

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 -597

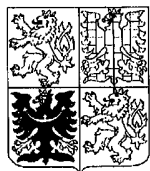
(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 233/87 C 07 D 487/04
C 07 C 235/52 A 61 K 31/165
C 07 C 237/36 A 61 K 31/33
C 07 C 317/50 A 61 P 19/02
C 07 C 323/39 A 61 P 11/06
C 07 D 215/50 A 61 P 29/00
C 07 D 233/32
C 07 D 295/088

//(C 07 D 487/04, C 07 D 239:00, C 07 D 231:00)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.08.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.08.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/056718**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.07.2000**
(Věstník č. 7/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/05135**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/10312**

(71) Přihlašovatel:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Chen Li, Westfield, NJ, US;
Guthrie Robert William, Saddle Brook, NJ, US;
Huang Tai-Nang, Lexington, MA, US;
Hull Kenneth G., Clifton, NJ, US;
Sidduri Achytharao, Livingston, NJ, US;
Tilley Jefferson Wright, North Caldwell, NJ, US;

(74) Zástupce:

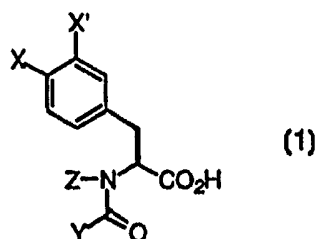
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

N-Aroylfenylalaninové deriváty

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce i a rovněž jejich soli a estery, které mají aktivitu jako inhibitory vazby mezi VCAM-1 a buňkami exprimujícími VLA-4. Takové sloučeniny jsou užitečné pro ošetření nemocí, jejichž symptomy a/nebo poškození jsou vztaženy k vazbě VCAM-1 k buňkám exprimujícím VLA-4.



N-Aroylfenylalaninové deriváty

Oblast techniky

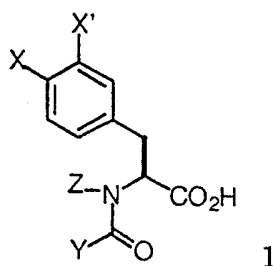
Předkládaný vynález se týká N-aroylfenylalaninových derivátů.

Dosavadní stav techniky

Vaskulární buněčná adhezní molekula (VCAM-1), člen imunoglobulinové (Ig) supergenové rodiny je exprimována na aktivované, nikoliv zbývajícím endothelium. Integrin VLA-4($\alpha_4\beta_1$), který je exprimován na řadu buněčných typů zahrnující cirkulační lymfocyty, eosinofily, basofily a monocyty, nikoliv však neutrofilů, je základní receptor pro VCAM-1. Protilátky proti VCAM-1 nebo VLA-4 mohou blokovat adhezi těchto mononukleárních leukocytů a rovněž melanomových buněk na aktivované endothelium *in vitro*. Protilátky k oběma proteinům jsou účinné při inhibici leukocytové infiltrace a prevenci poškození tkáně u několika zvířecích modelů zánětů. Bylo prokázáno, že anti-VLA-4 monoklonální protilátky blokují T-buněčnou emigraci v adjuvantem zavedené artritidě, zabráňují akumulaci eosinofilů a bronchokonstrikci v modelech astma a snižují paralýzu a inhibují monocytovou a lymfocytovou infiltraci v experimentální autoimunní encefalitidě (EAE). Bylo prokázáno, že anti-VCAM-1 monoklonální protilátky prodlužují dobu přežití srdečních aloimplantátů. Dřívější studie ukázaly, že anti-VLA-4 mAbs mohou zabránit insulitidě a diabetu u neobézní diabetické myši a podstatně zeslabují zánět v modelech kolitidy.

Tak sloučeniny, které inhibují interakci mezi α_4 -obsahující integriny a VCAM-1 budou užitečné jako terapeutická činidla pro léčbu chronických zánětlivých nemocí, jako je RA, násobná skleróza (MS)*, astma, a zánětlivé nemoci tlustého střeva.

Předkládaný vynález se týká nových sloučenin obecného vzorce:



a jejich farmaceuticky přijatelných solí a esterů, kde X, X', Z a Y mají význam uvedený dále, které inhibují vazbu VCAM-1 k VLA-4, způsobu přípravy takových sloučenin, léčiv, způsobu přípravy takových léčiv a použití nových sloučenin k léčbě nemocí, zejména zánětlivých nemocí, kde taková vazba způsobuje vznik nemoci.

Výraz "nižší alkyl", jak se zde používá, samotný nebo v kombinaci, znamená alkylovou skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem obsahující od jednoho do šesti atomů uhlíku, jako je methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek.butyl, terc.butyl, n-pentyl, n-hexyl apod. Nižší alkylové skupiny mohou být nesubstituované nebo substituované jednou nebo více skupinami, vybranými nezávisle ze souboru zahrnující cykloalkyl, nitro, aryloxy, aryl, hydroxy, halogen, kyano, nižší alkoxy, nižší alkanoyl, nižší alkylthio, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl a substituovaný amino. Příklady substituovaných nižších alkylových skupin zahrnují 2-hydroxyethyl, 3-oxobutyl, kyanomethyl a 2-nitropropyl.

Výraz "cykloalkyl" znamená nesubstituovaný nebo substituovaný 3- až 7-členný karbocyklický kruh. Substituenty používané v souladu s předkládaným vynálezem jsou hydroxy,

halogen, kyano, nižší alkoxy, nižší alkanoyl, nižší alkyl, aroyl, nižší alkylthio, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl, aryl, heteroaryl, a substituovaný amino.

Výraz "nižší alkoxy" znamená alkoxy skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem obsahujícím maximálně 6 atomů uhlíku, jako je methoxy, ethoxy, n-propoxy, isopropoxy, n-butoxy, terc.butoxy apod.

Výraz "nižší alkylthio" znamená nižší alkylovou skupinu vázanou přes dvojmocný atom síry, například methylmerkpto nebo isopropylmerkptoskupinu.

Výraz "aryl" znamená mono- nebo bicyklickou aromatickou skupinu, jako je fenyl nebo naftyl, která je nesubstituovaná nebo je substituovaná konvenčními substituenty. Výhodné substituenty jsou nižší alkyl, nižší alkoxy, hydroxy nižší alkyl, hydroxy, hydroxyalkoxy, halogen, nižší alkylthio, nižší alkylsulfonyl, nižší alkylsulfonyl, kyano, nitro, perfluoralkyl, alkanoyl, aroyl, aryl, alkynyl, nižší alkynyl a nižší alkanoylamino. Zvláště výhodné substituenty jsou nižší alkyl, hydroxy a perfluor nižší alkyl. Příklady arylových skupin, které mohou být použity v souladu s vynálezem zahrnují fenyl, p-tolyl, p-methoxyfenyl, p-chlorfenyl, m-hydroxyfenyl, m-methylthiofenyl, 2-methyl-5-nitrofenyl, 2,6-dichlorfenyl, 1-naftyl apod.

Výraz "aralkyl" znamená nižší alkylovou skupinu jak je definována shora, kde jeden nebo více atomů vodíku je nahrazeno arylovou nebo heteroarylovou skupinou, jak je zde definována. V souladu s vynálezem se může použít jakákoliv aralkylová skupina, jako je benzyl apod.

Výraz "heteroaryl" znamená nesubstituovaný nebo substituovaný 5- nebo 6-členný monocyklický heteroaromatický kruh nebo 9- až 10-členný bicyklický heteroaromatický kruh

obsahující 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomy, které jsou nezávisle N, S nebo O. Příklady heteroarylových kruhů jsou pyridin, benzimidazol, indol, imidazol, thiofen, isochinolin, chinolizin apod. V definici heteroarylu jsou rovněž zahrnuty substituenty uvedené shora pro "aryl".

Výraz "nižší alkoxykarbonyl" znamená nižší alkoxyskupinu vázanou přes karbonylovou skupinu. Příklady alkoxykarbonylových skupin jsou ethoxykarbonyl apod.

Výraz "nižší alkoxykarbonyloxy" znamená nižší alkoxykarbonyloxylové skupiny vázané přes atom kyslíku, například acetoxyskupinu.

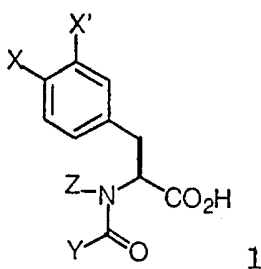
Výraz "nižší alkanoyl" znamená nižší alkylové skupiny vázané přes karbonylovou skupinu a zahrnuje ve smyslu shora uvedených definic skupiny, jako je acetyl, propionyl apod.

Výraz "nižší alkylkarbonylamino" znamená nižší alkylkarbonylové skupiny vázané přes atom dusíku, jako je acetylamino.

Výraz "aroyl" znamená mono- nebo bicyklickou arylovou nebo heteroarylovou skupinu vázanou přes karbonylovou skupinu. Příklady aroylových skupin zahrnují benzoyl, 3-kyanobenzoyl, 2-naftyl apod.

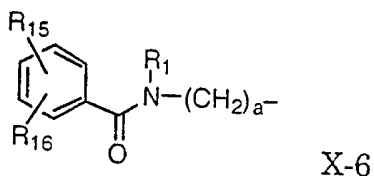
Výraz "aryloxy" znamená arylovou skupinu, jak je definována shora, která je vázána přes atom kyslíku. Výhodná aryloxyskupina je fenoxi.

V prvním aspektu se předkládaný vynález týká sloučeniny obecného vzorce:



kde:

Jedno z X a X' znamená vodík, halogen nebo nižší alkyl, zbývající je skupina obecného vzorce:



kde:

R₁ je vodík nebo nižší alkyl,

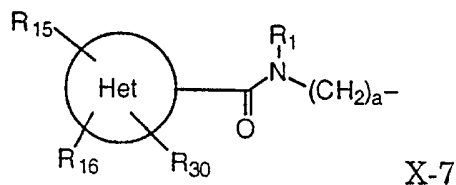
R₁₅ je halogen, nitro, nižší alkylsulfonyl, kyano, nižší alkyl, OH, nižší alkoxy, nižší alkoxykarbonyl, karboxy, nižší alkylaminosulfonyl, perfluor nižší alkyl, nižší alkylthio, hydroxy nižší alkyl, alkoxy nižší alkyl, halogen nižší alkyl, alkylthio nižší alkyl, alkylsulfinyl nižší alkyl, alkylsulfonyl nižší alkyl, nižší alkylsulfinyl, nižší alkanoyl, aroyl, aryloxy nebo skupina vzorce R₁₇C≡C-

R₁₆ je vodík, halogen, nitro, kyano, nižší alkyl, OH, perfluor nižší alkyl nebo nižší alkylthio,

R₁₇ je vodík, aryl, heteroaryl, nebo nižší alkyl, který je substituován nebo nesubstituován OH, arylem nebo heteroarylem
a

a je 0 nebo 1;

nebo jedno z X a X' je skupina obecného vzorce:



kde Het je 5- nebo 6-členný heteroaromatický kruh obsahující 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané z N, O a S;

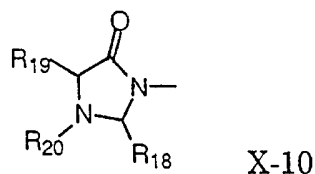
nebo

Het je 9- nebo 10-členný bicyklický heteroaromatický kruh obsahující 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomy vybrané z O, S a N,

a R_1 , R_{15} a R_{16} mají význam uvedený shora, a

R_{30} je vodík nebo nižší alkyl nebo je nepřítomen

jedno z X a X' je skupina obecného vzorce:



kde:

R_{18} je nižší alkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, heteroarylalkyl,

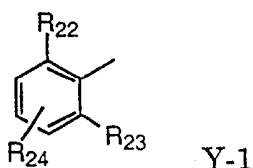
R_{19} je nižší alkyl, který je nesubstituován nebo je substituován jedním nebo více substituenty vybranými ze souboru, který zahrnuje halogen, hydroxy, nižší alkoxy, aryl, heteroaryl, alkylthio nebo R_{19} je aryl nebo heteroaryl, a

R_{20} je nižší alkyl nebo nižší alkanoyl, nebo

R_{19} a R_{20} spolu jsou tetramethylen;

a

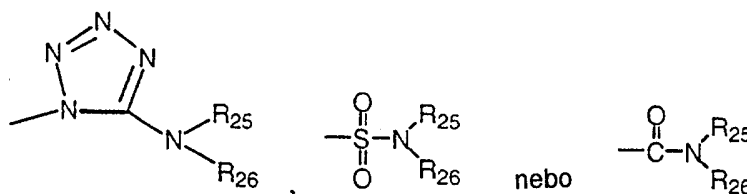
Y je skupina obecného vzorce:



kde:

R_{22} a R_{23} jsou nezávisle vodík, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkoxyalkyl, nižší alkylamino, aryl, arylalkyl, nitro, kyano, nižší alkylthio, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl, nižší alkanoyl, halogen nebo perfluoralkyl a alespoň jedno z R_{22} a R_{23} je jiné než vodík a

R_{24} je vodík, hydroxy, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkylsulfonyl, amino, aryl, nitro, kyano, halogen nebo je skupina obecného vzorce:



kde R_{25} je vodík, nižší alkyl, aryl, aryl nižší alkyl, alkoxy nižší alkyl a R_{26} je vodík nebo nižší alkyl nebo

R_{22} a R_{24} spolu tvoří kondenzovaný benzenový kruh; nebo

Y je skupina Y-2

kteřá je pěti nebo šesti členná monocyklická

heteroaromatická skupina obsahující 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané z N, O a S nebo 9- nebo 10-členná bicyklická heteroaromatická skupina obsahující 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomy vybrané z O, S a N, kde uvedená heteroaromatická skupina je vázána přes atom uhlíku k amidovému karbonylu a jeden nebo dva atomy uvedené heteroaromatické skupiny jsou substituovány nižším alkylem, halogenem, kyano, perfluoralkylem nebo arylem a alespoň jeden z uvedených substituovaných atomů uhlíku je sousední s atomem uhlíku vázaným k amidové karbonylové skupině;

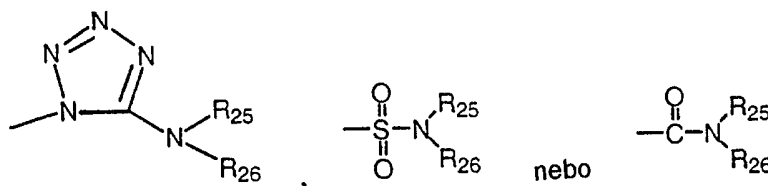
a jejich farmaceuticky přijatelných solí a esterů.

Sloučeniny podle vynálezu mohou existovat jako stereoisomery a diastereomery, přičemž všechny jsou zahrnuty do rozsahu předkládaného vynálezu.

Ve sloučenině obecného vzorce 1 je X' výhodně vodík, což znamená že X je skupina X-6, X-7 nebo X-10. Jestliže Z je nižší alkyl, výhodný je methyl. Z je výhodně vodík.

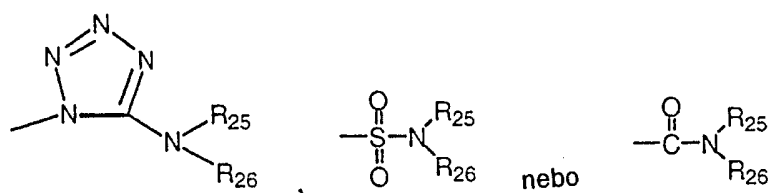
Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde skupina Y-1, která je výhodná před Y-2, R_{22} a R_{23} jsou výhodně vodík, nižší alkyl, nitro, nižší alkylthio, nižší alkoxy, nižší alkylamino, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl, nižší alkanoyl, halogen nebo perfluoralkyl, kde alespoň jedno z R_{22} a R_{23} není vodík a

R_{24} je vodík, hydroxy, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkylsulfonyl, amino, nitro, halogen nebo skupina obecného vzorce:



kde R_{25} je aryl nižší alkyl a R_{26} je vodík nebo nižší alkyl
nebo R_{22} a R_{24} společně tvoří benzenový kruh.

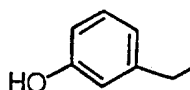
Výhodně je R_{22} vodík (když R_{23} je jiné než vodík), nižší alkyl nebo halogen. R_{24} je výhodně vodík, hydroxy, nižší alkylsulfonfyl, nižší alkyl, halogen, nitro nebo nižší alkoxy nebo skupina obecného vzorce:



kde R_{25} je nesubstituovaný nebo hydroxysubstituovaný fenyl
nižší alkyl a R_{26} je vodík,

nebo R_{22} a R_{24} společně tvoří kondenzovaný fenylový kruh.

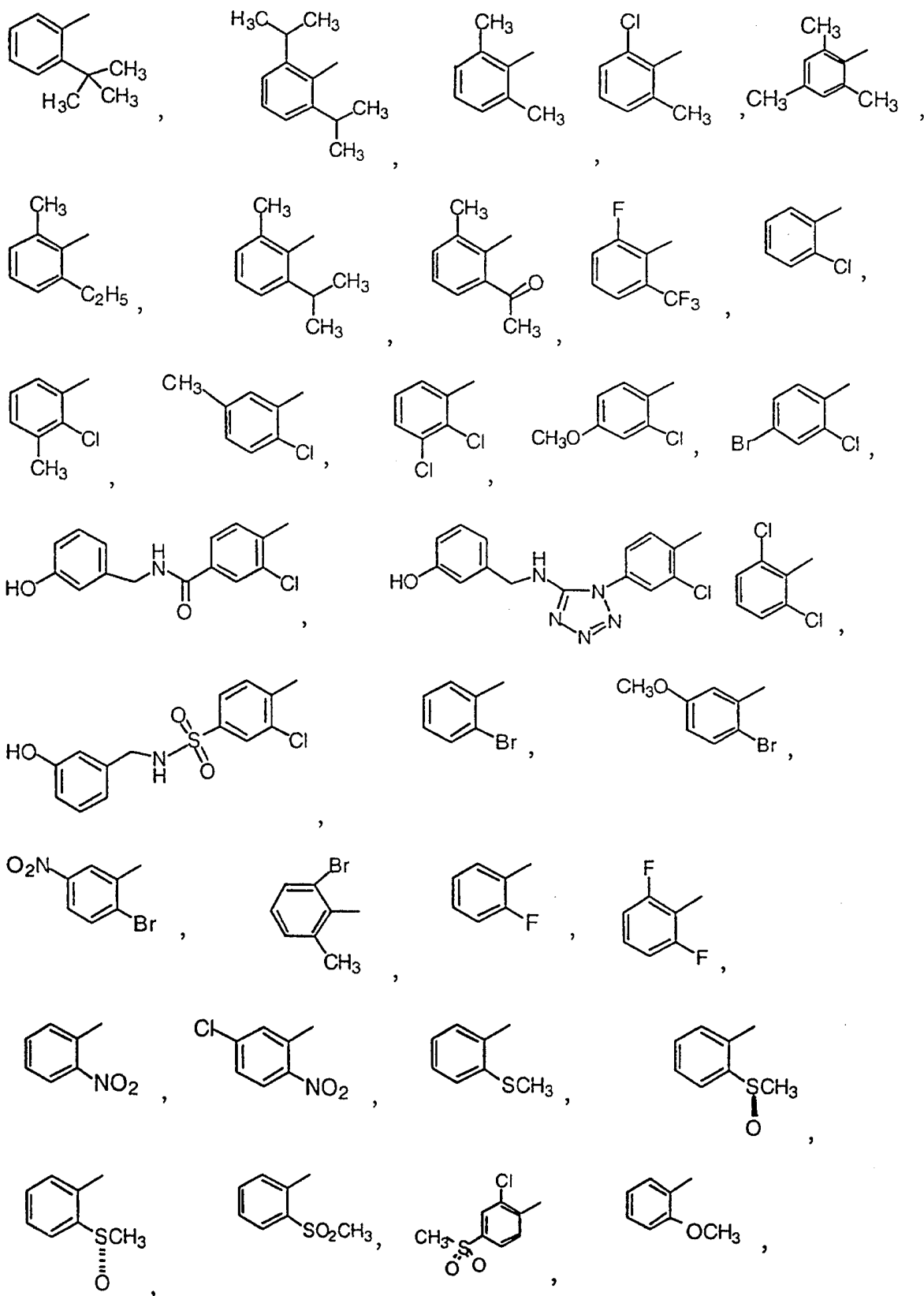
Výhodněji R_{24} je vodík, hydroxy, amino, methyl, chlor, brom,
nitro, $-OCH_3$, $-SO_2CH_3$ a R_{26} je H a R_{25} je

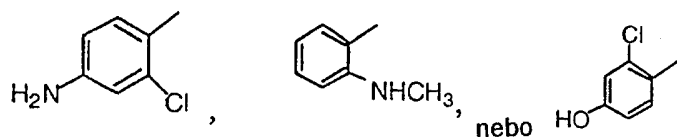


R_{23} je výhodně vodík (jestliže R_{22} je jiné než vodík), nižší alkyl, nižší alkylamino, halogen, nitro, perfluor nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkanoyl, nižší alkylsulfinyl nebo nižší alkylsulfonfyl. R_{23} je výhodněji methyl, ethyl, isopropyl, terc.butyl, trifluormethyl, chlor, brom, fluor, nitro, $-COCH_3$, $-SCH_3$, $-SOCH_3$, $-SO_2CH_3$, $-NHCH_3$ nebo $-OCH_3$.

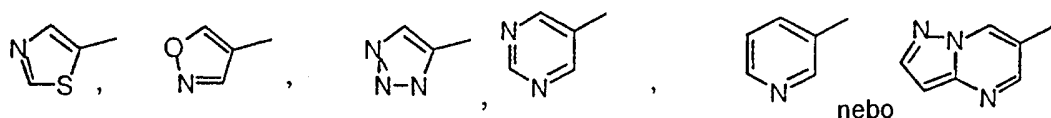
Nejvýhodněji je Y-1 vybráno ze skupiny zahrnující:

- 10 -

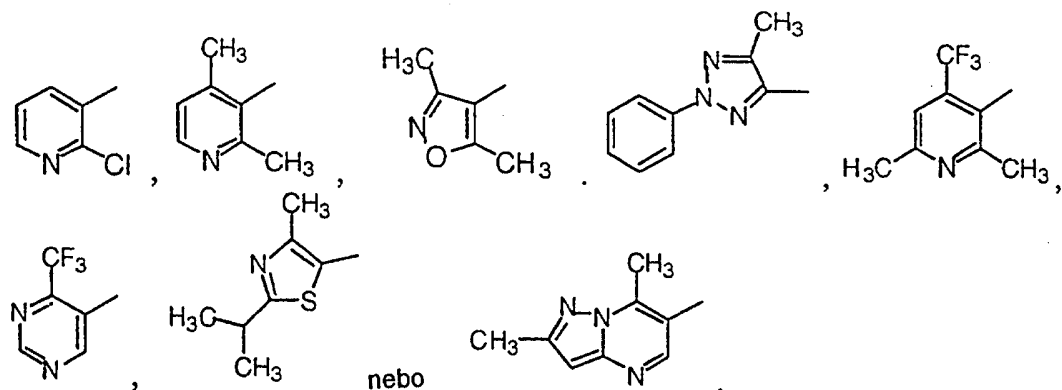




Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde Y-2 je monocyklická heteroaromatická nebo 9- nebo 10-členná bicyklická heteroaromatická skupina, pak heterocykl je výhodně vybrán ze skupiny zahrnující:

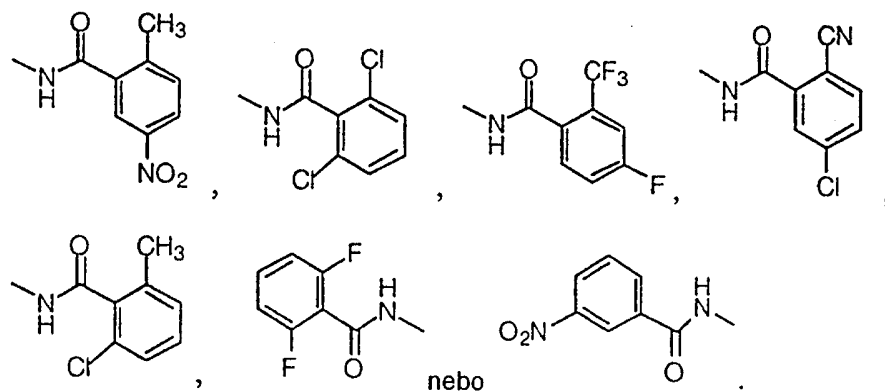


Výhodněji jsou Y-2 skupiny vzorce:

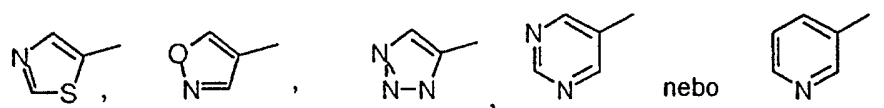


Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde X je X-6 jsou skupiny R_{15} a R_{16} výhodně nezávisle vybrány ze souboru, který zahrnuje vodík, nižší alkyl, nitro, halogen, perfluor nižší alkyl, kyano nebo aryloxy. Výhodně je R_{15} nebo R_{16} H, methyl, nitro, chlor, fluor, trifluormethyl, kyano nebo fenoxý.

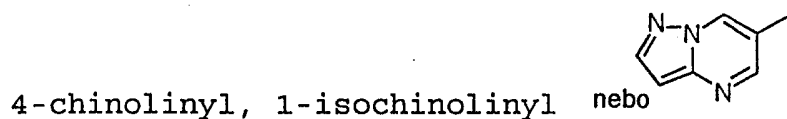
Nejvýhodnější skupiny X-6 jsou skupiny vzorce:



Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde X je X-7, Het je výhodně 5- nebo 6-členný monocyklický heteroaromatický kruh obsahující 1, 2 nebo 3 dusíky nebo dusík a síru nebo dusík a kyslík. Výhodně je heteroaromatický kruh



Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde X je X-7 a Het je bicyklický heteroaromatický kruh který výhodně obsahuje 1 až 3 dusíky jako heteroatomy. Výhodněji je bicyklický heteroaromatický kruh



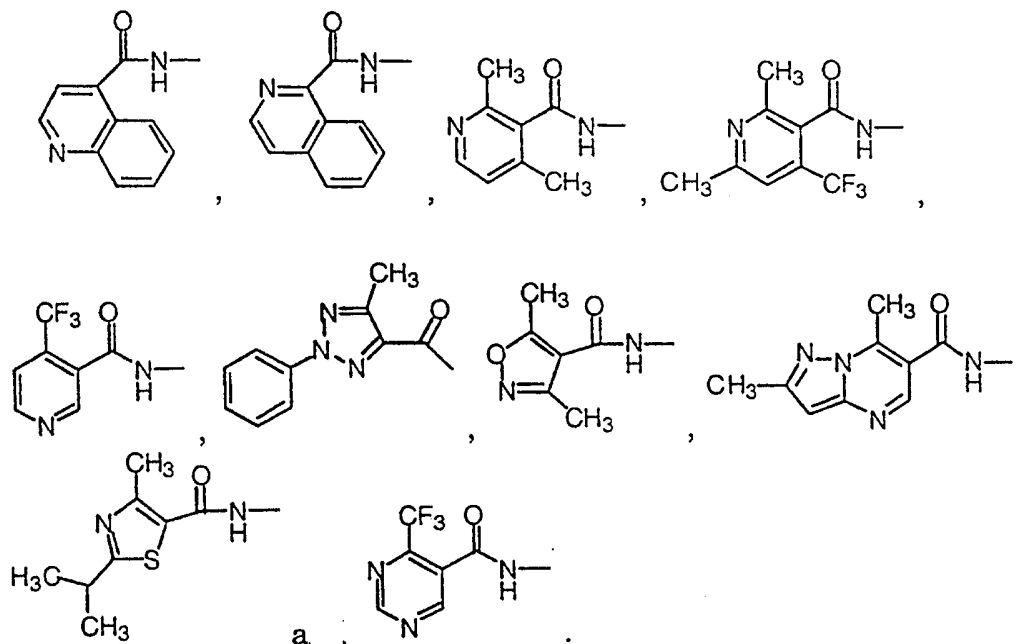
4-chinolinyl, 1-isochinolinyl nebo

Pokud jde o substituenty v heterocyklech X-7, R_{15} je výhodně vodík, nitro, nižší alkylsulfonfyl, kyano, nižší alkyl, nižší alkoxy, perfluor nižší alkyl, nižší alkylthio, nižší alkanoyl nebo aryl. Výhodněji R_{15} je isopropyl, methyl nebo fenyl.

R_{16} v heterocyklech X-7 je výhodně vodík, halogen, nitro, kyano, nižší alkyl nebo perfluor nižší alkyl. Výhodněji R_{16}

je methyl nebo trifluormethyl. R_{30} v X-7 je výhodně vodík nebo nižší alkyl, zejména methyl.

Výhodné skupiny X-7 jsou skupiny vzorce:



Ve výhodném provedení X-6 nebo X-7 je vodík. V jiném a je 0.

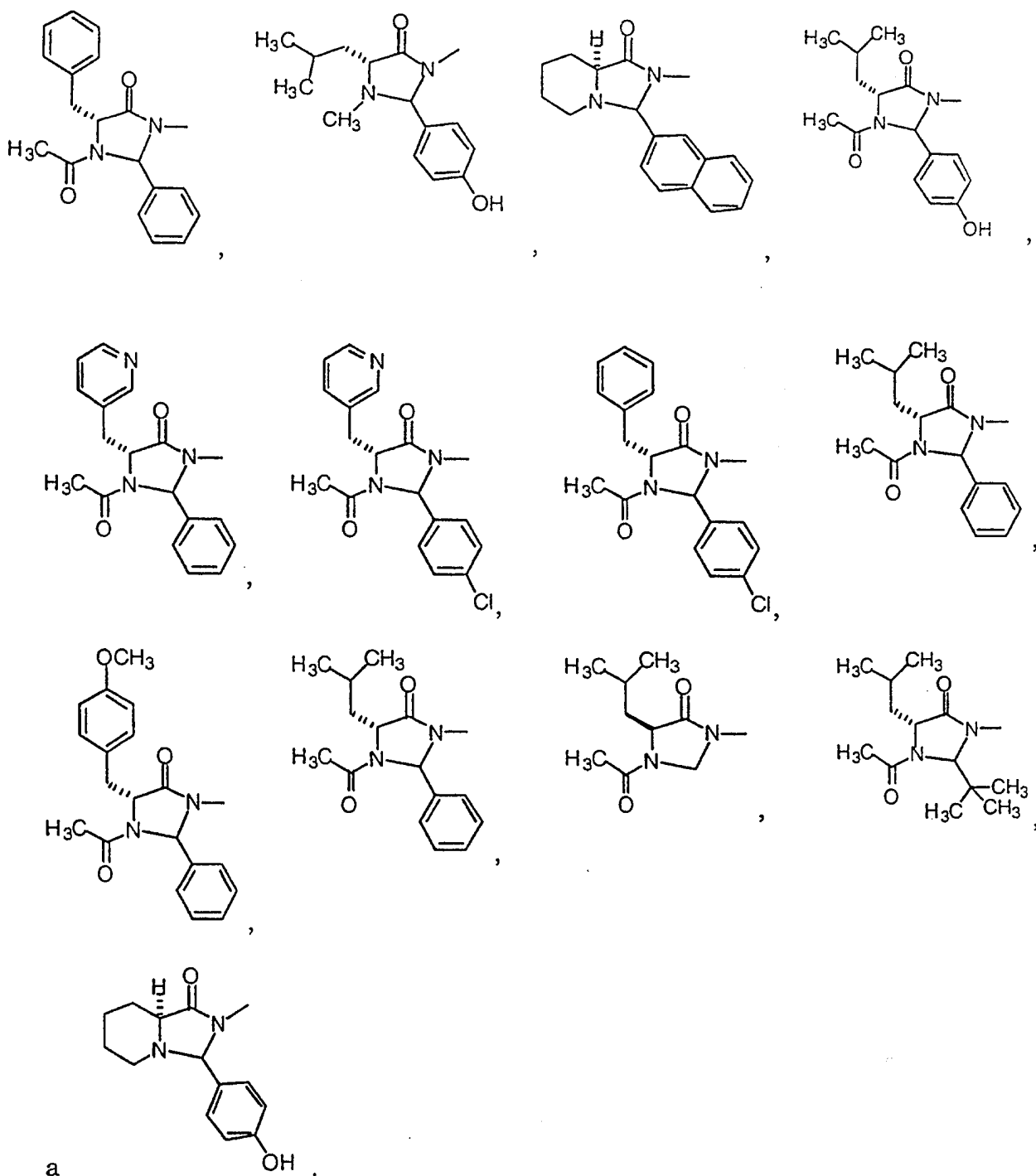
Ve sloučenině obecného vzorce 1, kde X je X-10 je R_{18} výhodně nižší alkyl nebo fenyl, kde fenylový kruh je nesubstituován nebo je monosubstituován halogenem hydroxy nebo je fenyl nižší alkyl. Výhodněji R_{18} je terc.butyl, fenyl, fenoxý, chlorfenyl nebo fenylethyl.

R_{19} je výhodně nižší alkyl, který je nesubstituován nebo je substituován pyridylem nebo fenylem, kde fenylový kruh je nesubstituován nebo je monosubstituován nižším alkoxy nebo halogenem. Výhodněji je R_{19} methyl, isobutyl, benzyl, 4-chlorbenzyl, 4-methoxybenzyl nebo 2-pyridylmethyl.

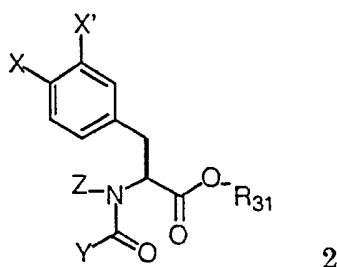
Jestliže je R_{20} v X-10 nižší alkyl, výhodný je methyl.

Výhodně je nižší alkanoyl, zejména acetyl.

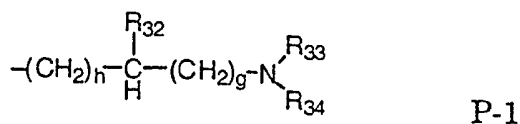
Nejvýhodnější skupiny X-10 jsou skupiny vzorce:



Sloučeniny podle vynálezu zahrnují jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery. Určité výhodné estery podle vynálezu jsou užitečné ke zlepšení biologické dostupnosti sloučenin podle vynálezu. Výhodné estery mají vzorec:



kde X, X', Z a Y mají význam uvedený shora a R_{31} je nižší alkyl nebo R_{31} je skupina vzorce P-1:



kde:

R_{32} je vodík nebo nižší alkyl,

R_{33} je vodík nebo nižší alkyl, aryl,

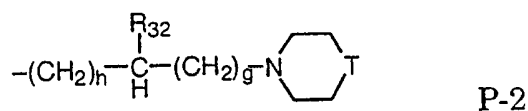
R_{34} je vodík nebo nižší alkyl,

h je celé číslo od 0 do 2,

g je celé číslo od 0 do 2,

součet h a g je 1 až 3; nebo

R_{31} je skupina obecného vzorce P-2:



kde

R_{32} , g a h mají význam uvedený shora,

T je O, S, $-(CH_2)_j$, vazba (když $J=0$) nebo skupina vzorce $N-R_{35}$,

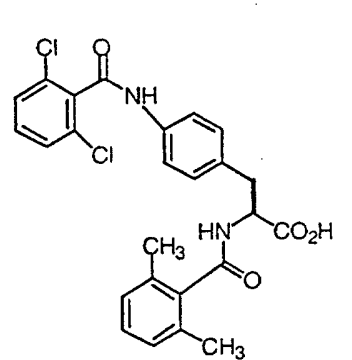
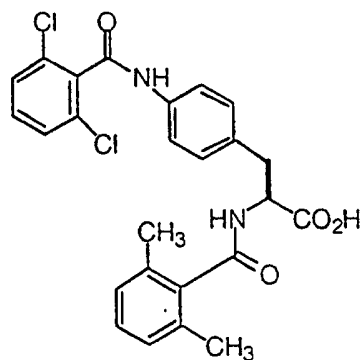
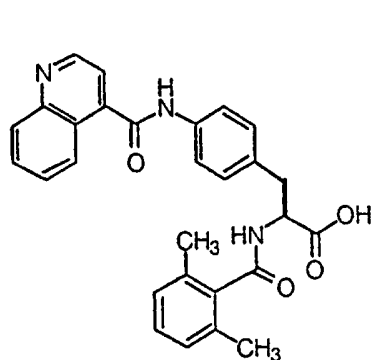
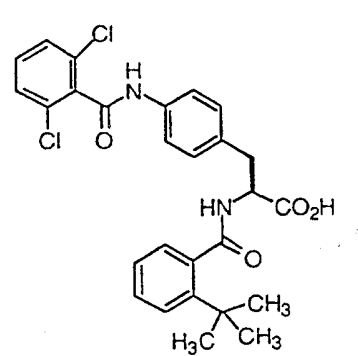
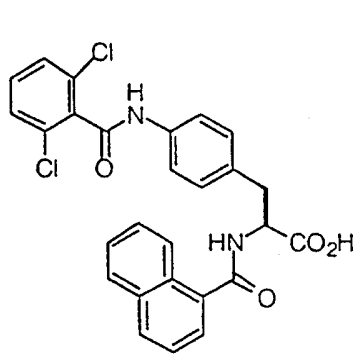
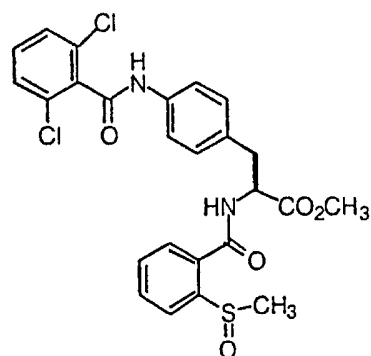
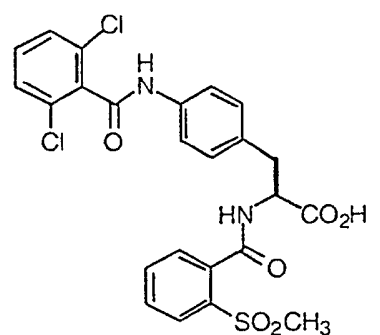
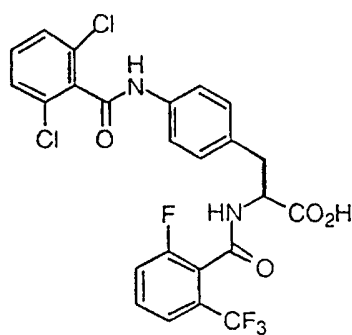
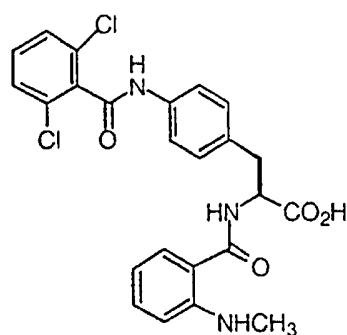
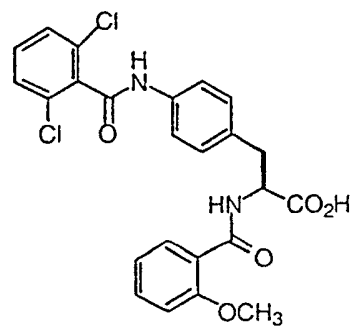
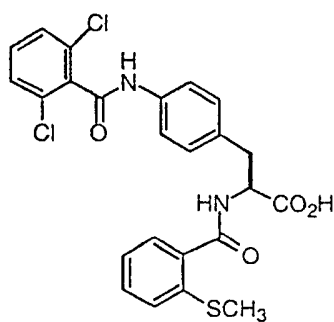
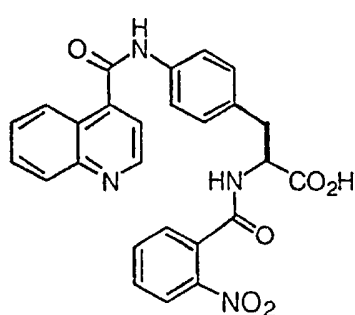
R_{35} je vodík, nižší allyl, nižší alkanoyl, nižší alkoxykarbonyl, a

j je 0, 1 nebo 2.

Zejména jsou alkylesterové skupiny methyl, ethyl, butyl, 1-methylethyl, 2-methylpropyl, 2-methoxyethyl a 2-hydroxyethyl. Zvláštní P1 skupina je 2-dimethylaminoethyl. Zvláštní P2 skupiny jsou 2-(4-morfolinyl)ethyl, 1-methyl-2-(4-morfolinylethyl), 1-methyl-4-piperidinyl, 2-(1-piperazinyl)ethyl a 2-(4-methyl-1-piperazinyl)ethyl.

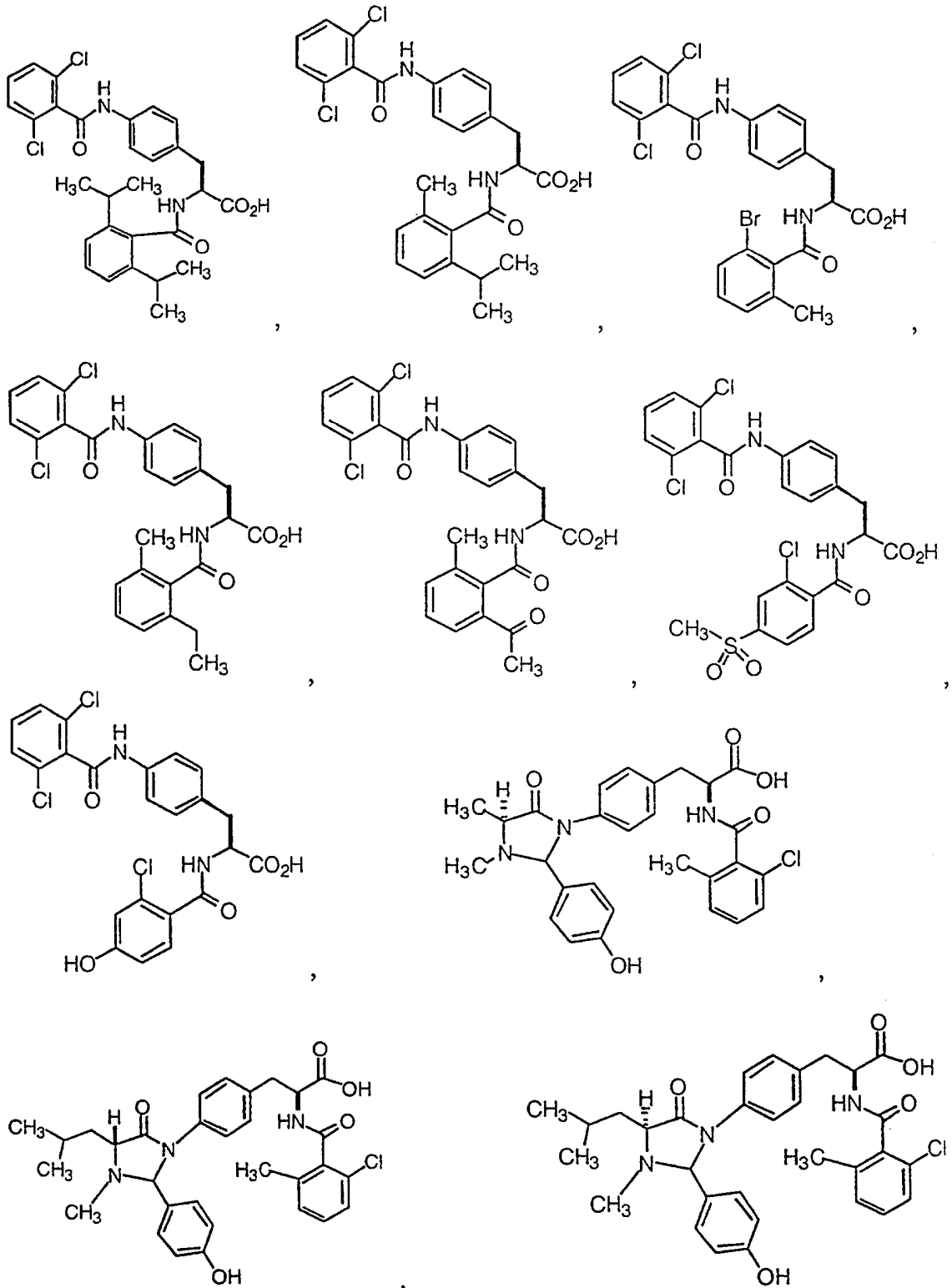
R_{31} je výhodně methyl, ethyl nebo 2-(4-morfolinyl)-ethyl.

Výhodné sloučeniny vzorce 1 a 2 jsou vybrány ze skupiny:



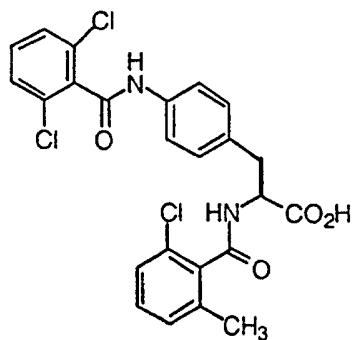
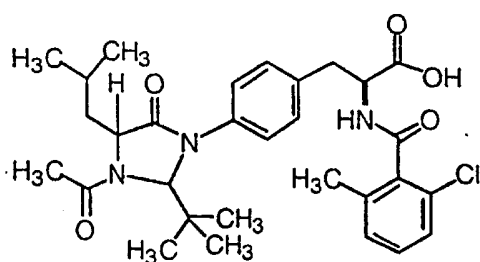
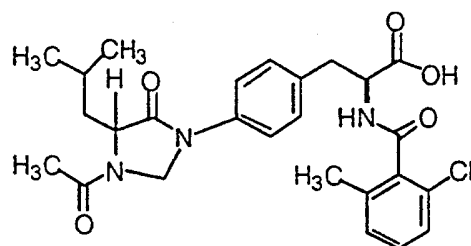
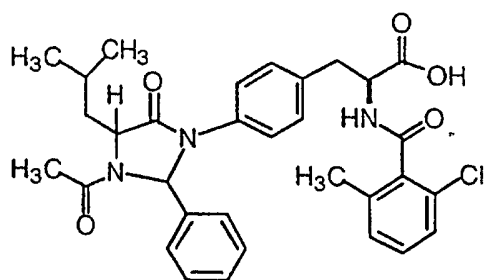
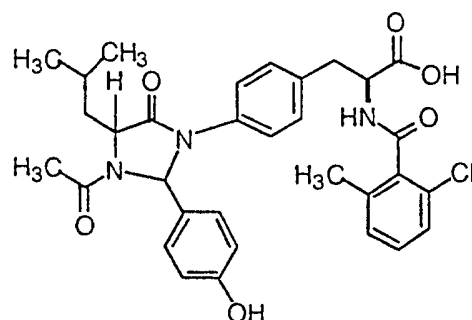
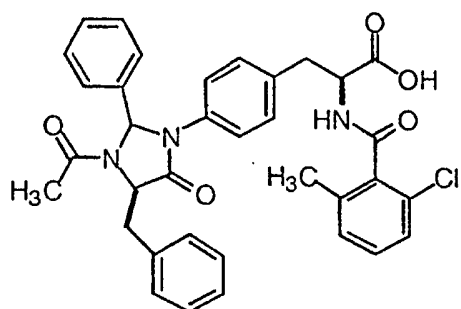
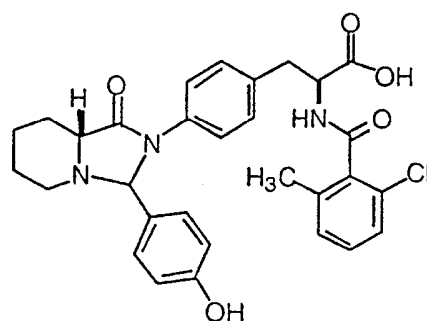
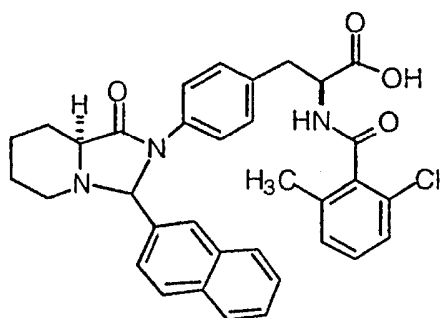
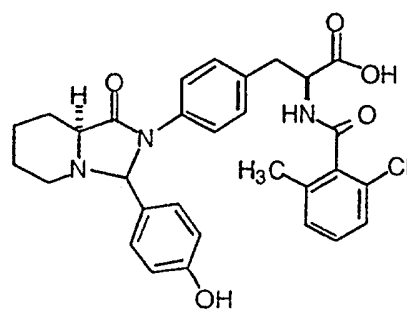
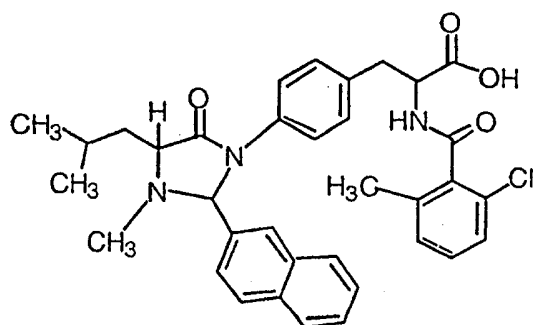
31.03.00

- 18 -



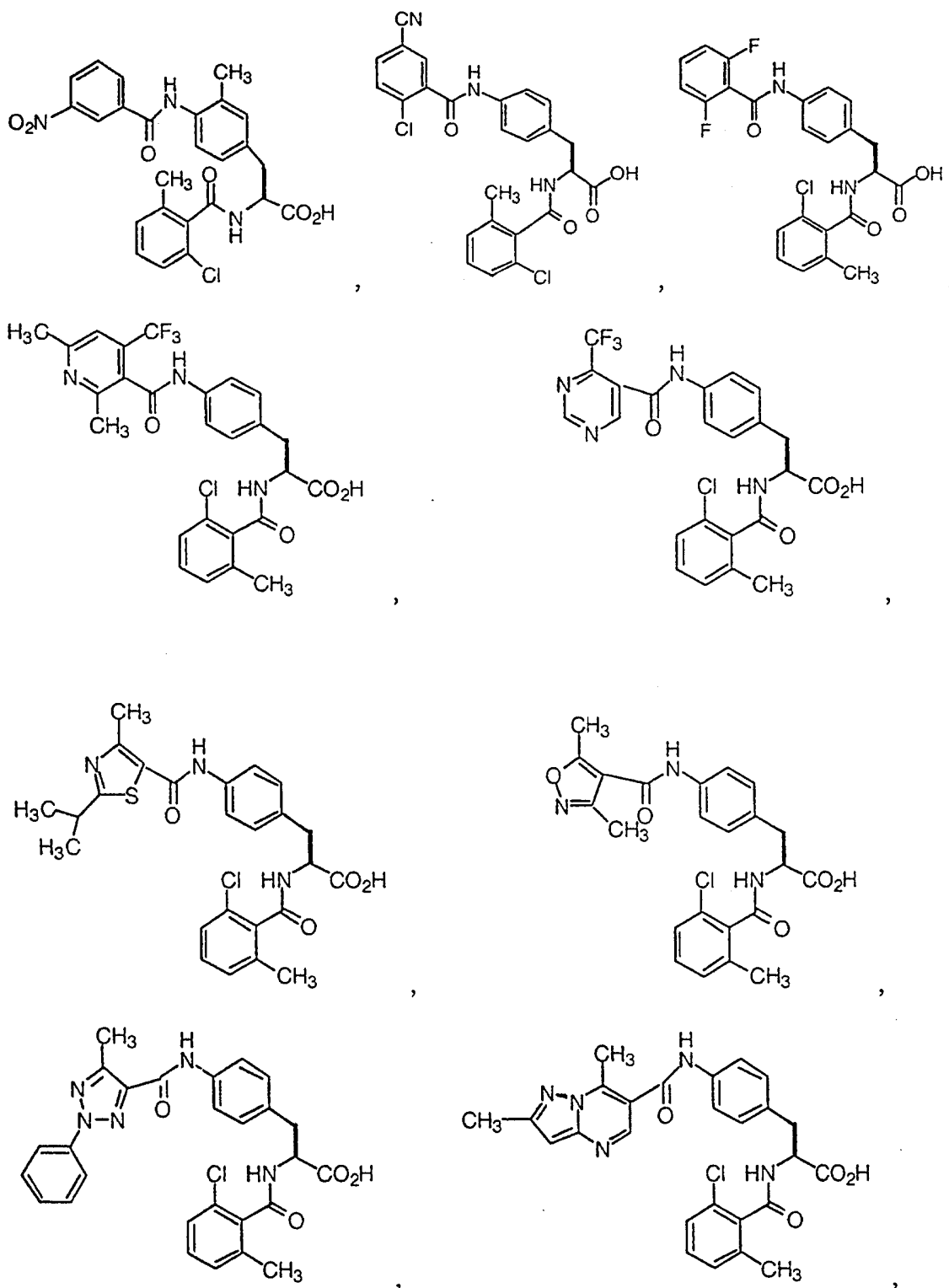
31.03.00

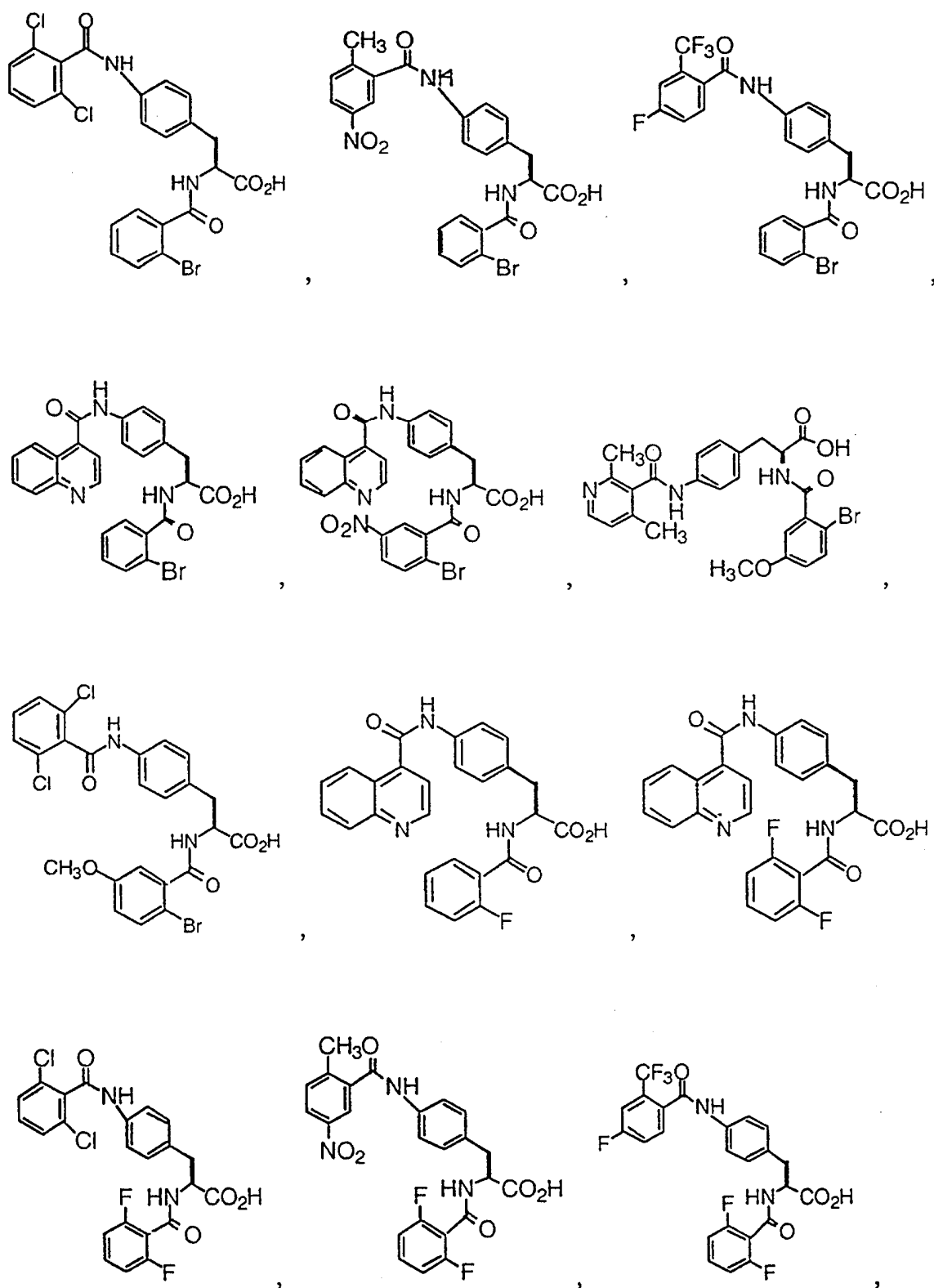
- 19 -



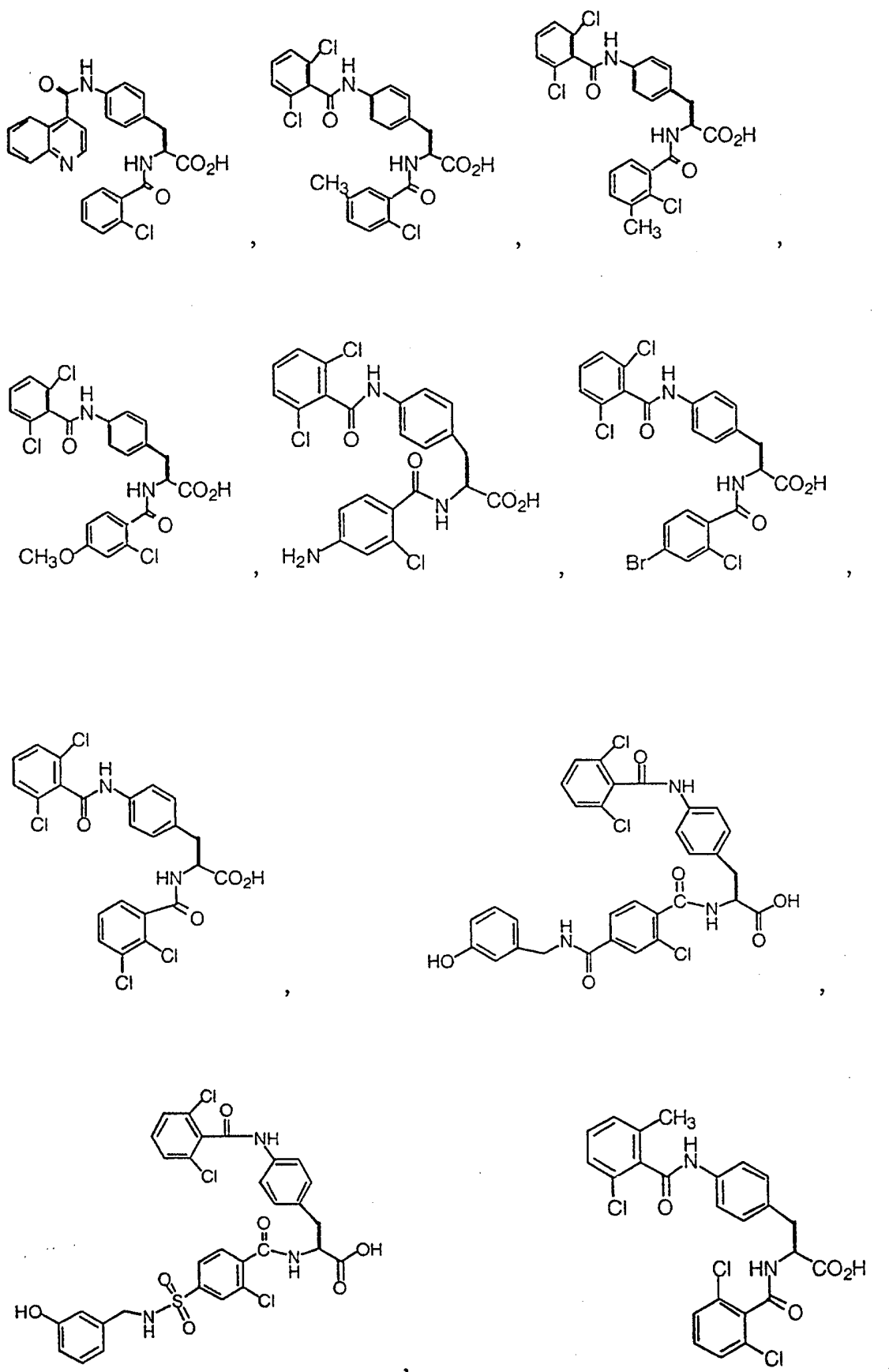
310300

- 20 -



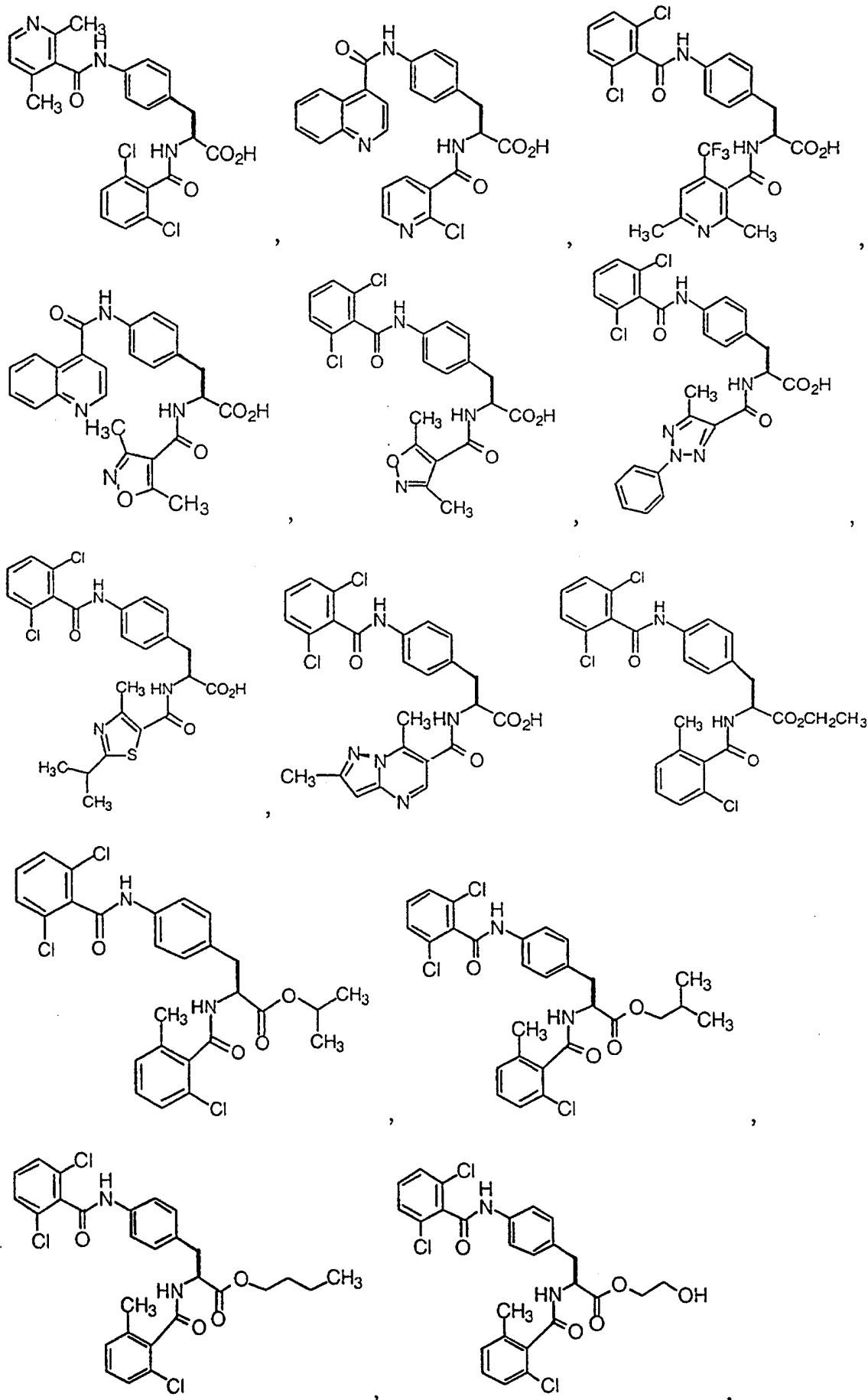


- 22 -



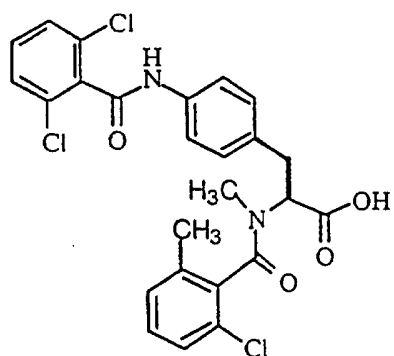
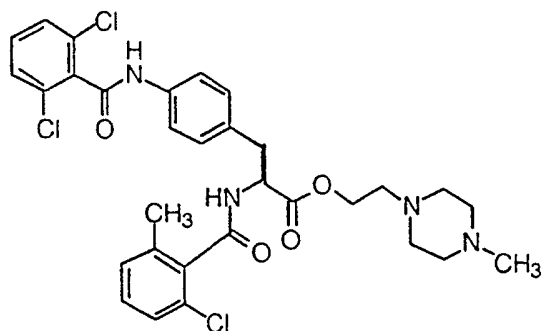
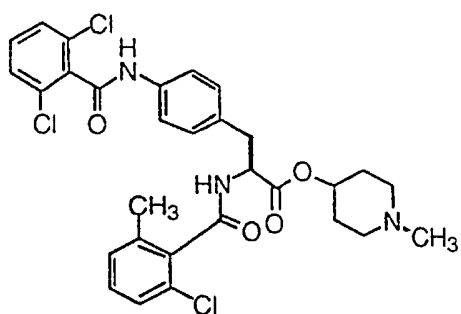
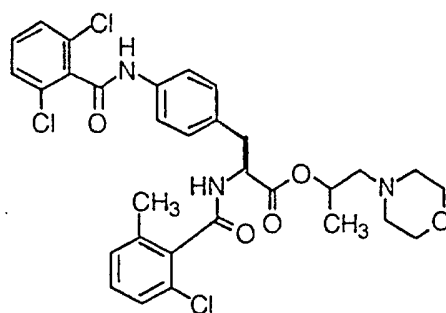
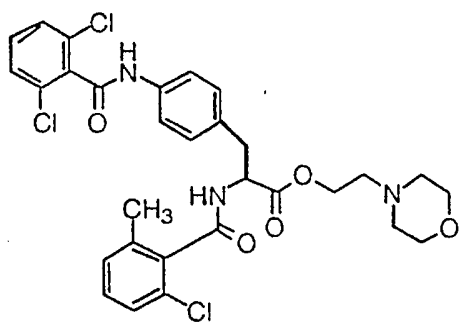
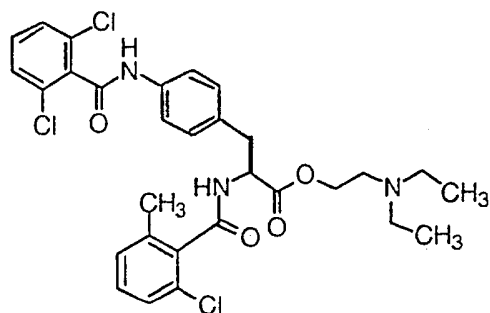
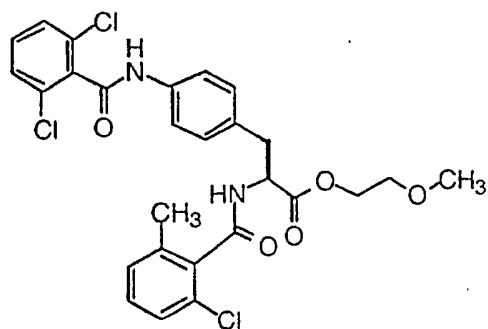
31.03.00

- 23 -



31.03.00

- 24 -



Sloučeniny podle vynálezu inhibují vazbu VCAM-1 a fibronectinu k VLA-4 na cirkulační lymfocyty, eosinofily, basofily a monocyty ("VLA-4-exprimující buňky"). Je známo, že vazba VCAM-1 a fibronectinu k VLA-4 na takové buňky je zahrnuta v určitých nemocných stavech, jako je revmatická artritida, násobná skleróza, zánět tlustého střeva a zejména ve vazbách eosinofilů k pulmonárnímu endotheliu, což je příčinou pulmonárního zánětu, který se vyskytuje u astma. Tak mohou být sloučeniny podle vynálezu užitečné pro léčbu astma.

V dalším aspektu, s ohledem na svoji schopnost inhibovat vazbu VCAM-1 a fibronectinu k VLA-4 na cirkulační lymfocyty, eosinofily, basofily a monocyty, sloučeniny podle vynálezu se mohou použít pro léčbu nemocí, o kterých je známo, že jsou spojeny s takovou vazbou. Příklady takových chorob zahrnují revmatickou artritidu, násobnou sklerózu, astma a zánět tlustého střeva. Sloučeniny podle vynálezu jsou výhodně použity k léčbě nemocí které zahrnují pulmonární zánět, jako je astma. Pulmonární zánět, který se vyskytuje u astma se vztahuje k eosinofilní infiltraci do plic, kde se eosinofily vážou k endotheliu, který se aktivuje některými příčinami nebo látkami spouštějícími astma.

Dále, sloučeniny podle vynálezu také inhibují vazbu VCAM-1 a MadCAM k buněčnému receptoru alfa4-beta7, také známého jako LPAM, který je exprimován na lymfocytech, eosinofilech a T-buňkách. Zatímco přesná úloha interakce alfa4-beta7 s různými ligandami při zánětlivých stavech jako je astma není zcela objasněna, sloučeniny podle vynálezu, které inhibují receptorovou vazbu jak alfa4-beta1 a alfa4-beta7 jsou účinné u zvířecích modelů astma. Další výzkum s monoklonálními protilátkami k alfa4-beta7 ukazuje, že sloučeniny, které inhibují vazbu alfa4-beta7 k MadCAM nebo VCAM jsou užitečné při léčbě zánětu tlustého střeva. Budou také užitečné při léčbě dalších nemocí, kde se taková vazba implikuje jako příčina poškození nebo symptomů nemoci.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být podány orálně, rektálně nebo parenterálně, například intravenózně, intramuskulárně, subkutánně, intratekálně nebo transdermálně; nebo sublinguálně nebo jako oftalmické preparáty nebo jako aerosol pro ošetření pulmonárního zánětu. Jako příklady dávkových forem se uvádějí kapsle, tablety, suspenze nebo roztoky pro orální podání, čípky, injekce, roztoky, oční kapky, masti nebo sprejové roztoky.

Výhodná forma podání je intravenózní, intramuskulární, orální nebo inhalační forma podání. Dávky, ve kterých se sloučeniny podle vynálezu podávají jsou závislé na účinném množství závislém na povaze aktivní složky, na věku a požadavcích pacienta a na způsobu podání. Dávky mohou být určeny jakýmkoliv konvenčním způsobem, například klinickými zkouškami. Tak předkládaný vynález také zahrnuje způsob ošetření hostitele, který trpí nemocí u které je kauzativním faktorem vazba VCAM-1 nebo fibronectinu k VLA-4-exprimující buňky, symptomy nebo poškození nemocí, tak, že se podá množství sloučeniny podle vynálezu, které je dostatečné k inhibici vazby VCAM-1 nebo fibronectinu k VLA-4-exprimující buňky, takže se uvedené symptomy nebo uvedené poškození sníží. Obecně jsou výhodné dávky 0,1 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti denně, výhodnější dávky jsou 1 až 25 mg/kg denně a zvláště výhodné jsou dávky 1 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti denně.

Vynález se dále týká farmaceutických kompozic nebo léčiv, které obsahují farmaceuticky účinné množství sloučeniny podle vynálezu a farmaceuticky a terapeuticky přijatelný nosič. Takové kompozice mohou být formulovány jakýmkoliv konvenčním způsobem převedením sloučeniny podle vynálezu do galenické formy společně s farmaceuticky inertním nosičovým materiálem. Je-li to žádoucí, může se přidat jedna nebo více dalších farmaceuticky aktivních substancí.

Tablety nebo granule mohou obsahovat řadu pojiv, plniv, nosičů nebo ředidel. Kapalně kompozice mohou být například ve formě sterilního, ve vodě misitelného roztoku. Kapsle mohou obsahovat vedle aktivní složky plniva nebo ztužovadla. Dále mohou být také přítomné aditiva zvyšující aroma a substance obvykle používané jako konzervační činidla, stabilizátory, vlhkost zadržující činidla a emulgační činidla a rovněž soli pro změnu osmotického tlaku, pufry a další aditiva.

Shora uvedené nosičové materiály a ředidla mohou zahrnovat jakékoliv konvenční farmaceuticky přijatelné organické nebo anorganické substance, například vodu, želatinu, laktózu, škrob, stearat hořečnatý, talek, arabskou gumu, polyalkylenglykoly apod.

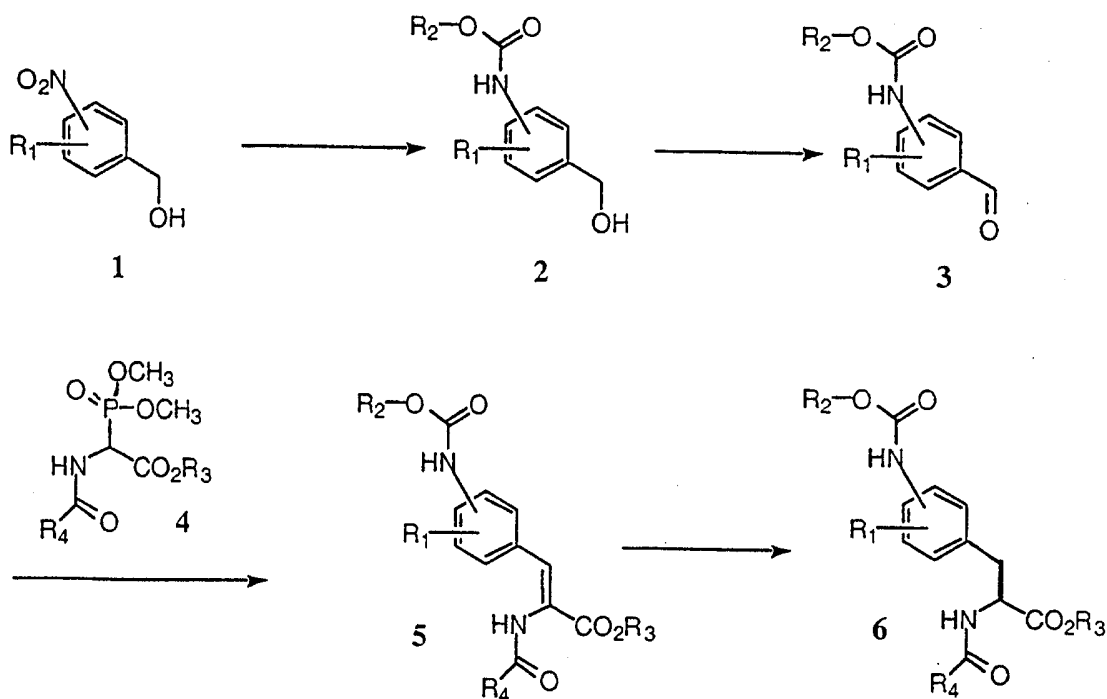
Orální jednotkové dávkové formy, jako tablety a kapsle výhodně obsahují 25 mg až 1000 mg sloučeniny podle vynálezu.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou připravit jakýmkoliv konvenčními způsoby. V reakčním schématu 1 se může sloučenina obecného vzorce 1, kde R_1 je H nebo nižší alkyl, a která je známou sloučeninou připravit standardní metodologií, redukcí s redukčním činidlem schopným selektivní redukce nitrosloučeniny v přítomnosti benzylalkoholu. Tento postup se výhodně provede v přítomnosti derivatizačního činidla obecného vzorce $R_2\text{OCOX}$, kde X je odcházející skupina a R_2 terc.alkyl, benzyl nebo podobně, aby vznikla snadno odštěpitelná chránící skupina a tak přímo sloučenina obecného vzorce 2. Například, tento postup se může konvenčně provést katalytickou hydrogenací 1 nad PdC v ethylacetátu v přítomnosti di-terc.butyldikarbonátu za vzniku derivátu sloučeniny 2, kde R_2 je terc.butyl.

Konverze na aldehyd vzorce 3 se může provést použitím

jakéhokoliv z řady oxidačních činidel schopných oxidace benzylalkoholu na odpovídající aldehyd, například aktivovaným oxidem manganičitým ve vhodném rozpouštědle, například dichlormethanu. Reakce 3 za získání dehydroaminové kyseliny vzorce 5 se může provést zpracováním Wittigovým činidlem vzorce 4, kde R_3 je nižší alkyl a R_4 je alkoxykupina, například benzyloxy- nebo terc.butoxy nebo představuje část jedné z acylových skupin sloučenin podle vynálezu, například substituovaný nižší aryl. Například zpracování 3 s ($\pm$)-N-(benzyloxykarbonyl)- α -fosfonoglycintrimethylesterem v přítomnosti vhodné báze například tetramethylguanidinu vede přímo k dehydroaminové kyselině vzorce 5, R_3 = methyl a R_4 = benzyloxy. Enantioselektivní redukce 5 na L-amino kyselinu 6 se může provést použitím řady redukčních činidel vhodných pro tyto účely, například nedávno popsáním ethyl-DuPHOS rhodiovým činidlem (Burk, M. J., Feaster, J. E.; Nugent, W. A.; Harlow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 10125).

Reakční schéma 1

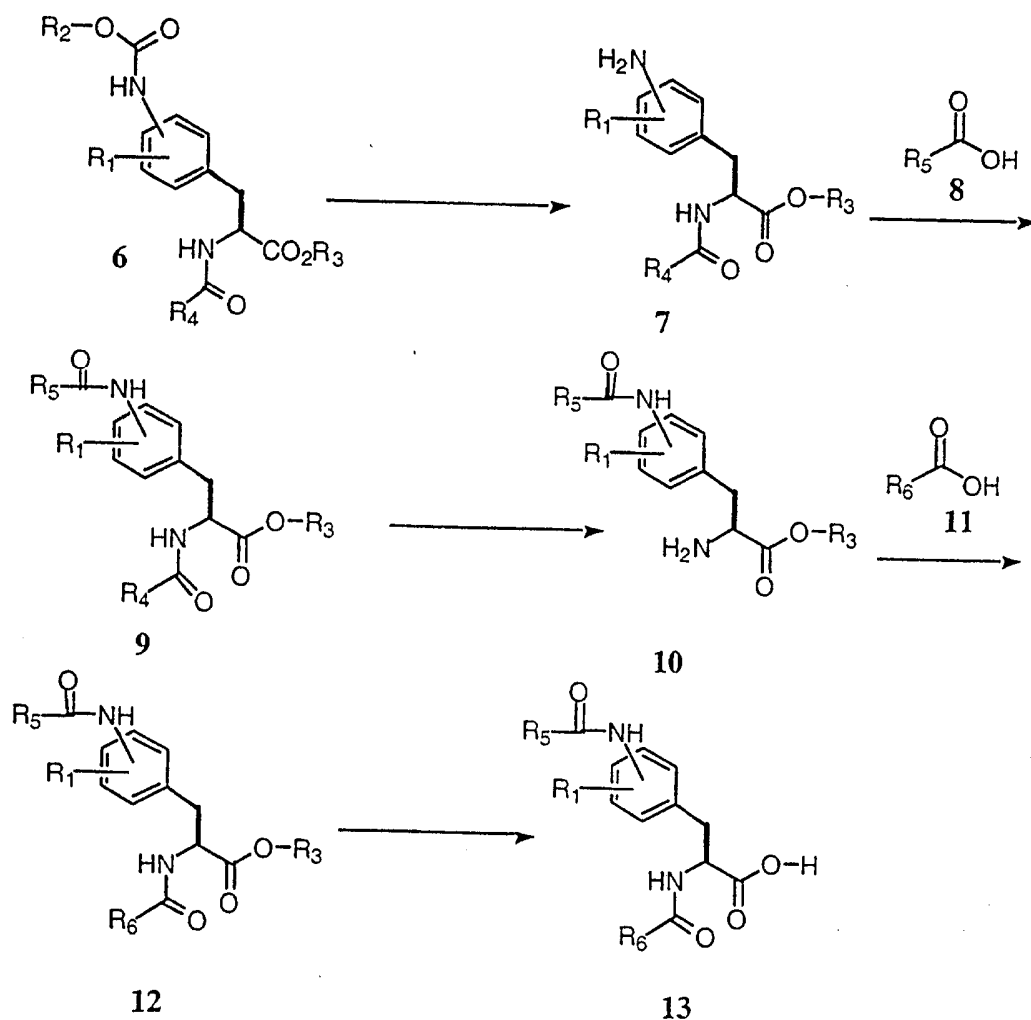


Jeden postup pro konverzi sloučenin struktury 6 do sloučenin podle vynálezu je uveden v reakčním schématu 2. Chránicí skupina R_2 se může odstranit při podmínkách závislých na zvláštním výběru R_2 a rovněž R_3 a R_4 . Výběr těchto skupin bude závislý na zvláštní cílové sloučenině. Řada obvyklých chránících skupin a jejich použití je popsána v "T. W. Green a P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2. vydání, Wiley Interscience, New York, 1991". Například jestliže je R_2 terc.butylskupina a R_3 je nižší alkyl a R_4 je buď benzyloxylová skupina nebo představuje část jedné z acylových skupin sloučenin podle vynálezu, například ortho substituovaný aryl, zpracování s trifluoroctovou kyselinou buď čistou nebo v dichlormethanovém roztoku, v přítomnosti vhodného zachycovače, například triethylsilanu nebo anisolu vede ke sloučenině obecného vzorce 7. Tato sloučenina může být kopulována s karboxylovou kyselinou obecného vzorce 8 za použití standardních peptidových kopulačních podmínek například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním, aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti za získání sloučeniny obecného vzorce 9. V karboxylové kyselině obecného vzorce 8, R_5 může představovat substituovanou alkylovou skupinu, substituovaný aromatický kruh nebo substituovaný heteroaromatický kruh. R_5 může také zahrnovat vhodně chráněné reaktivní funkční skupiny, které umožňují finální konverzi na sloučeniny podle vynálezu. Výběr a použití takových skupin je odborníkům zřejmé.

V závislosti na výběru R_4 a zda ester nebo kyselina je finálním cílem syntézy, sloučenina 9 může být sloučeninou podle vynálezu nebo v případě, že R_4 je chránicí skupina, například benzyloxy skupina, která může být odstraněna při vhodných podmínkách, například katalytickou hydrogenací na PdC ve vhodném rozpouštědle, jako je nižší alkohol za vzniku sloučeniny vzorce 10. Tento meziprodukt se může kopulovat s karbocyklickou kyselinou vzorce 11 použitím standardních

peptidových kopulačních podmínkách, například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 12. V karbocyklické kyselině vzorce 11 může také znamenat část sloučeniny podle vynálezu, například ortho substituovaný aryl nebo heteroaryl. Tyto sloučeniny jsou známé sloučeniny nebo mohou být připraveny známými způsoby. R_6 může také zahrnovat vhodné chráněné reaktivní funkční skupiny které umožňují finální konverzi na sloučeniny podle vynálezu. Výběr a použití takových skupin jsou odborníkům zřejmé. Jestliže je kyselina 13 cílovou sloučeninou, konverze sloučeniny vzorce 12 může být účinná za použití standardních hydrolytických podmínek vhodných pro zvláštní výběr R_3 a jakékoliv funkční skupiny přítomné jako část R_5 a R_6 . V případě, že R_3 je nižší alkylová skupina je obecně účinné zpracování s hydroxidem alkalického kovu, například s hydroxidem litným ve vodném THF.

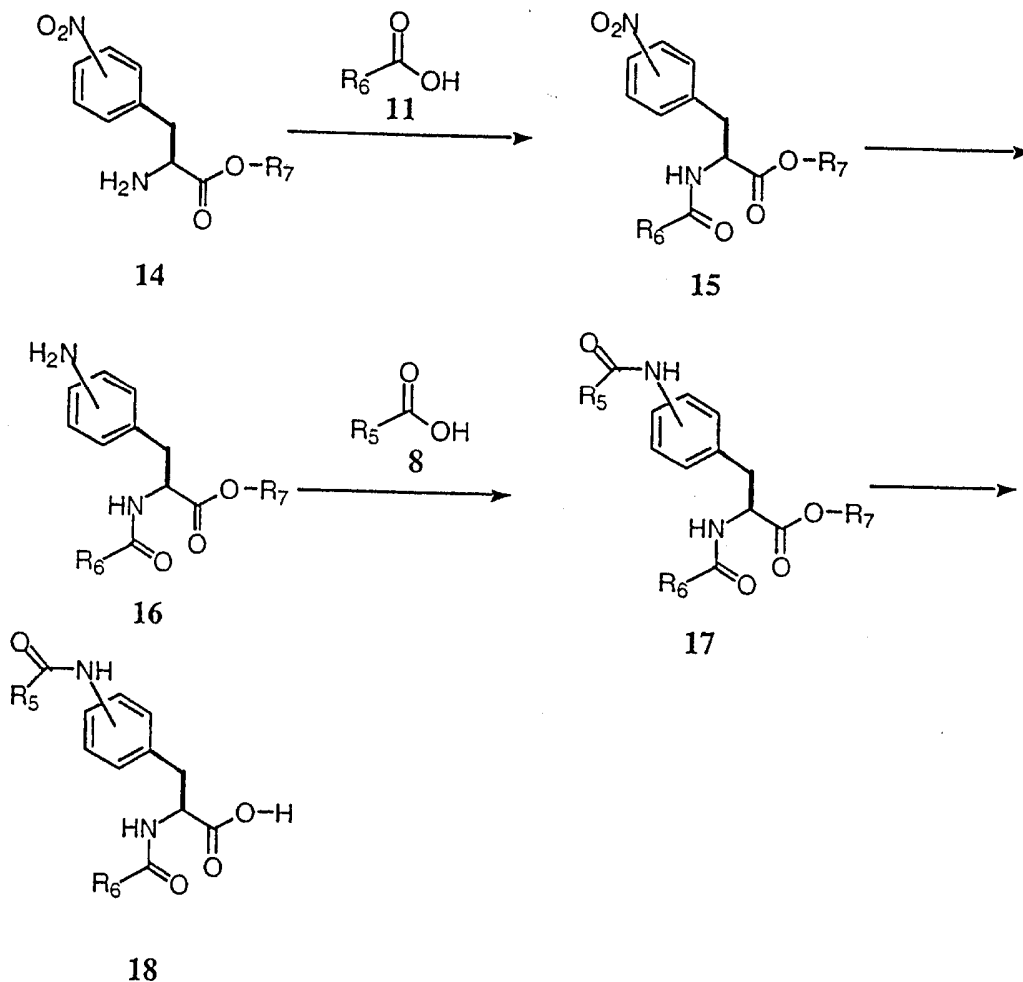
Reakční schéma 2



V reakčním schéma 3 se sloučenina vzorce 14, kde R_7 je nižší alkylová skupina, která může sloužit jako chránicí skupina nebo skupina vhodná pro použití v prekurzorech léčiv, například methyl, ethyl, terc.butyl nebo pod. nebo představuje vazbu k pryskyřici v pevné fázi, například Wangově pryskyřici, kopuluje s karboxylovou kyselinou vzorce 11 za použití standardních peptidových kopulačních podmínek, například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0°C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 15. Redukce

nitroskupiny 15 se může provést katalytickou hydrogenací například za použití PdC jako katalyzátoru nebo zpracováním s redukčním činidlem, například SnCl_2 . Vzniklá sloučenina struktury 16 je užitečná jako klíčový meziprodukt pro řadu serií sloučenin. Podle schématu 3 může být kopulována s kyselinou vzorce 8 za použití standardních peptidových kopulačních podmínek, například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 17. Sloučenina 17 může být sloučeninou podle vynálezu závislou na povaze R_7 nebo se může převést na sloučeninu podle vynálezu vhodnou hydrolýzou, například, v případě, že R_7 je nižší alkyl, hydrolýzou zpracováním s přebytkem alkalického hydroxidu, jako je hydroxid litný ve vodném alkoholu. Jestliže R_7 znamená pryskyřici vhodnou pro syntézu v pevné fázi, vhodné hydrolytické podmínky budou závislé na výběru pryskyřice. V případě Wangovy pryskyřice povede zpracování s kyselinou trifluoroctovou v přítomnosti vhodného zachycovače na kyselinu vzorce 18.

Reakční schéma 3

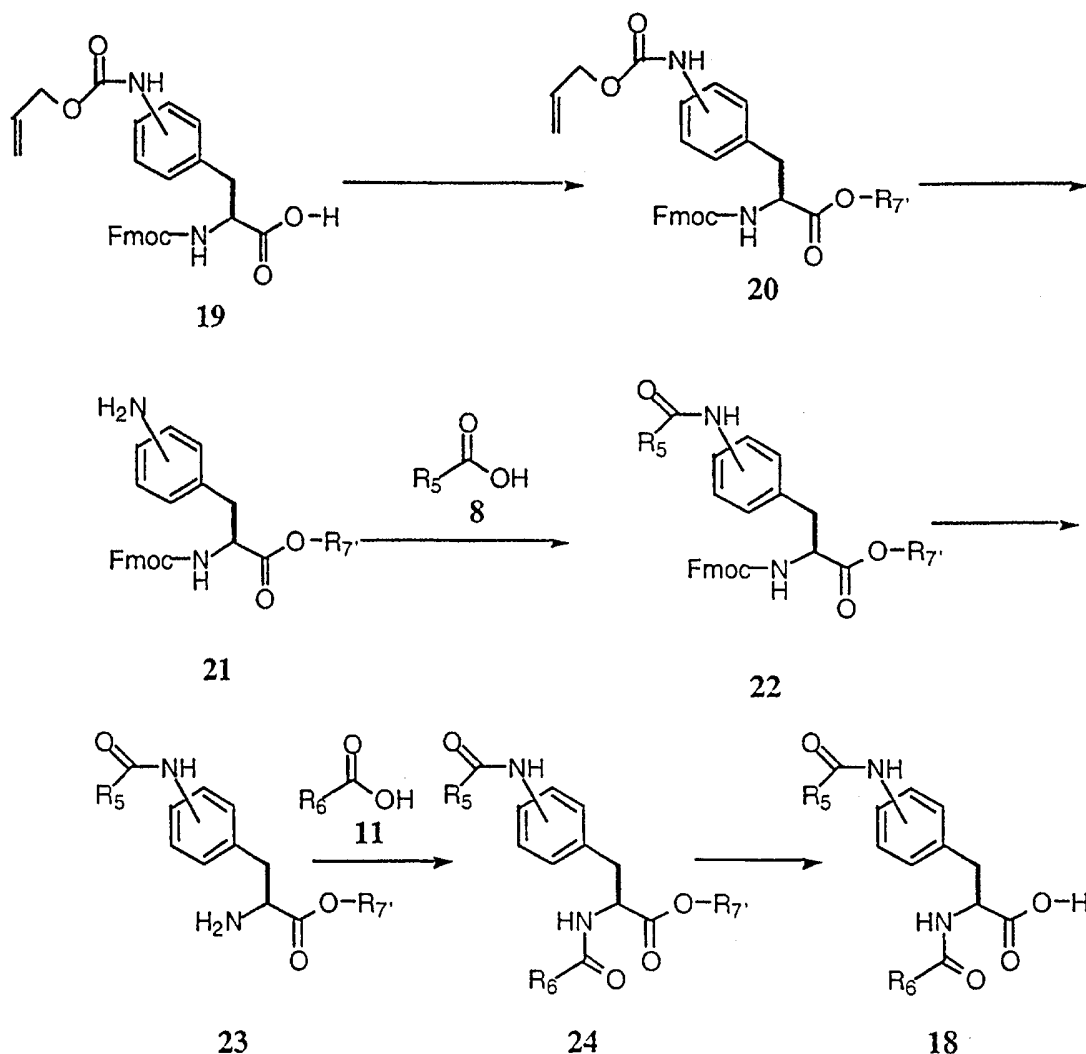


V metodě, zejména vhodné pro syntézu v pevné fázi, N'-Alloc-amino-N^a-Fmoc chráněný fenylalaninový derivát vzorce 19 může být kopulován na pryskyřici vhodnou syntézu v pevné fázi, například Wangovu pryskyřici, za použití standardních kopulačních podmínek, například tvořením směsného anhydridu s 2,6-dichlorbenzoylchloridem a provedením kopulační reakce v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je N-methylpyrrolidinon za získání sloučeniny struktury 20, kde R₇, znamená pryskyřici. Skupina Alloc se může odstranit standardními způsoby, například zpracováním s redukčním činidlem, jako je Bu₃SnH v přítomnosti katalyzátoru, který je zdrojem Pd⁰, například Pd(Ph₃P)₂Cl₂ za vzniku aminového

derivátu vzorce 21. Tato sloučenina se může kopulovat s karboxylovou kyselinou vzorce 8 za použití standardních peptidových kopulačních podmínek například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 22. Chránicí skupina Fmoc se může odstranit z 22 standardním bázeckým zpracováním dobře známým odborníkům, například piperidinem v DMF a získá se sloučenina vzorce 23. Vzniklá sloučenina 23 se může kopulovat s karbocyklickou kyselinou vzorce 11 za použití standardních peptidových kopulačních podmínek například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 24. Konečně se sloučenina 24 může odštěpit z pryskyřice za použití podmínek závislých na výběru pryskyřice. Například v případě Wangovy pryskyřice kyselé zpracování s kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu v přítomnosti zachycovače, který je nezbytný, povede ke sloučenině vzorce 18.

V závislosti na zvláštnosti cíle syntézy, pořadí odstranění chránících skupin ze sloučeniny 19 může být změněno tak, že se nejprve odstraní skupina Fmoc, provede se kopulace vzniklého aminu s kyselinou vzorce 11 a následuje odstranění skupiny Alloc a kopulace produktu s kyselinou vzorce 8 a odštěpení z pryskyřice. Rovněž výběr chránících skupin může být modifikován, aby zobrazil reaktivitu pryskyřice nebo výběr R_7 , a povahu kterékoliv funkční skupiny zahrnuté do R_5 a R_6 .

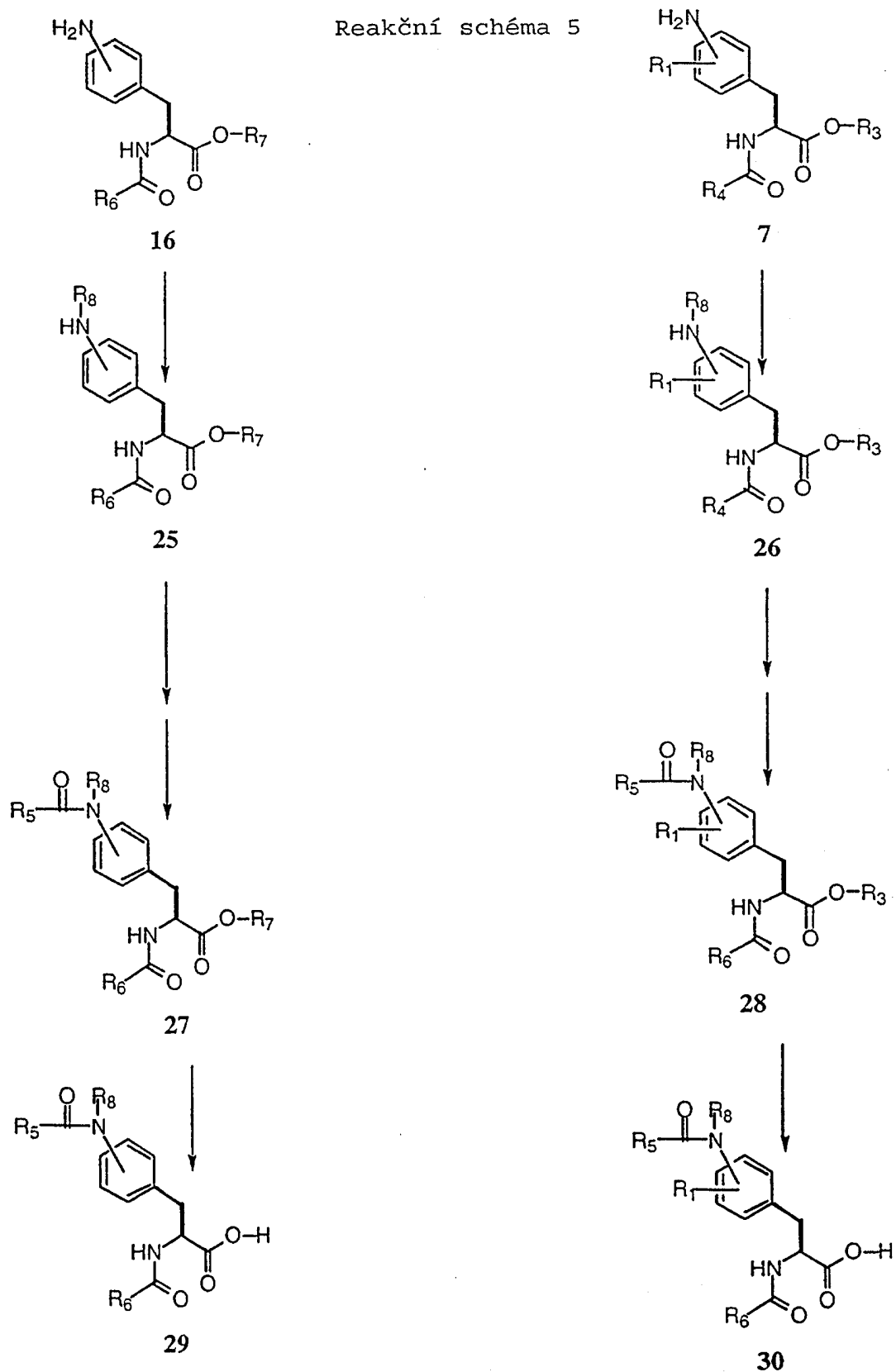
Reakční schéma 4



Sloučeniny odvozené od 3- nebo 4-(alkylamino)fenylalaninových derivátů se mohou připravit jak je popsáno v reakčním schématu 5. Sloučenina vzorce 16 nebo 7 se může zpracovat s diazomethanem ve vhodném rozpouštědle, například ethyletheru za získání produktů vzorců 25 a 26, kde R₈ znamená methyl. Alternativně se sloučenina struktury 16 nebo 7 může zpracovat s nižším alkylaldehydem nebo ketonem například acetonem, za vzniku Schiffovy báze, která se opět může zpracovat katalytickou hydrogenací nebo redukcí s kyanborohydridem sodným v přítomnosti organické kyseliny, například kyseliny octové, za vzniku sloučeniny vzorce 25

nebo 26, kde R_8 je nižší alkyl, jiný než methyl. Konverze sloučenin 25 nebo 26 na estery precursorů léčiv 27 nebo 28 nebo na odpovídající kyseliny 29 nebo 30 se může provést jak je popsáno shora v reakčním schématu 2 a 3.

Reakční schéma 5



Pro přípravu 3- nebo 4-sulfonylamino fenylalaninových derivátů, sloučeniny vzorce 7, 16, 25 nebo 26 mohou reagovat se sulfonylchloridem vzorce 31, kde R_9 je substituovaná arylová nebo heteroarylová část, v inertním rozpouštědle, například dichlormethanu v přítomnosti nenukleofilní báze, například triethylaminu nebo pyridinu při teplotě okolo 0 °C do teploty místnosti za vzniku sloučenin struktur 32 nebo 33, jak je ilustrováno v reakčním schématu 6 pro sloučeniny 7 a 26. Tyto sloučeniny mohou být potom převedeny na sloučeniny obecných vzorců 34 a 35 je-li to žádoucí, za použití obecných postupů popsanych shora v reakčních schématech 2 a 3.

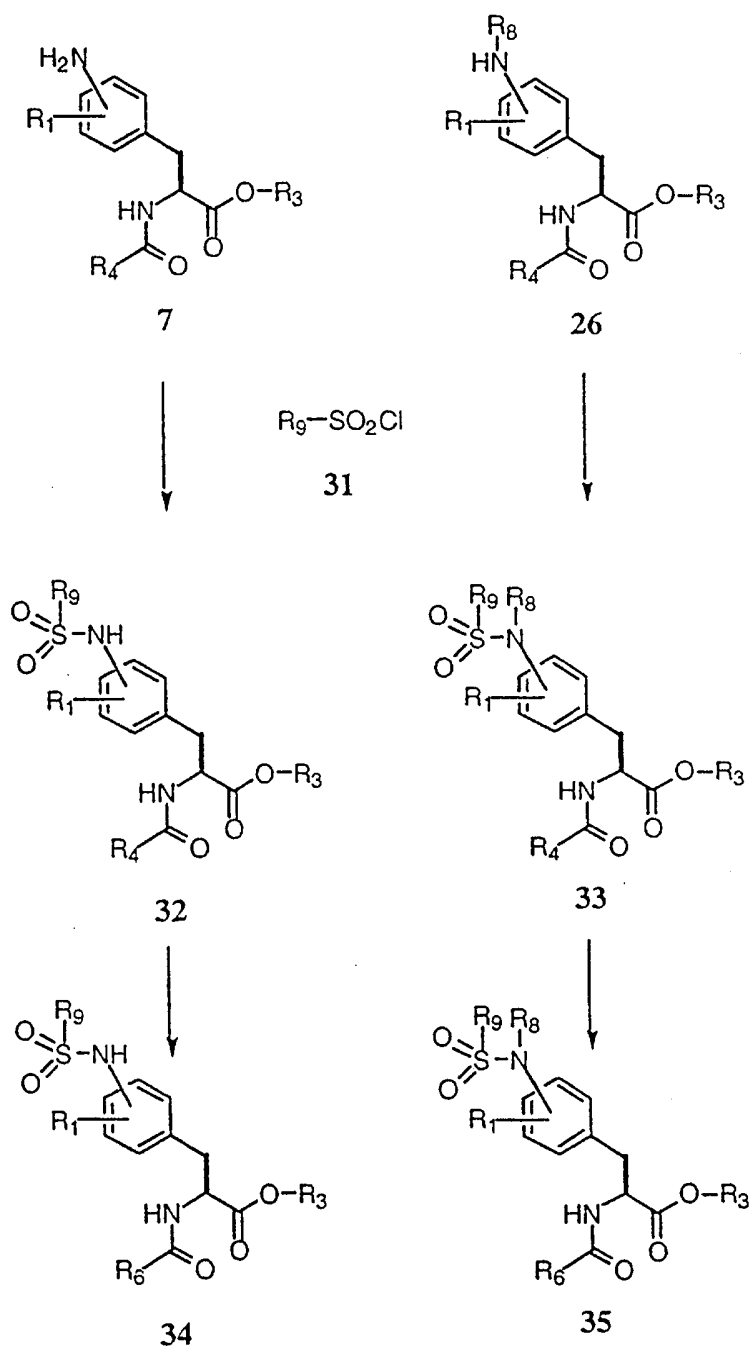
Pro přípravu sloučenin odvozených od 3- nebo 4-aminomethylfenylalaninu se může použít postup uvedený v reakčním schématu 7. 3- nebo 4-hydroxymethylbenzoát vzorce 36, kde R_{10} je nižší alkyl, což jsou známé sloučeniny nebo mohou být připraveny známými způsoby, se zpracuje se silylačním činidlem, kde R_{11} až R_{13} jsou nižší alkyl nebo fenyl, například terc.butyldimethylsilylchloridem v inertním rozpouštědle, například dimethylformamidu v přítomnosti imidazolu při teplotě okolo 0 °C a získá se silylová chráněná sloučenina vzorce 37. Redukce 37 se může provést za použití řady vhodných redukčních činidel, například lithiualuminiumhydridu v inertním rozpouštědle, jako je ether nebo tetrahydrofuran při teplotě okolo 0 °C následované zpracováním vodou za vzniku meziproductového alkoholu, který se může oxidovat jakýmkoliv oxidačním činidlem vhodným pro oxidaci benzylalkoholů na odpovídající aldehydy, například aktivovaným oxidem manganičitým, za vzniku aldehydu vzorce 38. Monosilylové chráněné dioly jsou alternativně dostupné z 3- nebo 4-hydroxymethylbenzylalkoholů monosilylací a separací vedlejších produktů. Alternativně, ester vzorce 37 může být redukován přímo na aldehyd vzorce 38 za použití diisobutylaluminiumhydridu při nízké teplotě, například při -78 °C.

K získání dehydroaminové kyseliny vzorce 39 se zpracuje sloučenina 38 s Wittigovým reakčním činidlem vzorce 4, kde R_3 je nižší alkyl a R_4 je alkoxyskupina, například benzyloxy- nebo terc.butoxy nebo představuje část jedné z acylových skupin sloučenin podle vynálezu, například ortho-substituovaný aryl nebo heteroaryl. Například zpracování 38 s trimethylesterem (+)-N-(benzyloxykarbonyl-a-fosfonoglycinem v přítomnosti vhodné báze, například tetramethylguanidinu vede přímo k dehydroaminové kyselině vzorce 39, R_3 = methyl a R_4 = benzyloxy. Enantioselektivní redukce 39 na L-aminokyselinu 40 se může provést použitím jednoho z řady redukčních činidel vhodných pro tyto účely, například nedávno popsáným ethyl-DuPHOS rhodiovým činidlem. Pro odborníka je zřejmé, že optimální postup pro další konverzi 40 na sloučeniny podle vynálezu bude závislý na výběru R_4 a R_3 . Pro případ, kde R_3 je nižší alkyl a R_4 je benzyloxy, konverze na amin vzorce 41 se konvenčně provede katalytickou hydrogenací 4 na PdC ve vhodném rozpouštědle, například methanolu v přítomnosti formiátu amonného jako redukčního činidla. Acylace 41 s karboxylovou kyselinou vzorce 11 se může provést jak je uvedeno shora v reakčním schématu 2 za získání sloučeniny vzorce 42. Podmínky pro odstranění silylové chránicí skupiny budou záviset na výběru R_{11} až R_{13} . V případě že R_{11} , R_{12} = methyl a R_{13} je terc.butyl, tato skupina se může snadno odstranit zpracováním se silnou kyselinou, například kyselinou chlorovodíkovou ve vhodném rozpouštědle pro výběr R_3 , například pro R_3 je methyl, pak se jako rozpouštědlo použije methanol.

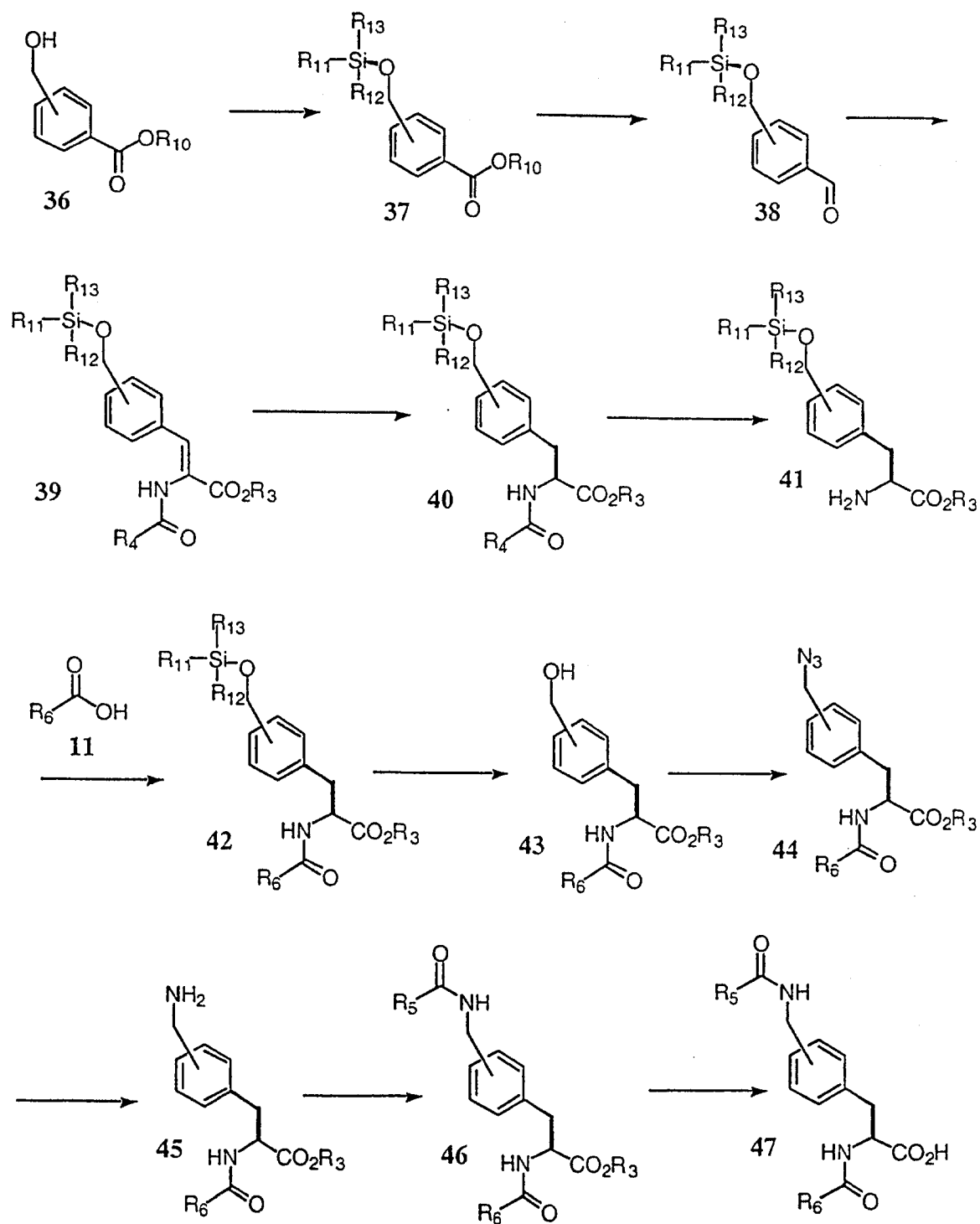
Výsledný benzylalkohol vzorce 43 se může převést na amin vzorce 45 za použití postupů ustanovených pro podobné transformace. Například alkohol vzorce 43 se může převést na odcházející skupinu, například mesylát zpracováním s methansulfonylchloridem v přítomnosti protonového akceptoru, například pyridinu a následuje nahrazení azidem alkalického kovu, například azidem sodným v polárním aprotickém

rozpouštědle, jako je dimethylformamid. Alternativně, transformace 43 na azid vzorce 44 se může provést přímo zpracováním s difenylfosforazidem, jak popsali Thompson, A.S.; Humphrey, G.R.; DeMarco, A.M.; Mathre, D.J.; Grabovski, E.J. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 5886-5888. Redukce azidu 44 na amin vzorce 45 se může provést řadou způsobů vhodných pro konverzi azidů na aminy, například zpracováním s fosfinem, například trifenylfosfinem v inertním rozpouštědle, jako je dichlormethan nebo THF a následuje zpracování vodou nebo katalytická hydrogenace na vhodném katalyzátoru, například PDC v rozpouštědle vhodném pro katalytickou hydrogenaci, jako je nižší alkanol nebo tetrahydrofuran. Výsledný amin vzorce 45 se může převést na odpovídající sloučeniny použitím postupů aplikovatelných na volné aminy popsaných v jiných reakčních schématech. Například kopulací 45 s karboxylovou kyselinou vzorce 8 při podmínkách popsaných v reakčním schématu 2 se získá amid vzorce 46, který se může dále převést na kyselinu vzorce 47, je-li to žádoucí, katalyzovanou hydrolýzou jak je popsáno v reakčním schématu 2.

Reakční schéma 6



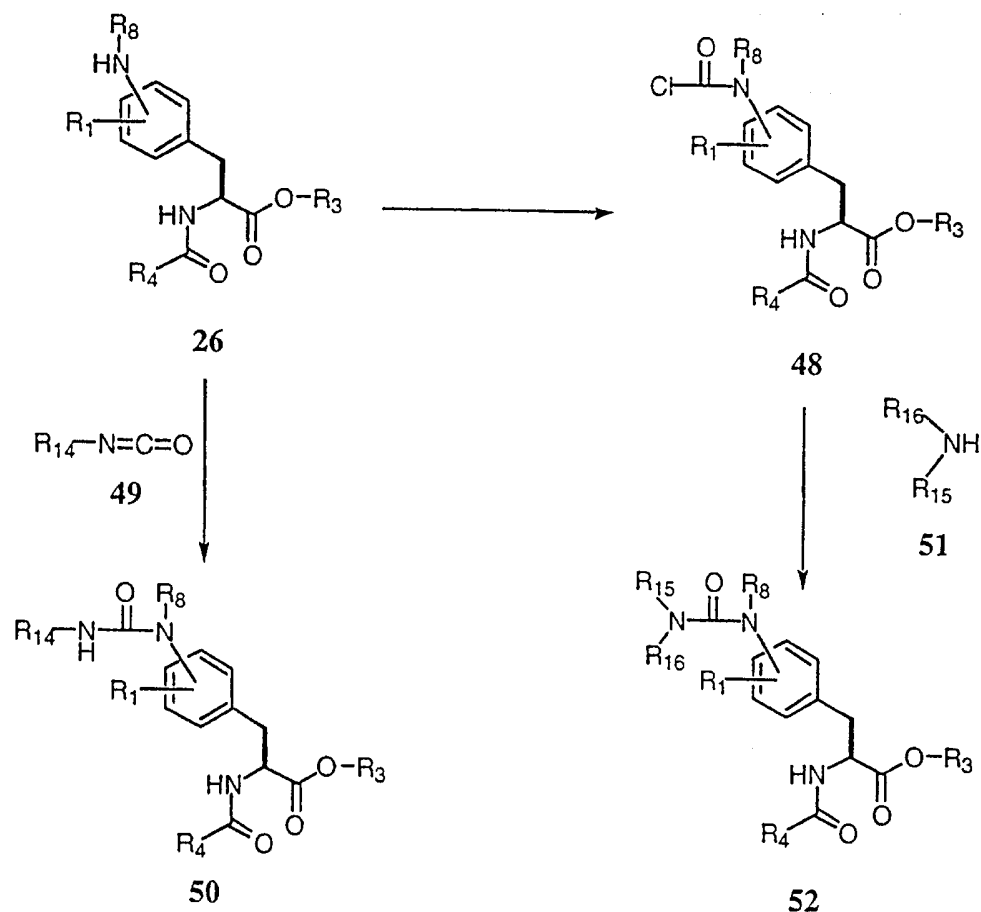
Reakční schéma 7



Pro přípravu derivátů močoviny se sloučenina vzorce 26 může zpracovat s isokyanátem vzorce 49, kde R_{14} je substituovaný aryl, substituovaný heteroaryl nebo

substituovaný nižší alkyl s potenciálně reaktivními substituenty chráněnými za použití vhodné konvenční strategie pro chránění skupiny, ve vhodném inertním rozpouštědle, například dichlormethanu, za získání močoviny vzorce 50. Obecněji, sloučenina vzorce 26 se může zpracovat s fosgenovým ekvivalentem, například trifosgenem v inertním rozpouštědle, jako je dichlormethan v přítomnosti nenukleofilního protonového akceptoru, například diisopropylethylaminu, za získání meziproduktu vzorce 48. Následným zpracováním sloučeniny vzorce 48 s aminem vzorce 51, kde R_{15} a R_{16} jsou nezávisle vodík, substituovaný nižší alkyl, substituovaný aryl, substituovaný heteroaryl nebo spolu tvoří substituovaný 5, 6 nebo 7 členný kruh se získá sloučenina vzorce 52. Další konverze, je-li to nezbytné, 50 nebo 51 na sloučeniny podle vynálezu se může provést jak je popsáno v reakčním schématu 5.

Reakční schéma 8

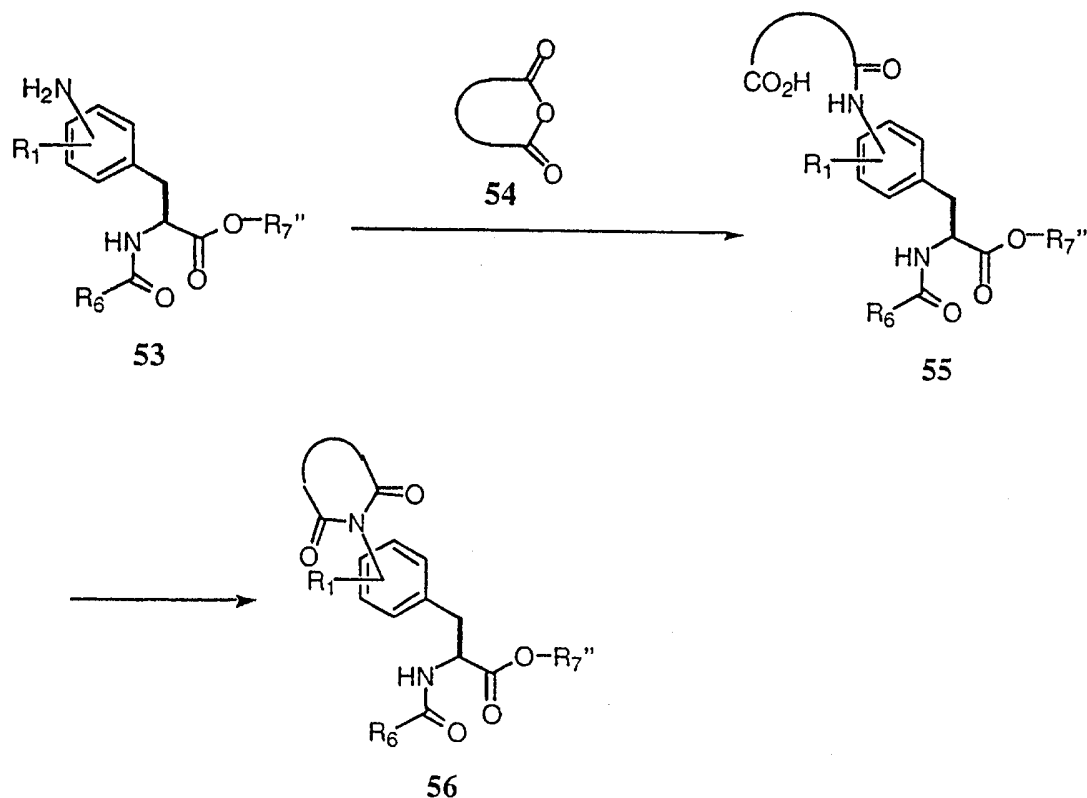


Pro přípravu imidů se použije aminofenylalaninový derivát struktury 53, kde R_1 je H nebo nižší alkyl, R_6 má význam definovaný shora a $R_{7''}$ je vodík nebo snadno odštěpitelná skupina, jako je substituovaný benzyl, terc.butyl, allyl nebo pod., nebo pokud je žádán jako finální produkt prekurzorový ester, znamená esterovou skupinu, například ethylesterovou skupinu. Sloučeniny vzorce 53 se mohou snadno získat z meziproductů popsanych shora v reakčním schématu 2. Reakce sloučeniny vzorce 53 s cyklickým anhydridem vzorce 54 v inertním rozpouštědle, například dichlometanu vede k meziproductu s otevřeným kruhem 55. Struktura zahrnutá 54 zahrnuje bicyklické molekuly, které

mohou zahrnovat kondenzované aromatické nebo heteroaromatické kruhy. Na místo 54 je také možné použít dikarboxylové kyseliny, které jsou schopné tvořit cyklické imidy. V pozdějším případě se kondenzační činidlo například karbonyldiimidazol, musí použít v prvním stupni. Zpracování sloučeniny vzorce 55 s reakčním činidlem, jako je karbonyldiimidazo schopný účinné cyklohydratace vede k imidu vzorce 56. Další manipulace funkčních skupin, které jsou přítomné na anhydridu vzorce 54 a modifikace R_7'' se může provést na sloučenině 56, jak je požadováno k získání dalších analogů, za použití standardní chemie, která je kompatibilní s přítomností imidové funkční skupiny.

Pro přípravu sloučenin, kde R_1 je halogen výhodně chlor, se vhodný atom halogenu vpraví během syntézy na různá místa, v závislosti na povaze dalších funkčních skupin v molekule. Například sloučenina vzorce 6, kde R_1 je vodík se může zpracovat mírným chloračním činidlem, například N-chlorsukcinimidem v přítomnosti protonového akceptoru, například octanu sodného, za získání sloučeniny vzorce 6, kde R_1 je chlor. V případě, že sloučenina 6 je odvozená od 3-amino-L-fenylalaninu může vzniknou směs regioizomerů, která se může oddělit ve vhodném bodě syntézy. Ostatní meziprodukty popsané ve schématech uvedených shora mohou být vhodnější výchozí materiály pro halogenaci na příslušnou cílovou molekulu. Podstata individuálních výchozích materiálů je pro odborníky zřejmá.

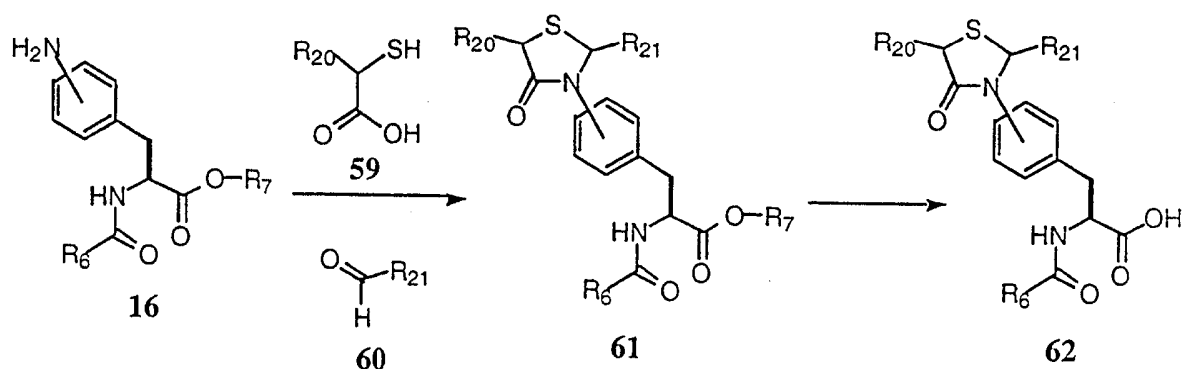
Reakční schéma 9



Pro přípravu thiazolidinonů vzorce 62 popsaných v reakčním schématu 10 se použije aminofenylalaninový derivát struktury 16, kde R_6 a R_7 mají význam definovaný shora. Reakce 16 s α -merkaptokarboxylovou kyselinou vzorce 59, kde R_{20} může být vodík, nižší alkyl nebo aryl, například α -merkaptooctovou kyselinou a aldehydem vzorce 60, kde R_{21} může být alkyl, hydroxyalkyl nebo substituovaná arylová skupina, například benzaldehydem, ve vhodném rozpouštědle, jako je benzen, THF nebo nižší alkohol, například methanol, v přítomnosti zachycovače vody, jako jsou 4A molekulární síta, při 60 až 80 °C poskytuje sloučeninu vzorce 61. Sloučenina 61 může být sloučeninou podle vynálezu v závislosti na povaze R_7 nebo může být převedena na sloučeninu podle vynálezu vhodnou hydrolýzou, například v případě, že R_7 je nižší alkyl, zpracováním s přebytkem hydroxidu alkalického, jako je hydroxid sodný ve vodném alkoholu. Pokud R_7 představuje

pryskyřici vhodnou pro syntézu v pevné fázi, vhodné podmínky hydrolýzy budou závislé na výběru pryskyřice. V případě Wangovy pryskyřice povede zpracování s trifluoroctovou kyselinou v přítomnosti vhodného zachycovače ke kyselině vzorce 62. Sekvence může být zahájena s příslušnými aniliny, například sloučeninou vzorce 7, kde R_1 je nižší alkyl nebo halogen za získání odpovídajících thiazolidinonů.

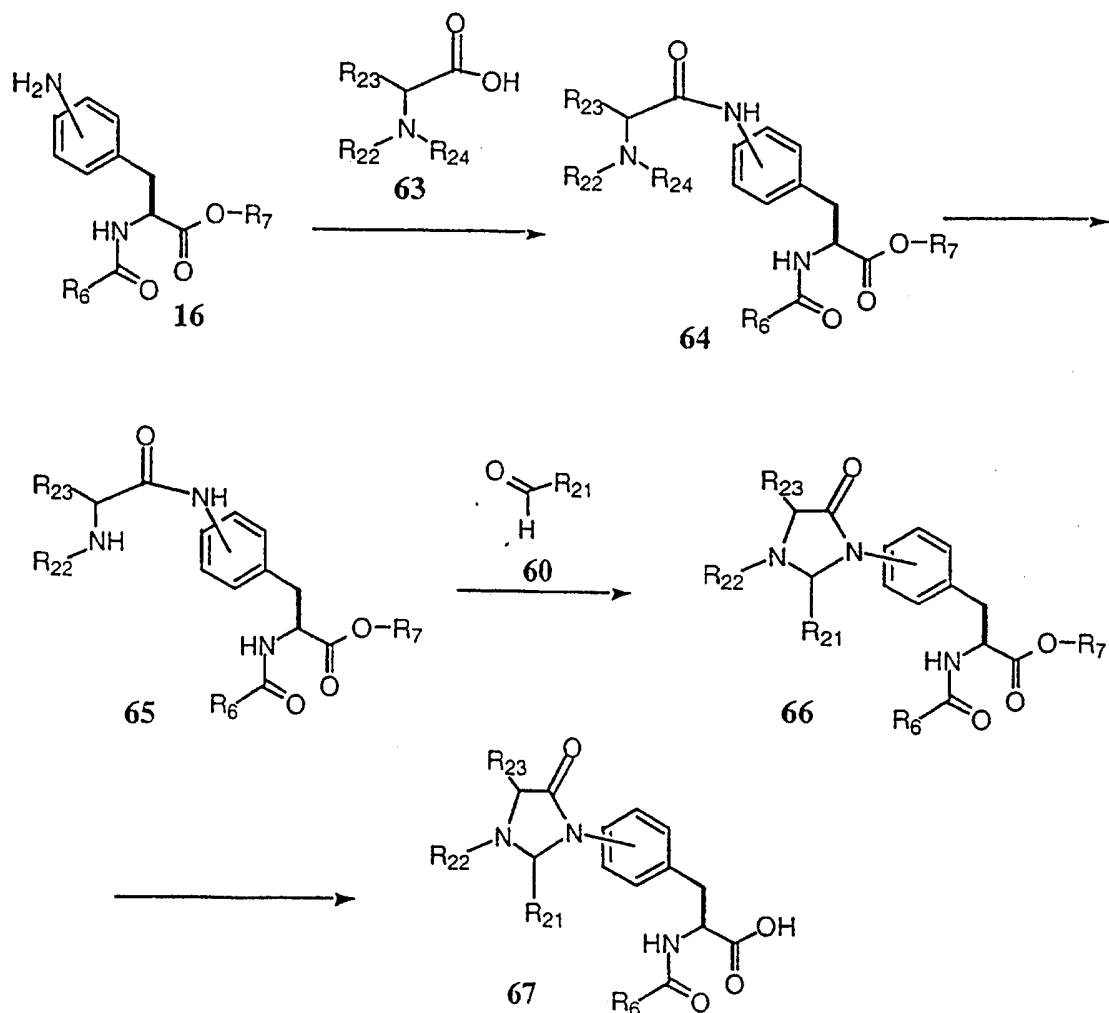
Reakční schéma 10



Pro přípravu imidazolidinonů vzorce 67, uvedenou v reakčním schématu 11 se může použít aminofenylalanin struktury 16, kde R_6 a R_7 mají význam uvedený shora. Sloučenina 16 se může snadno získat syntézou popsanou v reakčním schématu 3. Tato sloučenina se může kopulovat s N-chráněnou α -aminokyselinou vzorce 63, kde R_{22} může být nižší alkylová nebo nižší arylová skupina, R_{23} může být postranní řetězec přírodní nebo nepřírodní D- nebo L-aminokyseliny nebo R_{22} a R_{23} společně mohou tvořit kruh, například kruh prolinové nebo pipikolinové kyseliny a R_{24} může být standardní aminová chránicí skupina vhodná pro zvláštní výběr R_6 , R_7 , R_{22} a R_{23} , například terc.butoxykarbonyl. Kopulační reakce se může provést za použití standardních kopulačních podmínek, například HBTU v přítomnosti DIPEA v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti a získá se sloučenina vzorce 64. Vhodný způsob odstranění chránicí skupiny se provede v závislosti na povaze chránicí skupiny R_{24} a získá se

sloučenina vzorce 65. V případě, že chránicí skupina R_{24} je skupina Boc, odstranění chránicí skupiny se může provést reakcí 64 s HCl v dioxanu při teplotě místnosti. Reakce sloučeniny 65 s aldehydem vzorce 60, kde R_{21} má význam definovaný shora, v přítomnosti zachycovače vody, jako jsou 4A molekulární síta, při teplotě 60 až 80 °C ve vhodném rozpouštědle, například THF, poskytuje sloučeninu vzorce 66. Sloučenina 66 může být sloučeninou podle vynálezu v závislosti na povaze R_7 nebo může být převedena na sloučeninu podle vynálezu vhodnou hydrolýzou, například v případě, že R_7 je nižší alkyl, hydrolýzou s hydroxidem alkalického kovu, jako je například hydroxid sodný, ve vodném alkoholu, za získání karboxylové kyseliny vzorce 67.

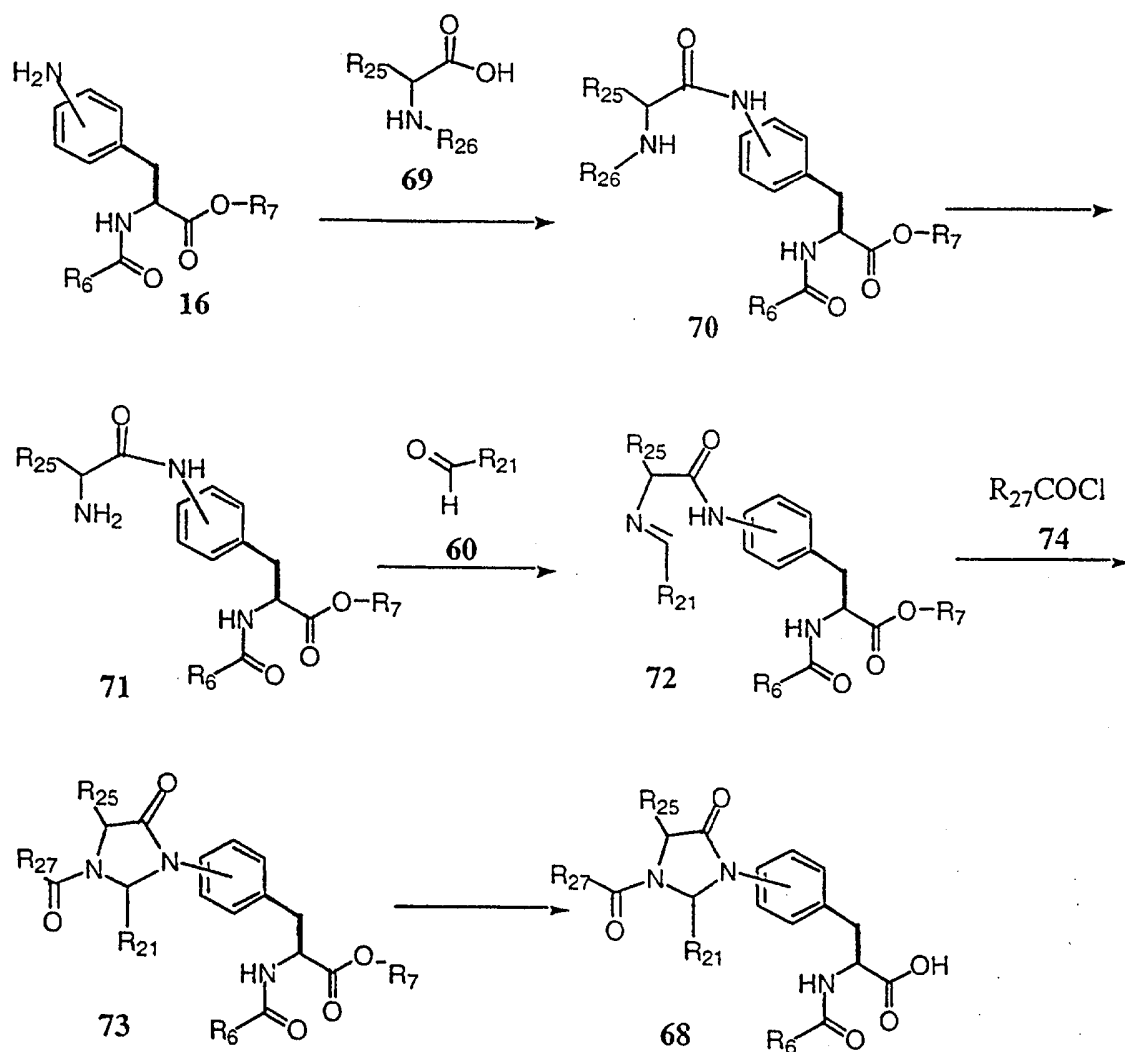
Reakční schéma 11



Pro přípravu imidazolidinonů vzorce 68, popsaných v reakčním schématu 12, se použije aminofenylalaninový derivát struktury 16, kde R_6 a R_7 mají význam uvedený shora. Sloučenina 16 se může snadno získat syntézou popsanou v reakčním schématu 3 v případě, že R_7 je nižší alkyl. Tato sloučenina se může kopulovat s N-chráněnou α -aminokyselinou vzorce 69, kde R_{25} může být postranní řetězec přírodní nebo nepřírodní aminokyseliny a R_{26} je dusíková chránicí skupina typu obvykle používaném v chemii peptidů, například skupina Fmoc, za použití standardních kopulačních podmínek, například HBTU v přítomnosti DIPEA, v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF, při teplotě mezi 0 °C a teplotou místnosti za získání sloučeniny vzorce 70. V závislosti na povaze chránicí skupiny R_{26} se použije vhodná metoda k odstranění chránicí skupiny a získá se sloučenina vzorce 71. V případě, že chránicí skupina R_{26} je skupina Fmoc, může být odstraněna ze sloučeniny 70 za použití standardního bázeického zpracování dobře známého odborníkům, například piperidinem v DMF za získání aminu vzorce 71. Sloučenina 71 může reagovat potom s aldehydem 60, kde R_{21} má význam uvedený shora, v přítomnosti zachycovače vody, jako jsou molekulární síta 4A ve vhodném rozpouštědle, jako je dichlormethan nebo tetrahydrofuran při 25 až 60 °C a získá se imin vzorce 72. Imin 72 se může potom zpracovat s acylačním činidlem, jako je acylchlorid vzorce 74, kde R_{27} může být alkylová nebo arylová skupina v přítomnosti báze, jako je DIPEA nebo DBU ve vhodném rozpouštědle, jako je dichlormethan nebo THF při 25 až 60 °C a získá se imidazolidinon vzorce 73. Alternativně se může použít při této reakci další reaktivní acylační skupina, jako jsou anhydridy kyselin nebo směsné anhydridy. Sloučenina 73 může být sloučeninou podle vynálezu, nebo v závislosti na povaze R_7 může být převedena na sloučeninu podle vynálezu vhodnou hydrolýzou, například v případě, že R_7 je nižší alkyl, hydrolýzou za použití hydroxidu alkalického kovu, například hydroxidu sodného ve vodném alkoholu a získá se, po okyselení, karboxylová kyselina vzorce 68. Sekvence může být

zahájena příslušnými aniliny, například sloučeninou vzorce 7, kde R_1 je nižší alkyl nebo halogen, za získání odpovídajících 3-acylimidazolidinonů.

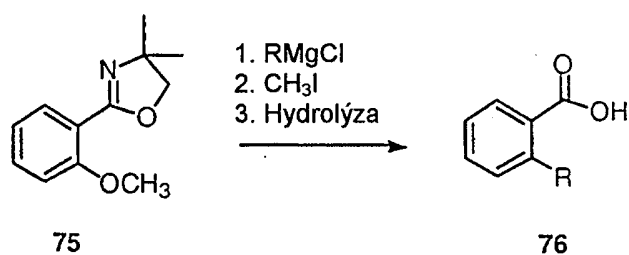
Reakční schéma 12



Deriváty ortho-substituované kyseliny benzoové, které nejsou komerčně dostupné se mohou připravit konvenčními způsoby. Například ortho-substituované aryljodidy nebo trifláty mohou být karbonylovány v přítomnosti oxidu uhelnatého a vhodného palladiového katalyzátoru. Příprava takových jodidových nebo triflátových meziproduktů je závislá

na partikulární substituci žádaného modelu a mohou být získány jodací nebo diazotací anilinu a následným zpracováním se zdrojem jodidu, například s jodidem draselným. Trifláty mohou být odvozeny od odpovídajících fenolů konvenčními způsoby, jako je zpracování s anhydridem kyseliny trifluormethansulfonové v přítomnosti báze, jako je triethylamin nebo diisopropylethylamin v inertním rozpouštědle. Další způsoby pro získání ortho-substituovaných benzoových kyselin zahrnují zpracování 2-methoxyfenyloxazolinového derivátu jako je 75 s alkylovým Grignardovým činidlem a následnou hydrolýzu oxazolinového kruhu podle postupu popsáném Meyers-em, A.I., Gabel-em, R., Mihelick-em, E.D., J. Org. Chem. 1978, 43, 1372-1379, za získání kyseliny vzorce 26. 2- nebo 2,6-disubstituované benzonitrily také slouží jako vhodné prekurzory k odpovídajícím benzoovým kyselinám. V případě vysoce bráněných nitrilů, například 2-chlor-6-methylbenzonitrilu je konvenční hydrolýza při kyselých podmínkách obtížná a lepších výsledků se dosáhne DIBAL redukcí na odpovídající benzaldehyd následovanou oxidací za použití oxidačních činidel chromu.

Reakční schéma 13



Obecně: Teploty tání byly stanoveny na Thomas-Hooverově aparatuře, polarimetru 241. ^1H -NMR spektra byla zapsána spektrometry Varian XL-200 a Unityplus 400 MHz za použití tetramethylsilanu jako vnitřního standardu. Ionizace nárazem elektronu (EI, 70ev) a FAB hmotová spektra byly stanoveny na hmotových spektrometrech VG Autospec nebo VG 70E-HF.

Silikagel používaný pro sloupcovou chromatografii byl silikagel Mallinkrodt SiliCar 230-400 mesh silikagel pro mžikovou chromatografii; kolony pracovaly při 0 až 0,0352 MPa dusíku k usnadnění průtoku. Chromatografie na tenké vrstvě se prováděla na tenkém skle a nebyla korigována. Optické rotace se stanovily na modelu Perkin Elmer, desky povlečeny silikagelem dodávaný E. Merck (E. Merck # 1,05719) a byly sledovány při 254 nm UV světlem v prohlížečím boxu, tím že byly vystaveny jodovým parám nebo postříkem s kyselinou fosfomolybdenovou (PMA) ve vodném ethanolu a nebo po expozici chlorovým parám a po reakci s 4,4'-tetramethyldiaminodifenylmethanovým činidlem připraveným podle E. Von Arx-e, M. Faupel-a a M. Brugger-a, *J. Chromatography*, 1976, 120, 224-228.

HPLC s reverzními fázemi se provede za použití buď Waters Delta Prep 4000 zahrnující kolonu 3 x 30 cm, Waters Delta Pak 15 μ M kolona C-18 při průtoku 40 ml/min. zahrnující gradient acetonitril:vodě (každý obsahuje 0,75 % TFA), typicky od 5 do 95 % acetonitrilu během 35-40 minut nebo Raininovou HPLC zahrnující kolonu 41,4 x 300 mm, 8 μ M, DynamaxTM C-18 při průtoku 49 ml/min a podobným gradientem acetonitrilu:vodě jak je uvedeno shora. Podmínky HPLC jsou typicky popsány ve formátu (5-95-35-214); toto udává lineární gradient od 5 % do 95 % acetonitrilu ve vodě po dobu 35 minut za současného sledování eluentu s UV detektorem 214 nM.

Methylenchlorid (dichlormethan), 2-propanol, DMF, THF, toluen, hexan, ether a methanol byly podle Fisherova reakčního stupně a použily se bez dalšího čištění, pokud nebylo uvedeno jinak, a acetonitril byl podle Fisherova hplc stupně a použil se jako takový.

Definice:

THF je tetrahydrofuran,

DMF je N,N-dimethylformamid,

HOBT je 1-hydroxybenzotriazol,
BOP je [(benzotriazol-1-yl)oxy]tris-(dimethylamino)fosfonium-hexafluorofosfát,
HATU je O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorofosfát,
HBTU je O-benzotriazol-N,N,N'-tetramethyluronium-hexafluorofosfát,
DIPE je diisopropylethylamin,
DMAP je 4-(N,N-dimethylamino)pyridin,
DPPA je difenylfosforylazid,
DPPP 1,3-bis(difenylfosfino)propan,
DBU je 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en,
NaH je hydrid sodný,
solanka je nasycený vodný roztok chloridu sodného,
TLC je chromatografie na tenké vrstvě,
LDA je diisopropylamid litný,
BOP-Cl je chlorid bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)fosfinové kyseliny,
NMP je N-methylpyrrolidinon.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu

K roztoku methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu (2,6 g, 8,6 mmol) v dichlormethanu (20 ml) se přidá při teplotě místnosti diisopropylethylamin (2,3 ml, 13 mmol) a potom 2,6-dichlorbenzoylchlorid (1,99 g, 9,5 mmol). Směs se míchá 15 minut, kdy se začne vytvářet sraženina. Směs se zředí s 30 ml dichlormethanu a 50 ml vody. Vrstvy se oddělí a vodná vrstva se extrahuje s dichlormethanem

(2 x 50 ml). Spojené extrakty se promyjí solankou a suší se nad síranem hořečnatým. Filtrací a koncentrací rozpouštědla se se získá 4,03 g (kvant.) methylesteru 4-[(2,6-dichlor-fenylkarbonyl)amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu jako bílá pevná látka: teplota tání 148 až 151 °C.

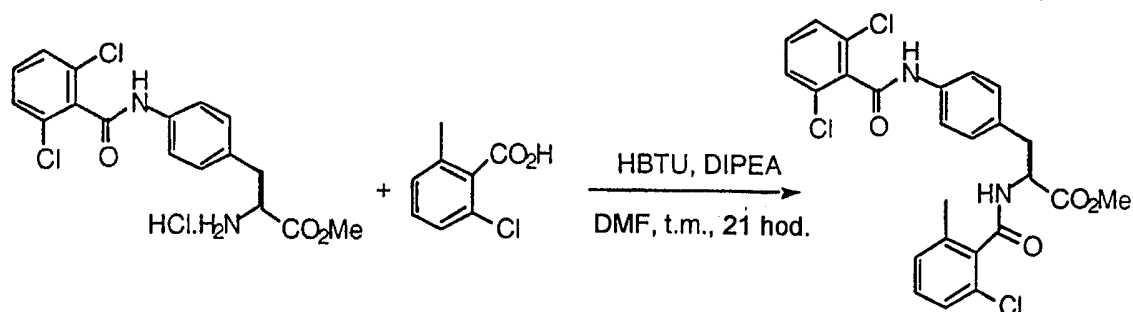
Příklad 2

Příprava hydrochloridové soli methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

Methylester 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (1,86 g, 4,0 mmol) se zpracuje při teplotě místnosti s 10 ml 4 N kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Po 5 minutách se pevná látka převede do roztoku a směs se míchá 1 hodinu a k vysráženému produktu se přidá 25 ml ethyletheru. Pevné látky se seberou filtrací a promyjí se hexanem. Výsledná hygroskopická a gumovitá pevná látka se rozpustí v 50 ml methanolu a koncentruje se. Po sušení ve vysokém vakuu se získá hydrochloridová sůl methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,64 g, 97 %) jako světle žlutá pevná látka, teploty tání 158 až 161 °C.

Příklad 3

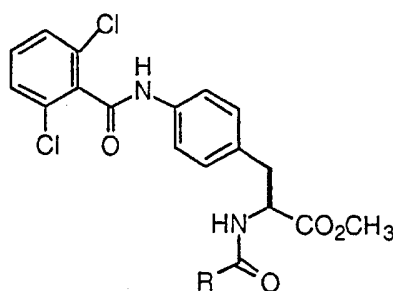
Příprava methylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu



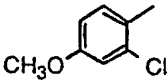
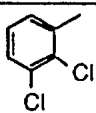
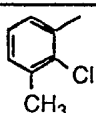
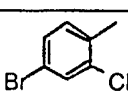
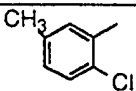
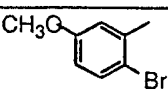
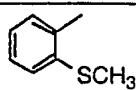
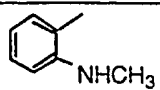
Roztok hydrochloridu methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,23 g, 3,05 mmol), 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny (0,50 g, 2,93 mmol), HBTU (1,16 g, 3,05 mmol) a DIPEA (1,33 ml, 7,6 mmol) v DMF (12 ml) se míchá 15 hodin při teplotě místnosti. Směs se zředí ethylacetátem (250 ml) a promyje se 0,5 N HCl (2 x 80 ml), nasyceným hydrogenuhlíčanem sodným (2 x 80 ml) a solankou (2 x 80 ml) a suší se (Na_2SO_4). Roztok se filtruje a koncentrací se získá žlutá guma, která krystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (0,75 g) vhodný pro použití v dalším stupni. Matečný louh se koncentruje a čistí chromatografií na silkagelu eluováním směsí ethylacetátu a hexanu 1:1 a získá se dalších 0,625 g.

Příklad 4 až 12

Sloučeniny uvedené dále se připraví z hydrochloridu methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a vhodných derivátů kyseliny benzoové podle postupu popsaném v příkladu 3.



Příklad	R	Výtěžek %	HRMS Nalez. hmot.	HRMS Vyp. hmot.
4		96	557,0657	557,0658

5		85	525,0596	525,0594
6		84	539,0090	539,0099
7		86	519,0633	519,0645
8		89	582,9581	582,9599
9		83	519,0633	519,0645
10		98	579,0071	579,0089
11		99	517,0742	517,0755
12		80	500,1144	500,1144

Příklad 13

Příprava N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,31 g, 2,6 mmol) v ethanolu (45 ml) a 1,0 N hydroxidu sodném (45 ml, 45 mmol) se míchá přes noc při teplotě místnosti a získá se čirý roztok. Směs se neutralizuje s 1 N kyselinou chlorovodíkovou k vysrážení 1,28 g bílé pevné látky. Matečný louh se extrahuje ethylacetátem (2 x 50 ml) a kombinované extrakty se promyjí nasycenou solankou, suší se (Na_2SO_4) a odpaří se na

0,56 g. Rekrystalizací prvního výtěžku z ethylacetátu se získá N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalanin (0,77 g). Rekrystalizací druhého výtěžku z ethylacetátu se získá dalších 0,20 g. FAB HRMS nalezeno hmot. 506,0483. Vypočteno hmot. 505,0488 (M+H).

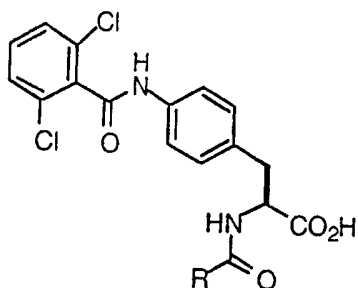
Příklad 14

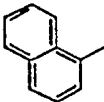
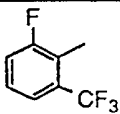
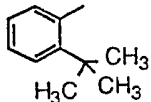
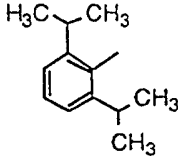
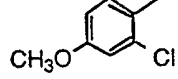
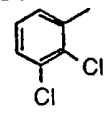
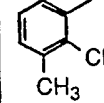
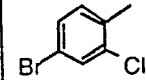
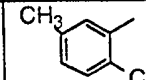
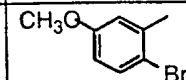
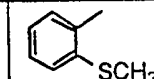
Příprava sodné soli N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

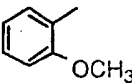
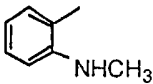
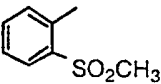
Roztok N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (0,15 g) v 1,0 N NaOH (0,3 ml) se aplikuje do 2 x 20 cm otevřené kolony C-18 se silikagelem v reverzní fázi (40-63 μ M, RP Silica Gel60, dodávaný firmou EM Separations, Cat. 10167) eluováním vodou, potom 40-50% methanolem ve vodě a získá se sodná sůl N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu po lyofilizaci jako amorfnní bílá pevná látka.

Příklady 15 až 30

Sloučeniny uvedené dále se připraví z odpovídajících methylesterů za použití metod popsanych v příkladu 13.



Příklad	Výchozí materiál z příkladu	R	Výtěžek %	HRMS Nalez. hmot.	HRMS Vyp. hmot.
15	161		76 ¹	507,0868	507,0878
16	4		98	543,0497	543,0501
17	163		79 ¹	513,1354	513,1348
18	165		8 ¹	541,1665	541,1661
19	5		86 ²	543,0254	543,0257
20	6		99	524,9939	524,9942
21	7		87	505,0482	505,0488
22	8		58	568,9428	568,9437
23	9		99	505,0486	505,0488
24	10		90	564,9921	564,9932
25	11		82 ²	525,0409	525,0418

26	166		99 ¹	487,0839	487,0827
27	12		86 ²	508,0814	508,0807
28	173		99 ¹	535,0497	535,0497

1. Výtěžek je pro dva stupně jak je popsáno v postupu popsaném v příkladech 3 a 4.

2. Izolováno jako sodná sůl, jak je popsáno v příkladu 14.

Příklad 29

Příprava methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-(methylthio)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-(methylthio)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (0,25 g, 0,48 mmol) a oxonu (147 mg, 0,24 mmol) v ethylacetátu (12 ml) a vodě (6 ml) se míchá při teplotě místnosti 2 hodiny a přidá se další část (147 mg, 0,24 mmol) oxonu. Směs se míchá přes noc, TLC (20:1 dichlormethan:methanolu) ukazuje na přítomnost výchozího materiálu a sulfonu vedle dvou sulfoxidů. Vrstvy se oddělí, vodná vrstva se extrahuje s ethylacetátem a spojené extrakty se promyjí nasycenou solankou a suší se (Na_2SO_4). Zbytek se po koncentraci chromatografuje na silikagelu eluováním směsí 20:1 dichlormethanu:methanolu a získá se methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-(methylsulfinyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (218 mg) jako směs diastereomerů.

Příklad 30

Příprava 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-(methyl-

sulfinyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu

Hydrolýza se provede jak je popsáno v příkladu 13. Vychází se z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-methylsulfinyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (214 mg, 0,41 mmol) a izolací produktu RP HPLC, eluováním směsí acetonitril:voda a následnou lyofylizací se získá polárnější diastereomer 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-[(N-(2-methylsulfinyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (63,6 mg) jako amorfni pevná látka. HRMS: Nalezeno 541,0385. Vypočteno 541,0368 (M+Na) a následovně méně polární diastereomer (74,2 mg), HRMS: nalezeno hmot. 541,0351. Vypočteno hmot. 541,0368 (M+Na).

Příklad 31

Příprava 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu

a. Roztok methylesteru 4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (935 mg, 3,54 mmol), HOAT (658 mg, 5,31 mmol), 2-benzylbenzoové kyseliny (1,13 g, 5,31 mmol) a DCC (1,09 g, 5,31 mmol) v DMF (20 ml) se míchá přes noc při teplotě místnosti. Směs se zředí vodou a extrahuje se ethylacetátem. Spojené extrakty se promyjí vodou a nasycenou solankou, suší se (Na_2SO_4), filtruje a odpaří. Zbytek se rekrystaluje z ethylacetátu obsahující malé množství dichlormethanu a methanolu a získá se 4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-N-[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (1,21 g, 74 %), vhodný pro použití v dalším stupni.

b. Argon se přehání přes roztok methylesteru 4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-N-[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (1,21 g, 2,63 mmol) a tetrakis(trifenylfosfin)-palladium (61 mg, 0,053 mmol) v 45 ml dichlormethanu po dobu 5 min. a potom se přidá tributylcínhydrid (800 μl , 2,9 mmol). Po 1,5 hodině při teplotě místnosti se směs zředí

dichlormethanem (50 ml) a promyje se nasyceným NaHCO_3 a solankou, suší se (Na_2SO_4) a koncentruje. Zbytek se rozpustí v dichlormethanu a etheru a přidá se hexan k vysrážení 99 mg bílé pevné látky. Filtrát se koncentruje a zbytek se rekrytaluje z dichlormethanu a získá se methylester 4-amino-N-[[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (594 mg).

c. Směs methylesteru 4-amino-N-[[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (200 mg, 0,52 mmol), 2,6-dichlorbenzoylchloridu (131 mg, 0,62 mmol) a triethylaminu (108 μl , 0,78 mmol) v 5 ml dichlormethanu se míchá 6 hodin při teplotě místnosti. Směs se zředí dichlormethanem (10 ml) a promyje se vodou a nasycenou solankou. Organická vrstva se suší (Na_2SO_4) a zbytek se chromatografuje na silikagelu eluováním s 20 až 60% ethylacetátem v hexanu a získá se methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (195 mg) jako ne zcela bílá pevná látka.

d. Roztok methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (195 mg, 1,4 mmol) a hydroxidu litného (33,5 mg, 1,4 mmol) v THF:methanolu:vodě (6 ml, 3:1:1) se míchá přes noc při teplotě místnosti a koncentruje se. Zbytek se trituruje s 1 N vodnou HCl po dobu 10 minut a pevné látky se seberou odstředěním, promyjí se vodou a etherem a získá se 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[(2-fenylmethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalanin (165 g) jako bílý prášek, který má čistotu 97 % (analýza hplc). FAB MS 569 ($\text{M}+\text{Na}$) (1 Cl), 547 ($\text{M}+\text{H}$) (1 Cl).

Příklad 32

Příprava 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-

-4-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]karbonyl]fenyl]karbonyl]-
-L-fenylalaninu

a. V inertní atmosféře se míchá roztok 3-chlor-4-methoxy-karbonylbenzoové kyseliny (1,13 g, 5,27 mmol), hydrochloridu 3-hydroxybenzylaminu (0,85 g, 5,35 mmol) a HBTU (2,08 g, 5,485 mmol) v dimethylformamidu (15 ml) a přidá se DIPEA (3,54 ml, 26,33 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti a těkavé podíly se odstraní ve vakuu. Jantarový olejovitý zbytek se rozdělí mezi ethylacetát (50 ml) a 0,5 N HCl (30 ml) a organické extrakty se promyjí solankou (30 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (30 ml) a solankou (30 ml). Vodné vrstvy se opět promyjí ethylacetátem. Následuje odpaření organických spojených vrstev, sušení (MgSO₄) a získá se 1,7 g surového produktu. Materiál se chromatografuje (silikagel, 50 g) a eluováním s ethylacetátem a hexanem (2:3) se získá amid jako bezbarvý olej (1,3 g). Krystalizací ze směsi etheru a hexanu se získá 1,12 g methylesteru 2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]benzoové kyseliny jako pevná látka. FAB HRMS: (C₁₆H₁₄ClNO₄) nalezeno hmot. 320,0681. Vypočteno hmot. 320,0689 (M+H).

b. Roztok methylesteru 2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]benzoové kyseliny (900 mg, 2,82 mmol) ve vodném roztoku 0,5 N hydroxidu sodného se míchá pod argonem při teplotě místnosti. Po 2 hodinách se roztok okyselí 1 N HCl (11 ml) a vzniklá bezbarvá pevná látka se filtruje, promyje se vodou, suší se ve vakuu a získá se 840 mg 2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]benzoové kyseliny. FAB HRMS: (C₁₅H₁₂ClNO₄) nalezeno hmot. 306,054. Vypočteno hmot. 306,0533 (M+H).

c. V atmosféře argonu se k míchanému roztoku 2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]benzoové kyseliny (45 mg, 0,1472 mmol), methylesteru 4-(2,6-dichlorbenzoylamino)-L-fenylalaninu (60 mg, 0,1488 mmol) a HBTU (59 mg, 0,16 mmol)

v dimethylformamidu (3 ml) přidá HBTU (59 mg, 0,16 mmol). Reakční směs se míchá 17 hodin při teplotě místnosti a potom se koncentruje do sucha ve vakuu a zbytek se rozdělí mezi dichlormethan (25 ml) a 0,5 N HCl (10 ml). Organická vrstva se promyje vodou a vodná vrstva se opět promyje dichlormethanem. Spojené dichlormethanové extrakty se suší (Na_2SO_4) a odpařením se získá 80 mg surového materiálu, který se krystaluje ze směsi methanolu a ethylacetátu a získá se 38 mg methylesteru N-[[2-chlor-4-[[3-hydroxyfenyl)amino]-karbonyl]fenyl]karbonyl]-4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu, teploty tání 230 až 232 °C. FAB HRMS: ($\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_6$) nalezeno hmot. 654,0952. Vypočteno hmot. 654,0965 (M+H).

d. Roztok methylesteru N-[[2-chlor-4-[[3-hydroxyfenyl)amino]-karbonyl]fenyl]karbonyl]-4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (35 mg, 0,053 mmol) v methanolu (0,35 ml) a tetrahydrofuranu (0,35 ml) se zpracuje vodným 1 N roztokem hydroxidu litného (0,16 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti pod argonem 90 minut. Roztok se koncentruje za sníženého tlaku a potom se zředí vodou (5 ml) a extrahuje se diethyletherem (2 x 5 ml). Oddělená vrstva se okyselí 1 N HCl (0,18 ml) a vzniklá pevná látka se odfiltruje, promyje se vodou a suší se a získá se 29 mg N-[[2-chlor-4-[[3-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]fenyl]karbonyl]-4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu. FAB HRMS: ($\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_6$) nalezeno hmot. 640,0821. Vypočteno hmot. 640,0809 (M+H).

Příklad 33

Příprava 4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-4-[5-[[3-hydroxyfenyl)methyl]amino]-1H-tetrazol-1-yl]fenyl]-karbonyl]-L-fenylalaninu

a. Míchaná suspenze 3-hydroxyfenyloctové kyseliny (10,2 g, 67

mmol) v anhydridu kyseliny octové (100 ml, 1,06 mol) se zpracuje při bezvodých podmínkách s pyridinem (0,5 ml). Při mírné exotermní reakci se pevné látky rozpustí během několika minut a směs se udržuje při 40 °C po dobu 5 hodin. Reakce se koncentruje ve vakuu na polovinu objemu a potom se přidá voda (30 g) ve formě ledových třísek takovou rychlostí, aby teplota zůstala < 45 °C. Když exotermní reakce poklesne, přidá se pomalu další část vody (200 ml) a směs se míchá 30 minut. Vysrážená pevná látka se odfiltruje, promyje se vodou a sušení do konstantní hmotnosti ve vakuu nad P₂O₅ a získá se 3-acetoxifynyloctová kyselina (11,7 g), která se použije bez dalšího čištění.

V inertní atmosféře se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny roztok shora uvedené 3-acetoxifynyloctové kyseliny (1,942 g, 10 mmol), difenylfosforylazidu (2,8 g, 10,17 mmol) a DIPEA (1,92 ml, 11 mmol) v benzenu (25 ml), potom se teplota reakční směsi pomalu zvýší na teplotu 70 °C. Při dosažení teploty přibližně 55 °C se vývoj plynu stane evidentní a reakce se stane intenzivnější při dosažení teploty 70 °C. Během 30 minut při této teplotě se vývoj plynu zastaví a reakční roztok obsahující vzniklý 3-acetoxybenzylisokyanát se ochladí na 40 °C. Přidá se další část DIPEA (3,84 ml, 22 mmol) a potom hydrochloridová sůl methylesteru 4-amino-2-chlorbenzoové kyseliny (2,95 g, 13,3 mmol) a nahnědlý purpurový roztok se míchá a zahřívá pod argonem přes noc. Reakční směs se ochladí, zředí se benzenem (50 ml) a promyje se s 1 N HCl a zředěnou solankou. Vodná vrstva se znovu extrahuje s benzenem, potom se spojí, sušené (MgSO₄) organické extrakty se odpaří a surový zbytek se čistí HPLC (silikagel, ethylacetát-hexan 2:3). Odpaření příslušných frakcí poskytne 3,24 g pevné močoviny, která se krystaluje ze směsi dichlormethan-ethylacetát a získá se methylester 4-[3-(3-acetoxybenzyl)ureido]-2-chlorbenzoové kyseliny (2,71 g) jako bezbarvá pevná látka, teploty tání 113 až 114 °C. FAB HRMS: (C₁₈H₁₇ClN₂O₅) nalezeno hmot. 377,0898. Vypočteno hmot.

377,0905 (M+H).

b. V atmosféře suchého argonu se zpracuje roztok trifenylfosfinu (1,684 g, 6,42 mmol), diethylazodikarboxylátu (1,13 g, 6,42 mmol) a methylesteru 4-[3-(3-acetoxybenzyl)-ureido]-2-chlorbenzoové kyseliny (1,21 g, 3,21 mmol) v suchém THF (30 ml) trimethylsilylazidem (0,86 ml, 6,48 mmol) a směs se míchá při teplotě místnosti 24 hodin. Zkoušení reakční směsi TLC ukazuje přítomnost značného množství výchozího materiálu, takže se přidá další množství trifenylfosfinu (0,842 g, 3,21 mmol), diethylazodikarboxylátu (0,565 g, 3,21 mmol) a trimethylsilylazidu (0,43 ml, 3,21 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti dalších 40 minut. Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku se zbytek převede do dichlormethanu (100 ml) a promyje se vodou (2 x 50 ml). Vodné extrakty se opět promyjí s dichlormethanem (50 ml) a spojí se, sušené (MgSO_4) extrakty se odpaří ve vakuu. Z předchozího experimentu bylo odvozeno, že reakce poskytuje komplexní obtížně oddělitelnou směs několika produktů, některé jsou deacetylované a/nebo deesterifikované. Podle toho, v tomto experimentu se zbytek rozpustí ve směsi methanolu (30 ml) a 1 N hydroxidu litného (15 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin k dokončení hydrolýzy obou esterů a fenolových acetátových skupin. Většina těkavých podílů se odstraní za sníženého tlaku, potom se báze roztok zředí vodou (20 ml) a promyje se dichlormethanem (2 x 30 ml). Vodná vrstva se okyselí 1 N HCl (16 ml) a extrahuje se ethylacetátem (2 x 50 ml). Sušené (MgSO_4) ethylacetátové extrakty se odpaří a pevný zbytek (810 mg), přibližně 4:1 směs žádaného aminotetrazolu a jeho polohového izomeru, se krystaluje z etheru a získá se 560 mg 2-chlor-4-[5-[(3-hydroxyfenyl)amino]tetrazol-1-yl]benzoové kyseliny jako bezbarvá pevná látka. FAB HRMS: ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O}_3$) nalezeno hmot. 345,0624. Vypočteno hmot. 345,0629 (M+H).

c. V atmosféře argonu se přidá DIPEA (0,102 ml, 0,585 mmol) k

míchanému roztoku 2-chlor-4-[5-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]-amino]-1H-tetrazol-1-yl]benzoové kyseliny (51 mg, 0,15 mmol), methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)]karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (60 mg, 0,15 mmol) a HBTU (59 mg, 0,1555 mmol) v dimethylformamidu (3 ml). Reakční směs se míchá 17 hodin při teplotě místnosti a potom se koncentruje za sníženého tlaku. Zbylý olej se převede do dichlormethanu (25 ml) a propláchne se 0,5 N HCl (10 ml) a vodou (10 ml). Vodné vrstvy se zpětně propláchnou s dichlormethanem. Spojené organické vrstvy se suší (Na_2SO_4) a odpařením se získá 85 mg surového produktu. Tento materiál se krystaluje ze směsi dichlormethanu a diethyletheru a získá se 79 mg methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)]karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-4-[5-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]-1H-tetrazol-1-yl]fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu jako bezbarvá pevná látka, teploty tání 155 až 158 °C. FAB HRMS: ($\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{N}_7\text{O}_5$), nalezeno hmot. 694,1158. Vypočteno hmot. 694,1139 (M+H).

d. Vodný roztok 1 N hydroxidu litného (0,33 ml) se přidá k roztoku methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)]karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-4-[5-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]-1H-tetrazol-1-yl]fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (75 mg, 0,108 mmol) v methanolu (0,66 ml) a THF (0,66 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti 90 minut. Rozpouštědlo se stripuje za sníženého tlaku, zbytek se rozpustí ve vodě (20 ml) a extrahuje se diethyletherem (3 x 5 ml). Vodná vrstva se filtruje přes celit a potom se okyselí 1 N HCl (0,35 ml). Vzniklá bezbarvá pevná látka se odfiltruje, promyje se vodou a suší se ve vakuu a získá se 57 mg 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)]karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-4-[5-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]-1H-tetrazol-1-yl]fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu. FAB HRMS: ($\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{N}_7\text{O}_5$) nalezeno hmot. 680,0981. Vypočteno hmot. 680,0983 (M+H).

Příprava 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[[2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]sulfonyl]fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu

a. Při teplotě místnosti se míchaný roztok hydrochloridu methylesteru 4-amino-2-chlorbenzoové kyseliny (1,11 g, 5 mmol) v konc. HCl (10 ml) zpracuje v jedné dávce s NaNO_2 (0,42 g, 6,09 mmol) ve vodě (3 ml). Po 15 minutách se vzniklá suspenze přidá během 2 minut k rychle míchanému, nasycenému roztoku SO_2 v kyselině octové (15 ml) obsahující CuCl_2 (0,15 g) ve vodě (1 ml). Dochází k bezprostřednímu vývoji plynu, který zmizí po 10 minutách a potom se reakční směs zředí ledovou vodou (200 ml). Vzniklá nafialovělá pevná látka se odfiltruje, promyje se vodou a potom se rozpustí v dichlormethanu. Suchý (Na_2SO_4) roztok se odpaří ve vakuu a vzniklý materiál se chromatografuje na silikagelu (50 g). Příslušné frakce, eluované s 30 až 40% diethyletheru v hexanu se koncentrují do sucha za sníženého tlaku a získá se 1,1 g 3-chlor-4-methoxykarbonylbenzensulfonylchloridu jako bezbarvá pevná látka.

Shora uvedený 3-chlor-4-methoxykarbonylbenzensulfonylchlorid (0,14 g, 0,52 mmol) v dichlormethanu (0,5 ml) se přidá v jedné dávce k míchanému roztoku 3-acetoxibenzylaminohydrochloridu (0,105 g, 0,52 mmol) a triethylaminu (0,2 ml, 1,42 mmol) v dichlormethanu (0,2 ml). Reakce se nechá probíhat 90 minut při okolní teplotě, potom se zředí s dichlormethanem (20 ml) a promyje se postupně s 0,5 N HCl (10 ml), solankou (10 ml), nasyceným roztokem NaHCO_3 (10 ml) a solankou (10 ml). Vodná vrstva se opět zpětně propláchne s dichlormethanem (10 ml). Spojené, suché (Na_2SO_4) organické vrstvy se koncentrují na 0,2 g oleje, který se chromatografuje (silikagel, 15 g). Produkt se eluuje z kolony směsí diethyletheru a hexanu (4:1) a diethyletheru a po odpaření se získá příslušná frakce, 165 mg methylesteru 4-[(3-acetoxibenzylamino)sulfonyl]-2-chlorbenzoové kyseliny

jako bezbarvá pevná látka. FAB HRMS: ($C_{17}H_{16}ClNO_6S$) nalezeno hmot. 398,0469. Vypočteno hmot. 398,0465 (M+H).

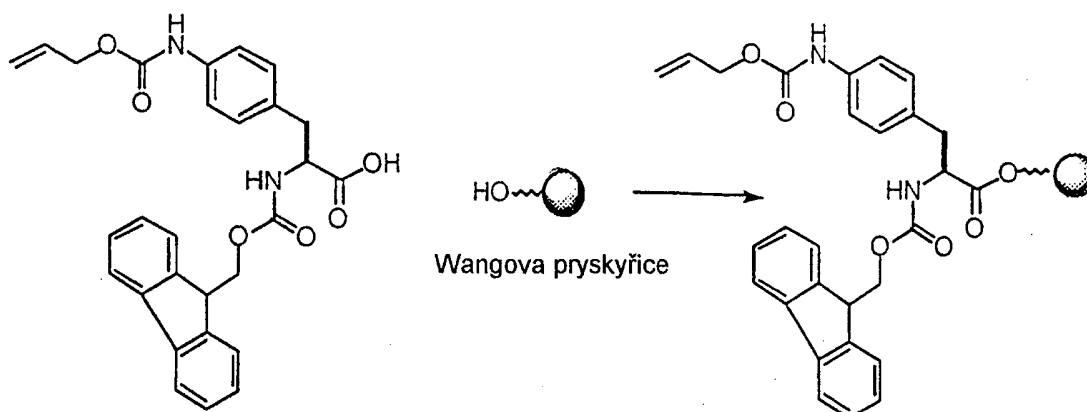
b. Míchaný roztok methylesteru 4-[(3-acetoxybenzylamino)-sulfonyl]-2-chlorbenzoové kyseliny (163 mg, 0,41 mmol) v methanolu (3 ml) a tetrahydrofuranu (3 ml) se zpracuje při teplotě místnosti s vodným 1 N roztokem hydroxidu litného (1,65 ml). Po 2 hodinách se těkavé podíly odstraní za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí ve vodě (15 ml) a roztok se filtruje přes celit. Filtrát se okyselí 1 N HCl (2 ml) a extrahuje se ethylacetátem (3 x 10 ml). Extrakty se opět zpětně propláchnou solankou, potom se suší (Na_2SO_4) a odpaří se ve vakuu a získá se 140 mg 2-chlor-4-[(3-hydroxybenzylamino)sulfonyl]benzoové kyseliny. Malý vzorek produktu se krystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se bezbarvá pevná látka, teploty tání 167 až 169 °C. FAB HRMS: ($C_{14}H_{12}ClNO_5S$) nalezeno hmot. 342. Vypočteno hmot. 342 (M+H).

c. Roztok 2-chlor-4-[(3-hydroxybenzylamino)sulfonyl]benzoové kyseliny (50 mg, 0,146 mmol), methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (60 mg, 0,1486 mmol), HBTU (5 mg, 0,15 mmol) a DIPEA (0,102 ml, 0,585 mmol) v dimethylformamidu (3 ml) se míchá 17 hodin pod argonem při teplotě místnosti a potom se koncentruje do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rozdělí mezi dichlormethan (25 ml) a 0,5 N HCl (25 ml). Oddělená vodná fáze se znovu extrahuje s dichlormethanem (10 ml), organické extrakty se promyjí opět vodou (2 x 25 ml). Spojené dichlormethanové vrstvy se suší (Na_2SO_4) a odpařením se získá 90 mg surového produktu jako tmavý olej. Chromatografií oleje přes silikagel (9 g, 4:1 směs ethylacetátu a hexanu) se získá 55 mg methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino)sulfonyl]fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu, jako bezbarvá pevná látka. FAB HRMS: ($C_{31}H_{26}Cl_3N_3O_7S$) nalezeno hmot. 690,0639. Vypočteno hmot. 690,0635 (M+H).

d. Vodný roztok 1 N roztoku hydroxidu litného (0,25 ml) se přidá k roztoku methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-amino]-N-[[[2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]sulfonyl]-fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu (51 mg, 0,0738 mmol) v methanolu (0,5 ml) a tetrahydrofuranu (0,35 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 90 minut, a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Surový produkt v minimálním množství methanolu se potom aplikuje do kolony silikagelu (5 g) uloženém ve směsi chloroformu, methanolu, kyseliny octové a vody (15:3:1:0,6). Kolona se eluuje stejnou směsí rozpouštědel a příslušné frakce se spojí a odpaří. Zbytek se lyofilizuje z deionizované vody a získá se 36 mg 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[[2-chlor-4-[[[(3-hydroxyfenyl)methyl]amino]sulfonyl]-fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu jako ne zcela bílá pevná látka. FAB HRMS: ($C_{30}H_{24}Cl_3N_3O_7S$) nalezeno hmot. 676,0482. Vypočteno hmot. 676,0479 (M+H).

Příklad 35

Vazba N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu na Wangovu pryskyřici



250 ml. cylindrická nádoba opatřená hrubou skleněnou fritou se naplní 10 g Wangovy pryskyřice (faktor plnění 1,15 mmol/g,

300 mesh). Pryskyřice se promyje dichlormethanem (2 x 100 ml), methanolem (2 x 100 ml) a dimethylformamidem (2 x 100 ml). K nabobtnalé pryskyřici se přidá N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-L-fenylalanin (11,2 g, 23 mmol) a 2,6-dichlorbenzoylchlorid (8,06 ml, 57,5 mmol) v N-methylpyrrolidonu (70 ml) a směs se míchá 30 minut. Přidá se pyridin (6,45 ml, 80,5 mmol) a vzniklá směs se míchá 24 hodin. Kvantitativním UV měřením Fmoc přítomné na pryskyřici byla nalezena substituce 0,75 mmol N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-4-[[[(2-propenyl-oxy)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu na gram pryskyřice.

Příklad 36

Příprava 4-amino-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu na Wangovu pryskyřici

500 ml cylindrická skleněná nádoba opatřená hrubou skleněnou fritou se naplní Wangovou pryskyřicí substituovanou N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-4-[[[(2-propenyloxy)karbonyl]amino]-L-fenylalaninem (10 g) získanou z příkladu 35 a roztokem připraveným z $\text{Pd}(\text{PhP})_2\text{Cl}_2$ (1,6 g, 2,3 mmol) a kyselinou octovou (5 ml, 83 mmol) v suchém dichlormethanu (150 ml). Vzniklá směs se míchá 30 minut a následuje přidání tri-n-butylcínhydridu (20 ml, 74,3 mmol). Vzniklá směs se míchá 1 hodinu. Ke směsi se přidá tri-n-butylcínhydrid (10 ml, 37 mmol). Míchání pokračuje 1 hodinu a směs se filtruje. Ke vzniklé směsi se přidá roztok připravený z $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ (1,6 g, 2,3 mmol) a kyselina octová (5 ml, 83 mmol) v suchém dichlormethanu (150 ml). Směs se míchá 30 minut a následuje přidání tri-n-butylcínhydridu (20 ml, 74,3 mmol). Vzniklá směs se míchá 1 hodinu. Ke směsi se přidá další tri-n-butylcínhydrid (10 ml, 37,15 mmol). Míchání pokračuje 1 hodinu. Po druhém deprotektčním cyklu se směs promyje dichlormethanem (2 x 100 ml), methanolem (2 x 100 ml) a dimethylformamidem (2 x 100 ml) a získá se 4-amino-N-[(9H-

-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalanin na Wangově pryskyřici vhodný pro použití v následujících stupních.

Příklad 37

Příprava 4-[[[(4-chinolinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu na Wangově pryskyřici

250 ml cylindrická skleněná nádoba opatřená hrubou skleněnou fritou se naplní 4-amino-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninem na Wangově pryskyřici (10 g) získanou v příkladu 36 a roztokem připraveným z chinolin-4-karboxylové kyseliny (5,2 g, 30 mmol), BOP (13,75 g, 30 mmol) a diisopropylethylaminu (6,8 ml) v 70 ml NMP. Kaše se míchá po dobu 4 hodin. Směs se filtruje a promyje s dichlormethanem (200 x 100 ml), methanolem (2 x 100 ml) a dimethylformamidem (2 x 100 ml). K promyté pryskyřici se přidá roztok 25% piperidinu v NMP (80 ml), směs se míchá při teplotě místnosti 20 minut a filtruje se. Postup se opakuje a kaše se filtruje a promyje se dichlormethanem (2 x 100 ml), methanolem (2 x 100 ml) a dimethylformamidem (2 x 100 ml). Filtrací se získá 4-[[[(4-chinolinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin na Wangově pryskyřici vhodný pro použití v dalším stupni.

Příklad 38

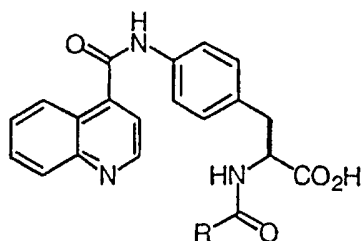
Příprava N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-4-[[[(4-chinolinyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

4-[[[(4-Chinolinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin na Wangově pryskyřici (300 mg, 0,20 mmol) se promyje dichlormethanem (2 x 10 ml), methanolem (2 x 10 ml) a dimethylformamidem (2 x 10 ml). K pryskyřici se přidá při teplotě místnosti roztok připravený z 2,6-dimethylbenzoové kyseliny (150 mg, 1,0 mmol), BOP (450 mg, 1,02 mmol) a diisopropylethylaminu (0,23

ml) ve 4 ml N-methylpyrrolidonu. Vzniklá směs se míchá 2 hodiny. Reakční směs se se potom filtruje a promyje se dichlormethanem (2 x 10 ml), methanolem (2 x 10 ml) a dichlormethanem (10 ml). Štěpení se provede působením 90% kyseliny trifluoroctové (TFA) v dichlormethanu po dobu 5 hodin. Směs se filtruje a TFA se odstraní ve vysokém vakuu. Přidání etheru (25 ml) způsobí vysrážení N-[(2,6-dimethyl-fenyl)karbonyl]-4-[[4-chinolinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (0,16 g).

Příklady 39 až 49

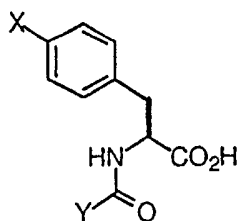
Za použití postupu popsaném v příkladu 38 se sloučenina uvedená dále připraví vycházeje z 4-[[4-chinolinyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a vhodných derivátů kyseliny benzoové



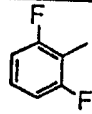
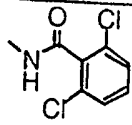
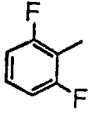
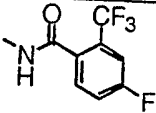
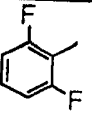
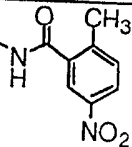
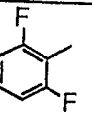
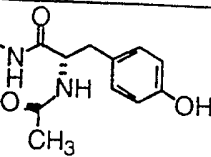
Příklad	R	MW
39		484,467
40		518,912
41		474,902
42		458,473
43		457,460
44		487,93
45		473,91
46		481,55
47		518,366
48		563,36
49		475,45

Příklady 50 až 61

Za použití postupu popsaném v příkladech 37 až 38 se připraví z následující sloučeniny z 4-amino-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu na Wangově pryskyřici a vhodných karboxylových kyselin:



Příklad	Y	X
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		

58		
59		
60		
61		

Příklad 62

Příprava N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-4-[[[(2,4,6-trimethylfenyl)sulfonyl]amino]]-L-fenylalaninu

Wangova pryskyřice plněná s 4-amino-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninem (3,0 g, 2,28 mmol) v pyridinu (15 ml) se ochladí na 0 °C a přidá se 2,4,6-benzensulfonylchlorid (2,49 g, 11,4 mmol) a směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Směs se filtruje a pryskyřice se promyje methanolem a dichlormethanem. Kopulační postup se opakuje. K promyté pryskyřici se přidá roztok 25% piperidinu v N-methylpyrrolidonu (10 ml), směs se míchá při teplotě místnosti 20 minut a filtruje. Postup se opakuje a vzniklá kaše se filtruje a promyje se dichlormethanem (2 x 10 ml), methanolem (2 x 10 ml) a dimethylformamidem (2 x 10 ml). Filtrací se získá 4-[[[(2,4,6-trimethylfenyl)sulfonyl]amino]]-L-fenylalanin na Wangově pryskyřici vhodný pro použití v dalším stupni.

Vzorek shora uvedené pryskyřice (0,3 g, 0,28 mmol) se suspenduje v N-methylpyrrolidinonu (3 ml) a zpracuje se s

2,6-dimethylbenzoovou kyselinou (171 mg, 1,14 mmol), BOP (0,50 g, 1,14 mmol) a DIPEA (0,26 ml, 1,4 mmol). Směs se míchá při teplotě místnosti 3 hodiny, filtruje se a promyje se dichlormethanem (2 x 10 ml), methanolem (2 x 10 ml) a dichlormethanem (2 x 10 ml). Štěpení se provede s 90% kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu během 5 minut. Směs se filtruje a TFA se odstraní ve vysokém vakuu. Přídavek esteru (25 ml) působí vysrážení N-[(2,6-dimethylfenyl)-karbonyl]-4-[[[(2,4,6-trimethylfenyl)sulfonyl]amino]]-L-fenylalaninu.

Příklad 63

N-(2-Brombenzoyl)-4-[[[(2,4,6-trimethylfenyl)sulfonyl]amino]]-L-fenylalanin se připraví z 4-[[[(2,4,6-trimethylfenyl)sulfonyl]amino]]-L-fenylalaninu na Wangově pryskyřici a 2-brombenzoové kyseliny za použití obecné metody popsané v příkladu 62.

Příklad 64

Příprava 4-[[[(4-kyano-4-fenyl-1-piperidiny)karbonyl]amino]]-N-(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

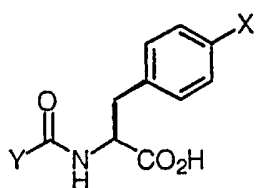
4-Amino-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalanin na Wangově pryskyřici (3,0 g, 2,04 mmol) se vloží do nádoby opatřené skleněnou fritou a suspenduje se v dichlormethanu (50 ml) a DIPEA (0,98 ml, 5,6 mmol). Směs se třepe 15 minut a v jedné dávce se přidá trifosgen (1,1 g, 3,7 mmol). Směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Směs se filtruje a promyje se dichlormethanem (3 x 25 ml). Pryskyřice se suspenduje v dichlormethanu (50 ml) a DIPEA (1,0 ml, 5,6 mmol) a přidá se hydrochlorid 4-kyano-4-fenylpiperidinu (2,73 g, 12,2 mmol). Vzniklá směs se míchá 4 hodiny. Reakční směs se potom filtruje a promyje se dichlormethanem (2 x 50 ml), methanolem (2 x 50 ml), dimethylformamidem (2 x 50 ml) a

methanolem (2 x 10 ml). Štěpení skupiny Fmoc se provede zpracováním s 25% piperidinem v N-methylpyrrolidinonu (2 x 15 minut).

Shora uvedená pryskyřice (0,3 g, 0,20 mmol), 2,6-dimethylbenzoová kyselina (0,15 g, 1 mmol) se suspenduje v N-methylpyrrolidinonu (3 ml) a zpracuje se s BOP-Cl (0,26 g, 1,0 mmol) a DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol). Směs se míchá při teplotě místnosti 3 hodiny a filtruje se. Reakční směs se potom filtruje a promyje se dichlormethanem (2 x 10 ml), methanolem (2 x 10 ml) a dichlormethanem (2 x 10 ml). Štěpení se provede 90% kyselinou trifluoroctovou (TFA) v dichlormethanu po dobu 3 minut. Směs se filtruje a TFA se odstraní ve vysokém vakuu. Přidání etheru (25 ml) způsobí vysrážení 4-[[[(4-kyano-4-fenyl-1-piperidiny)karbonyl]amino]-N-(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu.

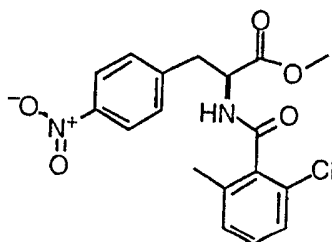
Příklady 65 až 66

Za použití postupu popsaném v příkladu 64 se připraví následující sloučeniny



Příklad	Y	X
65		
66		

Příklad 67



Příprava methylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-nitro-L-fenylalaninu

K roztoku hydrochloridu methylesteru 4-nitro-L-fenylalaninu (1,527 g, 5,86 mmol), 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny (1,0 g, 5,86 mmol) a DIPEA (3,2 ml, 2,3 g, 18 mmol) v DMF (10 ml) se přidá při teplotě místnosti HBTU (2,22 g, 5,86 mmol). Po 4 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs zředí ethylacetátem (20 ml) a organická vrstva se promyje vodou (20 ml), 1 N HCl, NaHCO₃ a solankou (2 x 30 ml pro každé rozpouštědlo) a suší se nad Na₂SO₄. Po odstranění rozpouštědla se zbytek čistí chromatografií na silikagelu eluováním směsí ethylacetátu a hexanu (1:2) a získá se methylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-nitro-L-fenylalaninu (1,71 g, 4,50 mmol, 77,6 %), teploty tání 123 až 124 °C. Analýza (C₁₈H₁₇ClN₂O₅) vypočteno: C, 57,38. H, 4,55. N, 7,43. Nalezeno: C, 57,11. H, 4,58. N, 7,27.

Příklad 68

Příprava methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu

Methylester N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-nitro-L-fenylalaninu (1,51 g, 4,0 mmol) a SnCl₂·H₂O (4,5 g, 20 mmol) se suspenduje v 30 ml ethanolu. Suspenze se míchá při teplotě lázně 97 °C po dobu 1 hodiny. Potom se ochladí na teplotu místnosti, rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v 15

ml vody. Vodný roztok se alkalizuje přidáním pevného K_2CO_3 na $pH > 10$ a extrahuje se ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené extrakty se suší nad K_2CO_3 a koncentrací se získá methylester 4-amino-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalaninu jako světle žlutá pěna (1,37 g).

Příklad 69

Příprava methylesteru (S)-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-
-[[[1-(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-2-piperidiny]karbonyl]-
amino]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-
karbonyl]-L-fenylalaninu (347 mg, 1,0 mmol) v DMF (2,0 ml) se
zpracuje při teplotě místnosti po dobu 6 hodin s 1-(1,1-
-dimethyl)ethylesterem (S)-piperidin-1,2-dikarboxylové
kyseliny (347 mg, 1,0 mmol), HBTU (380 mg, 1,0 mmol) a DIPEA
(0,54 ml, 3,0 mmol). Reakční směs se zředí 6 ml vody a
sraženina se sebere filtrací a promyje se vodou (2 x 2 ml).
Po sušení ve vakuu se světle žlutý prášek rekrystaluje ze
směsi ethylacetátu a hexanu a získá se methylester (S)-N-(2-
chlor-6-methylbenzoyl)-4-[[[1-(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-
-2-piperidiny]karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (507 mg, 0,82
mmol, 82 %) jako bílá pevná látka, teploty tání 87 až 91 °C.
HRMS: vypočteno hmot. 558,2371. Nalezeno hmot. 558,2359 (M+H).

Příklad 70

Příprava hydrochloridu methylesteru (S)-N-(2-chlor-6-
-methylbenzoyl)-4-[[2-piperidiny]karbonyl]amino]-L-
-fenylalaninu

Roztok methylesteru (S)-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-
-[[[1-(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-2-piperidiny]karbonyl]-
amino]-L-fenylalaninu (475 mg, 0,85 mmol) ve 2 ml
dichlormethanu se zpracuje s 4 N HCl v dioxanu (2 ml). Roztok

se míchá při teplotě místnosti po dobu 4 hodin a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Zbytek se zpracuje s 50 ml etheru a světle žlutá sraženina se sebere a sušením ve vakuu se získá hydrochlorid methylesteru (S)-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[[(2-piperidiny)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (440 mg, 0,89 mmol, >100%) jako světle žlutý prášek. ES MS: 458 (100 %) (M+H). NMR (DMSO-d₆, d, ppm): 10,26 (s, 1H), 9,30 (bd, 1H), 9,00 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,80 (bt, 1H), 7,65 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 7,24 (m, 5H), 4,70 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,32 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,25 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 1,70 (m, 5H).

Příklad 71

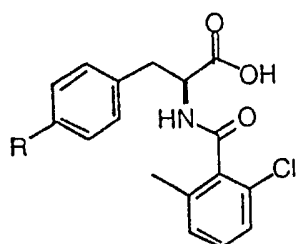
Příprava N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(8aS)-hexahydro-3-(4-hydroxyfenyl)-1-oxoimidazol[1,5-a]pyridin-2-yl]fenylalaninu

Hydrochlorid methylesteru (S)-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[[(2-piperidiny)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (100 mg, 0,2 mmol), DIPEA (0,10 ml, 0,54 mmol) a 4-hydroxybenzaldehyd (30 mg, 0,25 mmol) se přidá k suspenzi aktivovaných 3A molekulárních sít (100 mg) v THF (1,5 ml). Vzniklá směs se míchá při teplotě místnosti přes noc a při teplotě 60 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti se směs chromatografuje na silikagelové koloně a eluuje se směsí ethylacetátu a hexanu (2:1) a získá se methylester N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(8aS)-hexahydro-3-(4-hydroxyfenyl)-1-oxoimidazol[1,5-a]pyridin-2-yl]fenylalaninu (17,5 mg, 0,031 mmol) jako pěna. Methylester (17,5 mg, 0,031 mmol) se hydrolyzuje 1 N NaOH (0,1 ml, 0,1 mmol) v 0,5 ml ethanolu při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Reakční směs se okyselí na pH<2 s TFA a čistí se na RP-HPLC a získá se N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(8aS)-hexahydro-3-(4-hydroxyfenyl)-1-oxoimidazol[1,5-a]pyridin-2-yl]fenylalanin (8,3 mg, 0,015 mmol) v 7,5% výtěžku. HRMS: vypočteno hmot. 548,1952. Nalezeno

hmot. 548,1938 (M+H).

Příklad 72 až 74

Za použití postupu popsaném v příkladu 71 se připraví sloučeniny uvedené dále.



25

Příklad	R	Vypočt. hmot. (M+H)	Nalez. hmot. (M+H)
72		548,1952	548,1938
73			
74		608,1904	608,1910

Příklad 75

Příprava methylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[[(2R)-2-amino-4-methyl-1-oxopentyl]amino]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-

karbonyl]-L-fenylalaninu (561 mg, 1,61 mmol), připravený za použití postupu příkladu 68, v DMF (4,5 ml) se zpracuje s N-Boc-D-leucinem (393,2 mg, 1,7 mmol), HBTU (644,3 mg, 1,7 mmol) a DIPEA (0,62 ml, 3,50 mmol) při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Reakční směs se zředí 30 ml vody a bílá sraženina se sebere filtrací a promyje se vodou (2 x 2 ml). Po sušení ve vakuu se světle žlutý prášek rekrystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se methylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[[(2R)-2-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]amino-4-methyl-1-oxopentyl]amino]-L-fenylalaninu (920 mg) jako bílá pevná látka. MS 560 (M+H, 1 Cl). Tato pevná látka se rozpustí v 4 N HCl v dioxanu (5 ml). Roztok se míchá při teplotě místnosti přes noc. Po zředění s etherem se bílá suspenze nechá stát při -5 °C po dobu 1 hodiny. Bílá pevná látka se sebere filtrací a suší se ve vakuu po dobu 5 hodin. Shora uvedená pevná látka se potom rozpustí v 20 ml vody a roztok se zpracuje hydrogenuhlíčitanem sodným a potom K₂CO₃ na pH >9. Směs se potom extrahuje dichlormethanem (2 x 25 ml) a suší se nad síranem sodným. Po odstranění rozpouštědla se zbytek suší ve vakuu při 50 °C přes noc a získá se bílá pevná látka (520 mg, 1,1 mmol) v 70% celkovém výtěžku. HRMS: nalezeno hmot. 460,1997. Vypočteno hmot. 460,2003 (M+H).

Příklad 76 až 77

4-[(2S,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(2-methylpropyl)-5-oxo-imidazolidin-1-yl]-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalanin a 4-[(2R,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(2-methylpropyl)-5-oxo-imidazolidin-1-yl]-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalanin

Methylester (S)-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-((2R)-2-amino-4-methyl-1-oxopentyl)amino]-L-fenylalaninu (100 mg, 0,2 mmol) se rozpustí ve směsi THF/CH(OMe)₃ (1/1, 1,0 ml). K roztoku se potom přidá benzaldehyd (21,2 mg, 0,2 mmol) a roztok se míchá při teplotě místnosti. Po 24 hodinách se

reakční směs zahřívá na 95 °C a injekční stříkačkou se přidá acetanhydrid (0,1 ml, 1,0 mmol) a roztok se míchá při 110 °C po dobu 3 hodin. Po odpaření rozpouštědla se zbytek zředí ethylacetátem a promyje se dvakrát nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Po odstranění rozpouštědla se zbytek rozpustí ve 3 ml směsného rozpouštědla (THF/ethanol/H₂O = 2/2/1) a zpracuje se 1 N hydroxidem sodným (0,2 ml, 0,2 mmol). Po 4 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs ochladí s 0,5 ml kyseliny octové a surový produkt se čistí na RP-HPLC (C18, 5-95-35-214) a získá se trans izomer 4-[(2S,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(2-methylpropyl)-5-oxo-imidazolidin-1-yl]-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalaninu (27 mg, 46 μmol), HRMS (M+H): nalezeno hmot. 576,2251. Vypočteno hmot. 576,2265. Odpovídající cis izomer 4-[(2R,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(2-methylpropyl)-5-oxo-imidazolidin-1-yl]-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalaninu (50,1 mg, 86 μmol) má HRMS (M+H): vypočteno: hmot. 576,2265. Nalezeno hmot. 576,2250.

Příklad 78

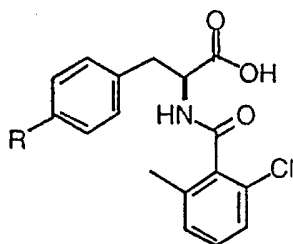
Příprava N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(S)-hexahydro-1,3-dioxoimidazol[1,5-a]pyridin-2-yl)]-L-fenylalaninu

K roztoku hydrochloridu methylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(S)-(2-piperidiny)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (50 mg, 0,1 mmol) a DIPEA (0,020 ml, 0,1 mmol) v 0,2 ml dichlormethanu se přidá při teplotě místnosti karbonyldiimidazol (16,2 mg, 0,1 mmol). Reakční směs se zředí ethylacetátem na 5 ml a organická vrstva se promyje 1 N HCl, nasyc. NaHCO₃ a solankou (2 x 1 ml každého rozpouštědla) a suší se nad Na₂SO₄. Rozpouštědlo se potom odstraní ve vakuu a získá se světle žlutá pevná látka (53,4 mg, 0,11 mmol). Shora uvedená pevná látka se potom rozpustí v ethanolu (1 ml) a míchá se při teplotě místnosti s 1 N NaOH (0,1 ml, 0,1 mmol)

po dobu 6 hodin. Reakční směs se okyselí na pH < 2 s TFA a čistí se na RP-HPLC a získá se N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-4-[(S)-hexahydro-1,3-dioxoimidazol[1,5-a]pyridin-2-yl)]-L-fenylalanin (27,0 mg, 0,057 mmol) v 57% celkovém výtěžku. HRMS: Nalezeno hmot. 470,1465, vypočteno hmot. 470,1483 (M+H).

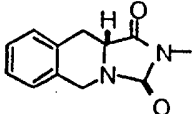
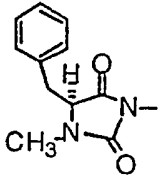
Příklady 79 až 84

Za použití postupů popsaných v příkladech 69, 70 a 78 se připraví z methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu a příslušných derivátů aminokyselin následující sloučeniny



10

Příklad	R	IC50 nM	HRMS (H+H) Vypočt. hmot.	HRMS (M+H) Nalez. hmot.
79		0.53	444,1326	444,1320
80		0.24	472,1639	472,1643
81		0.49	472,1639	472,1643
82		0.56	486,1795	486,1818

83		0.72	518,1482	518,1469
84		0.73	520,1639	520,1629

Příklad 85

Příprava methylesteru 4-nitro-N-[(2,6-dimethylfenyl)-
karbonyl]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru 4-nitrofenylalaninu (5,21 g, 20 mmol) v 20 ml dichlormethanu a DIPEA (15 ml) se zpracuje s 2,6-dimethylbenzoylchloridem. Po 4 hodinách se směs koncentruje, zbytek se převede do ethylacetátu (200 ml) a promyje se 1 N HCl (50 ml), nasyceným NaHCO₃ (50 ml) a nasycenou solankou (30 ml) a suší se (MgSO₄). Filtrací a koncentrací se získá 8,0 g pevné látky, která se čistí HPLC (Waters Preb 500 - dvojitá silikagelová patrona; 1:1 ethylacetát-hexan) a získá se methylester 4-nitro-N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (5,26 g, 74 %).

Příklad 86

Methylester 4-amino-N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví za použití postupu popsáném v příkladu 68; z methylesteru 4-nitro-N-[(2,6-dimethylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu (5,2 g, 14,6 mmol) se získá methylester 4-amino-N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (4,6 g, 97 %) jako světle žluté sklo.

Příklad 87

Příprava 4-[[(4-karboxy-3-pyridinyl)karbonyl]amino]-N-
-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a 4-[[(3-
-karboxy-4-pyridinyl)karbonyl]amino]-N-[(2,6-dimethylfenyl)-
karbonyl]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru 4-mino-N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-L-
-fenylalaninu (530 mg, 1,162 mmol) a anhydridu 3,4-pyridin-
dikarboxylové kyseliny v dichlormethanu (30 ml) se míchá přes
noc a sraženina se sebere. Pevná látka se rozpustí v THF (100
ml), filtruje se a koncentruje a získá se 1 g směsi
izomerních karboxylových kyselin. Tento materiál se rozpustí
v ethanolu (50 ml) a zpracuje se s 1 N NaOH (15 ml, 15 mmol)
a míchá se 2,5 hodiny. Směs se okyselí přebytkem kyseliny
octové a čistí se ve 3 dávkách na Raininově RP-HPLC a získá
se 0,6 g bílé pevné látky, jako směs izomerních
dikarboxylových kyselin.

Příklad 88

Příprava 4-(2,3-dihydro-1,3-dioxo-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-2-
-yl)-N-(2,6-dimethylbenzoyl)-L-fenylalaninu

Roztok směsi kyselin z příkladu 87 (272 mg, 0,59 mmol) v DMF
(10 ml) se zpracuje s karbonyldiimidazolem (385 mg, 2,4 mmol)
a nechá se míchat přes noc. Směs se filtruje a čistí přímo
HPLC na Raininově zařízení a po lyofilizaci se získá produkt,
4-(2,3-dihydro-2,3-dioxo-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-2-yl)-N-
-(2,6-dimethylbenzoyl)-L-fenylalanin (108 mg, 41 %), FAB
HRMS: nalezeno hmot. 444,1548. Vypočteno hmot. 444,1559 (M+H).

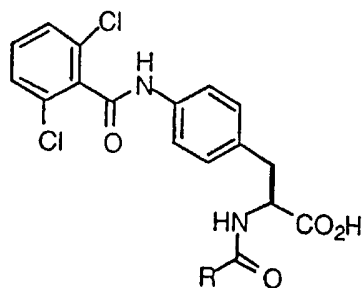
Příklad 89

Příprava N-[(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-4-[(R,S)-
-2,3,5,6,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-2-
-yl]-L-fenylalaninu

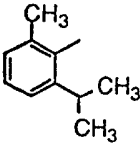
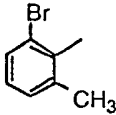
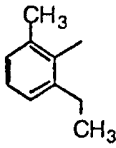
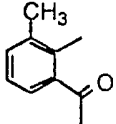
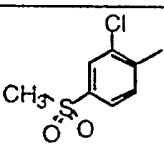
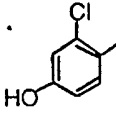
Roztok 4-(2,3-dihydro-1,3-dioxo-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-2-yl)-N-(2,6-dimethylbenzoyl)-L-fenylalaninu (108 mg, 0,24 mmol) v ethanolu:THF (25 ml, 1:1) se hydrogenuje přes 10% Pd/C (20 mg) po dobu 4 hodin. Směs se filtruje, koncentruje a RP-HPLC na Raininově zařízení pro HPLC. První produkt k eluování se lyofilizuje a získá se N-(2,6-dimethylfenyl)karbonyl]-4-[(R,S)-2,3,5,6,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-2-yl]-L-fenylalanin (29 mg, 27 %), FAB HRMS: nalezeno, 448,1862. Vypočteno, 448,1873 (M+H). Druhý produkt k eluování se lyofilizuje a získá se výchozí materiál (47 mg, 43 %).

Příklady 90 až 96

Sloučeniny uvedené dále se připraví za použití způsobů popsaných v příkladu 13 hydrolýzou methylesterových derivátů 4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-aroyl-L-fenylalaninu



Příklad	Výchozí materiál	R	IC50 nM	IC50 Ramos nM	HRMS	
					Vypočteno	Nalezeno

90	Příklad 174		1.2	23	513,1348	513,1363
91	Příklad 175		0.20	9.3	548,9983	548,9969
92	Příklad 176		0.3	10	499,1191	499,1193
93	Příklad 162		1.6	49	533,0438	533,0460
94	Příklad 167		0.25	9.5	569,0107	569,0109
95	Příklad 172		0.46	33	529,0100	529,0097

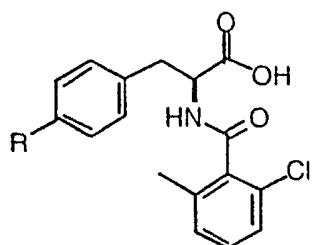
Příklad 96

Methylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-[(R)-2,5-dioxo-3-methyl-4-(1-methylethyl)-1-imidazolininyl]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-amino-N-(2-chlor-6-methylebnzoyl)-L-fenylalaninu a N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-N-methyl-D-valinu za použití postupu popsaném v příkladech 69, 70 a 78.

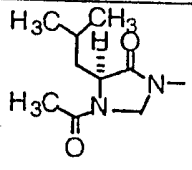
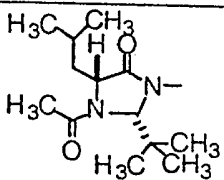
Příklad 97 až 102

Za použití postupů popsaných v příkladech 75, 76 a 77 se připraví následující sloučeniny z methylesteru 4-amino-N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-L-fenylalaninu a vhodných

Boc-chráněných aminokyselin.

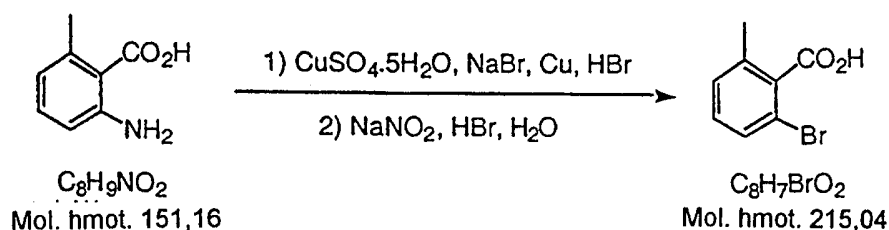


Příklad	R	HRMS (M+H)	HRMS (M+H)	IC50 (nM)
		Vypočt.	Nalez.	
97		592,2214	592,2200	0.44
98		592,2214	592,2210	2.35
99		576,2265	576,2240	0.58
100		576,2265	576,2252	10.0

101		500,1953	500,1940	9.90
102		556,2578	556,2582	41

Příklad 103

Příprava 2-brom-6-methylbenzoové kyseliny

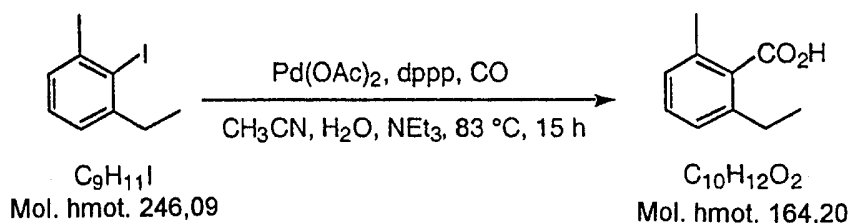


Bromid mědný se připraví zahříváním tmavého purpurového roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (33 mmol, 8,25 g) a NaBr (66 mmol, 6,75 g) v HBr (33 ml, 48 %) a přidáním Cu prášku (66 mmol, 4,2 g) po částech, dokud se purpurový roztok nestane bezbarvým. Tento roztok se potom přidá po částech k horkému roztoku (cca 90 °C) 2-amino-6-methylbenzoové kyseliny (33 mmol, 5 g) v H_2O (80 ml) a HBr (11,5 ml). Potom se přidá po kapkách k tomuto míchanému zahřívávanému roztoku v průběhu 25 minut roztok NaNO_2 (99 mmol, 6,85 g) v H_2O (20 ml). Tmavá nahnědlá směs se zahřívá na cca 90 °C po dobu 1 hodiny potom se zahřívá při zpětném toku dalších 30 minut, ochladí se teplotu místnosti a míchá se další 2 hodiny. Směs se potom vlije do ledu (cca 500 g), a přidá se 5% roztok NaOH do pH 14 a vzniklá tmavá suspenze se filtruje přes celit. Žlutý filtrát se okyselí s koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakcí (Et_2O , 3 x 150 ml) se

získá tmavý zbytek, který se rozpustí v Et₂O (100 ml), přidá se aktivní uhlí a vzniklý roztok se zahřívá při refluxu. Filtrací a koncentrací se získá materiál, který rekrystaluje z Et₂O/petrolether v hexanu (100 ml) a získá se 2-brom-6-methylbenzoová kyselina (3,5 g, 49 %, HRMS: nalezeno hmot. 213,9633. Vypočteno hmot. 213,9629, M+) jako krystalická, slabě růžová pevná látka; teplota tání 104 až 106 °C.

Příklad 104

Příprava 2-ethyl-6-methylbenzoové kyseliny



250 ml tlaková nádoba se naplní s 2-ethyl-6-methyljodbenzenem (30,07 mmol, 7,4 g), Pd(OAc)₂ (1,43 mmol, 334 mg) a dppp (1,43 mmol, 620 mg). Nádoba se uzavře septem a třikrát se evakuuje s argonem. Potom se injekční stříkačkou postupně přidá acetonitril (96 ml), triethylamin (189 mmol, 19,0 g, 26,25 ml) a voda (19,1 ml). Potom se pryžové septum nahradí teflonovým uzávěrem připojeným ke zdroji oxidu uhelnatého. Nádoba se potom natlakuje oxidem uhelnatým (0,2812 MPa) a přebytek tlaku se uvolní. Tento postup se opakuje třikrát a nakonec se směs míchá 5 minut pod tlakem 0,2812 MPa oxidu uhelnatého. Nádoba se potom odpojí od tlakové láhve s oxidem uhelnatým a ponoří se do přehřáté olejové lázně (83 až 85 °C). Reakční směs během 1 hodiny ztmavne a potom se míchá při této teplotě dalších 14 hodin. Potom se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a tlak se uvolní. Vzniklá směs se zředí etherem (200 ml) a 1,0 N NaOH (20 ml). Vzniklá kyselina se extrahuje do vody (2 x 100 ml). Spojené vodné extrakty se neutralizují 1,0 N HCl a kyselina se extrahuje do

dichlormethanu (3 x 100 ml). Spojené dichlormethanové extrakty se promyjí roztokem solanky a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla ve vakuu se získá 3,58 g (72,5 %) viskózního hnědého oleje, který pomalu přes noc tuhne. HRMS: nalezeno hmot. 164,0833. Vypočteno hmot. 164,0837 (M^+).

Příklad 105

Příprava 2-chlor-6-acetylbenzoové kyseliny

a) Příprava 1-acetyl-3-chlor-2-[[trifluormethyl)sulfonyl]oxy]benzenu

K roztoku 1-acetyl-6-chlorfenolu (2,9 mmol, 0,5 g) v dichlormethanu (33 ml) se přidá 4-(N,N-dimethylamino)pyridin (6,54 mmol, 0,8 g) při -70°C a následuje přidání při -70°C anhydridu kyseliny trifluormethansulfonové (4,33 mmol, 1,22 g, 0,73 ml). Po přidání se suspenze míchá 30 minut při této teplotě a potom se ohřeje na teplotu místnosti a míchá se další 3 hodiny, kdy TLC reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Směs se zředí H_2O (50 ml) a obě vrstvy se oddělí. Vodná vrstva se extrahuje dichlormethanem (50 ml). Spojené dichlormethanové extrakty se promyjí roztokem solanky a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla za sníženého tlaku se získá žlutý olej, který se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu a získá se 0,76 g (86 %) bezbarvého oleje. HRMS: nalezeno hmot. 301,9617. Vypočteno hmot. 301,9627 (M^+).

b) Příprava 1-acetyl-3-chlorbenzoové kyseliny

Do 100 ml tlakové nádoby se vloží 1-acetyl-3-chlor-2-[[trifluormethyl)sulfonyl]oxy]benzen (2,41 mmol, 0,73 g), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,2 mmol, 47 mg) a dppp (0,2 mmol, 87 mg). Potom se nádoba uzavře septem a evakuuje se třikrát argonem. Potom

se postupně injekční sříkačkou přidá acetonitril (96 ml), triethylamin (188,7 mmol, 19,0 g, 26,25 ml) a voda (19,1 ml). Pryžové septum se nahradí teflonovým uzávěrem připojeným ke zdroji oxidu uhelnatého. Nádoba se potom natlakuje oxidem uhelnatým (0,2812 MPa) a přebytek tlaku se uvolní. Tento postup se opakuje třikrát a nakonec se směs míchá 5 minut pod tlakem 0,2812 MPa oxidu uhelnatého. Nádoba se potom odpojí od tlakové láhve s oxidem uhelnatým a ponoří se do předeřáté olejové lázně (83 až 85 °C). Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a tlak se uvolní. Vzniklá směs se zředí etherem (200 ml) a 1,0 N NaOH (20 ml). Vzniklá kyselina se extrahuje do vody (2 x 100 ml). Spojené vodné extrakty se neutralizují 1,0 N HCl a kyselina se extrahuje do dichlormethanu (3 x 100 ml). Spojené dichlormethanové extrakty se promyjí roztokem solanky a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla ve vakuu se získá surový zbytek, který se rekrystaluje z dichlormethanu (cca 10 ml) a hexanu (cca 8 ml) a uloží se do mrazáku přes noc. Vysrážená pevná látka se sebere filtrací a suší se ve vysokém vakuu a získá se 330 mg (69 %) bezbarvé pevné látky: teplota tání 128 až 129 °C. HRMS: nalezeno hmot. 198,0090, vypočteno hmot. 198,0084 (M^+).

Příklad 106

Příprava 2-isopropyl-6-methylbenzoové kyseliny

a) Příprava 2-(1-methylethyl)-6-methyljodbenzenu

K suspenzi 2-(1-methylethyl)-6-methylanilinu (15,57 mmol, 14,9 g) v koncentrované HCl (50 ml) a 30 g ledu se přidá po kapkách při teplotě -5 °C až 5 °C během 30 minut roztok NaNO_2 (110 mmol, 8 g) v H_2O (35 ml). Po přidání se červeně zbarvený roztok míchá dalších 30 minut. Potom se přidá po kapkách během 20 minut při teplotě 0 až 5 °C roztok KI (200 mmol, 33,2 g) v H_2O (50 ml). Po skončení přidávání se směs

nechá ohřát na teplotu místnosti, přičemž dochází k exotermní reakci za vývoje plynu. Vzniklý červeně zbarvený roztok se míchá 18 hodin. Potom se směs extrahuje ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené extrakty se promyjí roztokem thiosíranu sodného (200 ml), solankou a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a koncentrací rozpouštědla ve vakuu se získá zbarvená sloučenina, která se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu a získá se čistý 2-(1-methylethyl)-6-methyljodbenzen (17,8 g, 68 %) jako žlutý olej. HRMS: nalezeno hmot. 260,0063. Vypočteno hmot. 260,0062 (M^+).

b) Příprava 2-(1-methylethyl)-6-methylbenzoové kyseliny

250 ml tlaková nádoba se naplní s 2-(1-methylethyl)-6-methyljodbenzenem (25,2 mmol, 6,55 g), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (1,2 mmol, 280 mg) a dppp (1,2 mmol, 520 mg). Nádoba se uzavře septem a třikrát se evakuuje s argonem. Potom se injekční stříkačkou postupně přidá acetonitril (96 ml), triethylamin (188,7 mmol, 19,0 g, 26,25 ml) a voda (19,1 ml). Potom se pryžové septum nahradí teflonovým uzávěrem připojeným ke zdroji oxidu uhelnatého. Nádoba se potom natlakuje oxidem uhelnatým (0,2812 MPa) a přebytek tlaku se uvolní. Tento postup se opakuje třikrát a nakonec se směs míchá 5 minut pod tlakem 0,2812 MPa oxidu uhelnatého. Nádoba se potom odpojí od tlakové láhve s oxidem uhelnatým a ponoří se do předehřáté olejové lázně (83 až 85 °C). Reakční směs během 1 hodiny ztmavne a potom se míchá při této teplotě dalších 4 hodiny. Potom se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a tlak se uvolní. Vzniklá směs se zředí etherem (200 ml) a 1,0 N NaOH (10 ml). Vzniklá kyselina se extrahuje do vody (2 x 100 ml). Spojené vodné extrakty se neutralizují 1,0 N HCl a kyselina se extrahuje do ethylacetátu (2 x 100 ml). Spojené organické extrakty se promyjí roztokem solanky a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla ve vakuu se získá 2,8 g (62 %) viskózního žlutého oleje. HRMS: nalezeno hmot. 178,096. Vypočteno hmot. 178,0994 (M^+).

Příklad 107

N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)-
karbonyl]amino]-L-fenylalanin

a) Příprava hydrochloridu methylesteru [[(2,4-dimethyl-3-
-pyridyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

K roztoku methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)-
karbonyl]-L-fenylalaninu (1,4 g, 4,8 mmol) v DMF (12 ml) se
přidá při teplotě místnosti hydrochlorid 2,4-dimethyl-3-
-pyridinkarboxylové kyseliny (919 mg, 4,9 mmol), HBTU (1900
mg, 5 mmol) a diisopropylethylamin (2,7 ml, 15 mmol). Směs se
míchá 15 hodin a potom se zředí s 10 ml ethylacetátu a 10 ml
vody. Vrstvy se oddělí a vodná vrstva se extrahuje
ethylacetátem (2 x 20 ml). Spojené extrakty se promyjí
solankou a suší se nad bezvodým síranem hořečnatým. Filtrací
a koncentrací rozpouštědla se získá surový produkt, který se
čistí na silikagelu eluováním směsí ethylacetátu a hexanu
(2:1 až 4:1) a získá se methylester 4-[[[(2,4-dimethyl-3-
-pyridyl)karbonyl]amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-
-L-fenylalaninu (226 g). Tato sloučenina (220 mg) se zpracuje
při teplotě místnosti 6 ml 4 N kyseliny chlorovodíkové
v dioxanu. Po 5 minutách se pevná látka převede do roztoku a
směs se míchá 18 hodin a koncentruje se a získá se bílá pevná
látka (210 mg). Tento meziprodukt se použije v dalším stupni
syntézy bez dalšího čištění.

b) Příprava N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,4-dimethyl-3-
-pyridinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

Roztok hydrochloridu methylesteru 4-[[[(2,4-dimethyl-3-pyridyl)-
karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (50 mg, 0,125 mmol),
2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny (34 mg, 0,2 mmol), HBTU (76
mg, 0,2 mmol) a DIPEA (0,071 ml, 0,4 mmol) v DMF (0,5 ml) se

míchá 15 hodin při teplotě místnosti. Směs se zředí ethylacetátem (10 ml) a promyje se 0,5 N HCl (2 x 8 ml), nasyceným hydrogenuhlíčitanem sodným (2 x 8 ml) a solankou (2 x 8 ml) a suší se (Na_2SO_4). Roztok se filtruje a koncentruje na žlutou gumu, která se hydrolyzuje 1 N NaOH (0,5 ml) v MeOH (3 ml) při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Reakční směs se okyselí kyselinou octovou a čistí se HPLC za použití podmínek popsanych v příkladu 76 až 77 a získá se bílá pevná látka (23,3 mg). MS (M+H): 466 (1 Cl).

Příklad 108

N-(2-Brom-5-methoxybenzoyl)-4-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalanin se připraví z hydrochloridu methylesteru 4-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-brom-5-methoxybenzoové kyseliny za použití obecné metody popsané v příkladu 107. MS (M+H) 526 (1 Br).

Příklad 109

Příprava methylesteru 4-[[[(2-chlor-5-kyanofenyl)karbonyl]-amino]-L-fenylalaninu

a) Příprava methylesteru 4-[(2-chlor-5-bromfenylkarbonyl)-amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu

Ke směsi methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu (20 mmol, 5,88 g), 2-chlor-5-brombenzoové kyseliny (22 mmol, 5,18 g) a HBTU (22 mmol, 8,34 g) v DMF (70 ml) se přidá při teplotě místnosti diisopropylethylamin (50 mmol, 8,7 ml). Suspenze se míchá 48 hodin a v této době analýza TLC směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Směs se zředí vodou (100 ml) a pevné látky se seberou filtrací a promyjí se vodou (150 ml). Po sušení na vzduchu se surový produkt čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu a získá se 1,02 g (10 %) bílé

pevné látky: teplota tání 158 až 161 °C. HRMS: nalezeno hmot. 533,0442. Vypočteno hmot. 533,0455 (M+Na).

b) Příprava methylesteru 4-[[(2-chlor-5-kyanofenyl) karbonyl] - amino] -N- (1,1-dimethylethoxy) karbonyl] -L-fenylalaninu

Ke směsi methylesteru 4-[(2-chlor-5-bromfenylkarbonyl) amino] -N- (1,1-dimethylethoxy) karbonyl] -L-fenylalaninu (2 mmol, 1,02 g), kyanidu zinečnatého (1,3 mmol, 152 mg) a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,2 mmol, 231 mg) se přidá při teplotě místnosti destilovaný a deoxygenovaný DMF (8 ml). Suspenze se zahřívá na 80 až 85 °C a míchá se 15 hodin a v této době analýza TLC směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a zředí se ethylacetátem (70 ml) a promyje se 20% vodným hydroxidem amonným (50 ml), roztokem solanky (50 ml) a suší se nad bezvodým síranem hořečnatým. Filtrací sušidla a koncentrací rozpouštědla se získá surový produkt, který se čistí sloupcovou chromatografií na silkagelu a získá se 555 mg (61 %) bílé pevné látky: teplota tání 185 až 187 °C. HRMS nalezeno hmot. 480,1301. Vypočteno hmot. 480,1302 (M+Na).

c) Příprava TFA soli methylesteru 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl) amino] -L-fenylalaninu

K roztoku methylesteru 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl) amino] -N- (1,1-dimethylethoxy) karbonyl] -L-fenylalaninu (1,2 mmol, 0,55 g) v dichlormethanu (12 ml) se přidá při teplotě místnosti kyselina trifluoroctová. Reakční směs se míchá 15 hodin při teplotě místnosti a v tuto dobu analýza TLC směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se azeotropuje s toluenem (2 x 10 ml) a suší se ve vysokém vakuu a získá se 0,43 g (100 %) žluté pevné látky. HRMS: nalezeno hmot. 358,0963. Vypočteno hmot. 358,0959 (M+H).

Příklad 110

Příprava 4-[[(2-chlor-5-kyanofenyl)karbonyl]amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

a) Příprava methylesteru 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl)-amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

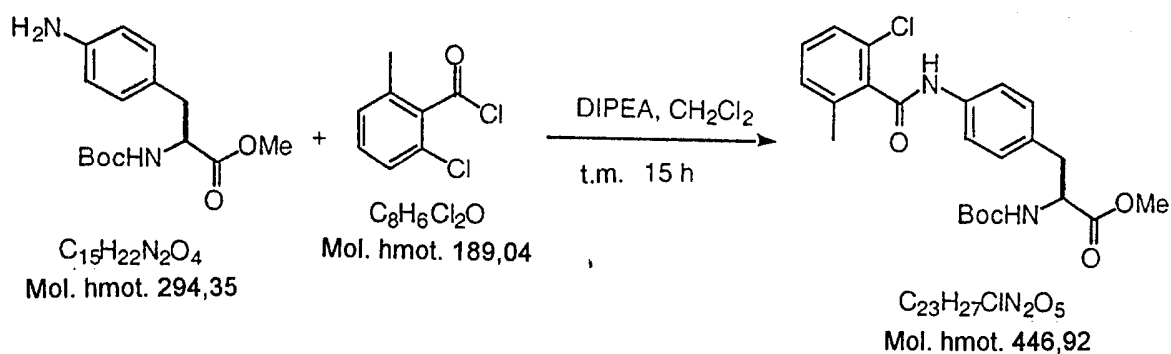
Za použití postupu popsaném v příkladu 3 se připraví methylester 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl)amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalanin v celkovém 61% výtěžku jako bílá pevná látka. HRMS: nalezeno hmot. 510,1003. Vypočteno hmot. 510,0988, M+H.

b) Příprava 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl)amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Ke směsi methylesteru 4-[(2-chlor-5-kyanofenylkarbonyl)-amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (0,146 mmol, 75 mg) a jodidu litného (1,5 mmol, 200 mg) se přidá při teplotě místnosti pyridin (3 ml). Roztok se zahřívá při zpětném toku 15 hodin a v tuto dobu analýza TLC směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Potom se směs ochladí na teplotu místnosti a zředí se vodou (15 ml). Pyridin se odstraní za sníženého tlaku na rotační odpařovače a zbytek se extrahuje etherem (2 x 15 ml) k odstranění neutrálních nečistot. Vodná vrstva se okyselí s 1 N HCl a vysrážená bílá pevná látka se sebere filtrací a promyje se 20 ml vody a 20 ml hexanu. Po vysušení se surový produkt rozpustí ve směsi ethylacetátu a hexanu a vloží se přes noc do mrazáku. Vytvoří se pouze stopy pevné látky a rozpouštědlo se dekantuje a odstraní se za sníženého tlaku a získá se 55 mg (76 %) bílé pevné látky. HRMS: nalezeno hmot. 496,0850. Vypočteno hmot. 496,0831 (M+H).

Příklad 111

Příprava methylesteru 4-[(2-chlor-6-methylfenylkarbonyl)-amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu



Za použití postupu popsaném v příkladu 1 se připraví methylester 4-[(2-chlor-6-methylfenylkarbonyl)amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu z methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu a 2-chlor-6-methylbenzoylchloridu v 83% celkovém výtěžku jako bílá pevná látka, teploty tání 154 až 157 °C. HRMS: nalezeno hmot. 469,1513. Vypočteno hmot. 469,1507 (M+Na).

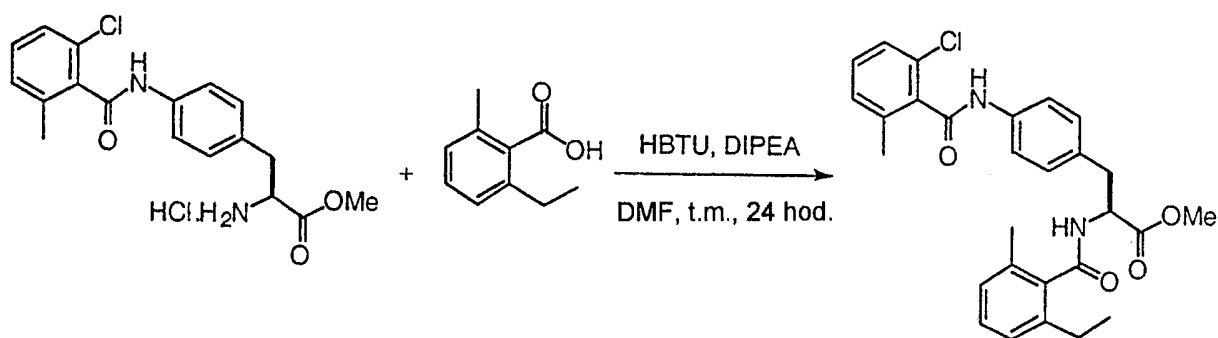
Příklad 112

Příprava hydrochloridové soli methylesteru 4-[(2-chlor-6-methylkarbonyl)amino]-L-fenylalaninu

Za použití postupu popsaném v příkladu 2 se připraví hydrochlorid methylesteru 4-[(2-chlor-6-methylfenylkarbonyl)-amino]-L-fenylalaninu v celkovém 99% výtěžku z produktu z příkladu 111 jako bílá pevná látka. HRMS: nalezeno hmot. 347,1165. Vypočteno hmot. 347,1162 (M+H).

Příklad 113

Methylester 4-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]amino]-N-[1-(2-methyl-6-ethylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví za použití postupu popsaném v příkladu 3 a získá se 70% celkový výtěžek jako bílá pevná látka. HRMS: nalezeno hmot. 515,1690. Vypočteno hmot. 515,1714 (M+Na).



Příklad 114

N-[1-(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[2,6-difluorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin se připraví z methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a 2,6-difluorbenzoové kyseliny za použití postupu popsaném v příkladech 109 a 13. HRMS: nalezeno hmot. 473,1094. Vypočteno hmot. 473,1079 (M+H).

Příklad 115

N-[1-(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[2,3,4,5,6-pentafluorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin se připraví z methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a pentafluorbenzoové kyseliny za použití postupu popsaném v příkladech 109 a 13. HRMS: nalezeno hmot. 527,0798. Vypočteno hmot. 527,0797 (M+H).

Příklad 116

Příprava methylesteru (Z)-3-[4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]-amino]-3-methylfenyl]-2-[[[(fenylmethoxy)karbonyl]amino]-2-propenové kyseliny

Příprava 4-[[[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methylbenzylalkoholu

Roztok 3-methyl-4-nitrobenzylalkoholu (7,0 g, 42 mmol) v ethylacetátu (175 ml) a Boc anhydridu (9,1 g, 42,7 mmol) se hydrogenuje nad 10% palladiem na uhlíku (0,33 g) po dobu 2 hodin. Reakční směs se filtruje a filtrát se koncentruje. Zbytek se rekrystaluje ze směsi a hexanu a získá se bílá pevná krystalická látka (6,73 g, 68 %), teploty tání 73 až 74 °C. Analýza ($C_{13}H_{19}NO_3$): C, 65,80, H, 8,07, N, 5,90. Nalezeno C, 65,74, H, 7,80, N, 5,80.

b. Příprav 4-[[[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methylbenzaldehydu

Roztok 4-[[[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methylbenzylalkoholu (7,2 g, 30,4 mmol) v dichlormethanu (60 ml) se zpracuje oxidem manganičitým (4 x 7 g) ve dvouhodinových intervalech a směs se míchá při teplotě místnosti 18 hodin. Směs se filtruje přes polštářek celitu, který se promyje dichlormethanem a filtrát se koncentruje. Zbytek se rekrystaluje ze směsi etheru a hexanu a získá se bílá krystalická pevná látka (6,3 g, 87 %), teploty tání 109 až 111 °C. Analýza ($C_{13}H_{17}NO_3$): vypočteno C, 66,36, H, 7,28, N, 5,95. Nalezeno C, 66,14, H 7,14, N, 5,85.

c. Příprava methylesteru (Z)-3-[4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]-amino]-3-methylfenyl]-2-[[[(fenylmethoxy)karbonyl]amino]-2-propenové kyseliny

Roztok trimethylesteru N-[(fenylmethoxy)karbonyl]-2-fosfonoglycinu (11,9 g, 36 mmol) v dichlormethanu (60 ml) se

zpracuje tetramethylguanidinem (4,5 ml, 36 mmol). Po 1 hodině se směs ochladí na vnitřní teplotu -30 °C a zpracuje se roztokem 4-[[[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methylbenzaldehydu (7,02 g, 29,8 mmol) v dichlormethanu (25 ml) takovou rychlostí, že se teplota nezvyšuje. Reakční směs se míchá při teplotě -30 °C po dobu 30 minut a potom se nechá přes noc ohřát na teplotu místnosti. Směs se zředí etherem (150 ml) a postupně se promyje s 0,5 N HCl (2 x 50 ml) a nasyceným NaHCO₃ (1 x 50 ml) a suší se nad MgSO₄. Roztok se koncentruje a zbytek se čistí chromatografií na Biotage Kilo Prep HPLC za použití silikagelové patrony a eluováním směsí ethylacetátu a hexanu (1:2). Frakce obsahující Z-izomer se spojí a koncentrují a ve vysokém vakuu se získá bezbarvé sklo (11,48 g, 86 %). Analýza (C₂₄H₂₈NO₆): vypočteno C, 65,44, H, 6,41, N, 6,36. Nalezeno C, 64,81, H, 6,43, N, 6,04. HRMS: nalezeno hmot. 440,1933. Vypočteno hmot. 440,1947 (M+H).

Příklad 117

Příprava methylesteru 4-[[[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methyl-N-[[[(fenylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu

Roztok methylesteru (Z)-3-[4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methylfenyl]-2-[[[(fenylmethoxy)karbonyl]amino]-2-propenové kyseliny (10 g, 22,7 mmol) z příkladu 116 v methanolu (50 ml) a THF (20 ml) se vloží do tlakové nádoby a směsí se prohání přes noc proud Ar. Přidá se (+)-1,2-bis((2S,5S)-2,5-dimethylfosfolano)benzen (cyklooktadien)rhodium trifluormethansulfonát (100 mg, 0,15 mmol) a nádoba se natlakuje třikrát 0,3515 MPa vodíkem a směs se míchá přes noc při teplotě místnosti pod tlakem 0,3515 MPa vodíku. Tlak se uvolní a roztok se koncentruje. Zbytek se zpracuje aktivním uhlím a rekrystaluje se ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se 6,72 g (67 %) produktu, teploty tání 120 až 121 °C. [α]₅₈₉ -5,9° (c = 1%, methanol). HRMS (C₂₄H₃₀N₂O₆): vypočteno 442,2113. Nalezeno 442,2104 (M+).

Příklad 118

Příprava methylesteru 4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]-amino]-3-methyl-N-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

a. Roztok methylesteru 4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]-amino]-3-methyl-N-[[[(fenylmethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (3,0 g, 6,8 mmol) v ethanolu (40 ml) a cyklohexenu (14 ml, 140 mmol) se zpracuje 10% palladiem na uhlíku (1,5 g) a směs se zahřívá při zpětném toku 20 minut a potom se ochladí. Směs se filtruje přes polštářek celitu, promyje se ethanolem a filtrát se koncentruje a získá se methylester 4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methyl-L-fenylalaninu (2,24 g) jako světle žlutý olej. HRMS ($C_{16}H_{24}N_2O_4$): nalezeno hmot. 309,1819. Vypočteno hmot. 309,1815 (M+H).

b. Roztok methylesteru 4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methyl-L-fenylalaninu (1,0 g, 3,24 mmol) a 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny (0,66 g, 3,86 mmol) v DMF (8 ml) se zpracuje HBTU (1,72 g, 4,53 mmol) a DIPEA (3 ml, 17 mmol) a směs se míchá přes noc. Roztok se koncentruje. Zbytek se rozpustí v ethylacetátu (30 ml) a promyje se nasyceným $NaHCO_3$ (10 ml), 0,1 N HCl (10 ml) a solankou (10 ml) a suší se nad $MgSO_4$. Zbytek získaný po filtraci a odpaření se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu na 140 g silikagelu eluováním směsí 1:9 ethylacetátu a dichlormethanu a získá se 1,16 g (78 %) gumy. HRMS ($C_{24}H_{29}N_2O_5Cl$): nalezeno hmot. 461,1858. Vypočteno hmot. 461,1844 (M+H).

Příklad 119

Příprava hydrochloridu methylesteru 4-amino-3-methyl-N-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Methylester 4-[[[(1-dimethylethoxy)karbonyl]amino]-3-methyl-N-
-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (1,1 g,
2,17 mmol) z příkladu 118 se zpracuje s 4 N HCl v dioxanu (20
ml) po dobu 4 hodin a koncentruje se do sucha. Zbytek se
trituruje s etherem a filtruje se a získá se 0,83 g, 96 %
jako bílá pevná látka. HRMS ($C_{19}H_{22}N_2O_3Cl_2$): nalezeno hmot.
361,1309. Vypočteno hmot. 361,1320 (M+H).

Příklad 120

Příprava N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[[3-(3-
-hydroxyfenyl)-1-oxopropyl]amino]-3-methyl-L-fenylalaninu

a. Roztok hydrochloridu methylesteru 4-amino-3-methyl-N-
-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (79,5 mg,
0,20 mmol) z příkladu 119, 3-(3-hydroxyfenyl)propanové
kyseliny (33,2 mg, 0,20 mmol) a DIPEA (120 μ l, 0,69 mmol) v
dichlormethanu (3 ml) se ochladí na 10 °C a zpracuje se s
BOP-Cl (51 mg, 0,20 mmol). Směs se míchá 4 hodiny a
koncentruje se. Zbytek se rozpustí v dichlormethanu (15 ml) a
promyje se 5 ml 0,5 N $NaHCO_3$, 0,5 N HCl a nasycenou solankou
a suší se ($MgSO_4$). Zbytek získaný po filtraci a koncentraci
se čistí chromatografií na 25 g silikagelu eluováním 7:3
směsí ethylacetátu a hexanu a získá se 47 mg bezbarvého skla.
HRMS: nalezeno hmot. 509,1849. Vypočteno hmot. 509,1844 (M+H).

b. Roztok methylesteru N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-
-4-[[[3-(3-hydroxyfenyl)-1-oxopropyl]amino]-3-methyl-L-
-fenylalaninu (45 mg, 0,088 mmol) v THF (30 ml) se zpracuje
roztokem $LiOH \cdot H_2O$ (20 mg, 0,47 mmol) ve vodě (1,0 ml). Za
účelem rozpustnosti se přidá methanol (0,5 ml) a směs se
míchá při teplotě místnosti 18 hodin. Směs se okyselí s 0,5
ml kyseliny octové a čistí se přímo RP-HPLC (5-95-35-214) a
po lyofilizaci se získá 34,3 mg bílého prášku. HRMS
($C_{27}H_{27}N_2O_5Cl$): nalezeno hmot. 405,1697. Vypočteno hmot.
495,1687 (M+H).

Příklad 121

N-[1-(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[2-(3-hydroxyfenyl)-1-oxoethyl]amino]-3-methyl-L-fenylalanin se připraví za použití obecného postupu popsáném v příkladu 120 z methylesteru 4-amino-3-methyl-N-[[2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu (79,5 mg) a 2-(3-hydroxyfenyl)-octové kyseliny (30 mg, 0,2 mmol) a získá se 23 mg bezbarvého skla. HRMS ($C_{26}H_{26}N_2O_5Cl$): nalezeno hmot. 481,1527. Vypočteno hmot. 481,1530 (M+H).

Příklad 122

N-[1-(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[2-(3-nitrofenyl)-1-oxoethyl]amino]-3-methyl-L-fenylalanin se připraví z methylesteru 4-amino-3-methyl-N-[[2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu (52 mg) a 3-nitrobenzoové kyseliny (32 mg, 0,19 mmol) za použití postupu popsáném v příkladu 120 a získá se 15 mg bílého prášku. HRMS ($C_{25}H_{22}N_3O_6Cl$): nalezeno hmot. 496,1288. Vypočteno hmot. 496,1288 (M+H).

Příklad 123

N-[1-(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-3-methyl-L-fenylalanin se připraví z methylesteru 4-amino-3-methyl-N-[[2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu (87,4 mg, 0,22 mmol) a 2,6-dichlorbenzoylchloridu za použití postupu popsáném v příkladu 1 a 120 a získá se 56 mg světlého prášku. HRMS ($C_{25}H_{21}N_2O_4Cl_3$): nalezeno hmot. 519,0656. Vypočteno hmot. 519,0645 (M+H).

Příklad 124

Příprava N-[(4-amino-2-chlorfenyl)karbonyl]-4-[[2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

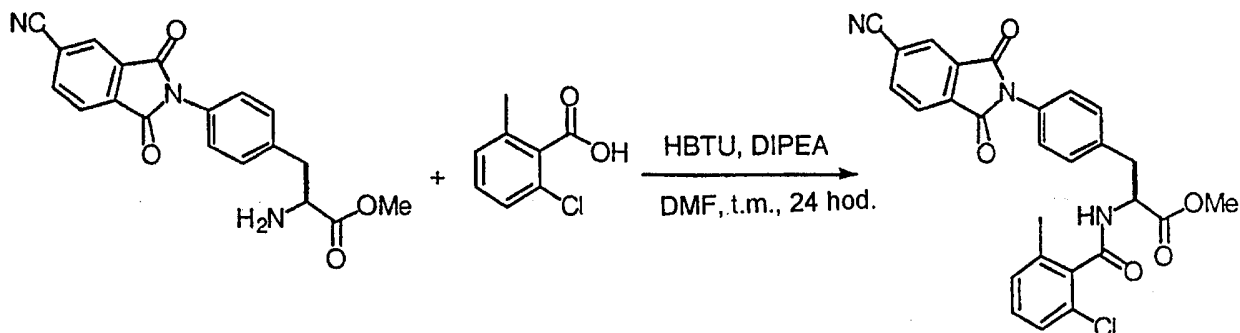
a. Roztok 4-amino-2-chlorbenzoové kyseliny (43 mg, 0,25 mmol) a hydrochloridu methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-amino]-L-fenylalaninu (100 mg, 0,25 mmol) a HBTU (100 mg, 0,27 mmol) v DMF (3 ml) se zpracuje s DIPEA (0,20 ml) a směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Směs se zředí vodou a extrahuje se s ethylacetátem. Organická vrstva se promyje nasyceným NaHCO_3 a suší se. Zbytek po filtraci a koncentraci se chromatografuje na 16 g silikagelu eluováním směsí ethylacetátu a hexanu 4:1 a získá se methylester N-[(4-amino-2-chlorfenyl)karbonyl]-4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (66 mg, 51 %) jako bílá pěna. HRMS ($\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_4$): nalezeno hmot. 520,0589. Vypočteno hmot. 520,0597 (M+H).

b. Roztok methylesteru N-[(4-amino-2-chlorfenyl)karbonyl]-4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (66 mg, 0,126 mmol) v THF (3 ml) se zpracuje roztokem $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mg, 0,48 mmol) ve vodě (0,5 ml) a směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Přidá se kyselina octová (0,5 ml) a směs se čistí přímo RP-HPLC (5-95-35-214) a získá se 40 mg světlé pevné látky. HRMS ($\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_4$): nalezeno hmot. 506,0461. Vypočteno hmot. 506,0441 (M+H).

Příklad 125

Příprava 4-(4-kyano-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

a) Příprava methylesteru 4-(4-kyano-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu



Za použití postupu popsáném v příkladu 3 se připraví methylester 4-(4-kyano-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu v celkovém 63% výtěžku jako bílá pevná látka: teplota tání 200 až 202 °C. HRMS: nalezeno hmot. 502,1173. Vypočteno hmot. 502,1169, M+H.

b) Příprava 4-(4-kyano-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Za použití postupu popsáném v příkladu 110 se připraví 4-(4-kyano-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalanin v celkovém 26% výtěžku jako bílá pevná látka: teplota tání 170 až 175 °C. HRMS: nalezeno hmot. 488,1004. Vypočteno hmot. 488,1013, M+H.

Příklad 126

Příprava ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

K roztoku sodné soli N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,583 g, 3,0 mmol) v DMF (75 ml) se přidá při teplotě místnosti přebytek jodethanu (3,27 g, 21 mmol). Vzniklý roztok se míchá 24 hodin. TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího

materiálu a přebytek jodethanu a DMF se odstraní na rotační odpařovačce pod vakuem. Zbytek se zředí 100 ml ethylacetátu a promyje se postupně vodou (2 x 100 ml), roztokem solanky (100 ml) a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla se získá bílá pevná látka, která se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu eluováním směsí ethylacetátu a hexanu 1:1 a získá se 1,4 g (87 %) ethylesteru jako bílá pevná látka, teploty tání 230 až 235 °C. HRMS: nalezeno hmot. 533,0817. Vypočteno hmo. 533,0801 (M+H).

Příklad 127

Příprava ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino-L-fenylalaninu

K suspenzi N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino-L-fenylalaninu (7,0 g, 13,84 mmol) a práškového hydrogenuhličitanu sodného (5,88 g, 70 mmol) v DMF (100 ml) se přidá při teplotě místnosti přebytek jodethanu (10,91 g, 70 mmol). Vzniklá směs se míchá 20 hodin a při této době TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu a přebytek jodethanu a DMF se odstraní na rotační odpařovačce pod vakuem. Zbytek se zředí 150 ml ethylacetátu a promyje se postupně vodou (2 x 100 ml), roztokem solanky (100 ml) a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla se získá bílá pevná látka, která se krystaluje z acetonitrilu. Vzniklá krystalická pevná látka se sebere filtrací a suší se při vysokém vakuu a získá se 5,58 g (77 %) ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu jako bílá pevná látka, teploty tání 230 až 235 °C.

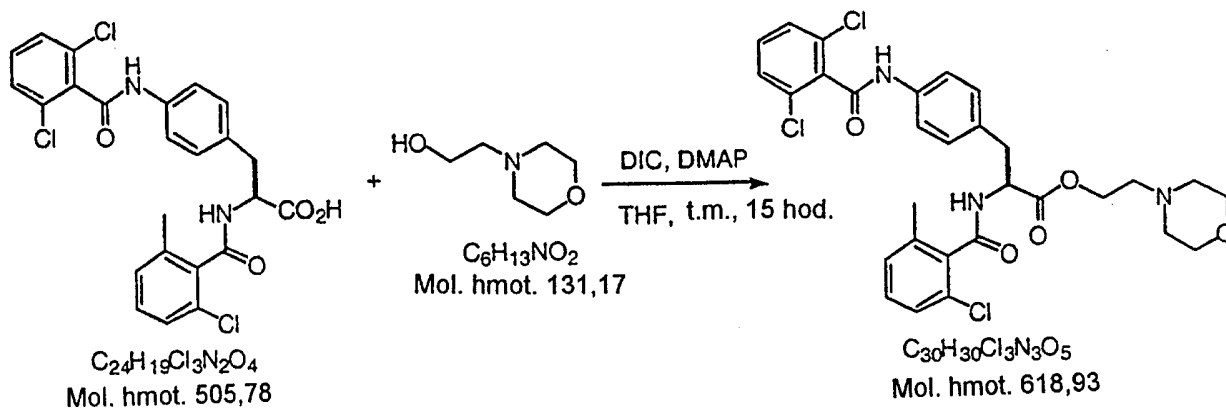
Příklad 128

Příprava 2-morfolinoethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino-L-fenylalaninu

K roztoku N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (0,505 g, 1,0 mmol) a 2-(4-morfolino)ethanolu (0,262 g, 2,0 mmol) v THF (13 ml) se přidá při teplotě místnosti dicyklohexylkarbodiimid (0,309 g, 1,5 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (61 mg, 0,5 mmol). Vzniklá směs se míchá 4 hodiny a v tuto dobu TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost kyseliny. Potom se směs zředí vodou (50 ml) a extrahuje se ethylacetátem (3 x 50 ml). Spojené extrakty se promyjí vodou (2 x 100 ml) a roztokem solanky (100 ml) a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla se získá bílá pevná látka, která se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití směsi dichlormethanu a methanolu 15:1 jako eluentu a získá se 0,428 g (69 %) 2-(4-morfolino)ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu jako bílá pevná látka, teploty tání 109 až 118 °C. HRMS: nalezeno hmot. 618,1311. Vypočteno hmot. 618,1329 (M+H).

Příklad 129

Příprava 2-(4-morfolino)ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

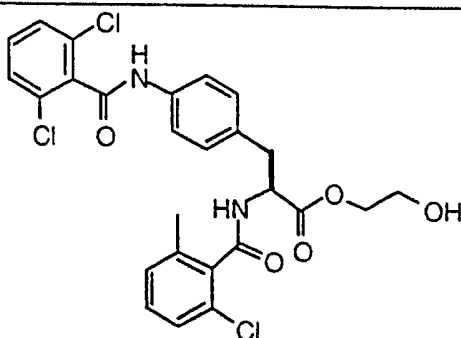


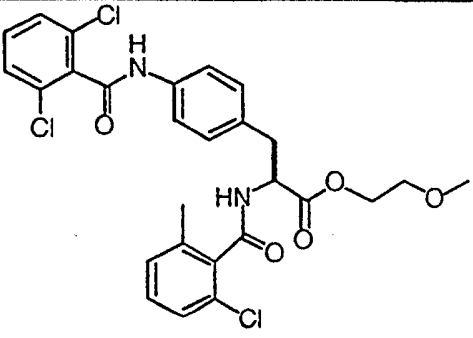
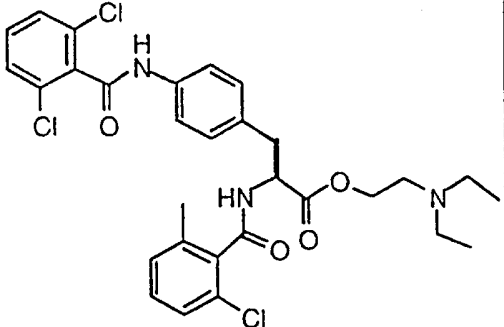
K roztoku N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (0,253 g, 0,5 mmol) a 2-(4-morfolino)ethanolu (0,131 g, 1,0 mmol) v THF (5 ml) se

přidá při teplotě místnosti diisopropylkarbodiimid (94,6 mg, 0,75 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (30,5 mg, 0,25 mmol). Vzniklá směs se míchá při teplotě místnosti 15 hodin a v tuto dobu TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost kyseliny. Potom se směs zředí vodou (50 ml) a THF se odstraní ve vakuu a zbytek se extrahuje dichlormethanem (3 x 25 ml). Spojené extrakty se promyjí vodou (2 x 50 ml), roztokem solanky (50 ml) a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a koncentrací rozpouštědla se získá bílá pevná látka, která se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití dichlormethanu a ethylacetátu (5:1 až 1:1) a čistého ethylacetátu jako eluentu a získá se 0,2 g (65 %) bílé pevné látky, teploty tání 109 až 118 °C.

Příklad 130 až 132

Za použití postupu popsaném v příkladu 129 se připraví následující esterové deriváty.

Příklad	Struktura	Výtěžek %	HRMS Vypočt.	HRMS Nalezeno
130		60	549,0751	549,0738

131		47	563,0907	563,0912
132		52	604,1536	604,1539

Příklad 133

Příprava 1-methyl-2-(4-morfolino)ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se v 32% výtěžku provede podle postupu popsáném v příkladu 129. HRMS vypočteno 632,1484. Nalezeno 632,1486 (M+H).

Příklad 134

1-Methylethylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se v 60% výtěžku připraví podle postupu popsáném v příkladu 127. HRMS m/z: vypočteno 569,0778. Nalezeno 569,0774 (M+Na).

Příklad 135

2-Methylpropylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se připraví podle postupu popsáném v příkladu 127. HRMS m/z: vypočteno

561,1114. Nalezeno 561,1125 (M+H).

Příklad 136

1-Methyl-4-piperidinylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-
-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se
připraví v 65% výtěžku podle postupu popsáném v příkladu 128.
HRMS $C_{30}H_{30}Cl_3N_3O_4$: nalezeno hmot. 602,1386. Vypočteno hmot.
602,1380 (M+H).

Příklad 137

Butylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-
-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se připraví v
75% výtěžku podle postupu popsáném v příkladu 127. HRMS
($C_{28}H_{27}Cl_3N_2O_4$): nalezeno hmot. 561,1115. Vypočteno hmot.
561,1114 (M+H).

Příklad 138

2-[4-[(1,1-Dimethylethoxy)karbonyl]-1-piperazinyl]ethylester
N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-
amino]-L-fenylalaninu se připraví v 78% výtěžku z N-(2-chlor-
-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-
fenylalaninu a 2-[4-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-1-
-piperazinyl]ethanolu za použití postupu popsáném v příkladu
129. HRMS: nalezeno hmot. 717,1995. Vypočteno hmot. 717,2013
(M+).

Příklad 139

2-(1-Piperazinyl)ethylester N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-
-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

K roztoku 2-[4-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-1-piperazinyl]-
ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)-

karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,0 mmol, 0,72 g) v dioxanu (4 ml) se přidá při teplotě místnosti roztok HCl v dioxanu (3,0 mmol, 0,75 ml, 4 N). Vzniklý roztok se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti a v tuto dobu TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozho materiálu. Potom se odstraní dioxan ve vakuu a pevná látka se trituruje s etherem (15 ml). Ether se dekantuje a pevná látka se suší ve vysokém vakuu a získá se 0,68 g (90 %) bílého produktu. HRMS ($C_{30}H_{31}Cl_3N_4O_4$): nalezeno hmot. 617,1464. Vypočteno hmot. 617,1489 (M+H).

Příklad 140

Příprava 2-(4-methyl-1-piperaziny)ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

K suspenzi dihydrochloridu 2-(1-piperaziny)ethylesteru N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (1,0 mmol, 0,617 g) z příkladu 139 a K_2CO_3 (8,0 mmol, 1,1 g) v NMP (10 ml) se přidá při teplotě místnosti methyljodid (3,0 mmol, 0,43 g). Vzniklá směs se míchá 48 hodin při teplotě místnosti a v tuto dobu TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Potom se směs zředí vodou a vysrážená pevná látka se sebere filtrací a suší se ve vysokém vakuu. Tato pevná látka se čistí HPLC s reverzní fází a získá se 0,35 g (55 %) pevné bílé látky. HRMS ($C_{31}H_{33}Cl_3N_4O_4$): nalezeno hmot. 631,9208. Vypočteno hmot. 631,9193 (M+H).

Příklad 141

Příprava methylesteru N-methyl-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-4-nitro-L-fenylalaninu

K suspenzi methylesteru N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-nitrofenylalaninu (0,375 mmol, 142 mg) a oxidu stříbrného (1,5 mmol, 340 mg) v DMF (2 ml) se přidá při teplotě místnosti methyljodid (28 mmol, 1,75 ml). Suspenze se míchá 2 dny při teplotě místnosti a po této době TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu a pevná látka se filtruje. Roztok se koncentruje a zředí se ethylacetátem (30 ml) a promyje se vodou (20 ml), roztokem solanky (20 ml) a suší se nad síranem hořečnatým. Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla se získá 99 mg (67 %) světle hnědé látky. LRMS ($C_{19}H_{19}ClN_2O_5$): 390 (M+H).

Příklad 142

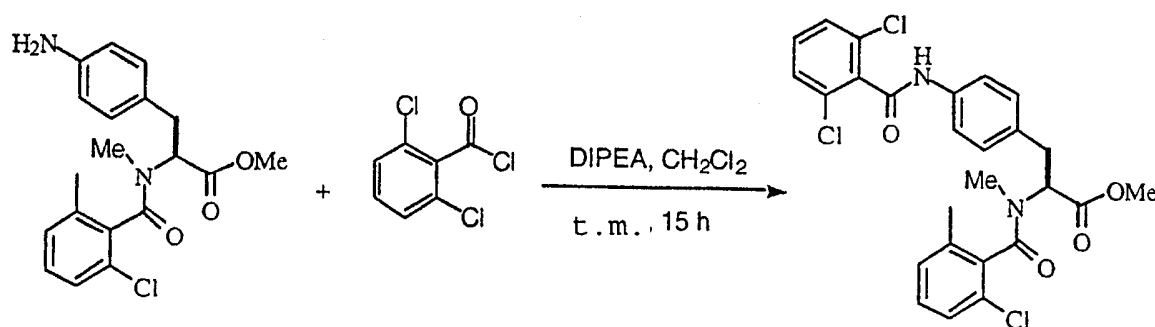
Příprava methylesteru 4-amino-N-methyl-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Ke směsi methylesteru N-methyl-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-4-nitro-L-fenylalaninu (0,5 mmol, 192 mg) z příkladu 141, zinkového prášku (cca 325 mesh, 5,0 mmol, 0,33 g, 10 ekv.) a chloridu amonného (7,5 mmol, 0,4 g, 15 ekv.) se přidá při teplotě místnosti methanol (4 ml) a voda (2 ml). Po přidání vody je reakce exotermní. Suspenze se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti a po této době TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu a reakční směs se filtruje přes celit. Filtrační koláč se promyje methanolem (30 ml) a vodou (20 ml). Filtrát se koncentruje k odstranění methanolu a zbytek se extrahuje ethylacetátem (3 x 20 ml). Spojené extrakty se promyjí roztokem solanky (30 ml) a suší se nad bezvodým síranem hořečnatým. Filtrací sušidla a koncentrací rozpouštědla se získá 148 mg (82 %) žlutého

oleje. LRMS ($C_{19}H_{21}ClN_2O_3$): 361 (M+H).

Příklad 143

Příprava methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenylkarbonyl)amino]-N-methyl-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu



Za použití postupu popsaném v příkladu 1 se připraví methyl 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu v 68% celkovém výtěžku jako amorfnní pevná látka. LRMS ($C_{26}H_{23}Cl_3N_2O_4$): 534 (M+H).

Příklad 144

Příprava 4-[(2,6-dichlorfenylkarbonyl)amino]-N-methyl-N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Za použití postupu popsaném v příkladu 13 se připraví N-[1-(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-N-methyl-4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin z produktu příkladu 143 v 59% celkovém výtěžku jako bílá pevná látka. HRMS: nalezeno 519,0631. Vypočteno 519,0645 (M+H).

Příklad 145

Příprava 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny

a. Příprava 2-chlor-6-methylbenzaldehydu

Do 500 ml tříhrdlé baňky opatřené magnetickým míchadlem, teploměrem, přídatnou nálevkou a vstupem argonu se vloží 75 g (494 mmol) 2-chlor-6-methylbenzonitrilu a 400 ml toluenu (skladován nad molekulárními síty 4A). Směs se ochladí na -2 °C (led + aceton) a po kapkách se přidá během 30 minut roztok DIBAL-H (593 mmol, 593 ml, 1,0 N) v hexanech, přičemž se teplota udržuje pod 0 °C. Po přidání se reakční směs míchá 1 hodinu při teplotě 0 °C a potom se nechá ohřát na teplotu místnosti. Po 2 hodinách při teplotě místnosti TLC analýza indikuje nepřítomnost výchozího materiálu (4:1 hexan:ether, postřík kyseliny fosfomolybdenové, analýza fluorescencí UV byla chybná). Reakční směs se vlije do ledu (2000 g) a koncentrované kyseliny sírové (50 ml) a míchá se přes noc. Vysrážené pevné látky se seberou filtrací a filtrát se extrahuje s etherem (2 x 200 ml). Spojené extrakty se promyjí roztokem solanky a suší se nad MgSO_4 . Filtrací sušidla a koncentrací roztoku se získá surový aldehyd, který se spojí se shora uvedenou pevnou látkou a získá se 71,31 g (93 %) světle žluté pevné látky vhodné pro použití v dalším stupni.

b. Příprava 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny

Do 1000 ml tříhrdlé baňky opatřené magnetickým míchadlem, teploměrem, přídatnou nálevkou a vstupem argonu se vloží 71,31 g (461 mmol, surový produkt získaný se shora uvedeného pokusu) 2-chlor-6-methylbenzaldehydu a 750 ml acetonitrilu. K této suspenzi se přidá při teplotě místnosti roztok jednosytného fosforečnanu sodného (115 mmol, 15,9 g, 0,25 ekv.) ve vodě (240 ml) a potom peroxid vodíku (50 ml, 30%). Potom se přidá po kapkách při 0 °C roztok chloritanu sodného (73,5 g, 811 mmol, 1,76 ekv.) ve vodě (700 ml), přičemž se teplota udržuje pod 3 °C. Po přidání se žlutá suspenze míchá 15 hodin při teplotě 0 °C až teplota místnosti a po této době TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost aldehydu. Potom se

přidá po kapkách roztok hydrogensířičitanu sodného (73 mg, 701 mmol, 1,52 ekv.) dokud žluté zbarvení nezmizí (pozitivní papír KI). Chlazení reguluje exotermní reakci. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku a získá se bílá pevná látka. Pevná látka se sebere filtrací a filtrát se extrahuje etherem (200 ml). Shora uvedené pevné látky se rozpustí v tomto etherovém roztoku a promyjí se s 10% roztokem NaOH (2 x 200 ml). Bázický vodný roztok se neutralizuje 10% HCl na pH cca 1. Vysrážená bílá pevná látka se sebere filtrací a suší se na vzduchu a získá se 54,88 g (celkem 65 %, ve dvou stupních) 2-chlor-6-methyl benzoové kyseliny jako bílá pevná látka.

Příklad 146

Příprava methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

a. Příprava methylesteru 4-nitro-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu

K suspenzi 4-nitro-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (226,2 mmol, 70,2 g) a uhličitanu sodného (1,13 mol, 95 g) v DMF (500 ml) se přidá při teplotě místnosti methyljodid (1,13 mmol, 70,4 ml). Suspenze se míchá 15 hodin při teplotě místnosti a po této době TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozí kyseliny a přebytek methyljodidu a určitá část DMF se odstraní ve vysokém vakuu. Směs se vlije do vody (2 l) a míchá se při teplotě místnosti a přes víkend se pomalu vytvoří sraženina. Vysrážená pevná látka se sebere filtrací a promyje se vodou (2 l). Po sušení na vzduchu se získá 72 g (98 %) methylesteru 4-nitro-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu jako světle žlutá pevná látka, teploty tání 95 až 96 °C. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 8,16 (d, 2H, J = 20 Hz), 7,53 (d, 2H, J = 20 Hz), 7,39 (d, 1H, J = 22 Hz), 4,26-4,28 (m, 1H), 3,6 (s, 3H), 2,96-3,19 (m, 2H), 1,25 (s, 9H). ^{13}C NMR, CDCl_3 (100 MHz) δ

172,04, 155,29, 146,27, 145,96, 130,48, 123,18, 78,36, 54,44, 51,9, 36,1, 27,99. HRMS: nalezeno 325,1404. Vypočteno 325,1400 (M+H).

b. Příprava methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu

Ke směsi methylesteru 4-nitro-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu (222 mmol, 72 g), zinkového prášku (cca 325 mesh, 2,2 mol, 145,2 g, 10 ekv.) a chloridu amonného (3,3 mol, 178,1 g, 15 ekv.) se přidá při teplotě místnosti methanol (1 l) a voda (500 ml). Po přidání vody je reakce exotermní a teplota se zvýší na 45 až 50 °C. Suspenze se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti a po této době TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu a reakční směs se filtruje přes celit, filtrační koláč se promyje s methanolem (1 l) a vodou (500 ml). Koncentrace k odstranění methanolu a určitého množství vody vede k vytvoření pevné látky, která se sebere filtrací a promyje se vodou. Po sušení na vzduchu se získá 65,5 g (kvantitativní) bílé pevné látky, teploty tání 86 až 89 °C. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 6,9 (d, 2H, J = 20 Hz), 6,62 (d, 2H, J = 20 Hz), 7,39 (d, 1H, J = 22 Hz), 4,26-4,28 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,96-3,19 (m, 2H), 1,25 (s, 9H). HRMS: nalezeno 284,1614. Vypočteno 294,1621.

c. Příprava methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenylkarbonyl)-amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu

K roztoku methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-L-fenylalaninu (127,6 mmol, 37,57 g) a 2,6-dichlorbenzoylchloridu (140,6 mmol, 29,45 g) v dichlormethanu (350 ml) se přidá při teplotě místnosti diisopropylamin (192 mmol, 33,4 ml). Hnědý roztok se míchá 15 hodin při teplotě místnosti a získá se bílá suspenze. V tuto dobu TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího

materiálu. Pevné látky se seberou filtrací a promyjí se dichlormethanem (150 ml) a sušením na vzduchu se získá 52,75 g (88,4 %) bílé pevné látky teploty tání 148 až 151 °C. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 10,68 (s, 1H), 7,47-7,6 (m, 5H), 7,2-7,29 (m, 3H), 4,12-4,17 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 2,79-2,99 (m, 2H), 1,33 (s, 9H). ^{13}C NMR, CDCl_3 (100 MHz) δ 172,49, 161,82, 155,37, 136,99, 136,36, 131,28, 131,16, 129,48, 128,19, 119,31, 78,27, 55,3, 51,76, 35,9, 27,77. HRMS: nalezeno 466,1069. Vypočteno 466,1062 (M+H).

d. Příprava hydrochloridové soli methylesteru 4-[(2,6-dichlorfenylkarbonyl)amino]-L-fenylalaninu

Methylester 4-[(2,6-dichlorfenylkarbonyl)amino]-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (92,97 mmol, 43,45 g) v dioxanu se zpracuje při teplotě místnosti se 166 ml 4 N kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Po 5 minutách se pevné látky převedou do roztoku a směs se míchá 2 hodiny. Určitá část dioxanu se odstraní ve vakuu a získá se žlutý sirup a přidá se 250 ml ethylacetátu. Vzniklá guma se rozpustí v THF (100 ml) a methanolu (100 ml). Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a získá se 43,7 g (100 %) hydrochloridové soli jako bílá pevná látka. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 10,81 (s, 1H), 7,76 (d, 2H, $J = 22$ Hz), 7,58 (d, 2H, $J = 18$ Hz), 7,51 (t, 1H, $J = 15$ Hz), 7,24 (d, 2H, $J = 22$ Hz), 4,23-4,26 (m, 1H), 3,56 (s, 3H), 3,14-3,17 (m, 2H). ^{13}C NMR, CDCl_3 (100 MHz) δ 169,03, 161,72, 137,56, 136,11, 131,19, 130,95, 129,93, 129,79, 128,06, 119,46, 53,17, 52,6, 35,13. HRMS: nalezeno 367,0611. Vypočteno 367,0616 (M+).

Příklad 147

Příprava methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

K roztoku hydrochloridové soli methylesteru 4-[[[(2,6-dichlor-

fenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu (272,5 mmol, 110 g) z příkladu 146 a 2-chlor-6-methylbenzoové kyseliny (276 mmol, 47,15 g) v DMF (600 ml) se přidá při teplotě místnosti HBTU (276 mmol, 105 g) a diisopropylethylamin (1,24 mol, 119 ml). Čirý roztok se míchá 48 hodin při teplotě místnosti a po této době TLC analýza reakční směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Reakční směs se pomalu vlije do 5 l vody, která obsahuje led ke snížení teploty. Bílá pevná sraženina se nechá usadit a sebere se filtrací. Pevný koláč se promyje vodou (1 l) a hexanem (1 l) a sušením se získá 150 g surového produktu. Tento produkt se rozpustí v horkém acetonitrilu (1 l) a ochladí se v mrazáku. Pevná látka se sebere filtrací a promyje se hexanem (500 ml) a sušením na vzduchu se získá 101,1 g. Matečný louh se koncentruje a zbytek se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu eluováním směsí dichlormethanu a ethylacetátu (15:1) a získá se dalších 17,07 g produktu (celkem 118,7 g, 83 %), teploty tání 244 až 245 °C. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 10,66 (s, 1H), 8,83 (d, 1H, J = 19 Hz), 7,47-7,6 (m, 5H), 7,15-7,29 (m, 5H), 4,58-4,68 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,12 (dd, 1H, J = 17,13 Hz), 2,87 (dd, 1H, J = 17,11 Hz), 2,09 (s, 3H). HRMS: nalezeno 518,0652. Vypočteno 518,0641.

Příklad 148

Příprava 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

K suspenzi methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (166 mmol, 86,2 g) z příkladu 147 v ethanolu (350 ml) se přidá při teplotě místnosti vodný 1 N hydroxid sodný (250 ml). Směs se zahřívá na 40 až 45 °C a vzniklý čirý roztok se míchá 3 až 4 hodiny. Směs se potom ochladí na teplotu místnosti a ethanol se odstraní na rotační odpařovačce. Zbytek se zředí 100 ml vody. Neutrální nečistoty se extrahují do etheru (2 x

100 ml) a bážická vodná vrstva se neutralizuje 1 N HCl. Vysrážená pevná látka se sebere filtrací a pevný koláč se promyje vodou a suší se přes víkend na vzduchu. Surová pevná látka se rozpustí v horkém acetonitrilu (2 l) a vzniklý roztok se uloží do mrazáku. Bílá krystalická látka se sebere filtrací a promyje se studeným acetonitrilem (100 ml). Po sušení na vzduchu se získá 79,76 g (95 %) bílé pevné látky teploty tání 212 až 215 °C. ^1H NMR, DMSO- d_6 (400 MHz) δ 10,66 (s, 1H), 8,85 (d, 1H, $J = 19$ Hz), 7,47-7,6 (m, 5H), 7,15-7,29 (m, 5H), 4,58-4,68 (m, 1H), 3,12 (dd, 1H, $J = 17, 13$ Hz), 2,87 (dd, 1H $J = 17, 11$ Hz), 2,09 (s, 3H). HRMS: nalezeno 505,0483. Vypočteno 505,0488 (M+).

Příklad 149

Příprava 2,6-dimethyl-4-trifluormethyl-3-pyridinkarboxylové kyseliny

Roztok ethylesteru 2,6-dimethyl-4-trifluormethyl-3-pyridin-karboxylové kyseliny v 40 ml THF a 10 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného se zahřívá při zpětném toku 48 hodin. TLC směsi (3:7 methanol:dichlormethanu) indikuje, že výchozí materiál byl spotřebován. Směs se okyselí kyselinou octovou (5 ml) a odpaří se do sucha. Zbytek se trituruje s THF a roztok se koncentruje a získá se 0,7 g materiálu, obsahujícího určité množství THF a kyseliny octové, jak indikováno NMR. Tento materiál se spojí s produktem stejného pokusu a chromatografuje se na 90 g silikagelu směsí methanolu a dichlormethanu (3:7) a získá se 1,05 g pevné látky. Tento materiál se zředí toluenem (6 ml) a odpaří se několikrát k odstranění většiny kyseliny octové a po vysušení ve vysokém vakuu se získá 0,9 g bílé pěny. LR-ES-MS ($\text{C}_9\text{H}_6\text{F}_3\text{NO}_2$): 218 (M-H).

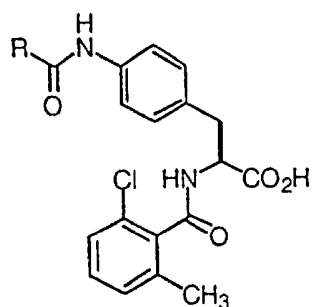
Příklad 150

Příprava N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(2,6-dimethyl-4-trifluormethyl-3-pyridinyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

a. K roztoku 2,6-dimethyl-4-trifluormethylpyridin karboxylové kyseliny (102 mg, 0,6 mmol) z příkladu 149 v dichlormethanu (3 ml) se přidá při 0 °C (ledová lázeň) kapka DMF a oxalylchlorid (0,78 mmol, 99 mg). Roztok se míchá při této teplotě 30 minut, ohřeje se na teplotu místnosti a míchá se další 1 hodinu. Potom se odstraní ve vakuu rozpouštědlo a přebytek oxalylchloridu a zbytek se suší ve vysokém vakuu. Přidá se methylester 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (0,5 mmol, 212 mg) a směs se rozpustí v dichlormethanu (5 ml). K tomuto čirému roztoku se přidá při teplotě místnosti DIPEA (2,0 mmol, 0,258 g). Směs se míchá 15 hodin a po této době TLC analýza směsi indikuje nepřítomnost výchozího materiálu. Směs se zředí dichlormethanem (20 ml) a vodou (100 ml). Obě vrstvy se oddělí a organická vrstva se promyje nasyceným hydrogenuhlíčitanem sodným (20 ml), roztokem solanky (30 ml) a suší se nad bezvodým síranem hořečnatým. Filtrací sušidla a odstraněním rozpouštědla se získá surový produkt, který se použije přímo v dalším stupni.

Příklady 151 až 155

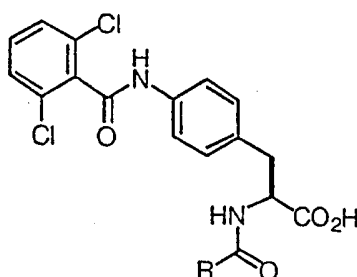
N-[(2-Chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[(heteroaryl)karbonyl]-amino]-L-fenylalaninové deriváty uvedené dále se připraví zpracováním ekvimolárních množství methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a příslušných heteroaromatických karboxylových kyselin za použití kopulačního postupu popsaném v příkladu 109 a hydrolýzou esteru popsanou v příkladu 13.



Příklad	R	Výtěžek %	Vzorec	LRMS (M+H) Nalez.	IC50 nM
151		17	C23H18N4O4ClF3	507	
152		38	C25H26N3O4ClS	500	967
153		49	C23H22N3O5Cl	456	975
154		74	C27H24N5O4Cl	518	2 474
155		7.5	C26H24N5O4Cl	506	644

Příklady 156 až 160.

4-[[(2,6-Dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(heteroaryl)-karbonyl]-L-fenylalaninové deriváty uvedené dále se připraví kopulací methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a příslušné heteroaromatické karboxylové kyseliny za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3, a poté za použití obecného postupu popsáném v příkladu 13.



Příklad	R	Výtěžek %	Vzorec	LRMS (M+1) Obs	IC50 nM
156		80	C ₂₅ H ₂₀ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₄	554	114
157		25	C ₂₄ H ₂₃ Cl ₂ N ₃ O ₄ S	520	.
158		75	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O ₅	476	946
159		63	C ₂₆ H ₂₁ Cl ₂ N ₅ O ₄	538	988
160		47	C ₂₅ H ₂₁ Cl ₂ N ₅ O ₄	526	

Příklad 161

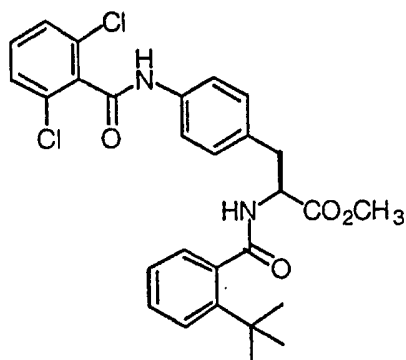
Methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(1-naftyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví v 77% výtěžku z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 1-naftoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 521,1024. Vypočteno 521,1053 (M+H).

Příklad 162

N-[(2-Acetyl-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin se připraví v 38% výtěžku z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-acetyl-6-methylbenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 547,0579. Vypočteno 547,0594 (M+Na).

Příklad 163

Methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2-(1,1-dimethylethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-(1,1-dimethylethyl)benzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 527,1523. Vypočteno 527,1573 (M+H).



$C_{28}H_{28}Cl_2N_2O_4$
Mol. hmot. 527,44

Příkladu 164

2,6-Bis-(1-methylethyl)benzoová kyselina se připraví ve dvou stupních z 2,6-bis(1-methylethyl)fenolu za použití dvoustupňového obecného postupu popsaném v příkladu 105. HRMS: nalezeno 206,0325. Vypočteno 206,0342 (M+).

Příklad 165

Methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[[2,6-bis-(1-methylethyl)fenyl]karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2,6-bis-(1-methylethyl)benzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. LRMS: 555 (M+).

Příklad 166

Methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-methoxyfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-methoxybenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 501,0984. Vypočteno 501,0984 (M+H).

Příklad 167

Methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-4-methylsulfonyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví v 73% výtěžku z methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-chlor-4-methylbenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 583,0263. Vypočteno 583,0264 (M+H).

Příklad 168

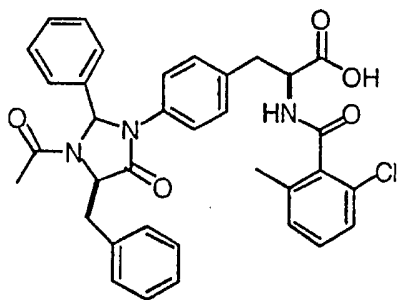
Methylester N-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-4-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2,6-dichlorbenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsaném v příkladu 3.

Příklad 169

N-[(2,6-Dichlorfenyl)karbonyl]-4-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalanin se připraví hydrolýzou methylesteru N-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-4-[[[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu z příkladu 168 za použití obecného postupu popsaném v příkladu 13.

Příklad 170

Příprava 4-[(2S,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(fenylmethyl)-5-oxo-1-imidazolinyl]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a 4-[(2R,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(fenylmethyl)-5-oxo-1-imidazolinyl]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu



a. Příprava methylesteru N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-4-[[[(2R)-2-amino-1-oxo-3-fenylpropyl]amino]-L-fenylalaninu

K roztoku methylesteru 4-amino-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (5,09 g, 17 mmol) v DMF (60 ml) se přidá Fmoc-D-fenylalanin (8,70 g, 22,5 mmol), DIPEA (12 ml, 69 mmol) a HBTU (8,50 g, 22,5 mmol). Směs se potom míchá při

teplotě místnosti 4 hodiny. Reakční směs se zředí vodou (150 ml) a vysrážená světle žlutá pevná látka se sebere filtrací. Tato pevná látka se znovu rozpustí v 60 ml acetonu a roztok se zpracuje 100 ml vody. Pevná látka se sebere filtrací a promyje se 1 N HCl a H_2O . Po sušení při 60 °C ve vakuu přes noc se získá světle žlutá pevná látka (13,2 g). Část této pevné látky (2,51 g, 3,78 mmol) se znovu rozpustí v 15 ml DMF a k roztoku se přidá 1,5 ml piperidinu. Shora uvedený roztok se míchá při teplotě místnosti 45 minut. Po odstranění rozpouštědla se zbytek rekrystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se methylester N-[(1,1-dimethylethoxy)-karbonyl]-4-[[(2R)-2-amino-1-oxo-3-fenylpropyl]amino]-L-fenylalaninu (1,36 g, 3,0 mmol) v 81,5% výtěžku. LRMS 442 (M+H).

b. Příprava methylesteru 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu

Roztok shora uvedeného aminu (1,48 mg, 3,35 mmol) a benzaldehydu (376 μ l, 3,7 mmol) v dichlormethanu (10 ml) a methylorthoformiátu (10 ml) se míchá při teplotě místnosti po dobu 3 dnů. Reakční nádoba se potom ohřeje na 90 °C a přidá se anhydrid kyseliny octové (čistý, 1,8 ml). Vzniklá směs se míchá při 110 °C po dobu 4 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a surový produkt se čistí sloupcovou chromatografií (ethylacetát:hexanu = 1:1) a získá se diastereomer 1 (417 mg) a diastereomer 2 (1,25 g) methylesteru 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu. Tyto sloučeniny jsou diastereoisomerní ve 2-poloze imidazolidinového kruhu. Oba diastereomery dávají LRMS ($C_{33}H_{37}N_3O_6$): 572 (M+H).

c. Příprava methylesteru 4-[(2S,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(fenylmethyl)-5-oxo-1-imidazolinyl]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu

Methylester 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-L-fenylalaninu (diastereomer 1) (415 mg, 0,7 mmol) se zpracuje při teplotě místnosti po dobu 2 hodin 10 ml 4 N HCl v dioxanu. Po odstranění rozpouštědla se zbytek suší přes noc ve vakuu. Zbytek (241 mg, 0,471 mmol) se rozpustí v DMF (4 ml) a zpracuje se při teplotě místnosti po dobu 4 hodin 2-chlor-6-methylbenzoovou kyselinou (105 mg, 0,617 mmol), HBTU (234 mg, 0,617 mmol) a DIEA (246 μ l, 1,42 mmol). Směs se zředí 30 ml ethylacetátu, promyje se 1 N HCl, vodou a solankou (vždy 8 ml). Po sušení nad MgSO_4 se rozpouštědlo odstraní a zbytek se filtruje přes silikagel eluováním směsí ethylacetátu a hexanu (4:1) a získá se diastereomer 1 methylesteru 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu.

d. Příprava diastereomeru 1 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu

Diastereomer methylesteru 1 4-(3-acetyl-5-oxo-2-fenyl-4-fenylmethyl-1-imidazolidinyl)-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-karbonyl]-L-fenylalaninu (90 mg, 0,128 mmol) v EtOH (3 ml) se zpracuje při teplotě místnosti po dobu 30 minut s NaOH (1 N, 0,3 ml). Vzniklý roztok se okyselí 1 kapkou HOAc a čistí se HPLC (C-18, lineární gradient od 5 % acetonitrilu do 95 % ve vodě v průběhu 30 minut) a po lyofizaci se získá bílá pevná látka. MS: nalezeno 609,9 (M+H).

Příklad 171

4-[(2S,4R)-3-Acetyl-2-fenyl-4-(3-pyridinylmethyl)-5-oxo-1-imidazolinyl]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a 4-[(2R,4R)-3-acetyl-2-fenyl-4-(3-pyridinylmethyl)-5-oxo-1-imidazolinyl]-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)-

karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví z methylesteru 4-amino-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu a Fmoc-D-3-pyridinylalaninu za použití obecného postupu popsáném v příkladu 170. Oba diastereomery ve 2 poloze imidazolinového kruhu se obtížně rozdělí C-18 RP-HPLC a a sloučeniny se zkoumají jako směs. HRMS: nalezeno 611,2070. Vypočteno 611,2061 (M+H).

Příklad 172

Methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-4-hydroxyfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví v 35% výtěžku z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-amino]-L-fenylalaninu a 2-chlor-4-hydroxybenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 521,0433. vypočteno 521,0438 (M+H).

Příklad 173

Methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-methylsulfonyl)fenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví v 99% výtěžku z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]-amino]-L-fenylalaninu a 2-methylsulfonylbenzoové kyseliny za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3. LRMS: 548 (M+).

Příklad 174

Methylester 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-(1-(methyl)ethyl-6-methylfenyl)karbonyl)-L-fenylalaninu se připraví v 35% výtěžku z methylesteru 4-[[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-(1-methyl)ethyl-6-benzoové kyseliny za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3. HRMS: nalezeno 526,1417. Vypočteno 526,1426 (M+).

Příklad 175

Methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-
-2-brom-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví
v 64% výtěžku z methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)-
karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-methyl-6-benzoové kyseliny
za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3. HRMS:
nalezeno 563,0138. vypočteno 563,0140 (M+H).

Příklad 176

Methylester 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-
-ethyl-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu se připraví
v 46% výtěžku z methylesteru 4-[[(2,6-dichlorfenyl)-
karbonyl]amino]-L-fenylalaninu a 2-ethyl-6-methylbenzoové
kyseliny za použití obecného postupu popsáném v příkladu 3.
HRMS: nalezeno 513,1359. Vypočteno 513,1348 (M+H).

Příklad 177

4-[(2,6-Dichlorfenyl)karbonyl]-4-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)-
karbonyl]amino]-L-fenylalaninu se připraví z hydrochloridu
methylesteru 4-[(2,4-dimethyl-3-pyridyl)karbonyl]amino]-L-
-fenylalaninu a 2,6-dichlorbenzoové kyseliny za použití
obecného postupu popsáném v příkladu 107. MS (M+H) 486 (2Cl).

Příklad 178

Příprava sodné soli 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-
-N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu

Suspenze 4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-N-[(2-chlor-6-
-methylfenyl)karbonyl]-L-fenylalaninu (127,13 mmol, 64,3 g)
ve vodě (500 ml) se titruje s vodným 1,0 N hydroxidem sodným
(120 ml) při teplotě místnosti dokud není pH roztoku
neutrální. Za účelem získání kompletního rozpuštění se směs
zahřívá během titrace na 40 až 45 °C. Určitá část vody se
odstraní ve vakuu na přibližný objem 300 až 350 ml a čirý

roztok se lyofilizuje ve vakuu po dobu 2 dnů a získá se 67 g (100 %) jako bezbarvá amorfnní látka. Analýza ($C_{24}H_{18}ClO_3NaO_4 \cdot 0,70H_2O$): vypočteno C, 54,62, H, 3,44, N, 5,31, Cl, 20,15, Na 4,36, H_2O , 2,33. Vypočteno: C, 54,37, H, 3,49, N, 5,18, Cl, 20,11, Na 4,25, H_2O , 2,54.

Příklad 179

Zkouška VLA-4/VCAM-1

VLA-4 antagonistická aktivita definovaná jako schopnost vázat se k imobilizovanému VCAM-1 se kvantifikuje za použití pevné fáze, dualistické protilátky ELISA. VLA-4 (integrin A4B1) vázaný k VCAM-1 se stanoví komplexem protilátka anti-integrin b1:HRP-konjugovaný myší IgG: chromogenní substrát (K-modř). Zpočátku toto vyžaduje povlečení ploten s 96 jamkami (Nunc Maxisorp) s rekombinačním lidským VCAM-1 (0,4 μg v 100 μl PBS), utěsnění každé plotny a potom ponechání ploten při teplotě 4 °C po 18 hodin. VCAM-povlečené plotny se následně blokují s 250 μl 1% BSA/0,02% NaN_3 k redukci nespecifické vazby. V den zkoušky se všechny plotny promyjí dvakrát s VCAM zkušebním pufrem (200 μl /jamku 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 0,05% Tween 20; pH 7,4). Testované sloučeniny se potom rozpustí ve 100% DMSO a potom se zředí 1:20 v VCAM zkušebním pufru a následně s 1 mg/ml BSA (tj. konečná koncentrace DMSO = 5 %). Potom se provede serie ředění 1:4 k dosažení koncentrace v rozsahu 0,005 nM až 1,563 μM pro každou testovanou sloučeninu. Potom se přidá 100 μl každého zředění do VCAM povlečených ploten následováno 10 μl VLA-4 odvozenými od Ramosových buněk. Tyto plotny se následně smíchají v šejkru 1 minutu, inkubují se 2 hodiny při 30 °C a potom se promyjí čtyřikrát s 200 μl /jamku VCAM zkušebním pufrem. Potom se přidá do každé jamky 100 μl myší anti-humánní protilátky integrin b1 (0,6 $\mu g/ml$ v VCAM zkušebním pufru + 1 mg/ml BSA) a směs se inkubuje 1 hodinu při teplotě 37 °C. na závěr této inkubační periody se všechny

plotny promyjí čtyřikrát s VCAM zkušebním pufrem (200 μ l/jamku). Odpovídající druhá protilátka, HRP-konjugovaný kozí anti-myší IgG (100 μ l na jamku @ 1:800 zředění ve VCAM zkušebním pufu + 1 mg/ml BSA) se potom přidá do každé jamky a následuje 1 hodinová inkubace při teplotě místnosti a nakonec trojí promytí (200 μ l/jamku) s VCAM zkušebním pufrem. Vývoj barvy se iniciuje přidáním 100 μ l modře K na jamku (15 min. inkubace, teplota místnosti) a zakončí se přidáním 100 μ l Red Stop Buffer na jamku. Všechny plotny se potom odečtou v UV/Vis spektrofotometru při 650 nm. Výsledky se počítají jako procenta inhibice celkové vazby (tj. VLA-4 + VCAM-1 v nepřítomnosti testované sloučeniny). Vybraná data pro sloučeniny podle vynálezu jsou uvedena v následující tabulce dále.

Příklad	ELISA IC ₅₀ nM
13	0,33
15	5,9
16	0,44
17	1,85
18	11
19	1,87
20	2,2
21	1,4

31.03.00

- 133 -

22	1,6
23	0,48
24	0,25
25	0,42
26	8,6
27	1,9
28	3,3
30	2,0
30	1,6
31	0,51
90	1,2
91	0,20
92	0,42
93	1,6
94	0,25
95	0,46
96	0,47
97	0,44
98	2,35
99	0,58
100	10
101	9,9

102	41
107	0,79
108	0,63
114	1,14
115	4,5
120	4,5
121	5,8
122	0,67
123	1,7
124	0,63
125	1,7

Příklad 180. Zkušební protokol založený na buňce Ramos
(VLA-4)/VCAM-1

Materiály:

Rozpustný rekombinatní lidský VCAM-1 (směs domén 5- a 7-Ig) se čistí od CHO kulturního media imunoafitní chromatografií a udržuje se v roztoku obsahujícím 0,1 M Tris-glycin (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,02 % NaN₃ a 10 µg/ml leupeptinu. Calcein-AM se získá od firmy Molecular Probes Inc.

Metody:

VLA-4 (a4b1) antagonistická aktivita definovaná jako schopnost obstát proti buněčnému povrchu VLA-4 pro vazbu k imobilizovaným VCAM-1 se kvantifikuje za použití zkoušky vazby Ramos-VCAM-1-buňky. Ramosova buňka nesoucí buněčný povrch VLA-4 se označí fluorescentním barvivem (Calcein-AM) a nechá se vázat k VCAM-1 v přítomnosti nebo nepřítomnosti testované sloučeniny. Snížení fluorescenční intenzity spojené s adherentními buňkami (% inhibice) zobrazovala kompetitivní inhibici VLA-4 zprostředkovanou buněčnou adhezí testované sloučeniny.

Zpočátku toto vyžaduje povlečení 96 jamkových ploten (Nunc Maxisorp) s rekombinantními lidskými VCAM-1 (100 ng v 100 μ l PBS), utěsnění každé plotny a ponechání ploten stát při teplotě 4 °C po dobu 18 hodin. VCAM povlečené plotny se následně promyjí dvakrát s 0,05% Tween-20 v PBS a potom se blokují 1 hodinu (teplota místnosti) s 200 μ l blokovacího pufru (1% BSA/0,02% thimerosal) ke snížení nespecifické vazby. Následuje inkubace blokovacím pufrém, plotny se otočí a zbývající pufr se odsaje. každá plotna se potom promyje 300 μ l PBS, obrátí se a zbývající PBS se odsaje.

Testované sloučeniny rozpustí ve 100% DMSO a potom se zředí 1:25 ve VCAM buněčném adhezním zkušebním pufru (4 mM CaCl_2 , 4 mM MgCl_2 v 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5) (konečná koncentrace DMSO = 4 %). Pro každou sloučeninu se provede serie osmi ředění 1:4 (koncentrace je v rozsahu 1 nM až 12 500 nM). Do každé VCAM-povlečené plotny se dá 100 μ l/jamku každého ředění a následuje přidání 100 μ l Ramosových buněk (200 000 buněk/jamku v 1% BSA/PBS). Plotny obsahující testované sloučeniny a Ramosovy buňky se inkubují 45 minut při teplotě místnosti a potom se přidá 165 μ l/jamku PBS. Plotny se obrátí k odstranění neadherentních buněk, odsají se a přidá se 300 μ l/jamku PBS. Plotny se opět obrátí, odsají a

zbývající pufr se jemně odsaje. Potom se přidá do každé jamky 100 μ l lýzového pufru (0,1 % SDS v 50 mM TRIS-HCl, pH 8,5) a směs se míchá 2 minuty v rotačním šejkru. Plotny se potom odečítají na fluorescenční intenzitu na fluorescenčním měřicím systému Cytofluor 2300 (Millipore) (excitace = 485 nm, emise = 530 nm). Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka

Příklad Ramos IC50
nM

13	15
15	2600
16	85
19	351
20	1630
21	1270
22	1320
23	316
24	20
25	103
90	93
91	9,3
92	255
94	49
94	9,5
95	33
107	20
108	22
115	678
120	439
121	515
122	430
123	316
124	985

150	47
152	967
153	975
154	2474
155	644
156	114
158	946
159	988
169	30
170	33,5
171	13,5

Příklad 181. Orální dávková forma

Položka	Složky	mg/tabletu			
1	Sloučenina podle vynálezu n	25	100	250	500
2	Bezvodá laktóza	83	35	19	38
3	Kroskarmelóza sodná	6	8	16	32
4	Povidon K30	5	6	12	24
5	Stearát hořečnatý	1	1	3	6
	Celková hmotnost (mg)	120	150	300	600

Postup přípravy

1. Ve vhodném mixéru se míchají složky 1,2,3 po dobu 15 minut.
2. Prášková směs ze stupně 1 se granuluje s 20% PVK K30 roztokem.
3. Granulát z 2. stupně se suší při 50 °C.
4. Granulát ze stupně 3 se převede do vhodného mlecího zařízení.

5. K rozemletému granulátu ze stupně 4 se přidá složka 5 a směs se míchá 3 minuty.

6. Granulát z 5. stupně se lisuje na vhodném lisu.

Příklad 182. Formulace pro aerosolové podání

Složky	Qty/mL
Sloučenina podle vynálezu	3-150 mg*
Chlorid sodný	8,0 mg
Fosfátový pufr (20 mM) pH 7,0* q.s.	1,0 mL

* závisí na aktivitě sloučeniny

pH se může upravit roztokem hydroxidu sodného (1 N) nebo roztokem HCl (10 % hmotn./objem.)

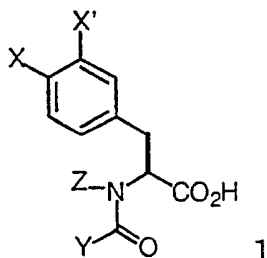
Postup:

1. Substance se rozpustí v pufru
2. Roztok se filtruje přes 0,22 mikronový filtr.

Distribuce částic po rozprášení shora uvedeného roztoku (měřeno na zařízení Malvern Mastersizer X) je v rozsahu 1 až 6 mikronů.

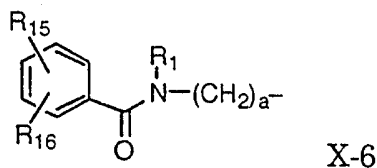
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina obecného vzorce:



kde

jedno z X a X' znamená vodík, halogen nebo nižší alkyl,
zbývající je skupina obecného vzorce:



kde:

R₁ je vodík nebo nižší alkyl,

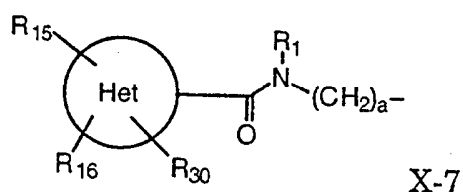
R₁₅ je halogen, nitro, nižší alkylsulfonyl, kyano, nižší alkyl, OH, nižší alkoxy, nižší alkoxykarbonyl, karboxy, nižší alkylaminosulfonyl, perfluor nižší alkyl, nižší alkylthio, hydroxy nižší alkyl, alkoxy nižší alkyl, halogen nižší alkyl, alkylthio nižší alkyl, alkylsulfinyl nižší alkyl, alkylsulfonyl nižší alkyl, nižší alkylsulfinyl, nižší alkanoyl, aroyl, aryloxy nebo skupina vzorce R₁₇C≡C-

R₁₆ je vodík, halogen, nitro, kyano, nižší alkyl, OH, perfluor nižší alkyl nebo nižší alkylthio,

R_{17} je vodík, aryl, heteroaryl, nebo nižší alkyl, který je substituován nebo nesubstituován OH, arylem nebo heteroarylem a

a je 0 nebo 1;

nebo jedno z X a X' je skupina obecného vzorce:



kde Het je 5- nebo 6-členný heteroaromatický kruh obsahující 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané z N, O a S;

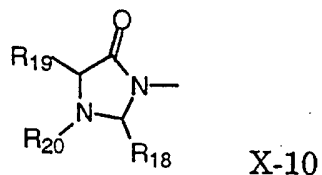
nebo

Het je 9- nebo 10-členný bicyklický heteroaromatický kruh obsahující 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomy vybrané z O, S a N,

a R_1 , R_{15} a R_{16} mají význam uvedený shora, a

R_{30} je vodík nebo nižší alkyl nebo je nepřítomno,

jedno z X a X' je skupina obecného vzorce:



kde:

R_{18} je nižší alkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, heteroarylalkyl,

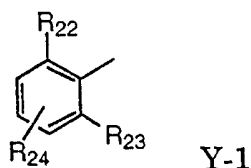
R_{19} je nižší alkyl, který je nesubstituován nebo je substituován jedním nebo více substituenty vybranými ze souboru, který zahrnuje halogen, hydroxy, nižší alkoxy, aryl, heteroaryl, alkylthio nebo R_{19} je aryl nebo heteroaryl, a

R_{20} je nižší alkyl nebo nižší alkanoyl, nebo

R_{19} a R_{20} spolu jsou tetramethylen;

a

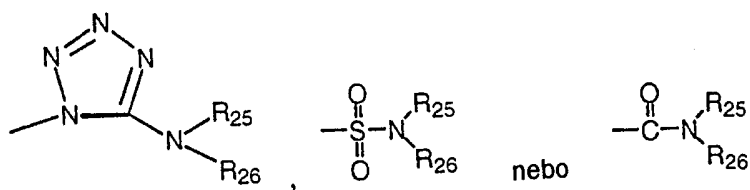
Y je skupina obecného vzorce:



kde:

R_{22} a R_{23} jsou nezávisle vodík, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkoxyalkyl, nižší alkylamino, aryl, arylalkyl, nitro, kyano, nižší alkylthio, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl, nižší alkanoyl, halogen nebo perfluoralkyl a alespoň jedno z R_{22} a R_{23} je jiné než vodík a

R_{24} je vodík, hydroxy, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkylsulfonyl, amino, aryl, nitro, kyano, halogen nebo je skupina obecného vzorce:



kde R_{25} je vodík, nižší alkyl, aryl, aryl nižší alkyl, alkoxy nižší alkyl a R_{26} je vodík nebo nižší alkyl nebo

R_{22} a R_{24} spolu tvoří kondenzovaný benzenový kruh; nebo

Y je skupina Y-2 která je pěti nebo šesti členná monocyklická heteroaromatická skupina obsahující 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané z N, O a S nebo 9- nebo 10-členná bicyklická heteroaromatická skupina obsahující 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomy vybrané z O, S a N, kde uvedená heteroaromatická skupina je vázána přes atom uhlíku k amidovému karbonylu a jeden nebo dva atomy uvedené heteroaromatické skupiny jsou substituovány nižším alkylem, halogenem, kyano, perfluoralkylem nebo arylem a alespoň jeden z uvedených substituovaných atomů uhlíku je sousední s atomem uhlíku vázaným k amidové karbonylové skupině;

a Z je vodík nebo nižší alkyl;

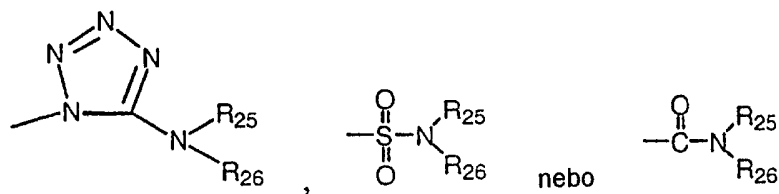
a její farmaceuticky přijatelné soli a estery.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde Z je vodík.

3. Sloučenina podle nároku 1 nebo 2, kde X' je vodík.

4. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_{22} a R_{23} jsou nezávisle vodík, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkoxyalkyl, nižší alkylamino, aryl, arylalkyl, nitro, kyano, nižší alkylthio, nižší alkylsulfinyl, nižší alkylsulfonyl, nižší alkanoyl, halogen nebo perfluoralkyl a alespoň jedno z R_{22} a R_{23} je jiné než vodík a

R_{24} je vodík, hydroxy, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkylsulfonyl, amino, aryl, nitro, kyano, halogen nebo je skupina obecného vzorce:

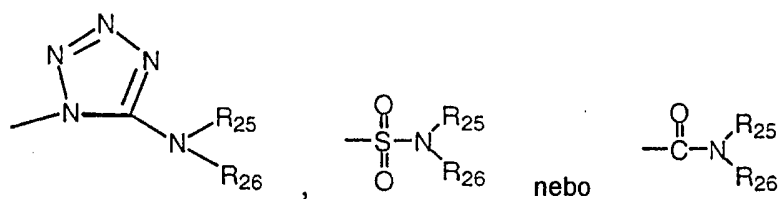


kde R_{25} je vodík, nižší alkyl, aryl, aryl nižší alkyl, alkoxy nižší alkyl a R_{26} je vodík nebo nižší alkyl nebo

R_{22} a R_{24} spolu tvoří kondenzovaný benzenový kruh.

5. Sloučenina podle nároku 4, kde R_{22} je vodík (když R_{23} je jiný než vodík), nižší alkyl nebo halogen.

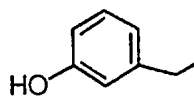
6. Sloučenina podle nároku 4 nebo nároku 5, kde R_{24} je vodík, hydroxy, nižší alkylsulfonyl, nižší alkyl, halogen, nižší alkoxy nebo skupina obecného vzorce:



kde R_{25} je nesubstituovaný nebo hydroxysubstituovaný fenyl nižší alkyl a R_{26} je vodík,

nebo R_{22} a R_{24} společně tvoří kondenzovaný fenylový kruh.

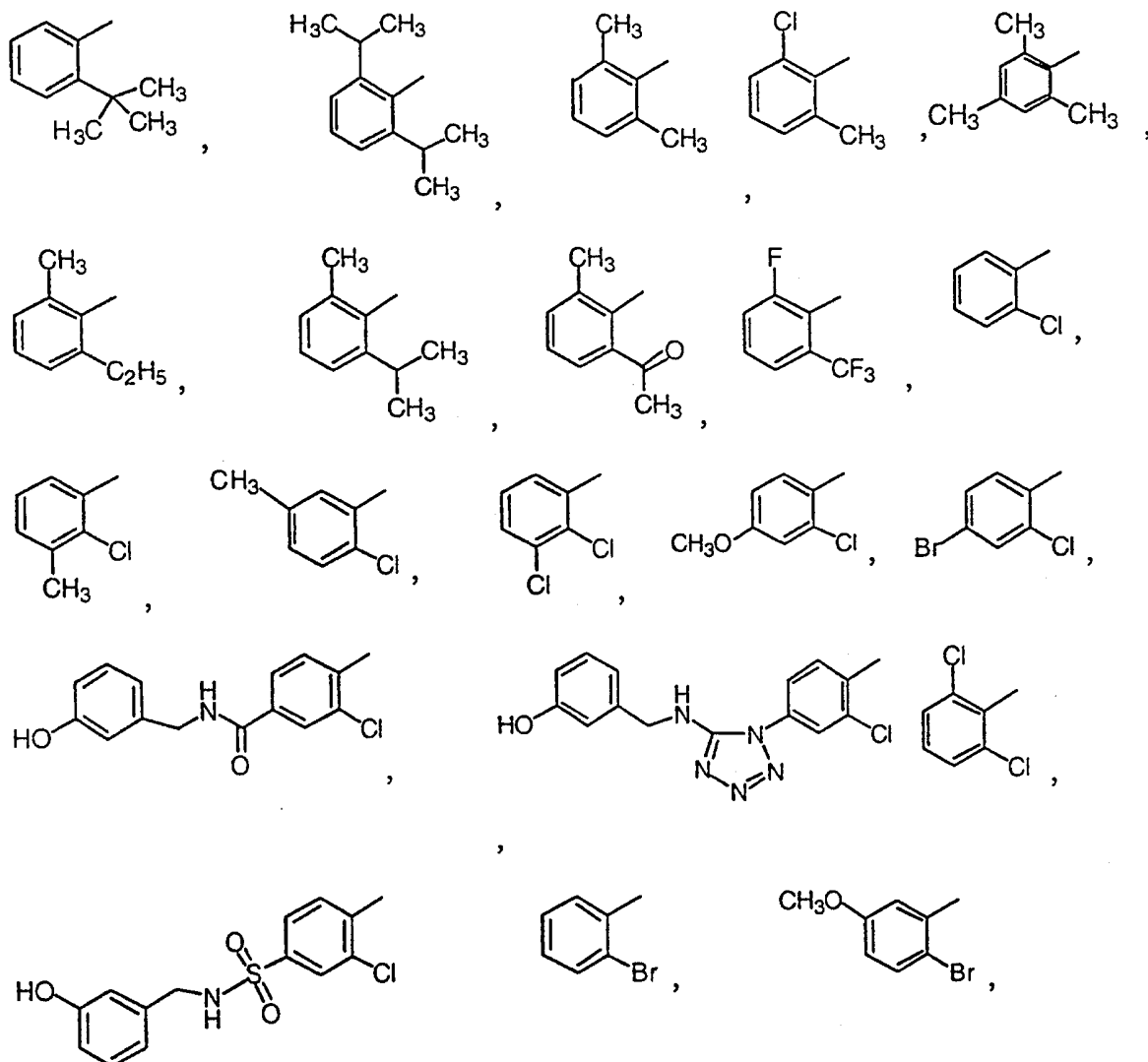
7. Sloučenina podle nároku 6, kde R_{24} je vodík, hydroxy, amino, methyl, chlor, brom, nitro, $-OCH_3$, $-SO_2CH_3$ a R_{26} je H a R_{25} je

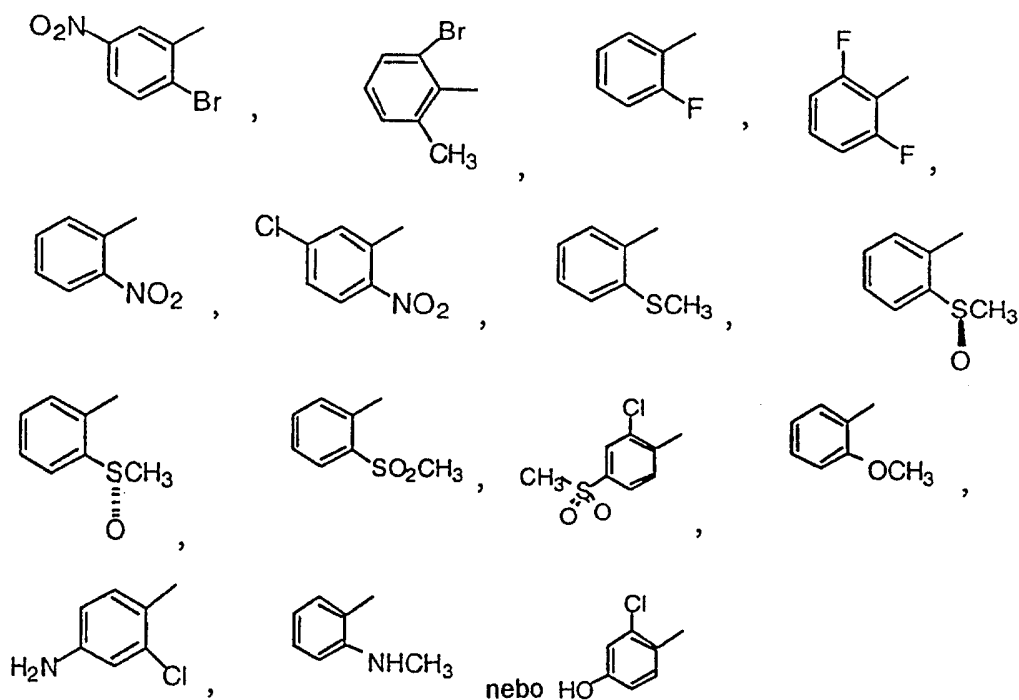


8. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 7, kde R_{23} je vodík (jestliže R_{22} je jiné než vodík), nižší alkyl, nižší alkylamino, halogen, nitro, perfluor nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkanoyl, nižší alkylsulfinyl nebo nižší alkylsulfonyl.

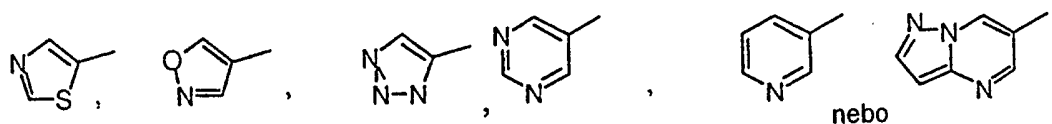
9. Sloučenina podle nároku 8, kde R_{23} je methyl, ethyl, isopropyl, terc.butyl, trifluormethyl, chlor, brom, fluor, nitro, $-\text{COCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, $-\text{SOCH}_3$, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, $-\text{NHCH}_3$ nebo $-\text{OCH}_3$.

10. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 9, kde Y-1 je vybráno ze skupiny zahrnující:

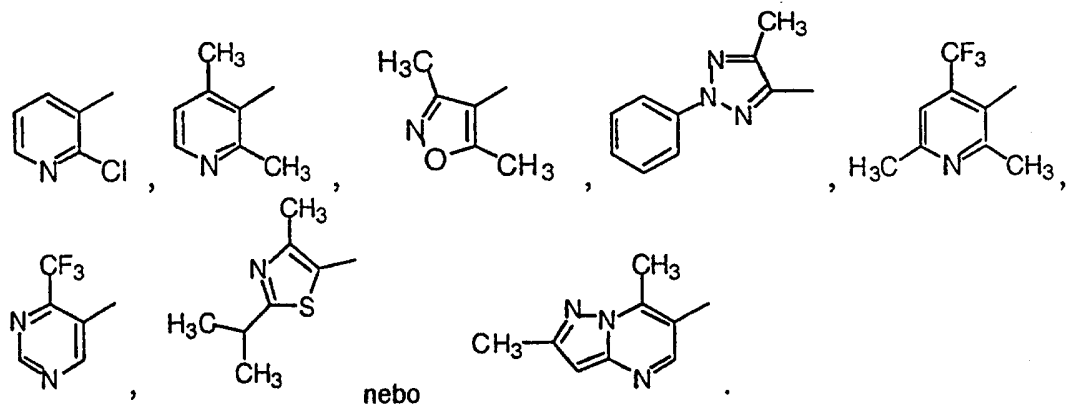




11. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde v Y-2 je monocyklická heteroaromatická nebo 9- nebo 10-členná bicyklická heteroaromatická skupina vybrána ze skupiny zahrnující:



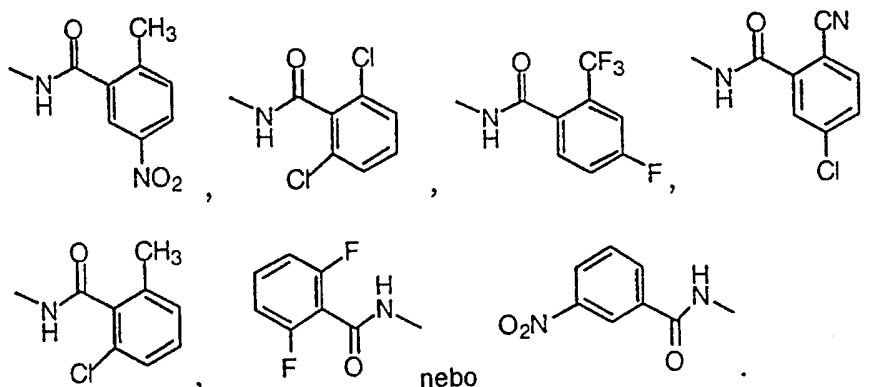
12. Sloučenina podle nároku 11, kde skupiny Y-2 jsou vzorce:



13. Sloučenina podle kterýchkoliv z nároků 1 až 3, kde v X-6 skupiny R_{15} a R_{16} jsou nezávisle vodík, nižší alkyl, nitro, halogen, perfluor nižší alkyl, kyano nebo aryloxy.

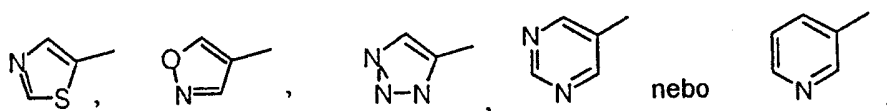
14. Sloučenina podle nároku 13, kde R_{15} nebo R_{16} je H, methyl, nitro, chlor, fluor, trifluormethyl, kyano nebo fenoxi.

15. Sloučenina podle nároku 13 nebo nároku 14, kde skupina X-6 je vzorce:



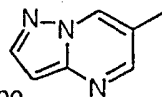
16. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde v H-7 Het je 5- nebo 6-členný monocyklický heteroaromatický kruh obsahující 1, 2 nebo 3 atomy dusíku nebo dusíku a síry nebo dusíku a kyslíku.

17. Sloučenina podle nároku 16, kde heteroaromatický kruh je



18. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde v X-7 Het je bicyklický heteroaromatický kruh obsahující 1 až 3 atomy dusíku jako heteroatomy.

19. Sloučenina podle nároku 18, kde bicyklický heteroaromatický kruh je



4-chinolinyl, 1-isochinolinyl nebo

20. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde v X-7 je R_{15} vodík, nitro, nižší alkyl sulfonyl, kyano, nižší alkyl, nižší alkoxy, perfluoralkyl, nižší alkylthio, nižší alkanoyl nebo aryl.

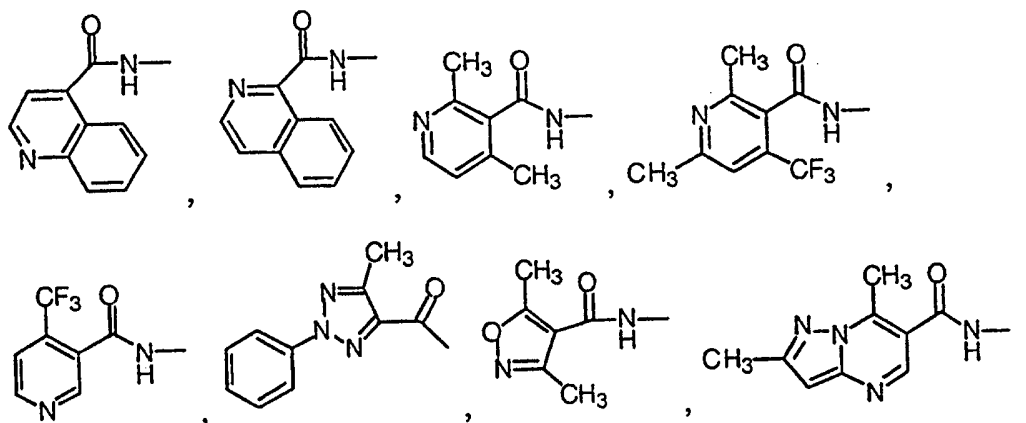
21. Sloučenina podle nároku 20, kde R_{15} je isopropyl, methyl nebo fenyl.

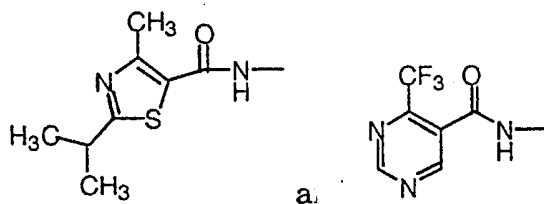
22. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_{16} v X-7 je vodík, halogen, nitro, kyano, nižší alkyl nebo perfluor nižší alkyl.

23. Sloučenina podle nároku 22, kde R_{16} je methyl nebo trifluormethyl.

24. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_{30} v X-7 je vodík nebo nižší alkyl.

25. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde skupiny X-7 jsou vzorce:





26. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_1 je v X-6 nebo v X-7 vodík.

27. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde a je v X-6 nebo X-7 0.

28. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_{18} je v X-10 nižší alkyl nebo fenyl, kde fenylový kruh je nesubstituován nebo je monosubstituován halogenem, hydroxy nebo je fenyl nižší alkyl.

29. Sloučenina podle nároku 28, kde R_{18} je terc.butyl, fenyl, fenoxý, chlorfenyl nebo fenylethyl.

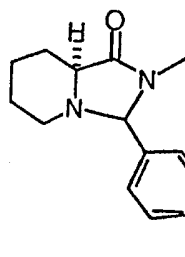
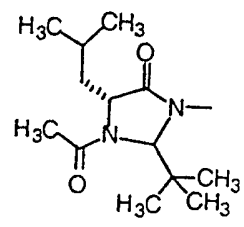
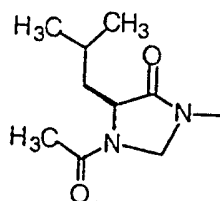
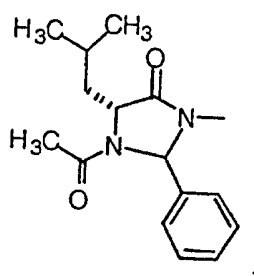
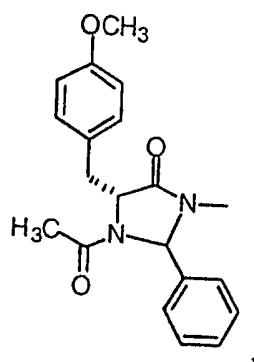
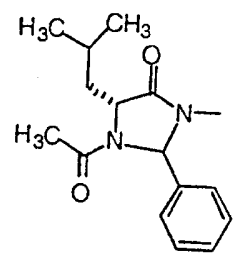
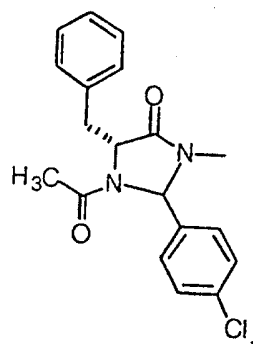
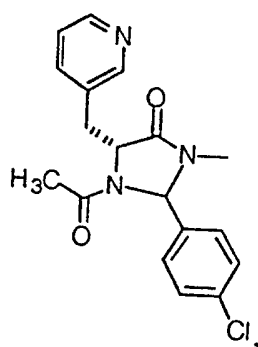
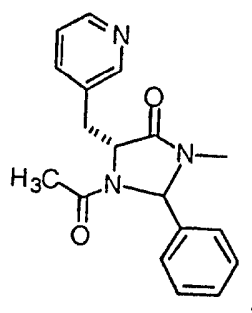
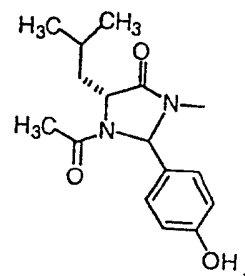
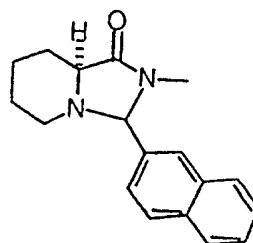
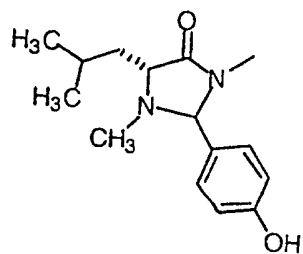
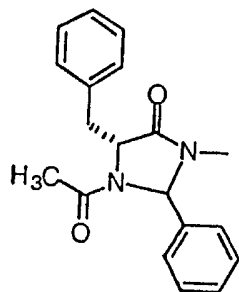
30. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R_{19} v X-10 je nižší alkyl, který je nesubstituován nebo je substituován pyridylem nebo fenylem, kde fenylový kruh je nesubstituován nebo je monosubstituován nižším alkoxy nebo halogenem.

31. Sloučenina podle nároku 30, kde R_{19} je methyl, isobutyl, benzyl, 4-chlorbenzyl, 4-methoxybenzyl nebo 2-pyridylmethyl.

32. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároku 1 až 3, kde R_{20} v X-10 je nižší alkanoyl.

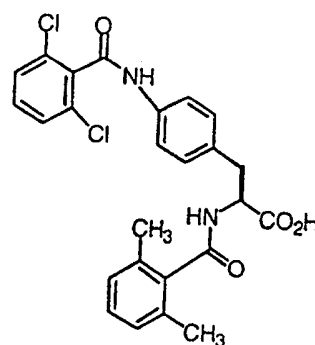
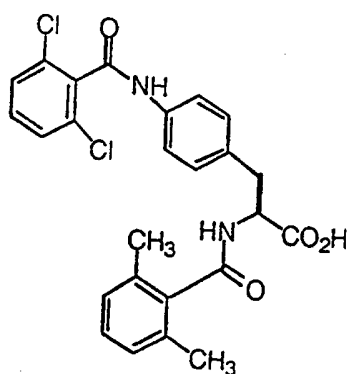
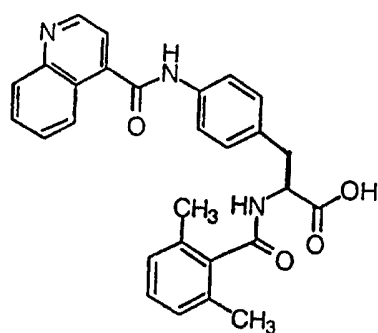
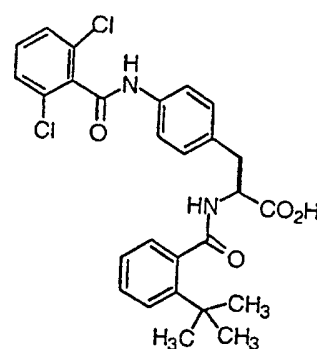
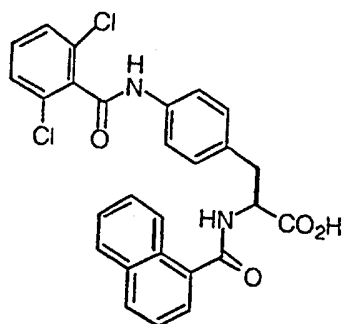
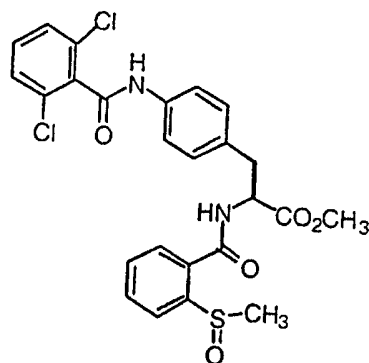
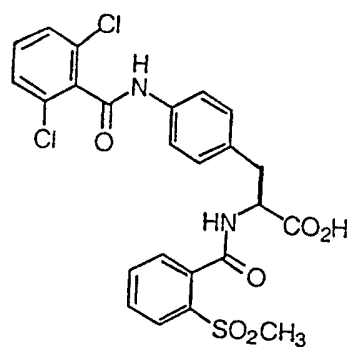
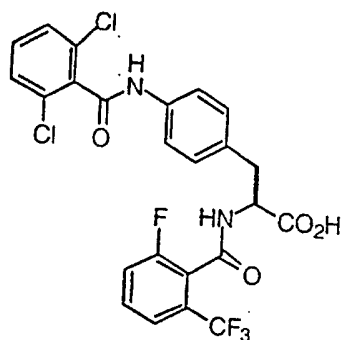
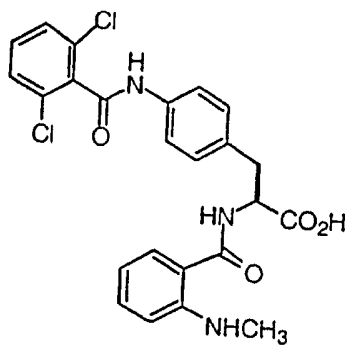
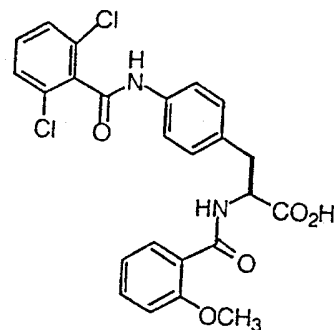
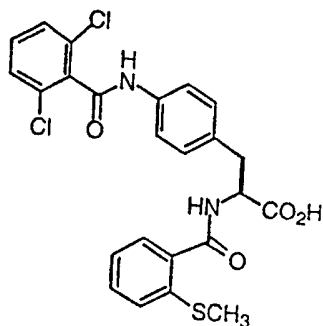
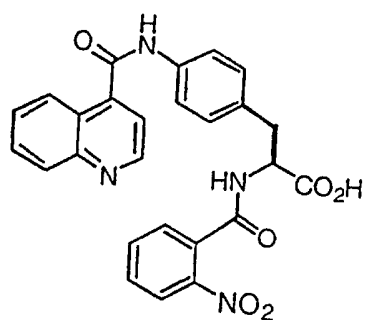
33. Sloučenina podle nároku 32, kde R_{20} je acetyl.

34. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde skupiny X-10 jsou vzorce:



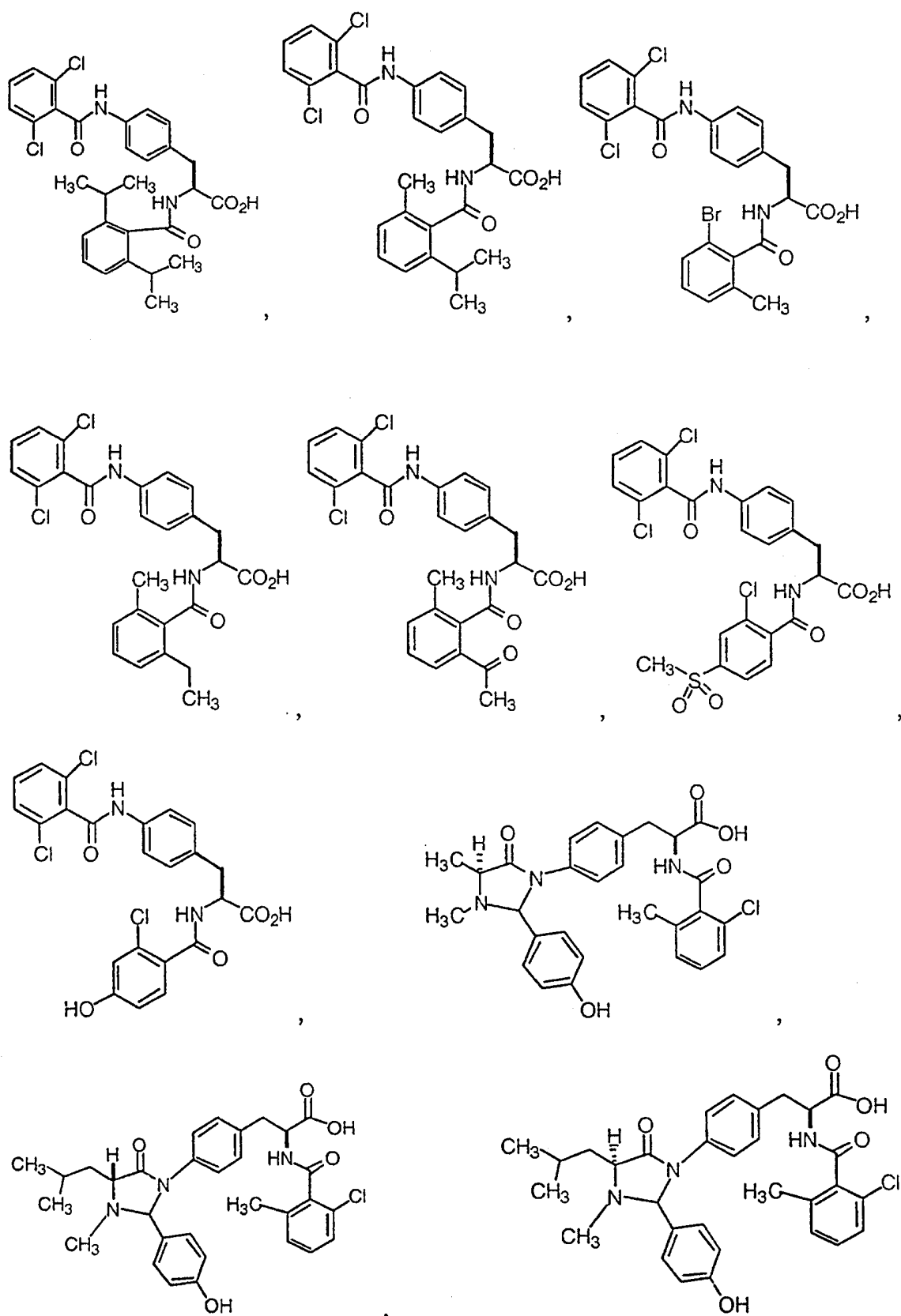
a.

35. Sloučenina vybraná ze skupiny:



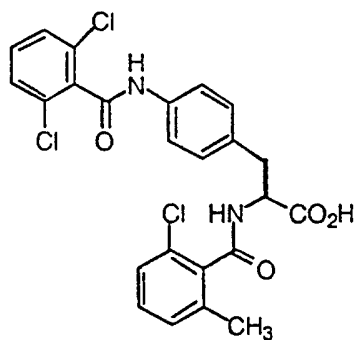
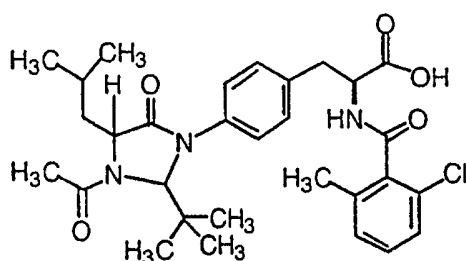
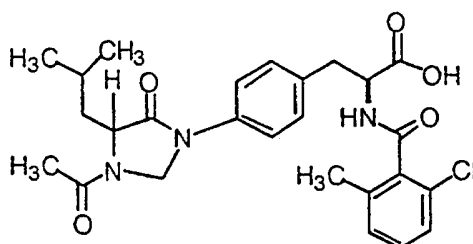
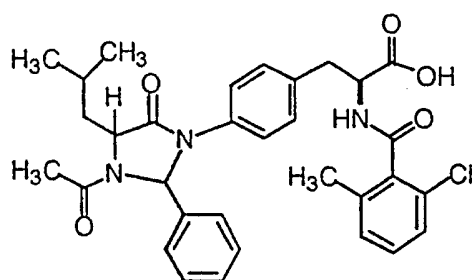
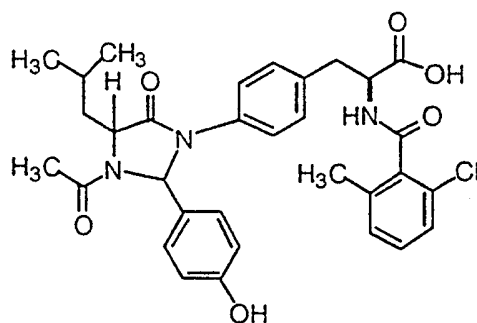
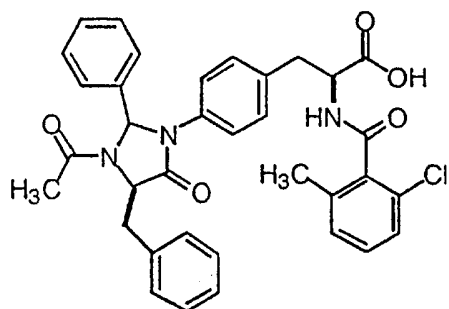
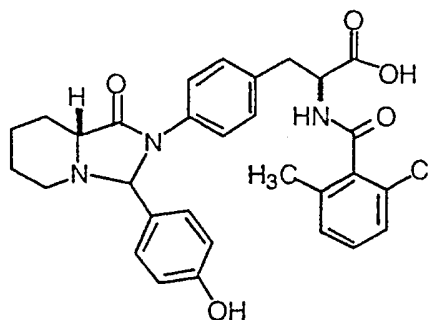
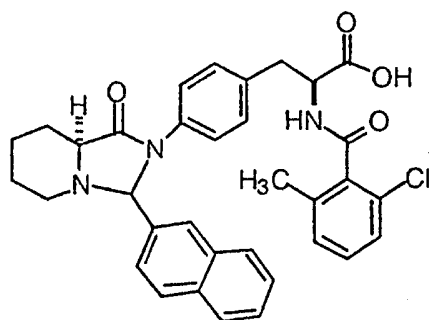
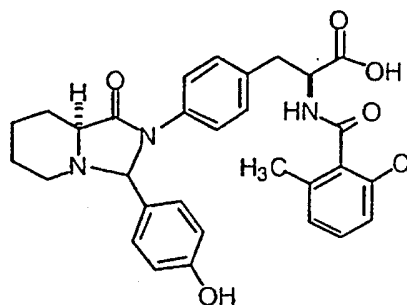
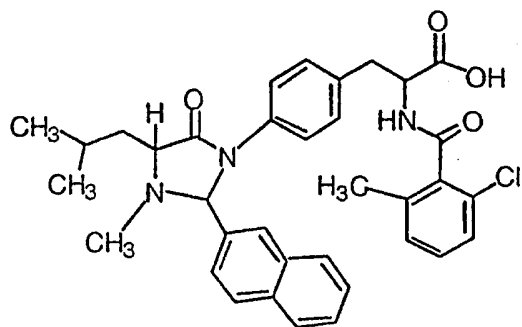
31.03.00

- 151 -



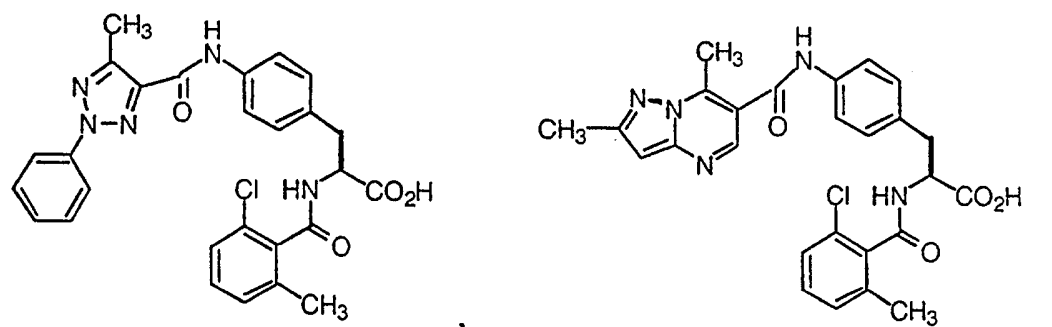
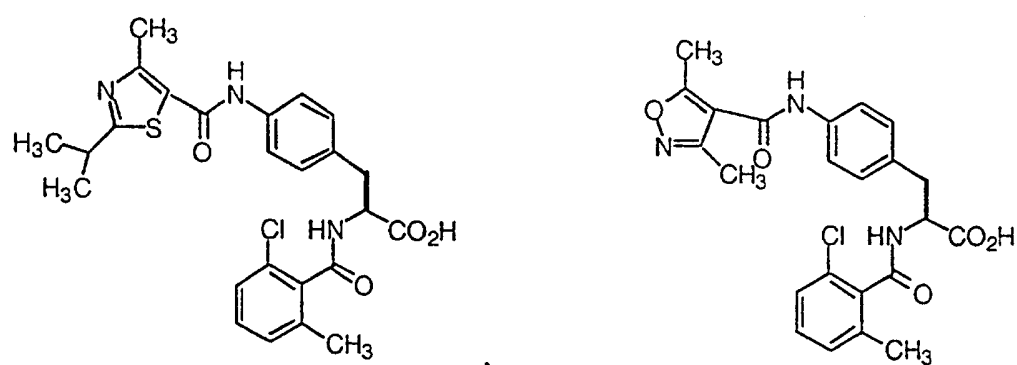
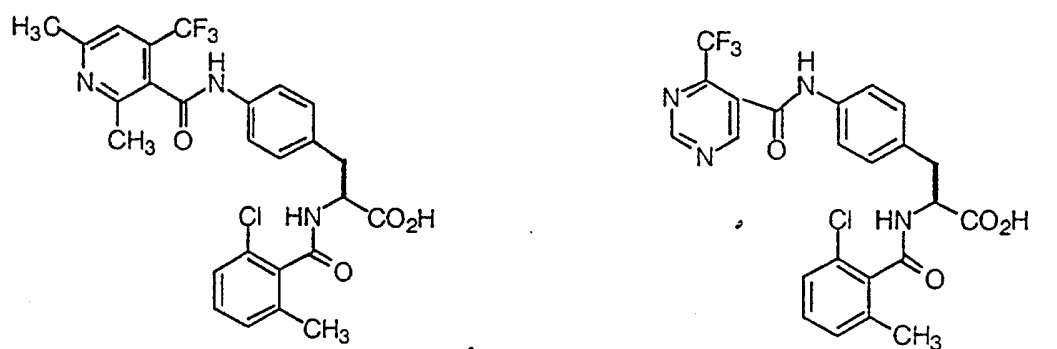
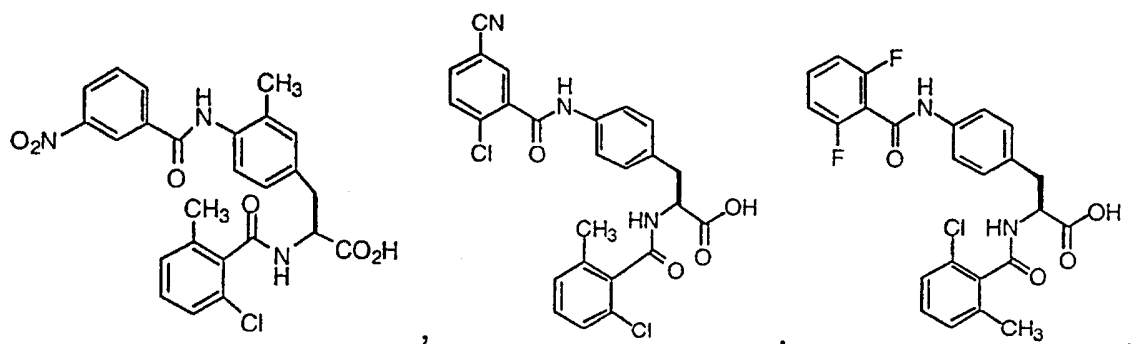
31.03.00

- 152 -



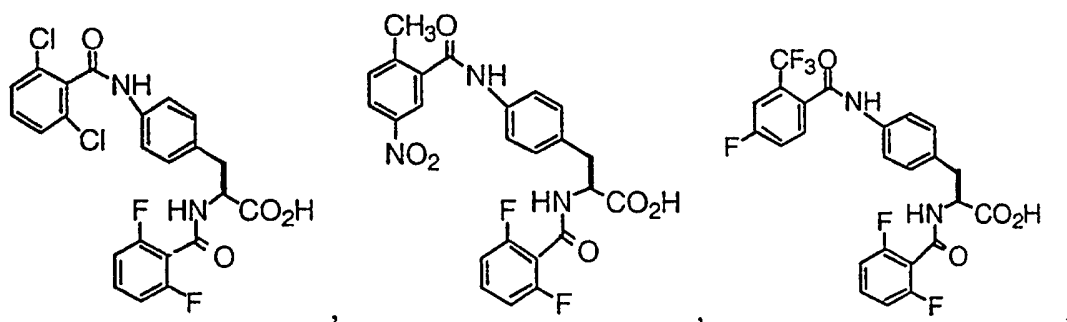
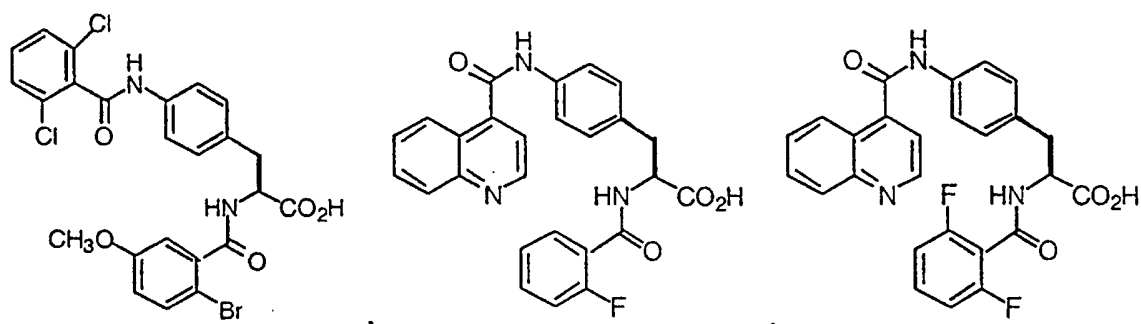
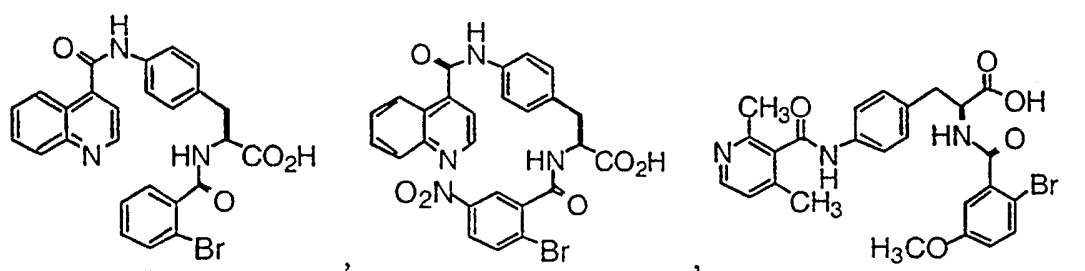
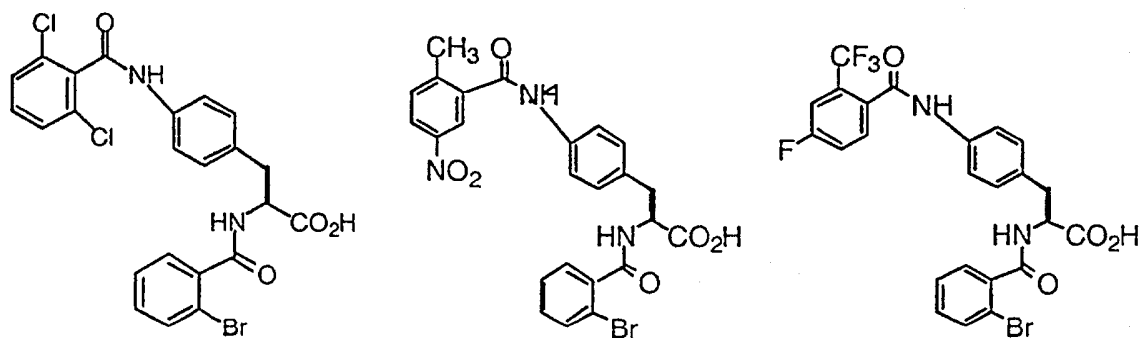
31.03.00

- 153 -



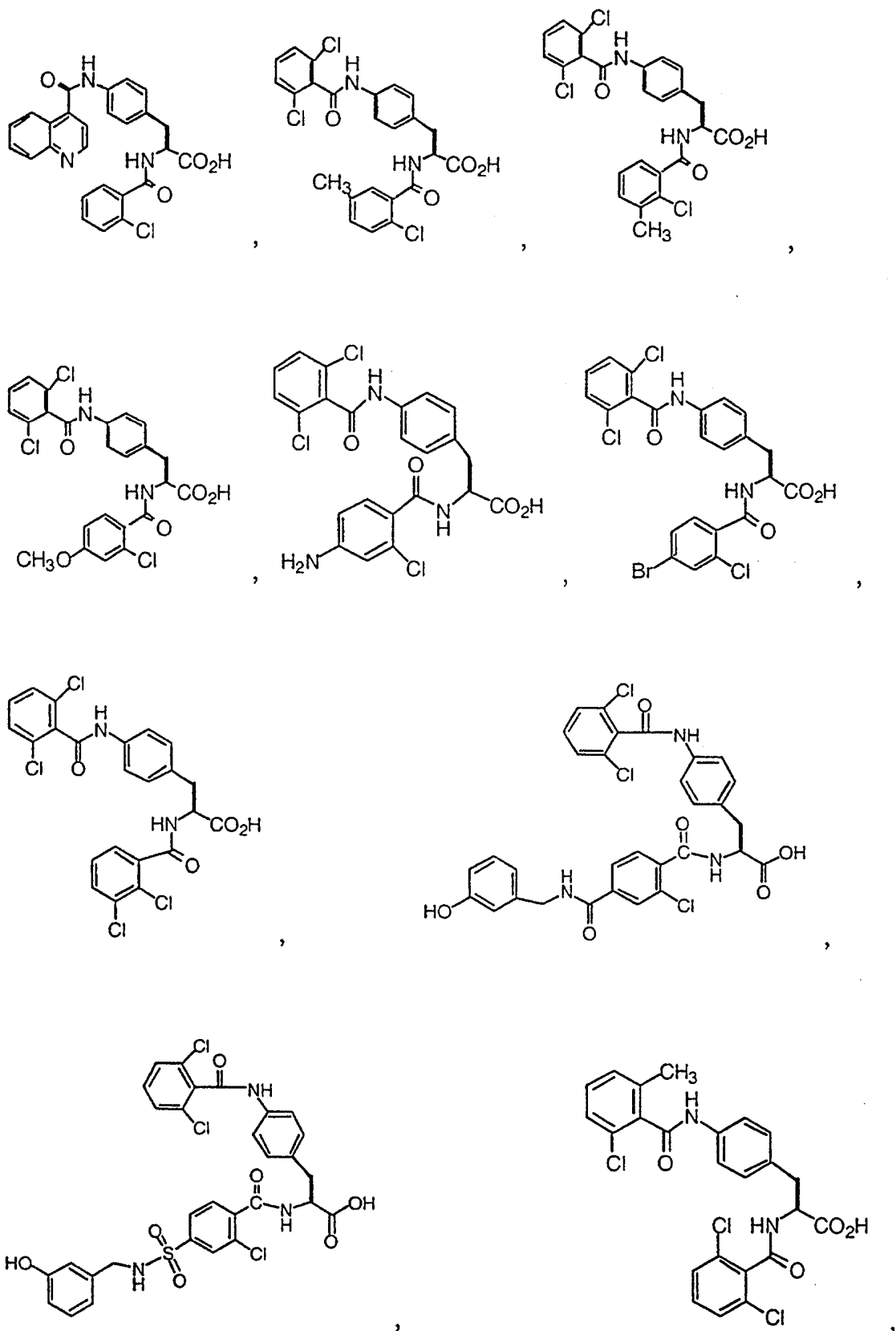
31.03.00

- 154 -



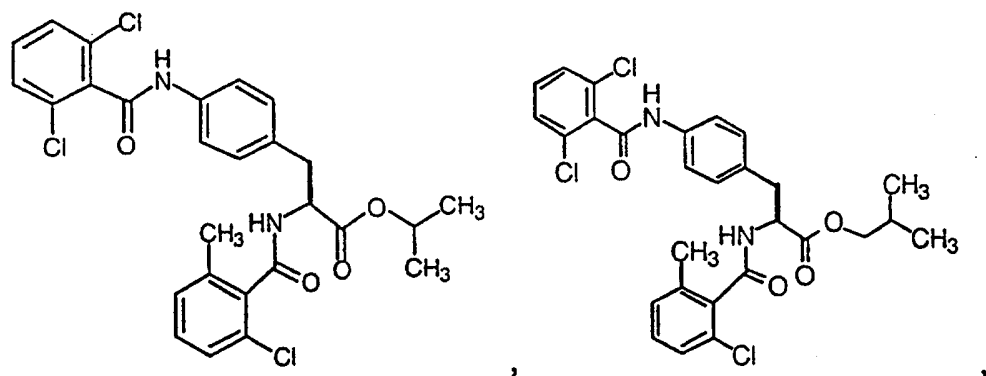
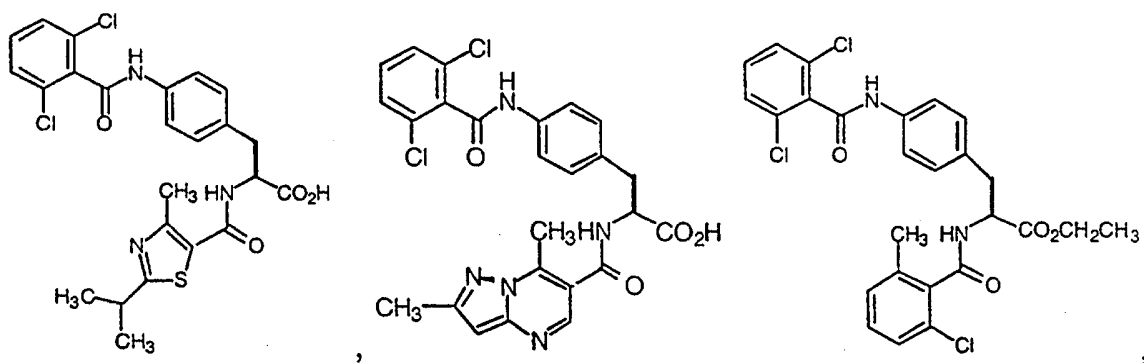
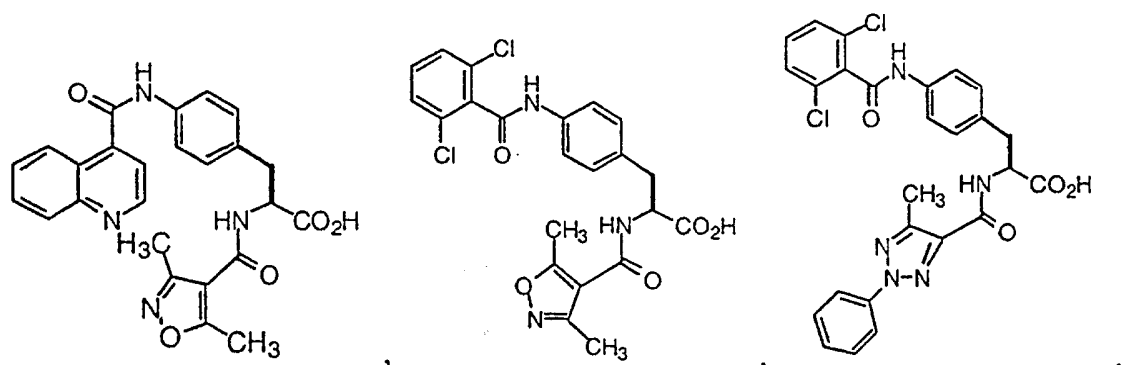
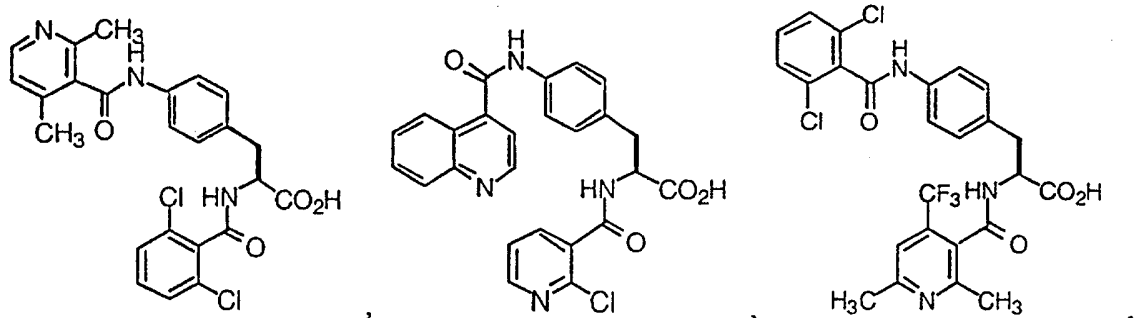
31.03.00

- 155 -



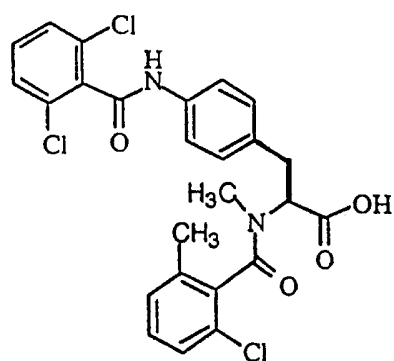
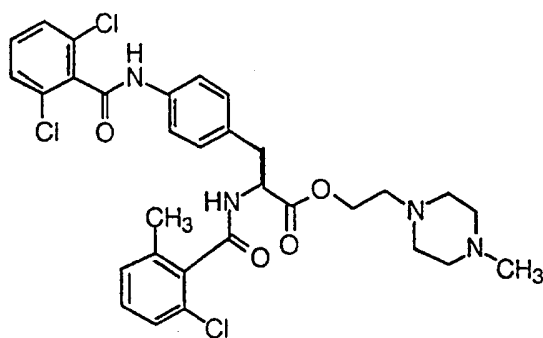
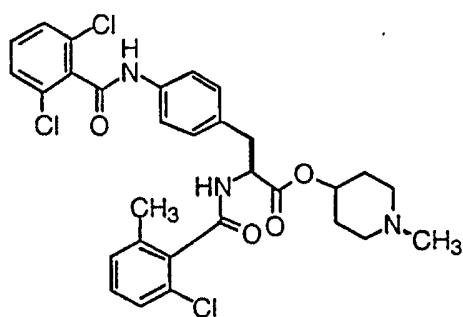
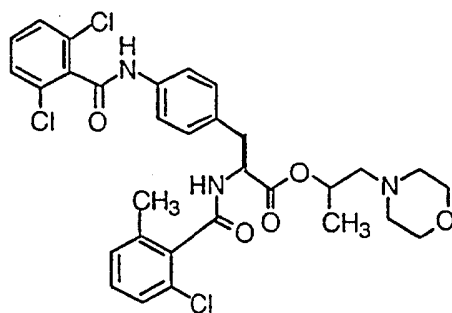
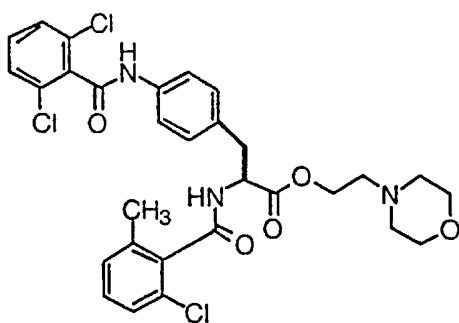
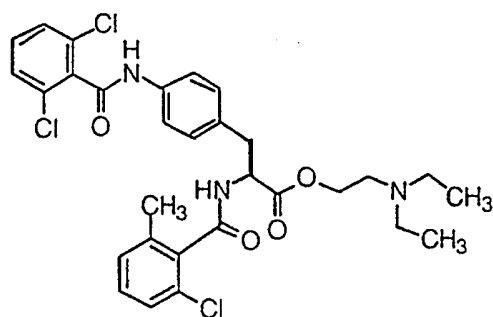
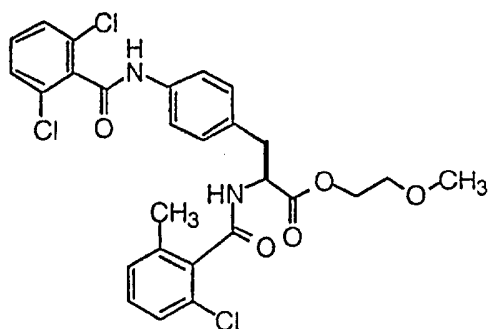
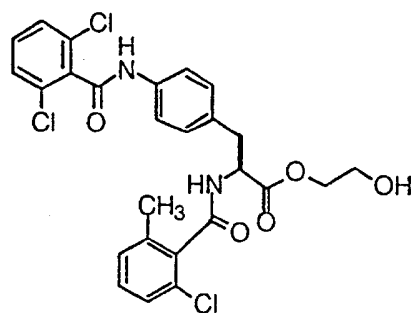
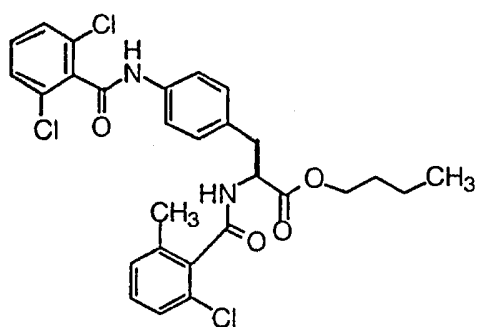
31.03.00

- 156 -



31.03.00

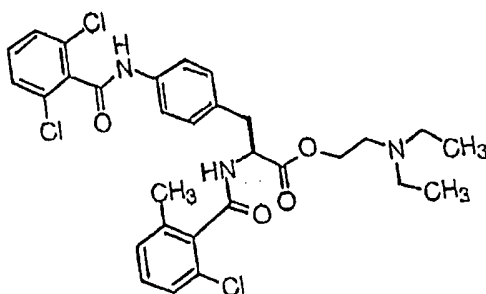
- 157 -



a.

36. Sloučenina podle nároku 1, kterou je N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino-L-fenylalanin nebo sodná sůl N-(2-chlor-6-methylbenzoyl)-4-[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu.

37. Sloučenina podle nároku 1, mající vzorec



kteou je 2-(N,N-diethylamino)ethylester N-[(2-chlor-6-methylfenyl)karbonyl]-4-[[(2,6-dichlorfenyl)karbonyl]amino]-L-fenylalaninu

38. Sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35 pro použití jako léčivo.

39. Sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35 pro použití jako léčivo při ošetření revmatické artritidy, násobné sklerózy, zánětlivého střevního syndromu nebo astma.

40. Léčivo, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35 a therapeuticky inertní nosičový materiál.

41. Léčivo pro ošetření revmatické artritidy, násobné sklerózy, zánětlivého střevního syndromu nebo astma, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu podle kteréhokoliv z nároku 1 až 35 a terapeuticky inertní nosičový materiál.

42. Způsob přípravy léčiva, zejména pro ošetření revmatické artritidy, násobné sklerózy, zánětlivého střevního syndromu nebo astma, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje převedení sloučeniny podle kterékoliv z nároků 1 až 35 do galenické formy spolu s terapeuticky inertním nosičovým materiálem a, je-li to žádoucí, jednu nebo více dalších terapeuticky aktivních látek.

43. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35 k ošetření nemocí, zejména při léčbě revmatické artritidy, násobné sklerózy, zánětlivého střevního syndromu nebo astma.

44. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35 k k přípravě léčiva pro ošetření revmatické artritidy, násobné sklerózy, zánětlivého střevního syndromu nebo astma.

45. Nové sloučeniny, meziprodukty, postupy, léčiva a způsoby jak jsou popsány shora.