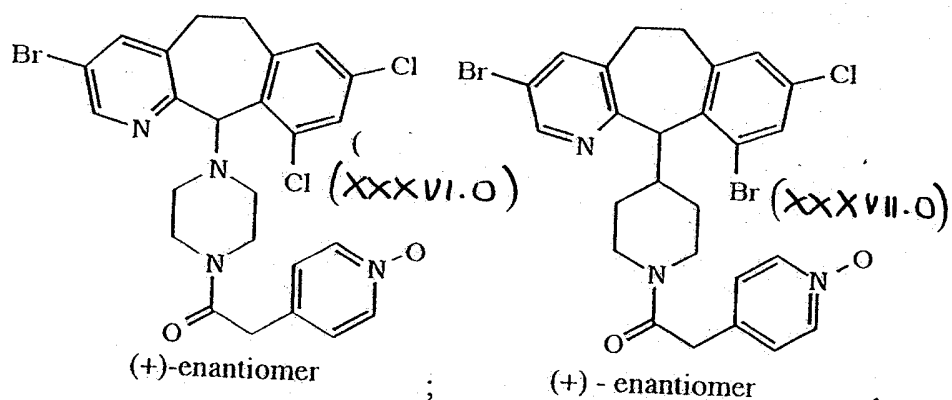
14.08.98

3. Sloučenina podle nároku 1, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:

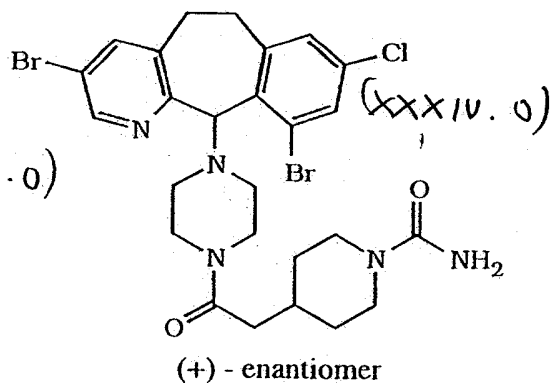
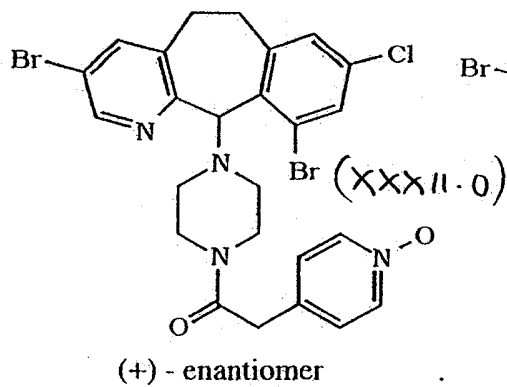
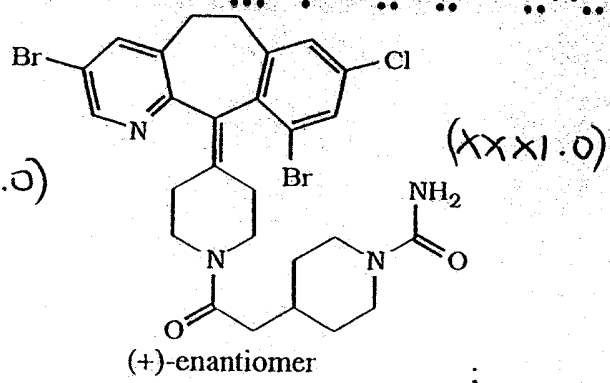
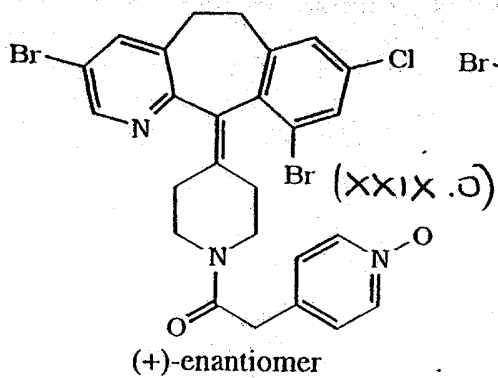


; and

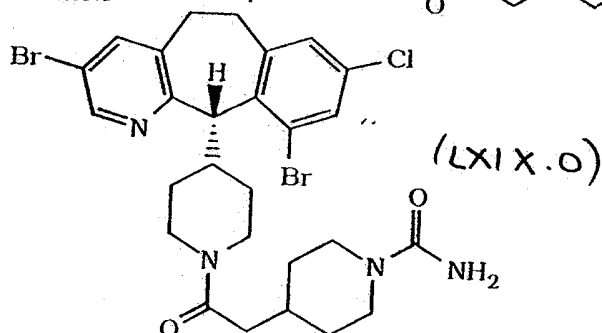
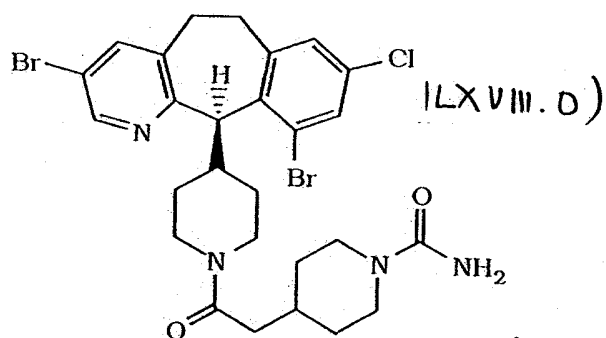
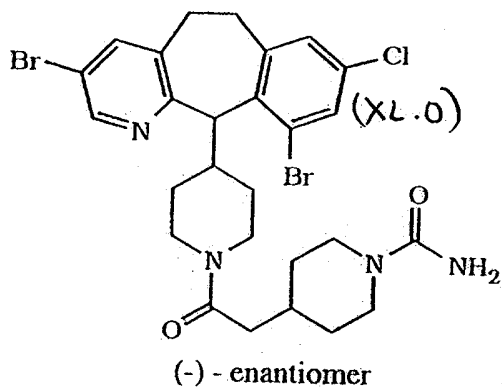
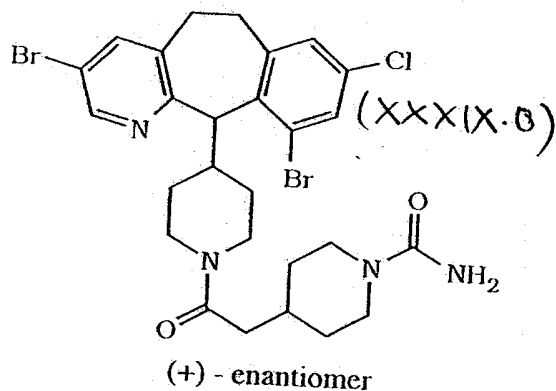
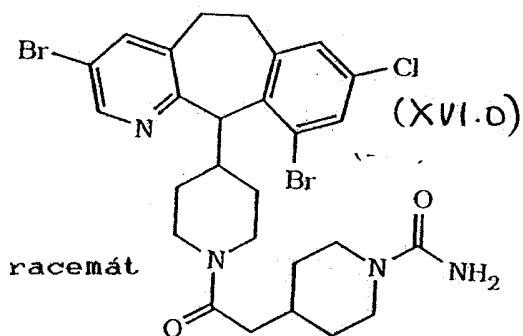
4. Sloučenina podle nároku 1, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:



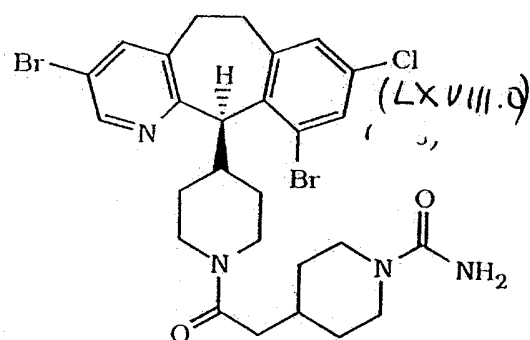
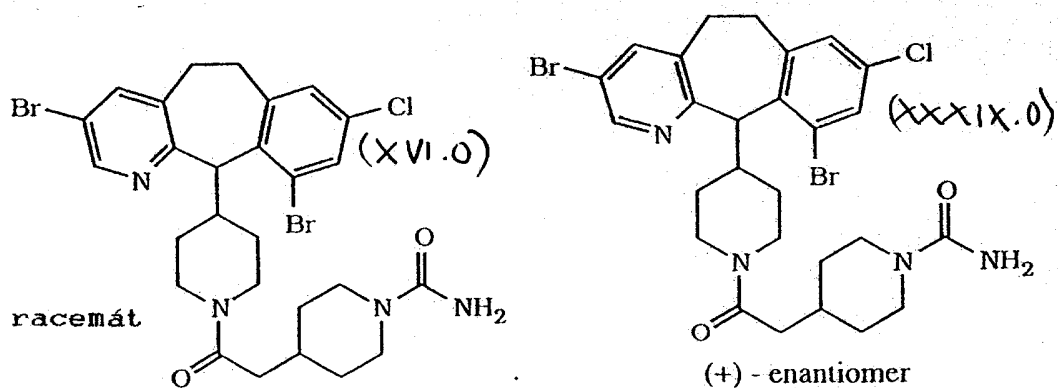
14.08.98



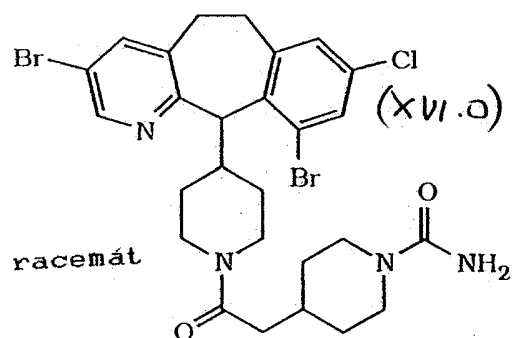
5. Sloučenina, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:



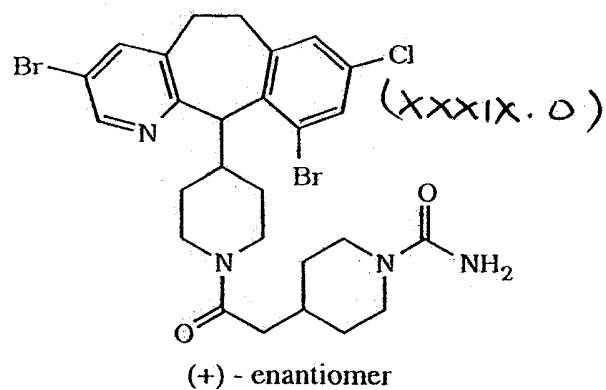
6. Sloučenina podle nároku 5, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:



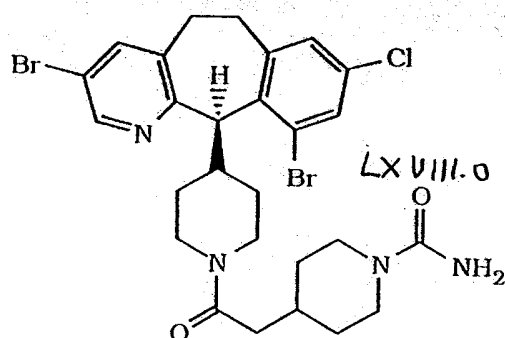
7. Sloučenina podle nároku 5, která má strukturní vzorec:



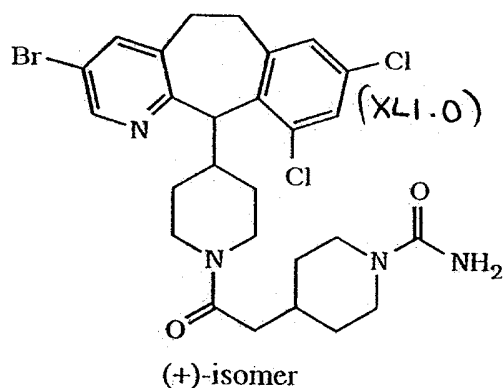
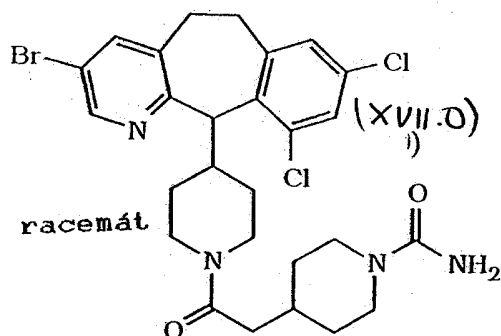
8. Sloučenina podle nároku 5, která má strukturní vzorec:



9. Sloučenina podle nároku 5, která má strukturní vzorec:



10. Sloučenina podle nároku 1, která je vybrána ze skupiny, která se skládá z:



11. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství sloučeniny podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

12. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro přípravu léčiva pro inhibici farnesyl protein transferázy.

13. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro přípravu léčiva pro léčení rakoviny pankreatu, plic, myeloidní leukémie, thyroïdní rakoviny folikula, myelodysplastického syndromu, epidermálních nádorů, nádoru močového měchýře,

rakoviny tračnicku, rakoviny prsu nebo rakoviny prostaty.

14. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro inhibici farnesyl protein transferázy u pacientů, kteří takovou léčbu potřebují, která zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10.

15. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro léčení rakoviny pankreatu, rakoviny plic, myeloidní leukemie, thyrooidní rakoviny folikula, myelodysplastického syndromu, epidermálního karcinomu, karcinomu močového měchýře, rakoviny tračnicku, rakoviny prsu nebo rakoviny prostaty u pacientů, kteří takovou léčbu potřebují, které zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10.

16. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro přípravu léčiva pro inhibici abnormálního růstu buněk.

17. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro přípravu léčiva pro inhibici abnormálního růstu buněk, kde inhibované buňky jsou nádorové buňky, které se vyznačují aktivovanými ras onkogeny.

18. Použití sloučeniny podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 pro přípravu léčiva pro inhibici abnormálního růstu buněk, kde jsou inhibované buňky, ve kterých je Ras protein aktivován jako výsledek onkogenní mutace v jiných genech než je Ras gen.

19. Použití sloučeniny podle nároku 11 pro přípravu léčiva pro léčení rakoviny pankreatu, rakoviny plic, myeloidní leukemie, thyrooidní rakoviny folikula, myelodysplastického syndromu, epidermálního karcinomu, karcinomu močového měchýře, rakoviny tračnicku, rakoviny prsu nebo rakoviny prostaty.