

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 31.08.2001

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 31.08.2000 21.03.2001

(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/229398 2001/277641

(33) Země priority: US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 18.06.2003
(Věstník č. 6/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US01/26008

(87) PCT číslo zveřejnění: WO02/018369

(21) Číslo dokumentu:

2003 -595

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7:

C 07 D 403/00

C 07 K 14/18

C 07 K 7/06

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Babine Robert Edward, Franklin, MA, US;
Chen Shu Hui, Carmel, IN, US;
Collado Ivan, Madrid, ES;
Garcia-Paredes Cristina, Madrid, ES;
Glass John Irvin, Indianapolis, IN, US;
Jin Ling, Carmel, IN, US;
Lamar Jason Eric, Indianapolis, IN, US;
Parker Raymond Samuel III III., Doylestown, PA, US;
Snyder Nancy June, Lizton, IN, US;
Sun Xicheng, Superior, CO, US;
Tebbe Mark Joseph, Hamburg, DE;
Victor Frantz, Indianapolis, IN, US;
Wang Q May, Indianapolis, IN, US;
Yip Yvonne Yee Mai, Indianapolis, IN, US;
Guo Deqi, Carmel, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Peptidomimetické inhibitory proteáz

(57) Anotace:

Řešení se týká peptidomimetických sloučenin použitelných jako inhibitory proteáz, obzvláště jako inhibitory serinových proteáz a především jako inhibitory NS3 proteáz viru hepatitidy C; meziproduktů pro jejich výrobu; jejich přípravy včetně stereoselektivního způsobu výroby meziproduktů. Řešení se také týká farmaceutických kompozic a způsobů použití sloučenin pro inhibici HCV proteáz nebo pro léčeni pacienta trpícího HCV infekcí nebo fyziologickými stavy, které s ní souvisejí. Řešení se také týká farmaceutických kombinací, které obsahují kromě jednoho nebo více inhibitorů HCV serinové proteázy jeden nebo více interferonů, které mají má účinek proti HCV a/nebo jednu nebo více sloučenin, které mají má účinek proti HCV, a farmaceuticky přijatelný nosič, a způsobu léčení nebo prevence HCV infekce u

pacienta použitím těchto kompozic. Řešení se také týká souprav a farmaceutických balení pro léčení nebo prevenci HCV infekce u pacienta.

Peptidomimetické inhibitory proteáz

Oblast techniky

Předložený vynález se týká peptidomimetických sloučenin a meziproduktů pro jejich výrobu, jejich přípravy včetně stereoselektivního způsobu výroby meziproduktů, farmaceutických kompozic, obsahujících peptidomimetické sloučeniny a použití peptidomimetických sloučenin nebo kompozic s jejich obsahem jako inhibitorů proteáz, obzvláště jako inhibitorů serinových proteáz a především jako inhibitorů NS3 proteáz viru hepatitidy C ("HCV"). Peptidomimetické sloučeniny, jako jsou inhibitory HCV NS3 proteáz, jsou obzvláště vhodné pro interferenci s životním cyklem viru hepatitidy C a při léčení nebo prevenci HCV infekcí nebo fyziologických stavů, které s ní souvisejí. Předložený vynález se také týká způsobů provádění kombinační terapie pro inhibici replikace HCV v buňkách nebo pro léčení nebo prevenci HCV infekce u pacienta použitím peptidomimetických sloučenin nebo farmaceutických kompozic nebo souprav a farmaceutických balení vytvořených pro tento účel. Farmaceutické kompozice podle předloženého vynálezu jsou takové, které obsahují inhibitor HCV serinové proteázy v kombinaci s interferonem, který má účinek proti HCV; inhibitor HCV serinové proteázy v kombinaci se sloučeninou, jinou než interferon, která má účinek proti HCV; nebo inhibitor HCV serinové proteázy v kombinaci s interferonem, který má účinek proti HCV i se sloučeninou, jinou než interferon, která má účinek proti HCV. Předložený vynález se dále týká stereoselektivních způsobů přípravy

chirálních bicykloprolinátových meziproduktů, použitelných při syntéze peptidomimetických sloučenin.

Dosavadní stav techniky

Infekce způsobované virem HCV představují závažný problém v humánní medicíně a jsou nyní uznávány jako příčina většiny případů hepatitidy, která není typu A nebo B.

Předpokládá se, že 3 % světové populace je chronicky infikováno virem HCV [A. Alberti a kol., "Natural History of Hepatitis C", J. Hepatology, 31, (Suppl. 1), 17-24 (1999)]. V samotných Spojených státech je úroveň infekce 1,8% neboli 3,9 milionů osob [M. J. Alter, "Hepatitis C Virus Infection in the United States", J. Hepatology, 31, (Suppl. 1), 88-91 (1999)]. U více než 70 % pacientů se vyvine chronická infekce, která je považována za hlavní příčinu cirrhózy a hepatocelulárního karcinomu. [D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C", J. Viral Hepatitis, 6,35-47 (1999)].

Replikace HCV zahrnuje genomické kódování polyproteinu o 3010-3033 aminokyselinách [Q.-L. Choo a kol., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455 (1991); N. Kato a kol., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa a kol., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus

Genome Isolated From Human Carriers", J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)]. Předpokládá se, že HCV nestrukturální (NS) proteiny představují základní katalytický mechanismus virové replikace. NS proteiny vznikají proteolytickým štěpením polyproteinu [R. Bartenschlager a kol., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", J. Virol., 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui a kol. "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", J. Virol., 67, 2832-2843 (1993); A. Grakoui a kol., Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", J. Virol., 67, 1385-1395 (1993); L. Tomei a kol., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", J. Virol., 67, 4017-4026 (1993)]. Bylo ukázáno, že prvních 181 aminokyselin NS3 (zbytky 1027-1207 virového polyproteinu) obsahují oblast serinové proteázy NS3, která zpracovává všechna čtyři dále následující místa HCV polyproteinu [C. Lin a kol., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", J. Virol., 68, 8147-8157 (1994)].

HCV NS protein 3 (NS3) má účinek serinové proteázy, který napomáhá při zpracování většiny virových enzymů a tudíž je považován za podstatný pro replikaci a infekční vlastnosti viru. Důležitost NS3 proteázy byla vyvozena z faktu, že mutace NS3 proteázy ve viru žluté horečky snižují infekčnost viru [T. J. Chambers a kol., "Evidence that the

N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8898-8902 (1990)]. Nedávno bylo dokázáno, že mutace aktivního místa HCV NS3 proteázy mohou úplně odstranit HCV infekci v šimpanzím modelu [C. M. Rice a kol. "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*", *J. Virol.*, 74 (4) 2046-51 (2000)]. HCV NS3 serinová proteáza je také považována za podstatnou pro replikaci viru jako taková a s ní související kofaktor, NS4A, napomáhá zpracování všech enzymů viru. Zdá se, že toto zpracování je analogické zpracování aspartylové proteázy u viru lidské imunitní nedostatečnosti ("HIV"). Kromě toho demonstrované použití inhibitorů HIV proteáz jako potenciálních protivirových činidel u člověka ukazuje, že přerušení etapy zpracování proteázového proteinu v životním cyklu viru dává terapeuticky účinná činidla. V důsledku toho jsou proteázové enzymy atraktivní cíl při hledání nových léčiv.

Bylo popsáno několik potenciálních inhibitorů HCV proteáz. Publikované PCT přihlášky č. WO 00/09558, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO98/46630, WO 98/17679 a WO 97/43310, U.S. patent č. 5,990,276, M. Llinas-Brunet a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1713-1718 (1998), W. Han a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 711-713 (2000), R. Dunsdon a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 1571-1579 (2000), M. Llinas-Brunet a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2267-2270 (2000) a S.

LaPlante a kol., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2271-2274 (2000) všechny popisují potenciální inhibitory HCV NS3 proteáz. Naneštěstí však nejsou v současné době k dispozici žádné inhibitory serinových proteáz jako činidla proti HCV.

Ve skutečnosti nejsou k dispozici žádné terapie proti HCV s výjimkou inteferonu- α , kombinace inteferonu- α /ribavir a v nedávné době pegylovaný interferon- α . Udržitelné poměry odezvy u terapií inteferonem- α a kombinací inteferon- α /ribavirin však jsou obvykle nízké ($< 50\%$) a vedlejší účinky způsobované tímto způsobem léčby jsou obvykle významné a závažné [M. A. Walker, "Hepatitis C Virus: an Overview of Current Approaches and Progress", DDT, 4, 518-529 (1999); D. Moradpour a kol., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C", Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, 1199-1202 (1999); H. L. A. Janssen a kol., "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis", J. Hepatol., 21, 241-243 (1994); a P. F. Renault a kol., "Side effects of alpha interferon", Seminars in Liver Disease 9, 273-277, (1989)]. Kromě toho interferonové terapie indukují dlouhodobý ústup nemoci pouze u zlomku případů (přibližně 25%) [O. Weiland, "Interferon Therapie in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Mikrobiol. Rev., 14, 279-288 (1994)]. Výše uvedené problémy léčení pomocí inteferonu- α dokonce vedly k vývoji a klinickým zkouškám pegylačně derivatizovaných sloučenin na základě inteferonu- α jako zlepšených léčiv proti HCV.

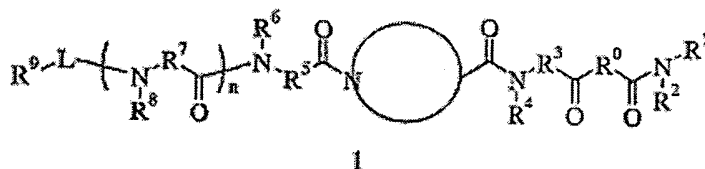
Vzhledem k současné situaci týkající se léčiv proti HCV je zřejmé, že přetrvává potřeba účinnějších a lépe snášených způsobů léčení.

Kromě toho byla syntéza složitých peptidomimetických sloučenin dlouho brzděna nestereoselektivní povahou většiny způsobů organické syntézy. Je dobře známo, že terapeutický účinek enantiomerů peptidomimetických sloučenin se mění v širokých rozmezích. Získání takových stereospecifických způsobů syntézy je proto velkým přínosem.

Předchozí pokusy syntetizovat chirálně specifické bicykloprolinátové meziprodukty, použitelné při syntéze terapeutických peptidomimetických inhibitorů proteáz dlouho trpěly tím, že nebyly enantioselektivní nebo diastereoselektivní nebo zahrnovaly dlouhé posloupnosti kroků syntézy nebo byly nevhodné pro přípravu velkého množství produktu. Proto také existuje potřeba způsobů přípravy velkých množství bicykloprolinátů diastereoselektivním způsobem a v enantiomericky obohacené formě.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká peptidomimetické sloučeniny obecného vzorce 1



ve kterém:

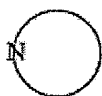
R^0 je vazba nebo difluormethylen;

R^1 je atom vodíku, popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^2 a R^9 jsou každý nezávisle popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^3 , R^5 a R^7 jsou každý nezávisle (popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina) (popřípadě substituovaný methylen nebo popřípadě substituovaný ethylen), popřípadě substituovaný (1,1- nebo 1,2-)cykloalkylen nebo popřípadě substituovaný (1,1- nebo 1,2-)heterocyklylen;

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou každý nezávisle atom vodíku nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;



je substituovaný monocyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl, ve kterém nenasycenost je v kruhu vzdáleném od kruhu nesoucího skupinu $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ a ke kterému je vázána skupina $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)_nR^2R^1$;

L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$, nebo $-NR^{10}S(O)_2-$;

a

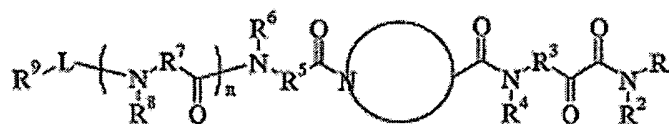
n je 0 nebo 1,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru,



s podmínkou, že pokud je substituovaný , potom L je $-OC(O)-$ a R^9 je popřípadě substituovaná alifatická skupina, nebo alespoň jeden z R^3 , R^5 a R^7 je (popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina) (popřípadě substituovaný ethandiyl), nebo R^4 je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

Předložený vynález se také týká sloučeniny, která má strukturní obecný vzorec:



ve kterém:

R^1 je atom vodíku, popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^2 a R^9 jsou každý nezávisle popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^3 , R^5 a R^7 jsou každý nezávisle (popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina) (popřípadě substituovaný methandiyl nebo popřípadě substituovaný ethandiyl);

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou každý nezávisle atom vodíku nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;



je substituovaný monocyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl, ve kterém nenasycenost je v kruhu vzdáleném od kruhu nesoucího

skupinu $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ a ke kterému je vázána skupina $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)_nR^2R^1$;

L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$, nebo $-NR^{10}S(O)_2-$;

a

n je 0 nebo 1,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor, nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru,



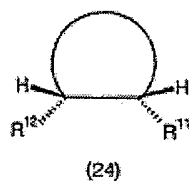
s podmínkou, že pokud  je substituovaný , potom L je $-OC(O)-$ a R^9 je popřípadě substituovaná alifatická skupina, nebo alespoň jeden z R^3 , R^5 a R^7 je (popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina) (popřípadě substituovaný ethandiyl), nebo R^4 je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

Předložený vynález je se také týká farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu obecného vzorce 1 a způsobu použití sloučeniny obecného vzorce 1 pro inhibici HCV proteázy nebo léčení nebo prevence HCV infekce u pacienta nebo fyziologického stavu vztahujícího se k infekci.

Předložený vynález je se také týká stereoselektivního způsobu přípravy chirální bicykloprolinátové sloučeniny, která je meziprodukt použitelný pro přípravu sloučeniny

obecného vzorce 1. Způsob syntézy zahrnuje následující kroky:

(a) štěpení a cyklizace sloučeniny obecného vzorce 24



ve kterém



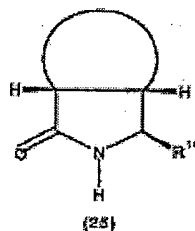
je popřípadě substituovaný cykloalkyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl;

R^{11} je $-CO_2R^{13}$;

R^{12} je iminový glycinimidový adukt;

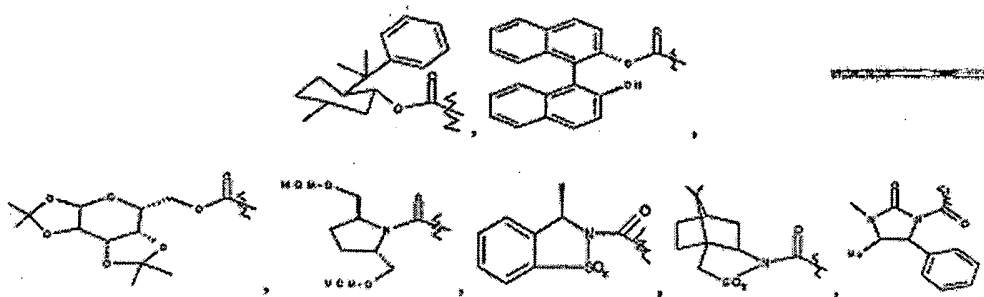
R^{13} je ochranná skupina kyseliny nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

za podmínek štěpení a cyklizace pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 25



ve kterém

R^{14} je $\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, CN ;

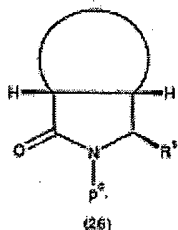


nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina; a

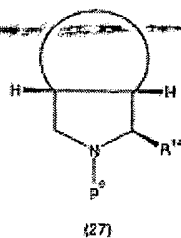
(b) ochrana atomu dusíku laktamové části sloučeniny obecného vzorce 25 ochrannou skupinou amidu pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 26



ve kterém:

p^0 je ochranná skupina amidu;
 R^{14} je jako bylo popsáno výše; a

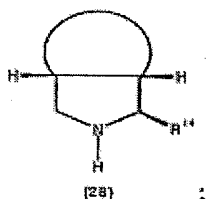
(c) redukce sloučeniny obecného vzorce 26 za redukčních podmínek pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 27



ve kterém:

p^0 a R^{14} jsou jako bylo popsáno výše; a

(d) odstranění ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 27 za podmínek vhodných pro odstranění ochranné skupiny, pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 28

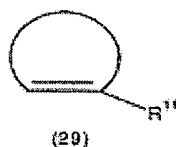


ve kterém:

R^{14} je jako bylo popsáno výše.

Předložený vynález se dále týká výše uvedeného způsobu syntézy, který dále zahrnuje krok, ve kterém se sloučenina

obecného vzorce 24 připraví provedením Michaelovy adice iminové glycinimidové sloučeniny na sloučeninu obecného vzorce 29



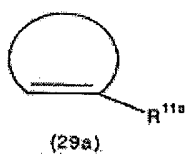
ve kterém:



je popřípadě substituovaný cykloalkenyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkenyl;

R^{11} je $-CO_2R^{13}$;

kde sloučenina obecného vzorce 29 může být připravena esterifikací sloučeniny obecného vzorce 29a



ve kterém:



je popřípadě substituovaný cykloalkenyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkenyl;

07.04.03

R^{11a} je $-\text{CHO}$, $-\text{COR}^{15}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$ nebo $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$; a R^{15} je jako bylo popsáno výše.

Odborník v oboru především ví, že přeměna ketonů na estery může být dosažena například Bayer-Villigerovou reakcí. Přeměna nitrilů a amidů na estery může být dosažena například vodnou hydrolýzou, následovanou další esterifikací. Přeměna aldehydů na estery může být dosažena například oxidací aldehydu následovanou esterifikací.

Předložený vynález se dále týká sloučeniny obecného vzorce 1, ve které substituenty jsou zvoleny ze souboru, zahrnujícího kombinace výhodných nebo zvláštních provedení, které budou definovány.

Předložený vynález se dále týká sloučenin obecných vzorců 24-29, kde substituenty jsou zvoleny ze souboru, zahrnujícího kombinace výhodných nebo zvláštních provedení, které budou definovány.

Předložený vynález se dále týká farmaceutických kompozic obsahujících kromě jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz také jeden nebo více interferonů nebo sloučenin, které indukují tvorbu interferonů, které vykazují účinek proti HCV a/nebo jednu nebo více sloučenin, které mají HCV aktivitu, včetně imunomodulačních sloučenin, jako jsou imunostimulační cytokiny, vykazující HCV protivirový účinek, a farmaceuticky přijatelný nosič.

Předložený vynález se dále týká způsobů léčení nebo prevence HCV infekce u pacienta, který má jeho potřebu, který zahrnuje podávání uvedenému pacientovi farmaceuticky účinného množství kombinace jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz; jednoho nebo více interferonů nebo sloučenin, které indukují tvorbu inteferonu, který vykazuje účinek proti HCV; a/nebo jedné nebo více sloučeniny, které mají účinek proti HCV, včetně imunomodulačních sloučenin jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek.

Předložený vynález je se dále týká použití jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz v kombinaci s jedním nebo více interferony nebo sloučeninami, které indukují tvorbu inteferonu, který vykazuje účinek proti HCV a/nebo jedné nebo více sloučenin, které mají účinek proti HCV, včetně imunomodulačních sloučenin jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci HCV infekce u pacienta, který má jeho potřebu.

Předložený vynález se také týká soupravy nebo farmaceutického balení pro léčení nebo prevenci HCV infekce u pacienta, kde souprava nebo farmaceutické balení obsahuje dvě nebo více oddělených nádobek, kde alespoň jedna uvedená nádobka obsahuje jeden nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz (samotných nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem), alespoň jedna další uvedená nádobka obsahuje jeden nebo více interferonů nebo sloučenin, které indukují tvorbu inteferonu, který vykazuje

účinek proti HCV, (samotný nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem) a popřípadě alespoň jedna uvedená nádobka obsahuje jednu nebo více sloučenin, které mají účinek proti HCV (samotných nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem), včetně imunomodulačních sloučenin, jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek.

Množství inhibitoru nebo inhibitorů HCV serinových proteáz, interferonu nebo interferonů nebo sloučeniny nebo sloučenin s účinkem proti HCV ve výše uvedených aplikacích může být farmaceuticky účinné množství, subklinické množství účinné proti HCV nebo jejich kombinace, pokud výsledná kombinace inhibitoru nebo inhibitorů HCV serinových proteáz, interferonu nebo interferonů nebo sloučeniny nebo sloučenin nebo sloučenin, které indukují tvorbu interferonu, který vykazuje účinek proti HCV a/nebo sloučeniny nebo sloučenin, který vykazují účinek proti HCV, zahrnuje farmaceuticky účinné množství sloučenin, které je účinné pro léčení nebo prevenci HCV infekce u pacienta.

Přehled vyobrazení

Výše uvedené a další znaky, charakteristiky a výhody předloženého vynálezu budou lépe srozumitelné po následujícím detailním popisu, který využívá přiložených obrázků, které jsou všechny uvedeny pouze jako ilustrace a neomezují předložený vynález, kde:

Obr. 1 ukazuje inhibici akumulace HCV replikonové RNA po 48 hodinách ošetření buněk, obsahujících replikon, sloučeninou CU a inteferonem- α 2B, individuálně nebo v kombinaci.

Obr. 2 graficky ukazuje isobolovou konkávnost, kterou vykazují sloučeniny, používané v kombinaci, které jsou antagonistické, aditivní a synergické podle způsobu výpočtu synergie, jak jej popsali Greco, Park a Ruston (1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50,5318-5327).

Obr. 3 ukazuje geometrický vztah mezi α a zakřivením isoboly. Hypotetická isobola pro hladinu účinku $E = 50\%$ je znázorněna přímkovou isobolou, která by byla očekávána v případě aditivity. M je průsečík přímky $y = x$ a hypotetické isoboly. N je průsečík přímky $y = x$ a přímkové isoboly. O je počátek (0,0). S označuje zakřivení isoboly, kde $S = ON/OM$. ON je vzdálenost od O k N a OM je vzdálenost od O k M. Parametr α souvisí s S rovnicí $\alpha = 4 (S^2 - S)$.

Obr. 4 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a interferonu alfa-2B (Schering-Plough) použitím 6 ředění každé sloučeniny v Experimentu 1.

Obr. 5 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a

interferonu alfa-2A použitím 6 ředění každé sloučeniny v Experimentu 2.

Obr. 6 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a interferonu alfa-2B (Schering-Plough) použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 3.

Obr. 7 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a interferonu alfa-2A použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 4.

Obr. 8 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a ovčího interferonu tau použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 5.

Obr. 9 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny EC a interferonu alfa-2B (Schering-Plough) použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 6.

Obr. 10 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny EC a interferonu alfa-2A použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 7.

Obr. 11 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny CU a

07.04.03

interferonu beta použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 8.

Obr. 12 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci sloučeniny EP a interferonu alfa-2B (Schering-Plough) použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 9.

Obr. 13 ukazuje výpočet isoboly použitím způsobu, který popsali Greco a kol., supra, pro kombinaci Ribavirinu a interferonu alfa-2B (Schering-Plough) použitím 8 ředění každé sloučeniny v Experimentu 10.

Obr. 14 ukazuje inhibici akumulace HCV replikonové RNA způsobenou ošetřením replikonových buněk buď (A) Ribavirinem samotným nebo (B) interferonem alfa-2B samotným. Na obou nákresech je znázorněna inhibice stejně tak jako inhibice korigovaná na cytotoxicitu sloučenin.

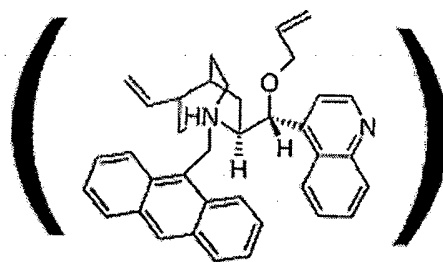
Detailní popis předloženého vynálezu

Obsah každého z patentových dokumentů a dalších referencí zde uvedených je zde ve svém celém rozsahu zahrnut jako reference.

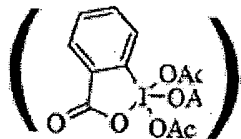
Jak byly použity výše a jak jsou používány dále v celém popisu předloženého vynálezu, následující zkratky, pokud není uvedeno jinak, mají následující významy:

Označení	Reakční činidlo nebo fragment
----------	-------------------------------

ACN	acetonitril
AIBN	2,2'-azobisisobutyronitril
BOC nebo Boc	terc.-butylkarbamát
BOP	benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfát
n-Bu ₃ SnH	hydrid tri-n-butylcínu
t-Bu	terc.-butyl
Cbz	benzylkarbamát
chirální PTC	chirální katalyzátor přenosu fáze

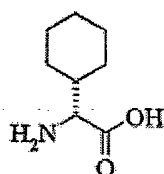


DAST	(diethylamino)sulfurtrifluorid (Et ₂ NSF ₃)
DCC	dicyklokarbodiimid
DCM	dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)
DIBAL-H	diisobutylaluminum hydrid
DIC	1,3-diisopropylkarbodiimid
DIPEA	diisopropylethylamin
DMAP	4-(N,N-dimethylamino)pyridin
Činidlo DMP	Dess-Martinovo periodinanové činidlo



DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EA	elementární analýza

EDCI	1-ethyl-
	3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid HCl
ekv.	ekvivalent (y)
Et	ethyl
Et ₂ O	diethylether
EtOH	ethanol
EtOAc	ethylacetát
Et ₃ Si	triethylsilan
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl



H-Chg-OH	
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBT	1-hydroxybenztriazol
HOSu	N-hydroxysukcinamid
HPLC	vysokovýkonná kapalinová chromatografie
LAH	lithium aluminum anhydrid
Me	methyl
MeI	methyljodid
MeOH	methanol
MeOC(O)Cl	methylchlorformát
MOMCl	methoxymethylchlorid
MOM	methoxymethyl
MS	hmotová spektroskopie
NaBH ₄	borhydrid sodný
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	vínan sodný
NMP	N-methylpyrrolidinon
NMR	nukleární magnetická rezonance
P-	polymerní vazba

PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytris-pyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfát
TBD	1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dec-5-en
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
TBSCl	terc.-butyldimethylsilyl chlorid
TCA	kyselina trichloroctová
TFA	kyselina trifluoroctová
Tf ₂ O	triflát anhydrid
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

Jak byly používány výše a při popisu předloženého vynálezu mají následující výrazy, pokud není uvedeno jinak, následující významy:

"Kyselý bioisoster" znamená skupinu, která má chemické a fyzikální podobnosti, které představují širokou škálu podobných biologických vlastností s karboxylovou skupinou (viz Lipinski, Annual Reports in Medicinal Chemistry, "Bioisosterism In Drug Design" 21,283 (1986); Yun, Hwahak Sekye, "Application Of Bioisosterism To New Drug Design" 33, 576-579, (1993); Zhao, Huaxue Tongbao, "Bioisosteric Replacement And Development Of Lead Compounds In Drug Design" 34-38, (1995); Graham, Theochem, "Theoretical Studies Applied To Drug Design: ab initio Electronic Distributions In Bioisosteres" 343, 105-109, (1995)). Příklady kyselých bioisosterů zahrnují -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfono,

alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl a podobně.

"Kyselá funkční skupina" znamená skupinu, obsahující kyselý atom vodíku. Příklady kyselých funkčních skupin zahrnují karboxyl ($-C(O)OH$), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, imidazolyl, merkaptó a podobně a vhodnou skupinu hydroxy, jako je skupina hydroxy na aromatické skupině, například hydroxyfenyl.

"Ochranná skupina kyseliny" znamená snadno odstranitelnou skupinu, o které je v oboru známo, že chrání kyselý atom vodíku karboxylové skupiny proti nežádoucím reakcím během syntézy, například blouje nebo chrání kyselou funkční skupinu, zatímco probíhají reakce týkající se dalších funkčních míst sloučeniny a ochrannou skupinu je možno odstranit selektivně. Takové ochranné skupiny kyselin jsou dobře známy odborníkům v oboru a jsou široce používány pro ochranu karboxylových skupin, jsou popsány v U. S. Patentech č. 3,840,556 a 3,719,667, které jsou zde zahrnuty jako reference. Příklady vhodných ochranných skupin kyselin jsou uvedeny v monografii T. W. Green a P. G. M. Wuts,

"Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991. Ochranné skupiny kyselin také zahrnují hydrogenačně labilní ochranné skupiny kyselin, jak jsou zde definovány. Příklady ochranných skupin kyselin zahrnují estery, jako je substituovaný a nesubstituovaný C₁-C₈ nižší alkyl, například methyl, ethyl, terc.-butyl, methoxymethyl, methylthiomethyl, 2,2,2-trichlorethyl a podobně, tetrahydropyranyl, substituovaný a nesubstituovaný fenylalkyl jako je benzyl a jeho substituované deriváty jako je alkoxybenzyl nebo nitrobenzylové skupiny a podobně, cinnamyl, dialkylaminoalkyl, například dimethylaminoethyl a podobně, trimethylsilyl, substituované a nesubstituované amidy a hydrazidy, například amidy a hydrazidy skupin N,N-dimethylamin, 7-nitroindol, hydrazin, N-fenylhydrazin a podobně, acyloxyalkylové skupiny jako je pivaloyloxymethyl nebo propionyloxymethyl a podobně, aroyloxyalkyl jako je benzoyloxyethyl a podobně, alkoxykarbonylalkyl jako je methoxykarbonylmethyl, cyklohexyloxykarbonylethyl a podobně, alkoxykarbonyloxyalkyl jako je terc.-butyloxykarbonyloxymethyl a podobně, alkoxykarbonylaminoalkyl jako je terc.-butyloxykarbonylaminomethyl a podobně, alkylaminokarbonylaminoalkyl jako je methylaminokarbonylaminomethyl a podobně, acylaminoalkyl jako je acetylaminomethyl a podobně, heterocyklylkarbonyloxyalkyl jako je 4-methylpiperazinyalkarbonyloxymethyl a podobně, dialkylaminokarbonylalkyl jako je dimethylaminokarbonylmethyl a podobně, (5-(nižší alkyl)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)alkyl jako je (5-terc.-butyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl a podobně a (5-fenyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)alkyl jako je (5-fenyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl a podobně.

"Kyselinově labilní ochranná skupina aminu" znamená ochrannou skupinu aminu, jak zde byla definována, kterou je možné snadno odstranit působením kyseliny, zatímco zůstává relativně stabilní k jiným činidlům. Výhodná kyselinově labilní ochranná skupina aminu je BOC.

"Alifatická" skupina znamená alkyl, alkenyl nebo alkinyl, jak zde byly definovány.

"Substituent(y) alifatické skupiny" znamenají substituenty, vázané k alifatické skupině, jak zde byla definována, zahrnují skupiny aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, atom halogenu, skupiny nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol,

methylen ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$), oxo ($\text{O}=\text{}$), thioxo ($\text{S}=\text{}$), $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, nebo $\text{Y}^3\text{SO}_2\text{NY}^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle na sobě atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl a Y^3 je alkyl, cykloalkylaryl nebo heteroaryl nebo v případě substituentu $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$ jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jak bylo definováno výše, nebo v případě substituentů $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$ nebo $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$ nebo Y^1 a Y^2 mohou spolu s druhým atomem dusíku, kterým jsou Y^1 a Y^2 spojeny, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl. Kyselé/amidové substituenty alifatické skupiny jsou karboxy (kyselina), $-\text{C}(\text{O})-\text{NHOH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CN}$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl a $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NCO}-$. Nekyselé polární substituenty alifatických skupin jsou hydroxy, oxo ($\text{O}=\text{}$), thioxo ($\text{S}=\text{}$), acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl,

heteroarylsulfinyl, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$. Příklady alifatických skupin nesoucích alifatický substituent zahrnují methoxymethoxy, methoxyethoxy, ethoxyethoxy, (methoxy-, benzyloxy-, fenoxý- nebo ethoxy-) karbonyl (methyl nebo ethyl), benzyloxykarbonyl, pyridylmethyloxykarbonylmethyl, methoxyethyl, ethoxymethyl, n-butoxymethyl, cyklopentylmethyloxyethyl, fenoxypentyl, fenoxyalyl, trifluormethyl, cyklopropylmethyl, cyklopentylmethyl, karboxy (methyl nebo ethyl), 2-fenethenyl, benzyloxy, 1- nebo 2-naftylmethoxy, 4-pyridyl-methyloxy, benzyloxyethyl, 3-benzyloxyallyl, 4-pyridylmethyl-oxyethyl, 4-pyridylmethyloxyallyl, benzyl, 2-fenethyl, naftylmethyl, styryl, 4-fenyl-1,3-pentadienyl, fenylpropinyl, 3-fenylbut-2-ynyl, pyrid-3-ylacetylenyl a chinolin-3-ylacetylenyl, 4-pyridyl-ethinyl, 4-pyridylvinyl, thienylethenyl, pyridylethenyl, imidazolyl-ethenyl, pyrazinylethenyl, pyridylpentenyl, pyridylhexenyl a pyridylheptenyl, thienyl-methyl, pyridylmethyl, imidazolylmethyl, pyrazinylmethyl, tetrahydropyranylmethyl, tetrahydropyranylmethyloxymethyl a podobně.

"Acyl" znamená skupinu $H-CO-$ nebo (alifatická skupina nebo cyklyl)- $CO-$, kde alifatická skupina je jak bylo popsáno výše. Výhodné acylové skupiny obsahují nižší alkyl. Příklady acylových skupin zahrnují formyl, acetyl, propanoyl, 2-methylpropanoyl, butanoyl, palmitoyl, akryloyl, propinoyl, cyklohexylkarbonyl a podobně.

"Alkenoyl" znamená skupinu alkenyl- $CO-$, kde alkenyl je jak zde bylo definováno.

"Alkenyl" znamená alifatickou uhlovodíkovou skupinu obsahující dvojnou vazbu uhlík-uhlík, která může být přímá nebo rozvětvená a má od přibližně 2 do přibližně 15 atomů uhlíku v řetězci.

Výhodné alkenylové skupiny mají od přibližně 2 do přibližně 12 atomů uhlíku v řetězci; a výhodněji od přibližně 2 do přibližně 4 atomů uhlíku v řetězci. Rozvětvený znamená, že jedna nebo více nižších alkylových skupin jako je methyl, ethyl nebo propyl je vázána k přímému alkenylovému řetězci.

"Nižší alkenyl" znamená od přibližně 2 do přibližně 4 atomů uhlíku v řetězci, který může být přímý nebo rozvětvený. Příklady alkenylových skupin zahrnují ethenyl, propenyl, n-butenyl, i-butenyl, 3-methylbut-2-enyl, n-pentenyl, heptenyl, oktenyl, cyklohexylbutenyl, decenyl a podobně.

"Substituovaný alkenyl" znamená alkenylovou skupinu jak bylo definováno výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty alifatických skupin" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde bylo definováno. Příklady substituentů alkenylových alifatických skupina zahrnují atom halogenu nebo cykloalkylové skupiny.

"Alkenyloxy" znamená skupinu alkenyl-O-, kde alkenylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklady alkenyloxy skupin zahrnují allyloxy, 3-butenyloxy a podobně.

"Alkoxy" znamená skupinu alkyl-O-, kde alkylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklady alkoxy skupin zahrnují

methoxy, ethoxy, n-propoxy, i-propoxy, n-butoxy, heptoxy a podobně.

"Alkoxykarbonyl" znamená skupinu alkyl-O-CO-, kde alkylová skupina je jak bylo definováno výše. Příklady alkoxykarbonylových skupin zahrnují methoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, terc.-butyloxykarbonyl a podobně.

"Alkyl" znamená alifatickou uhlovodíkovou skupinu, která může být přímá nebo rozvětvená a mít od přibližně 1 do přibližně 20 atomů uhlíku v řetězci. Výhodné alkylové skupiny mají od 1 do přibližně 12 atomů uhlíku v řetězci, výhodnější je nižší alkyl, jak zde bylo definováno. Rozvětvený znamená, že jedna nebo více nižších alkylových skupin jako je methyl, ethyl nebo propyl, jsou vázány na přímý alkylový řetězec.

"Nižší alkyl" znamená alkyl, který má od přibližně 1 do přibližně 4 atomů uhlíku v řetězci a může být přímý nebo rozvětvený. "Substituovaný alkyl" znamená alkylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituován jedním nebo více "substituenty alifatických skupin" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde bylo definováno.

"Alkylsulfinyl" znamená skupinu alkyl-SO-, kde alkylová skupina je jak bylo definováno výše. Výhodné skupiny jsou ty, ve kterých alkylová skupina je nižší alkyl.

"Alkylsulfonyl" znamená skupinu alkyl-SO_2- , kde alkylová skupina je jak bylo definováno výše. Výhodné skupiny jsou ty, ve kterých alkylová skupina je nižší alkyl.

"Alkylsulfonylkarbamoyl" znamená skupinu $\text{alkyl-SO}_2\text{-NH-C(=O)-}$, kde alkylová skupina je jak bylo popsáno výše. Výhodné alkylsulfonylkarbamoylové skupiny jsou takové, kde alkylová skupina je nižší alkyl.

"Alkylthio" znamená skupinu alkyl-S- , kde alkylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklady alkylthio skupin zahrnují methylthio, ethylthio, i-propylthio a heptylthio.

"Alkynyl" znamená alifatickou uhlovodíkovou skupinu, obsahující trojnou vazbu uhlík-uhlík, která může být přímá nebo rozvětvená a mít od přibližně 2 do přibližně 15 atomů uhlíku v řetězci.

Výhodné alkynylové skupiny mají od přibližně 2 do přibližně 12 atomů uhlíku v řetězci a výhodněji od přibližně 2 do přibližně 4 atomů uhlíku v řetězci. Rozvětvený znamená, že jedna nebo více nižších alkylových skupin jako je methyl, ethyl nebo propyl jsou vázány na přímý alkynylový řetězec. "Nižší alkynyl" znamená skupinu, která má od přibližně 2 do přibližně 4 atomů uhlíku v řetězci a může být přímá nebo rozvětvená. Alkynylová skupina může být substituována jedním nebo více atomy halogenu. Příklady alkynylových skupin zahrnují ethynyl, propynyl, n-butylnyl, 2-butylnyl, 3-methylbutynyl, n-pentylnyl, heptylnyl, oktylnyl, decylnyl a podobně. "Substituovaný alkynyl" znamená alkynyl jak byl

definován výše, který je substituovaný jedním nebo více "substituenty alifatických skupin" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde bylo definováno.

"Ochranná skupina aminové skupiny" nebo "ochranná skupina aminu" znamená snadno odstranitelnou skupinu, o které je v oboru známo, že chrání atom dusíku v aminové nebo amidové skupině proti nežádoucí reakci během syntézy a je selektivně odstranitelná. Použití ochranných skupin aminu/amidu je v oboru dobře známo pro ochranu skupin proti nežádoucím reakcím během syntézy a mnoho takových ochranných skupin je známo, viz například monografie T. W. Greene a P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2. vydání, John Wiley & Sons, New York (1991), která je zde zahrnuta jako reference. Ochranné skupiny aminu/amidu také zahrnují "kyselinově labilní ochranné skupiny aminu/amidu" a "hydrogenačně labilní ochranné skupiny aminu/amidu".

Příklady ochranných skupin aminu/amidu jsou acyl, v to počítaje formyl, acetyl, chloracetyl, trichloracetyl, o-nitrofenylacetyl, o-nitrofenoxy-acetyl, trifluoracetyl, acetoacetyl, 4-chlorbutyryl, isobutyryl, o-nitrocinnamoyl, pikolinoyl, acylisothiokyanát, aminokaproyl, benzoyl a podobně a acyloxy, v to počítaje methoxy-karbonyl, 9-fluorenylmethoxykarbonyl, 2,2,2-trifluorethoxykarbonyl, 2-trimethylsilylethoxy-karbonyl, vinyloxykarbonyl, allyloxykarbonyl, terc.-butyloxykarbonyl (BOC), 1,1-dimethyl-propinyloxykarbonyl, benzyloxykarbonyl (CBZ),

p-nitrobenzyloxykarbonyl, 2,4-dichlor-benzyloxykarbonyl a podobně.

"Ochranná skupina amidu" znamená snadno odstranitelnou skupinu, o které je v oboru známo, že chrání atom dusíku amidové skupiny proti nežádoucí reakci během syntézy a je selektivně odstranitelná po její přeměně na amin. Použití ochranných skupin amidu je v oboru dobře známo pro ochranné skupiny proti nežádoucím reakcím během syntézy a je známo mnoho takových ochranných skupin, viz například monografie T. W. Greene a P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2. vydání, John Wiley & Sons, New York (1991), která je zde zahrnuta jako reference. Ochranné skupiny amidu také zahrnují "kyselinově labilní ochranné skupiny amidu" a "hydrogenačně labilní ochranné skupiny amidu".

Příklady ochranných skupin amidu jsou o-nitrocinnamoyl, pikolinoyl, aminokaproyl, benzoyl a podobně a acyloxy, v to počítaje methoxykarbonyl, 9-fluorenylmethoxykarbonyl, 2,2,2-trifluorethoxykarbonyl, 2-trimethylsilylethoxykarbonyl, vinyloxykarbonyl, allyloxykarbonyl, terc.-butyloxykarbonyl (BOC), 1,1-dimethyl-propinyloxykarbonyl, benzyloxykarbonyl (CBZ), p-nitrobenzyloxykarbonyl, 2,4-dichlor-benzyloxykarbonyl a podobně.

"Aminokyselina" znamená aminokyselinu zvolenou ze souboru, zahrnujícího přírodní a v přírodě se nevyskytující aminokyseliny, jak zde byly definovány. Aminokyselina také zahrnuje aminokyseliny, které mají stereochemii L nebo D na α -uhlíku. Výhodné aminokyseliny jsou ty, které mají α -

aminovou skupinu. Aminokyseliny mohou být neutrální, kladné nebo záporné v závislosti na substituentech v postranním řetězci. "Neutrální aminokyselina" znamená aminokyselinu, obsahující nenabitě substituenty v postranním řetězci. Příklady neutrálních aminokyselin zahrnují alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, tryptofan, methionin, glycin, serin, threonin a cystein. "Kladná aminokyselina" znamená aminokyselinu, ve které jsou substituenty v postranním řetězci kladně nabitě při fyziologickém pH. Příklady kladných aminokyselin zahrnují lysin, arginin a histidin. "Záporná aminokyselina" znamená aminokyselinu, ve které jsou substituenty v postranním řetězci nesou při fyziologickém pH záporný náboj. Příklady záporných aminokyselin zahrnují kyselinu aspartovou a kyselinu glutamovou. Výhodné aminokyseliny jsou α -aminokyseliny. Příklady přírodních aminokyselin jsou isoleucin, prolin, fenylalanin, tryptofan, methionin, glycin, serin, threonin, cystin, tyrosin, asparagin, glutamin, lysin, arginin, histidin, kyselina aspartová a kyselina glutamová. "V přírodě se nevyskytující aminokyseliny" znamenají aminokyseliny pro které neexistuje kodon v nukleových kyselinách.

Příklady v přírodě se nevyskytující aminokyselin zahrnují například D-isomery přírodních α -aminokyselin uvedených výše; Aib (kyselina aminomáselná), β Aib (kyselina 3-aminoisomáselná), Nva (norvalin), β -Ala, Aad (kyselina 2-aminoadipová), β Aad (kyselina 3-aminoadipová), Abu (kyselina 2-aminomáselná), Gaba (kyselina γ -aminomáselná),

07.04.03

Acp (kyselina 6-aminokapronová), Dbu (kyselina 2,4-diaminomásečná), kyselina α -aminopimelová, TMSA (trimethylsilyl-Ala), alle (allo-isoleucin), Nle (norleucin), terc.-Leu, Cit (citrulin), Orn, Dpm (kyselina 2,2'-diaminopimelová), Dpr (kyselina 2,3-diaminopropionová), α - nebo β -Nal, Cha (cyklohexyl-Ala), hydroxyprolin, Sar (sarkosin) a podobně; cyklické aminokyseliny; Na-alkylované aminokyseliny jako je MeGly (Na-methylglycin), EtGly (Na-ethylglycin) a EtAsn (Na-ethylasparagin); a aminokyseliny, ve kterých α -uhlík nese dva postranní řetězce. Jména přírodních a v přírodě se nevyskytujících aminokyselin a jejich zbytků, které jsou zde užívány, jsou vytvořena podle nomenklaturních konvencí, které navrhla IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry a IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, jak jsou uvedeny v "Nomenclature of α -amino Acids (Recommendations, 1974)" Biochemistry, 14 (2), (1975). Pokud budou v tomto popisu a přiložených nárocích použita odlišná jména a zkratky aminokyselin a jejich zbytků, budou uvedena odlišná jména a zkratky aminokyselin vysvětlena.

"Ochranná skupina aminokyseliny" znamená skupinu, která chrání kyselou nebo aminovou část aminokyseliny, nebo další reaktivní skupinu v postranním řetězci aminokyseliny, například skupinu hydroxy nebo thiol. Příklady "odpovídajících chráněných derivátů" aminokyselinových postranních řetězců, viz T. W. Green a P. G. M. Wuts,

"Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley a Sons, 1991.

Ochranné skupiny kyselé skupiny aminokyseliny jsou popsány na jiném místě, například v oddíle "kyselé funkční skupina" a "hydrogenačně labilní ochranná skupina kyseliny". Ochranné skupiny aminové skupiny aminokyseliny jsou popsány na jiném místě, například v oddíle "ochranná skupina aminu", "kyselinově labilní ochranná skupina aminu" a "hydrogenačně labilní ochranná skupina aminu".

"Aminokyselinový zbytek" znamená individuální jednotku aminokyseliny vloženou do sloučeniny podle předloženého vynálezu.

"Postranní řetězec aminokyseliny" znamená substituent, nacházející se na atomu uhlíku mezi aminovou a karboxy skupinou α -aminokyseliny. Příklady postranních řetězců aminokyseliny zahrnují isopropyl, methyl a karboxymethyl pro valin, alanin respektive kyselinu aspartovou.

"Ekvivalent aminokyseliny" znamená aminokyselinu, kterou může být nahrazena další aminokyselina v peptidech podle předloženého vynálezu, aniž by došlo ke znatelnému úbytku funkčních vlastností. Při vytváření takových náhrad se substituce podobných aminokyselin provádějí na základě relativní podobnosti postranních řetězců, například co do velikosti, náboje, hydrofility, hydropathicity a hydrofobnosti, jako bylo popsáno výše.

"Aromatická skupina" znamená aryl nebo heteroaryl, jak zde byly definovány. Příklady aromatických skupin zahrnují fenyl, atomem halogenu substituovaný fenyl, azaheteroaryl a podobně.

"Aroyl" znamená skupinu aryl-CO-, kde arylová skupina je jak bylo popsáno výše.

Příklady aroylových skupin zahrnují benzoyl, 1- a 2-naftoyl a podobně.

"Aryl" znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický kruhový systém obsahující od přibližně 6 do přibližně 14 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 6 do přibližně 10 atomů uhlíku. V pojmu aryl jsou zahrnuty kondenzovaný arylcykloalkenyl, kondenzovaný arylcykloalkyl, kondenzovaný arylheterocyklenyl a kondenzovaný arylheterocyklyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány prostřednictvím jejich arylové části. Aryl je popřípadě substituován jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů", které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde bylo definováno. Příklady arylových skupin zahrnují fenyl nebo naftyl nebo substituovaný fenyl nebo substituovaný naftyl. "Substituovaný aryl" znamená arylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituována jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

"Aryldiazo" znamená skupinu aryl-diazo-, ve které arylové a diazo skupiny jsou jak zde byly definovány.

"Arylen" znamená popřípadě substituovanou 1,2-, 1,3-, 1,4-dvojvaznou arylovou skupinu, kde arylová skupina je jak zde bylo definováno. Příklady arylenových skupin zahrnují popřípadě substituovaný fenylen, naftylen a indanylen. Obzvláště vhodný arylen je popřípadě substituovaný fenylen.

"Substituovaný arylen" znamená arylenovou skupinu jak byla definována výše, která je substituována jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

"Aryloxy" znamená skupinu aryl-O-, kde arylová skupina je jak zde bylo definováno. Příklady aryloxy skupin zahrnují fenoxi a 2-naftyloxy.

"Aryloxykarbonyl" znamená skupinu aryl-O-CO-, kde arylová skupina je jak zde bylo definováno. Příklady aryloxykarbonyl skupin zahrnují fenoxycarbonyl a naftoxykarbonyl.

"Arylsulfonyl" znamená skupinu aryl-SO₂-, kde arylová skupina je jak zde bylo definováno.

"Arylsulfonylkarbamoyl" znamená skupinu aryl-SO₂-NH-C (=O)-, kde arylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklad arylsulfonylkarbamoylové skupiny je fenylsulfonylkarbamoyl.

"Arylsulfinyl" znamená skupinu aryl-SO-, kde arylová skupina je jak zde bylo definováno.

"Arylthio" znamená skupinu aryl-S-, kde arylová skupina je jak bylo popsáno výše.

Příklady arylthio skupin zahrnují fenylthio a naftylthio.

"Bázický atom dusíku" znamená sp^2 nebo sp^3 hybridizovaný atom dusíku, který má nevázaný pár elektronů, který je možno protonovat. Příklady bázických atomů dusíku zahrnují popřípadě substituovanou iminovou skupinu, popřípadě substituovanou aminovou skupinu a popřípadě substituovanou amidinovou skupinu.

"Karboxy" znamená skupinu HO(O)C- (karboxylová kyselina).

"Kopulační činidlo" znamená sloučeninu, která reaguje s hydroxylovou částí karboxy skupiny, čímž ji upraví tak, že je náchylná k nukleofilnímu ataku. Příklady kopulačních činidel zahrnují DIC, EDCI, DCC a podobně.

"Cykloalkenyl" znamená nearomatický mono- nebo multicyklický kruhový systém s od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 5 do přibližně 10 atomů uhlíku, který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík. Pod pojem cykloalkenyl spadají kondenzovaný arylcykloalkenyl a kondenzovaný heteroarylcykloalkenyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány prostřednictvím jejich cykloalkenylové části. Výhodné velikosti kruhů v

kruhovém systému jsou v rozmezí od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhu jsou také označovány jako "nižší". "Substituovaný cykloalkenyl" znamená cykloalkenylovou skupinu jak bylo definováno výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde bylo definováno.

Příklady monocyklických cykloalkenylů zahrnují cyklopentenyl, cyklohexenyl, cykloheptenyl a podobně. Příkladem multicyklického cykloalkenylu je norbornylenyl.

"Cykloalkyl" znamená nearomatický mono- nebo multicyklický kruhový systém od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 5 do přibližně 10 atomů uhlíku. Výhodné velikosti kruhů kruhového systému jsou od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhu jsou také označovány jako "nižší". Pod pojem cykloalkyl spadají kondenzovaný arylcykloalkyl a kondenzovaný heteroarylcykloalkyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány prostřednictvím jejich cykloalkylové části.

"Substituovaný cykloalkyl" znamená cykloalkylovou skupinu jak bylo definováno výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Příklady monocyklického cykloalkylu zahrnují cyklopentyl, cyklohexyl, cykloheptyl a podobně. Příklady

multicyklických cykloalkylů zahrnují 1-dekalin, norbornyl, adamant-(1- nebo 2-)-yl a podobně.

"Cykloalkylen" znamená dvojvaznou cykloalkylovou skupinu, jak zde byla definována, která má od přibližně 4 do přibližně 8 atomů uhlíku. Výhodné velikosti kruhů cykloalkylenů zahrnují od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhů se také označují jako "nižší". Místa vazby cykloalkylenových skupin zahrnují uspořádání 1,1-, 1,2-, 1,3- nebo 1,4- a pokud je to aplikovatelné, stereochemický vztah míst vazby je buď cis nebo trans. Příklady cykloalkylenových skupin zahrnují (1,1-, 1,2- nebo 1,3-)cyklohexylen a (1,1- nebo 1,2-)cyklopentylen.

"Substituovaný cykloalkylen" znamená cykloalkylenovou skupinu, jak byla definována výše, který je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. "Cyklický" nebo "cyklyl" znamená cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl, jak zde byly definovány. Výraz "nižší", jak je používán ve spojení s výrazem cyklický je stejný, jak je použito ve spojitosti s výrazem cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl.

"Cyklyloxy" znamená skupinu cyklyl-O-, kde cyklylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklady cykloalkoxy skupin zahrnují cyklopentyloxy, cyklohexyloxy, chinuklidyloxy, pentamethylensulfidoxy, tetrahydro-

pyranyloxy, tetrahydrothiofenyloxy, pyrrolidinyloxy, tetrahydrofuranyloxy nebo 7-oxabicyklo[2.2.1]heptanyloxy, hydroxytetrahydropyranyloxy, hydroxy-7-oxabicyklo[2.2.1]-heptanyloxy a podobně.

"Cyklylsulfinyl" znamená skupinu cyklyl-S(O)-, kde cyklylová skupina je jak bylo popsáno výše.

"Cyklylsulfonyl" znamená skupinu cyklyl-S(O)₂-, kde cyklylová skupina je jak bylo popsáno výše.

"Cyklylthio" znamená skupinu cyklyl-S-, kde cyklylová skupina je jak bylo popsáno výše.

"Diazo" znamená dvojvazný zbytek -N=N-.

"Přemístitelná skupina" znamená skupinu která, pokud je asociována s L, jak zde bylo definováno, je vystavena přemístění nukleofilním atakem mono- nebo di-substituovanou aminovou skupinou za nebo bez přítomnosti činidla, které usnadňuje uvedený atak, například kopulačního činidla. Příklady přemístitelných skupin zahrnují skupiny hydroxy, alifatický oxy, halogen, N-oxysukcinimid, acyloxy a podobně.

"Účinné množství" znamená množství sloučeniny/kompozice podle předloženého vynálezu, které umožňuje dosažení požadovaného terapeutického účinku.

"Kondenzovaný arylcykloalkenyl" znamená kondenzovaný aryl a cykloalkenyl, jak zde byly definovány.

Výhodné kondenzované arylcykloalkenyly jsou ty, ve kterých jejich arylová část je fenyl a cykloalkenyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný arylcykloalkenyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. "Substituovaný kondenzovaný arylcykloalkenyl" znamená kondenzovanou arylcykloalkenylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

Příklady kondenzovaných arylcykloalkenylů zahrnují 1,2-dihydronaftalen, inden a podobně.

"Kondenzovaný arylcykloalkyl" znamená kondenzovaný aryl a cykloalkyl, jak zde byly definovány. Výhodné kondenzované arylcykloalkyly jsou ty, ve kterých jejich arylová část je fenyl a cykloalkyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný arylcykloalkyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. "Substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl" znamená kondenzovanou arylcykloalkylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

Příklady kondenzovaných arylcykloalkylů zahrnují 1,2,3,4-tetrahydronaftylen a podobně.

"Kondenzovaný arylheterocyklenyl" znamená kondenzovaný aryl a heterocyklenyl, jak zde byly definovány.

Výhodné kondenzované arylheterocyklenyly jsou ty, ve kterých jejich arylová část je fenyl a heterocyklenyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný arylheterocyklenyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heterocyklenylovou částí kondenzovaného arylheterocyklenylu označuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu.

"Substituovaný kondenzovaný arylheterocyklenyl" znamená kondenzovanou arylheterocyklenylovou skupinu, jak bylo definováno výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného arylheterocyklenylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heterocyklenylové části kondenzovaného arylheterocyklenylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid. Příklady kondenzovaných arylheterocyklenylů zahrnují 3H-indolinylyl, 1H-2-oxochinolyl, 2H-1-oxoiso-chinolyl, 1,2-dihydrochinolinylyl, 3,4-dihydrochinolinylyl,

1,2-dihydroisochinolinyl, 3,4-dihydroisochinolinyl a podobně.

"Kondenzovaný arylheterocyklyl" znamená kondenzovaný aryl a heterocyklyl, jak zde byly definovány. Výhodné kondenzované arylheterocyklyly jsou ty, ve kterých jejich arylová část je fenyl a heterocyklyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný arylheterocyklyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heterocyklylovou částí kondenzovaného arylheterocyklylu definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný kondenzovaný arylheterocyklyl" znamená kondenzovanou arylheterocyklylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituována jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného arylheterocyklylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heterocyklylové části kondenzovaného arylheterocyklylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid. Příklady kondenzovaných arylheterocyklylových kruhových systémů zahrnují indolinyl, 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin, 1,2,3,4-tetrahydrochinolin, 1H-2,3-dihydroisoindol-2-yl, 2,3-dihydrobenz[f]isoindol-2-yl, 1,2,3,4-tetrahydrobenz[g]-isochinolin-2-yl a podobně.

"Kondenzovaný heteroarylcykloalkenyl" znamená kondenzovaný heteroaryl a cykloalkenyl, jak zde byly definovány. Výhodné kondenzované heteroarylcykloalkenyly jsou ty, jejichž heteroarylová část je fenyl a cykloalkenyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný heteroarylcykloalkenyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heteroarylovou částí kondenzovaného heteroarylcykloalkenylu definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný kondenzovaný heteroarylcykloalkenyl" znamená kondenzovanou heteroarylcykloalkenylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného heteroarylcykloalkenylu může být báze atom dusíku. Atom dusíku heteroarylové části kondenzovaného heteroarylcykloalkenylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid. Příklady kondenzovaných heteroarylcykloalkenylů zahrnují 5,6-dihydrochinolyl, 5,6-dihydroisochinolyl, 5,6-dihydrochinoxalyl, 5,6-dihydrochinazolyl, 4,5-dihydro-1H-benzimidazolyl, 4,5-dihydrobenzoxazolyl a podobně.

"Kondenzovaný heteroarylcykloalkyl" znamená kondenzovaný heteroaryl a cykloalkyl, jak zde byly definovány. Výhodné kondenzované heteroarylcykloalkyly jsou ty, jejichž heteroarylová část obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6

atomů kruhu a cykloalkyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný heteroarylcykloalkyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heteroarylovou částí kondenzovaného heteroarylcykloalkylu definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný kondenzovaný heteroarylcykloalkyl" znamená kondenzovanou heteroarylcykloalkylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituovaný jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného heteroarylcykloalkylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku heteroarylové části kondenzovaného heteroarylcykloalkylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid. Příklady kondenzovaných heteroarylcykloalkylů zahrnují 5,6,7,8-tetrahydrochinoliny, 5,6,7,8-tetrahydroisochinolyl, 5,6,7,8-tetrahydrochinoxaliny, 5,6,7,8-tetrahydrochinazolyl, 4,5,6,7-tetrahydro-1H-benzimidazolyl, 4,5,6,7-tetrahydro-benzoxazolyl, 1H-4-oxa-1,5-diazanaftalen-2-onyl, 1,3-dihydroimidazol-[4,5]-pyridin-2-onyl a podobně.

"Kondenzovaný heteroarylheterocyklenyl" znamená kondenzovaný heteroaryl a heterocyklenyl, jak zde byly definovány. Výhodné kondenzované heteroarylheterocyklenyly jsou takové, jejichž heteroarylová část obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu a heterocyklenyl

obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný heteroarylheterocyklyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heteroarylovou nebo heterocyklylovou částí kondenzovaného heteroarylheterocyklylu definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný kondenzovaný heteroarylheterocyklyl" znamená kondenzovanou heteroarylheterocyklylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného heteroarylazaheterocyklylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heteroarylové části kondenzovaný heteroarylheterocyklyl může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid. Atom dusíku nebo atom síry heteroarylové nebo heterocyklylové části kondenzovaného heteroarylheterocyklylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid. Příklady kondenzovaných heteroarylheterocyklylů zahrnují

7,8-dihydro[1,7]naftyridinyl, 1,2-dihydro[2,7]-naftyridinyl, 6,7-dihydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridyl, 1,2-dihydro-1,5-naftyridinyl, 1,2-dihydro-1,6-naftyridinyl, 1,2-dihydro-1,7-naftyridinyl, 1,2-dihydro-1,8-naftyridinyl, 1,2-dihydro-2,6-naftyridinyl a podobně.

"Kondenzovaný heteroarylheterocyklyl" znamená kondenzovaný heteroaryl a heterocyklyl, jak zde byly definovány. Výhodné

kondenzované heteroarylheterocyklyly jsou takové, jejichž heteroaryl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu a heterocyklyl obsahuje od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Kondenzovaný heteroarylheterocyklyl může být vázán prostřednictvím libovolného atomu jeho kruhového systému, který je schopen takové vazby. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heteroarylovou nebo heterocyklylovou částí kondenzovaného heteroarylheterocyklylu definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný kondenzovaný heteroarylheterocyklyl" znamená kondenzovanou heteroarylheterocyklylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku kondenzovaného heteroarylheterocyklyl může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heteroaryl části kondenzovaného heteroarylheterocyklylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid. Atom dusíku nebo atom síry heteroarylové nebo heterocyklylové části kondenzovaného heteroarylheterocyklylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid.

Příklady kondenzovaných heteroarylheterocyklylů zahrnují

- 2,3-dihydro-1H-pyrrol[3,4-b]chinolin-2-yl,
- 1,2,3,4-tetrahydrobenz[b][1,7]naftyridin-2-yl,
- 1,2,3,4-tetrahydrobenz[b][1,6]naftyridin-2-yl,
- 1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido[3,4-b]indol-2-yl,

1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl, 2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-b]indol-2-yl, 1H-2,3,4,5-tetrahydroazepino[3,4-b]indol-2-yl, 1H-2,3,4,5-tetrahydroazepino[4,3-b]indol-3-yl, 1H-2,3,4,5-tetrahydroazepino[4,5-b]indol-2-yl, 5,6,7,8-tetrahydro[1,7]naftyridyl, 1,2,3,4-tetrhydro[2,7]naftyridyl, 2,3-dihydro[1,4]dioxino[2,3-b]pyridyl, 2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridyl, 3,4-dihydro-2H-1-oxa[4,6]diazanaftalenyl, 4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridyl, 6,7-dihydro[5,8]diazanaftalenyl, 1,2,3,4-tetrahydro[1,5]naftyridinyl, 1,2,3,4-tetrahydro[1,6]naftyridinyl, 1,2,3,4-tetrahydro[1,7]naftyridinyl, 1,2,3,4-tetrahydro[1,8]naftyridinyl, 1,2,3,4-tetrahydro[2,6]naftyridinyl a podobně.

"Halogen" znamená fluor, chlor, brom, nebo jod. Výhodné jsou fluor, chlor nebo brom, a výhodnější jsou fluor nebo chlor.

"Heteroaroyl" znamená skupinu heteroaryl-CO-, kde heteroarylová skupina je jak bylo popsáno výše. Příklady heteroaroylových skupin zahrnují thiofenoyl, nikotinoyl, pyrrol-2-ylkarbonyl, 1- a 2-naftoyl, pyridinoyl a podobně.

"Heteroaryl" znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů, obsahující od přibližně 5 do přibližně 14 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 5 do přibližně 10 atomů uhlíku, v kterém jeden nebo více atomů v

kruhovém systému je/jsou heteroatomy jiné než uhlík, například atom dusíku, atom kyslíku nebo atom síry. Výhodně kruhový systém obsahuje 1 až 3 heteroatomy. Výhodné velikosti kruhů kruhového systému zahrnují od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu. Pod pojem heteroaryl spadají kondenzovaný heteroarylcykloalkenyl, kondenzovaný heteroarylcykloalkyl, kondenzovaný heteroarylheterocyklenyl a kondenzovaný heteroarylheterocyklyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány pomocí jejich heteroarylové části. "Substituovaný heteroaryl" znamená heteroarylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heteroarylem definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. Atom dusíku heteroarylu může být bázecký atom dusíku a může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid. Příklady heteroarylových a substituovaných heteroarylových skupin zahrnují pyrazinyl, thienyl, isothiazolyl, oxazolyl, pyrazolyl, furazanyl, pyrrolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, pyridazinyl, chinoxaliny, ftalazinyl, imidazo[1,2-a]pyridin, imidazo[2,1-b]thiazolyl, benzofurazanyl, azaindolyl, benzimidazolyl, benzothienyl, thienopyridyl, thienopyrimidyl, pyrrolopyridyl, imidazopyridyl, benzoazaindolyl, 1,2,4-triazinyl, benzthiazolyl, furanyl, imidazolyl, indolyl, indoliziny, isoxazolyl, isochinoliny, isothiazolyl, oxadiazolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, pyrazolyl, pyridyl, pyrimidiny, pyrrolyl, chinazolinyl, chinoliny, 1,3,4-thiadiazolyl,

07.04.03

thiazolyl, thienyl, triazolyl a podobně. Výhodná heteroarylová skupina je pyrazinyl.

"Heteroaryldiazo" znamená skupinu heteroaryl-azo-, kde skupiny heteroaryl a azo jsou jak zde byly definovány.

"Heteroarylidyl" znamená dvojjazný zbytek, odvozený od heteroarylu, kde heteroaryl je jako bylo popsáno výše. Příkladem heteroaryldiylového zbytku je popřípadě substituovaný pyridindiyl.

"Heteroarylsulfonylkarbamoyl" znamená skupinu heteroaryl-SO₂-NH-C(=O)-, kde heteroarylová skupina je jak bylo popsáno výše.

"Heterocyklenyl" znamená nearomatický monocyklický nebo multicyklický uhlovodíkový kruhový systém od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 5 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/Jsou heteroatom jiný než uhlík, například atom dusíku, atom kyslíku nebo atom síry a který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík nebo dvojnou vazbu uhlík-dusík. Výhodně kruh obsahuje 1 až 3 heteroatomy. Výhodné velikosti kruhů v kruhovém systému zahrnují od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhů jsou také označovány jako "nižší". Pod pojem heterocyklenyl spadají kondenzovaný arylheterocyklenyl a kondenzovaný heteroarylheterocyklenyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány pomocí jejich heterocyklenylové části. Označení aza, oxa nebo thia jako

prefix před heterocyklenyl definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný heterocyklenyl" znamená heterocyklenylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku heterocyklenylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heterocyklenylu mohou také být popřípadě oxidovány na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid.

Příklady monocyklických azaheterocyklenylových skupin zahrnují 1,2,3,4-tetrahydrohydropyridin, 1,2-dihydropyridyl, 1,4-dihydropyridyl, 1,2,3,6-tetrahydropyridin, 1,4,5,6-tetrahydropyrimidin, 2-pyrrolinyl, 3-pyrrolinyl, 2-imidazolinyl, 2-pyrazolinyl a podobně. Příklady oxaheterocyklenylových skupin zahrnují 3,4-dihydro-2H-pyran, dihydrofuran a fluordihydrofuran. Příklad multicyklické oxaheterocyklenylové skupiny je 7-oxabicyklo[2.2.1]heptenyl.

Příklady monocyklických thiaheterocyklenylových kruhů zahrnují dihydrothiofenyl a dihydrothiopyran.

"Heterocyklyl" znamená nearomatický nasycený monocyklický nebo multicyklický kruhový systém od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, výhodně od přibližně 5 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/Jsou heteroatom jiný než uhlík, například atom dusíku, atom kyslíku nebo atom síry. Výhodně

kruhový systém obsahuje od 1 do 3 heteroatomů. Výhodné velikosti kruhů v kruhovém systému zahrnují od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhů jsou také označovány jako "nižší". Pod pojem heterocyklyl spadají kondenzovaný arylheterocyklyl a kondenzovaný heteroarylheterocyklyl, jak zde byly definovány, pokud jsou vázány pomocí jejich heterocyklylové části. Označení aza, oxa nebo thia jako prefix před heterocyklylem definuje, že alespoň jeden atom dusíku, atom kyslíku respektive atom síry je přítomen jako atom kruhu. "Substituovaný heterocyklyl" znamená heterocyklylovou skupinu, jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. Atom dusíku heterocyklylu může být bázecký atom dusíku. Atom dusíku nebo atom síry heterocyklylu může také být popřípadě oxidován na odpovídající N-oxid, S-oxid nebo S,S-dioxid. Příklady monocyklických heterocyklylových kruhů zahrnují piperidyl, pyrrolidinyl, piperazinyl, morfolinyl, thiomorfolinyl, thiazolidinyl, 1,3-dioxolanyl, 1,4-dioxanyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydrothiofenyl,



tetrahydrothiopyranyl a podobně. jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je substituovaný přímo nebo přes spojovací člen alespoň jedním substituentem, který je nebo zahrnuje nebo je substituovaný aromatickou skupinou, jak zde byla definována; například aryl, heteroaryl, aryloxy, heteroaryloxy, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, aroyloxy,

heteroaroyloxy, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, arylthio, heteroarylthio, aryldiazo, heteroaryldiazo, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde alespoň jeden z Y^1 a Y^2 je, zahrnuje nebo je substituovaný arylovou nebo heteroarylovou skupinou. Výhodné spojovací členy jsou $-C(O)-$, $-OC(O)-$, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkenyl, $-O-$, $-S-$, $-C(O)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NR^{80}-$, kde R^{80} je atom vodíku, skupiny alkyl, cykloalkyl, aryl, aralkyl, heterocyklyl nebo heteroaryl. Obzvláště výhodné spojovací členy jsou $-C(O)-$ a $-OC(O)-$. "Substituovaný multicyklický azaheterocyklyl" znamená multicyklickou azaheterocyklylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány. „Substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl“ znamená multicyklickou azaheterocyklenylovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

"Heterocyklylen" znamená dvojvaznou heterocyklylovou skupinu, jak zde byla definována, která obsahuje od přibližně 4 do přibližně 8 atomů uhlíku. Výhodné velikosti kruhů heterocyklylenu zahrnují od přibližně 5 do přibližně 6 atomů kruhu; a takové výhodné velikosti kruhu jsou také označovány jako "nižší". Místa vazby cykloalkylenové skupiny zahrnují možnosti 1,1-, 1,2-, 1,3-, nebo 1,4- a pokud je to aplikovatelné, stereochemický vztah míst vazby

je buď cis nebo trans. Příklady heterocyklylenových skupin zahrnují (1,1-, 1,2- nebo 1,3-)piperidinylen a (1,1- nebo 1,2-) tetrahydrofuranylen. "Substituovaný heterocyklylen" znamená heterocyklylenovou skupinu jak byla definována výše, která je substituovaná jedním nebo více "substituenty skupiny kruhů" (výhodně 1 až 3), které mohou být stejné nebo různé a jsou jak zde byly definovány.

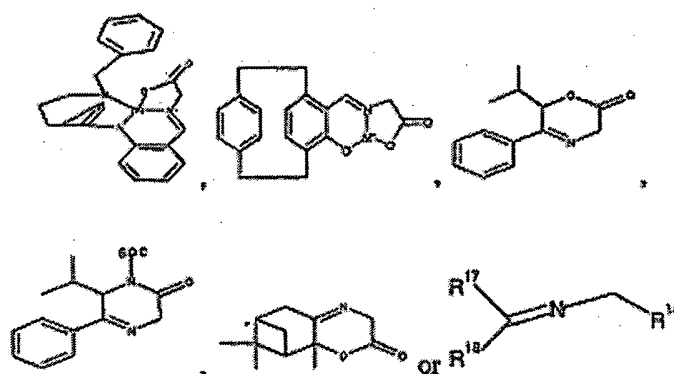
"Hydrát" znamená solvát, ve kterém molekula nebo molekuly rozpouštědla je/jsou H_2O .

"Hydrogenačně labilní ochranná skupina aminu" znamená ochrannou skupinu aminu, jak zde byla definována, který je snadno odstranitelná hydrogenací, zatímco zůstává relativně stabilní vůči ostatním činidlům. Výhodná hydrogenačně labilní ochranná skupina aminu je Cbz.

"Hydrogenačně labilní ochranná skupina kyseliny" znamená ochrannou skupinu kyseliny, jak zde byla definována, který je snadno odstranitelná hydrogenací, zatímco zůstává relativně stabilní vůči ostatním činidlům. Výhodná hydrogenačně labilní ochranná skupina kyseliny je benzyl.

"Hygroskopičnost" znamená sorpci, implikující získané množství vody nebo stavovou vodu, dostatečnou pro ovlivnění fyzikálních nebo chemických vlastností látky (Editoři J. Swarbrick a J. C. Boylan, Encyklopedia of Farmaceutical Technology, 10, 33).

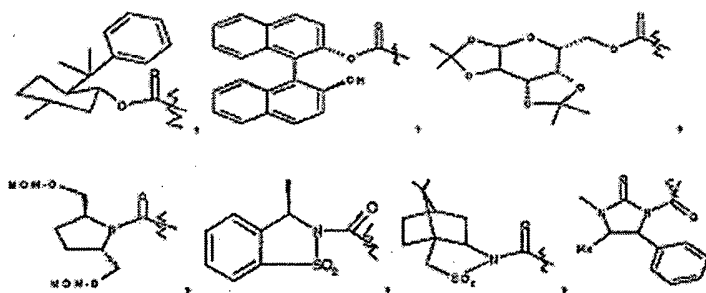
"Iminový glycinimidový derivát" znamená iminovou Schiffovu bázi glycinu, která je použitelná při syntéze α -aminokyselin, jak přirozených, tak i v přírodě se nevyskytujících. Iminová esterová funkční skupina může obsahovat jedno nebo více asymetrických center, které mohou napomáhat stereoindukci během procesu vytváření vazby. Kromě toho tyto iminové glycinimidové deriváty mohou být zabudovány do polymerního nosiče pro usnadnění kombinatorické syntézy. Iminové glycinimidové deriváty mohou být připraveny kondenzací glycinesteru s vhodným ketonem v přítomnosti kyselého katalyzátoru. Reakce je usnadněna odebráním vody. Iminové glycinimidové deriváty jsou dobře známy v oboru pro použití v Michaelově adičním způsobu syntézy, jak je popsáno například v práci Guillena, G. a kol., J. Org. Chem. 2000, 65, 7310-7322, která je zde zahrnuta jako reference. Konkrétní příklady iminových glycinimidových derivátů podle předloženého vynálezu zahrnují deriváty zvolené ze souboru, zahrnujícího skupiny obecných vzorců



kde:

M^* je přechodný kov, výhodně CU, výhodněji CU^{II} ,

R^{14} j $-CO_2R^{16}$, $-CN$,

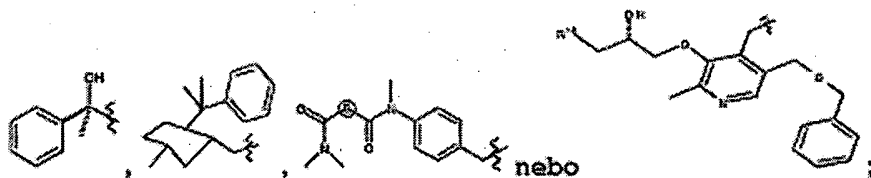


nebo $-CONR^{15}R^{15}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina;

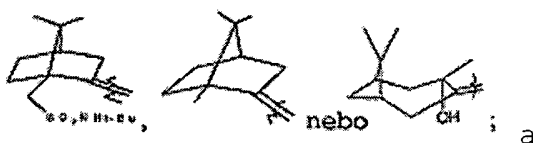
R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{17} je popřípadě substituovaný aryl, popřípadě substituovaná alifatická skupina,



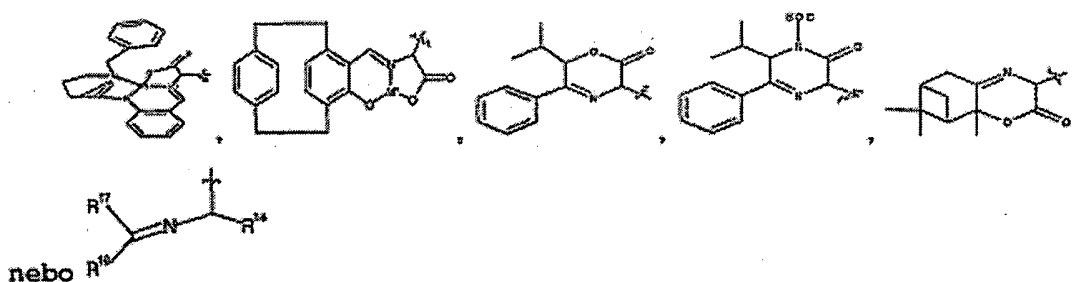
R^{18} je atom vodíku, skupiny alkyl, nebo alkylthio; nebo popřípadě substituovaný aryl;

R^{17} a R^{18} společně s atomem uhlíku, ke kterému jsou R^{17} a R^{18} vázán je



⑤ je pevná fáze.

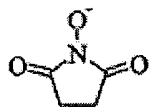
"Adukt iminového glycinimidového derivátu" znamená výslednou sloučeninu, kde část od α -atomu vodíku k atomu dusíku a karbonylová část Schiffovy báze se odstraní a použijí pro vytvoření připojení pro tvorbu vazby. Konkrétní příklady aduktů iminových glycinimidových derivátů podle předloženého vynálezu zahrnují takové, které jsou zvoleny ze souboru, zahrnujícího obecné vzorce



kde:

R^{14} , R^{17} a R^{18} jsou definovány jak je popsáno v definici iminového glycinimidového derivátu, uvedené výše.

"N-oxysukcinimid" znamená skupinu následující struktury



"N-oxid" znamená skupinu následující struktury

"Pacient" zahrnuje člověka a další savce.

"Peptidomimetický" znamená polymer obsahující aminokyselinové zbytky, spojené spolu amidovými vazbami.

"Farmaceuticky přijatelný ester" označuje estery, které se hydrolyzují *in vivo* a zahrnuje estery, které se v lidském těle snadno rozpadají pro zanechání původní sloučeniny nebo její sole.

Vhodné esterové skupiny zahrnují například skupiny odvozené od farmaceuticky přijatelných alifatických karboxylových kyselin, obzvláště alkanových kyselin, alkenových kyselin, cykloalkanových kyselin a alkandiových kyselin, ve kterých každý alkyl nebo alkenyl výhodně nemá více než 6 atomů uhlíku.

Příklady esterů zahrnují mravenčany, octany, propionáty, máselnany, akryláty, ethyljantarany a podobně.

Výraz "farmaceuticky přijatelné prekurzory", jak je zde používán, označuje takové prekurzory sloučenin podle předloženého vynálezu, které jsou v rámci zdravého lékařského úsudku vhodné pro použití v kontaktu s lidskými tkáněmi a tkáněmi nižších živočichů bez nadměrné toxicity, podráždění, alergické odezvy a podobně, přinášejí rozumný poměr přínosu a rizika a jsou účinné pro jejich zamýšlené použití, stejně tak jako zwitterionové formy, pokud jsou možné, sloučenin podle předloženého vynálezu. Výraz "prekurzor" označuje sloučeniny, které se rychle transformují *in vivo* pro získání původní sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce, například hydrolýzou v krvi. Funkční skupiny, které mohou být rychle transformovány, například metabolickým štěpením *in vivo*, vytvářejí třídu sloučenin reagujících s karboxylovou skupinou sloučenin podle předloženého vynálezu. Tyto sloučeniny zahrnují neomezujícím způsobem takové skupiny jako je alkanoyl (jako je acetyl, propanoyl, butanoyl a podobně), nesubstituovaný a substituovaný aroyl (jako je benzoyl a substituovaný benzoyl), alkoxykarbonyl (jako je ethoxykarbonyl), trialkylsilyl (jako je trimethyl- a triethylsilyl), monoestery vytvořené s dikarboxylovými kyselinami (jako je jantaran) a podobně. V důsledku snadnosti, se kterou se metabolicky odštěpitelné skupiny sloučenin podle předloženého vynálezu štěpí *in vivo*, sloučeniny nesoucí takové skupiny působí jako prekurzory. Sloučeniny nesoucí metabolicky odštěpitelné skupiny mají výhodu v tom, že mohou vykazovat zlepšenou biologickou dostupnost jako výsledek zvýšené rozpustnosti a/nebo rychlosti absorpce, kterou jim ve srovnání s původní sloučeninou přináší

metabolicky odštěpitelná skupina. Důkladná diskuse je podána v monografii Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Enzymology; K. Widder a kol., Ed., Academic Press, 42,309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Developement, Krogsgaard-Larsen a H. Bandaged, ed., kapitola 5; "Design and Applications of Prodrugs" 113-191 (1991); Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci., 77,285 (1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya a kol., 32,692 (1984); Prodrugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi a V. Stella, 14 A. C. S. Symposium Series, and Bioreversible Supports in Drug Design, E. B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, které jsou všechny zahrnuty jako reference.

"Farmaceuticky přijatelná sůl" označuje relativně netoxickou, anorganickou a organickou adiční sůl kyseliny a adiční sůl báze sloučeniny podle předloženého vynálezu. Tyto sole mohou být připraveny *in situ* během závěrečné izolace a čištění sloučenin. Obzvláště mohou být adiční sole kyselin být připraveny oddělenou reakcí čištěné sloučeniny ve formě její volné báze s vhodnou organickou nebo anorganickou kyselinou a izolací takto vytvořené kyseliny.

Příklady adičních solí kyselin zahrnují hydrobromid, hydrochlorid, síran, hydrogensíran, fosforečnan, dusičnan, octan, šťavelan, valerát, olejnan, palmitan, stearan, laurát, boritan, benzoát, mléčnan, fosfát, tosylát, citronan, maleinan, fumaran, jantaran, vínan, naftylát,

mesylát, glukheptonát, laktobionát, sulfamáty, malonát, salicyláty, propionáty, methylen-bis-(3-hydroxynaftoáty, gentisáty, isethionáty, di-p-toluoylvínany, methansulfonáty, ethansulfonáty, benzensulfonáty, p-toluensulfonáty, cyklohexylsulfamáty a chinátlaurylsulfonáty a podobně. Viz například S. M. Berge a kol.", *Pharmaceutical Salts*", J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), který je zde zahrnut jako reference. Adiční solel bází mohou také být připraveny oddělenou reakcí čištěné sloučeniny ve formě kyseliny s vhodnou organickou nebo anorganickou bází a izolací takto vzniklé sole. Adiční sole bází zahrnují farmaceuticky přijatelné sole kovů a aminové sole. Vhodné sole kovů zahrnují sole sodné, draselné, vápenaté, barnaté, zinečnaté, hořečnaté a hlinité. Sodné a draselné sole jsou výhodné. Vhodné anorganické adiční sole bází se připraví z bází tvořených kovy, které zahrnují hydrid sodný, hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid vápenatý, hydroxid hlinitý, hydroxid lithný, hydroxid hořečnatý, hydroxid zinečnatý a podobně. Vhodné aminové adiční sole bází se připraví z aminů, které mají dostatečnou zásaditost pro vytvoření stabilní sole a výhodně zahrnují ty aminy, které jsou často používány v lékařské chemii pro jejich nízkou toxicitu a přijatelnost pro lékařské použití. Jako příklad lze uvést sole amonia, ethylendiaminu, N-methyl-glukaminu, lysinu, argininu, ornithinu, cholinu, N,N'-dibenzylethylendiaminu, chlorprokainu, diethanolaminu, prokainu, N-benzylfenethylaminu, diethylaminu, piperazinu, tris(hydroxymethyl)-aminomethanu, tetramethylamonium hydroxidu, triethylaminu, dibenzylaminu efenaminu,

dehydroabietylaminu, N-ethylpiperidinu, benzylaminu, tetramethylamonia, tetraethylamonia, methylaminu, dimethylaminu, trimethylaminu, ethylaminu, bázičských aminokyselin, například lysinu a argininu, a dicyklohexylaminu a podobně.

"Substituenty skupiny kruhů" znamenají substituenty vázané k aromatickému nebo nearomatickému kruhovému systému, které zahrnují skupiny aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $YY^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl nebo když substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl,

aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je definován výše, nebo když substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s dusíkovým atomem, prostřednictvím kterého jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytváří 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl. Pokud kruhový systém je nasycený nebo částečně nasycený, "substituenty skupiny kruhů" dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$). Kyselé/amidové substituenty skupiny kruhů jsou karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl a Y^1Y^2NCO- . Nekyselé polární substituenty skupiny kruhů jsou hydroxy, oxo ($O=$), thioxo ($S=$), acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfiny, cyklylsulfiny, arylsulfiny, heteroarylsulfiny, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$.

"Solvát" znamená fyzikální spojení sloučeniny podle předloženého vynálezu s jednou nebo více molekulami rozpouštědla. Toto fyzikální spojení zahrnuje vodíkovou

vazbu. V jistých případech je solvát schopný izolace, například pokud jedna nebo více molekul rozpouštědla jsou zabudovány do krystalické mřížky krystalické pevné látky. "Solvát" zahrnuje roztokovou fázi a izolovatelné solváty. Příklady solvátů zahrnují hydráty, ethanoláty, methanoláty a podobně.

Výhodná provedení

V dalším textu jsou uvedena konkrétní a výhodná provedení předloženého vynálezu.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^0 je vazba.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^0 je difluormethylen.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^1 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^1 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^1 je atom vodíku.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^2 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina nebo popřípadě substituovaná monocyklická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^2 je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný nižší alkenyl, nebo popřípadě substituovaný monocyklický cykloalkyl.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^2 je karboxymethyl, 1-karboxy-2-fenylethyl, cyklopropyl, cyklobutyl, 1-cyklohexylethyl, 1-fenylethyl, but-2-yl, 1-pyrid-4-ylethyl, propen-3-yl nebo 3-methylbut-2-yl; výhodnější je cyklopropyl.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^3 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^3 je popřípadě atomem halogenu substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl) methylen.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^3 je propylmethylen, 2,2-difluorethylmethylen, 2,2,2-trifluormethylen nebo propen-3-ylmethylen; výhodnější R^3 je propylmethylen nebo 2,2-difluorethylmethylen; ještě výhodnější R^3 je propylmethylen.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^4 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^4 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^4 je atom vodíku.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^5 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^5 je popřípadě (fenyl, karboxy, karboxamido nebo alkoxykarbonyl) substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl) methylen.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^5 je methylmethylen, isopropylmethylen, terc.-butylmethylen, but-2-ylmethylen, butylmethylen, benzylmethylen, 3methylbutylmethylen, 2-methylpropyl-methylen, karboxymethylmethylen, karboxamidomethylmethylen, benzyloxykarbonylmethylmethylen, benzyloxykarbonylpropylmethylen nebo fenylpropen-3-ylmethylen; výhodnější R^5 je isopropylmethylen nebo terc.-butyl-methylen.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^6 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^6 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^6 je atom vodíku.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^7 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen, popřípadě substituovaná nižší cyklická skupina methylen nebo popřípadě substituovaný monocyklický (aryl nebo heteroaryl) methylen.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^7 je popřípadě substituovaný nižší alkylmethylen, popřípadě substituovaný nižší cykloalkylmethylen nebo popřípadě substituovaný fenylmethylen.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^7 je methylmethylen, isopropylmethylen, n-propylmethylen, fenylmethylen, cyklohexylmethylen, cyklopentylmethylen, terc.-butylmethylen, s-butylmethylen, cyklohexylmethylmethylen, nebo fenylmethylmethylen; výhodnější je isopropylmethylen, cyklohexylmethylen, cyklopentylmethylen, terc.-butylmethylen nebo s-butylmethylen.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je také takové, že každý z R^3 , R^5 , a R^7 je monosubstituovaný methylen.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je také takové, že R^3 je monosubstituovaný methylen a má (S) konfiguraci na atomu uhlíku vázaném ke skupině $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^8 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^8 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^8 je atom vodíku.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina nebo popřípadě substituovaná monocyklická aromatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je popřípadě substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě substituovaný monocyklický heteroaryl.

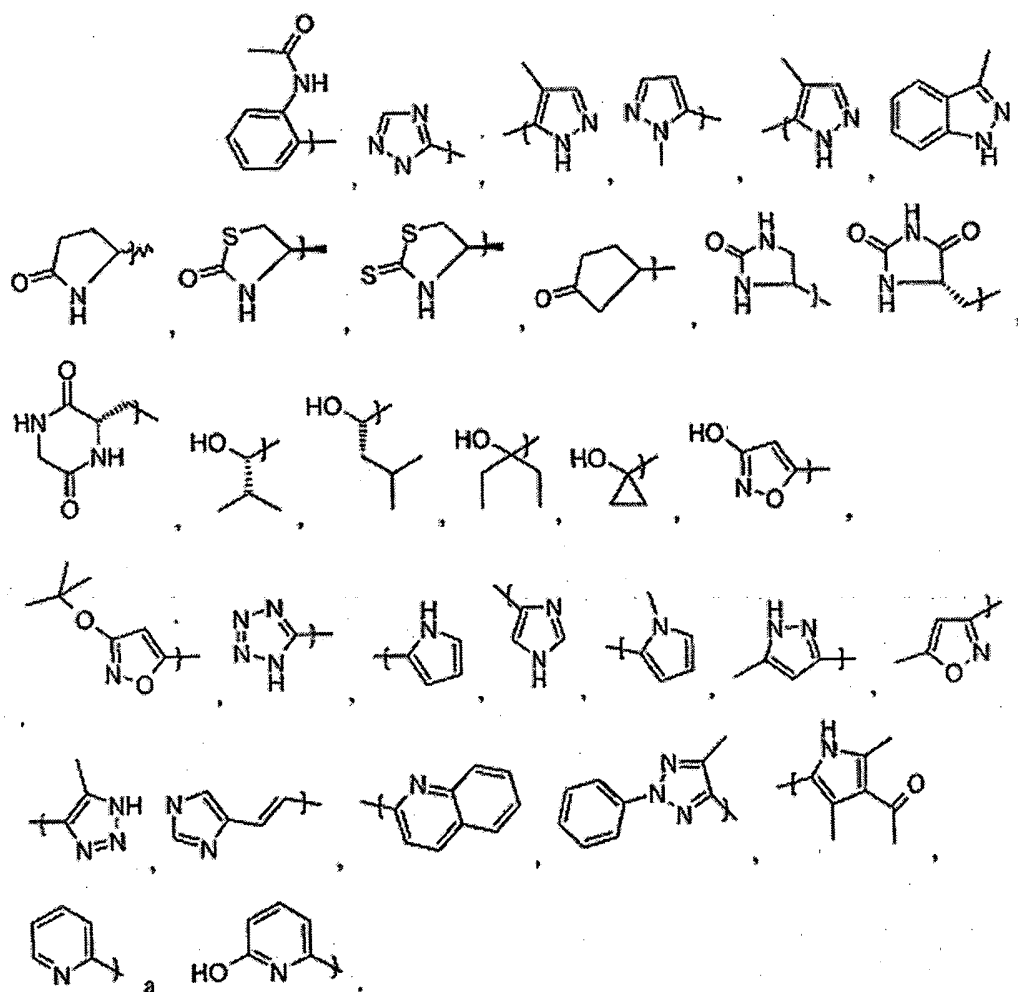
Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je popřípadě (karboxy, (nižší alkyl) SO_2NH- , (nižší alkyl) $HNCO-$, hydroxy, fenyl, heteroaryl, nebo (nižší alkyl) $OC(O)_nH$ -substituovaný nižší alkyl, nebo popřípadě substituovaný monocyklický heteroaryl.

Ještě výhodnější provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je nižší alkyl substituovaný skupinou (mono- nebo di-) $\text{MeOC(O)}_n\text{H-}$; výhodnější je 1,2-di($\text{MeOC(O)}_n\text{H}$)-ethyl nebo 1-($\text{MeOC(O)}_n\text{H-ethyl}$).

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je (karboxy, (nižší alkyl) HNCO- nebo tetrazolyl) substituovaný nižší alkyl; výhodnější 3-karboxypropyl, 2-tetrazol-5-ylpropyl, 3-(N-methylkarboxamido)propyl nebo 3-karboxy-2,2-dimethylpropyl; ještě výhodnější je 3-karboxypropyl, 2-tetrazol-5-ylpropyl nebo 3-(N-methylkarboxamido) propyl.

Další výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je popřípadě substituovaný nižší alkyl; výhodnější je 1-hydroxy-2-fenylethyl, methyl, isopropyl nebo terc.-butyl; ještě výhodnější je methyl, isopropyl nebo terc.-butyl.

Další výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je zvolen ze souboru, zahrnujícího



Ještě další výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^9 je pyrazinyl.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{10} je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{10} je atom vodíku nebo nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{10} je atom vodíku.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že

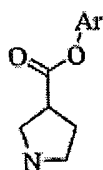


jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je substituovaný pyrrolidinyl.

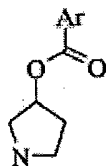
Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že



jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je

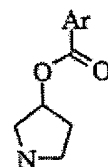


popřípadě substituovaný nebo popřípadě substituovaný



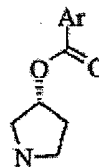
, kde Ar je R^2 obsahující aromatickou část;

výhodnější je popřípadě substituovaný

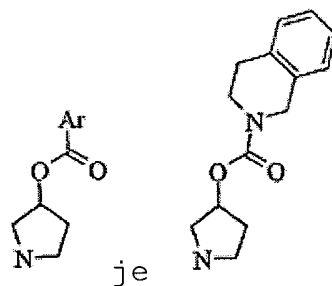


; ještě

výhodnější je popřípadě substituovaný

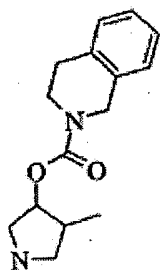


Další výhodný popřípadě substituovaný

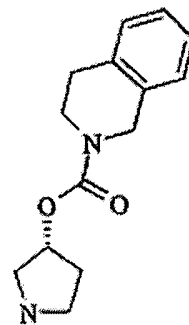


je

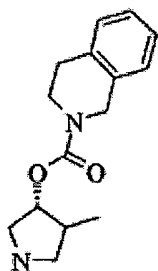
nebo



; ještě výhodnější je



nebo



Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že



jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl

je

popřípadě

substituovaný



;

07.04.03

výhodnější je popřípadě substituovaný  . Obzvláštní

substituenty pro  jsou hydroxy, fluor nebo oxo.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že

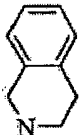
 jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný  ;

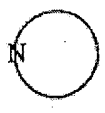
výhodnější je  ; ještě výhodnější je .

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že

 jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný .

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že -

$C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)_nR^2R^1$ část vázaná k  je vázána α -atom uhlíku k atomu dusíku.

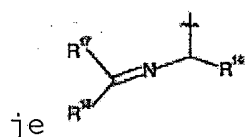
Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že L je $-C(O)-$ nebo $-OC(O)-$.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že n je 0.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že n je 1.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{11} je $-CO_2R^{13}$.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{12}



Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{13} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{13} je an alkylová skupina.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{13} je nižší alkyl.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{13} je methyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{14} je $-\text{CO}_2R^{16}$.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{15} je alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{15} je nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{15} je methyl.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{16} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

Další konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{16} je alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{16} je nižší alkyl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{16} je t-Bu.

07.04.03

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{17} je popřípadě substituovaný aryl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{17} je fenyl.

Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{18} je popřípadě substituovaný aryl.

Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že R^{18} je fenyl.

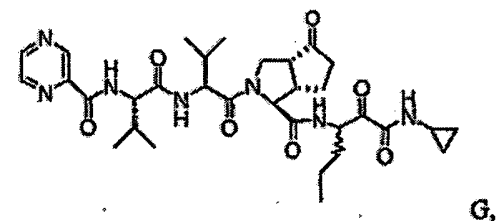
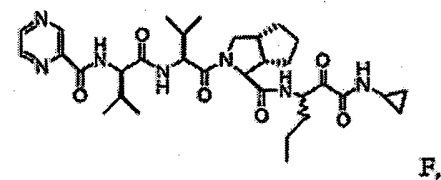
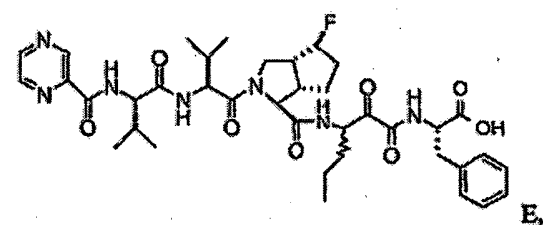
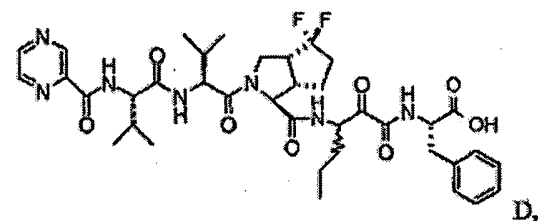
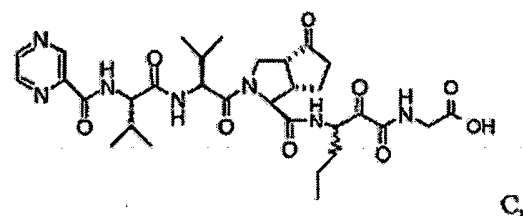
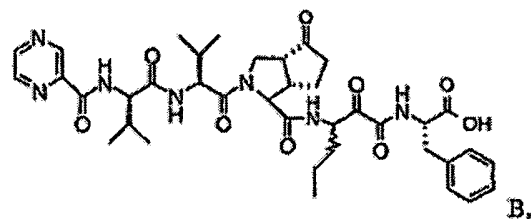
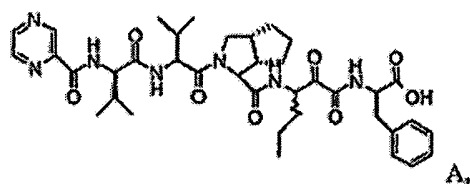
Konkrétní provedení předloženého vynálezu je takové, že p^0 je zvolen ze souboru, zahrnujícího BOC, CBz a -COalkyl.

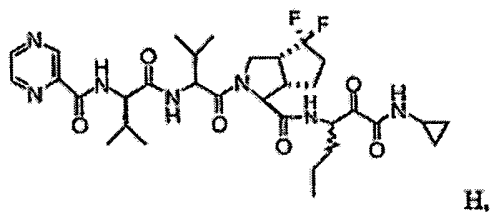
Výhodné provedení předloženého vynálezu je takové, že p^0 je BOC.

Je zřejmé, že předložený vynález zahrnuje všechny vhodné kombinace konkrétních výhodných provedení.

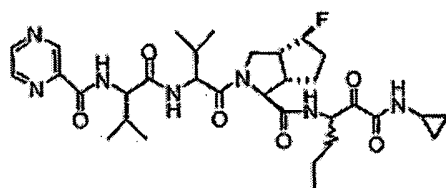
Konkrétní sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou zvoleny ze souboru, zahrnujícího sloučeniny A-FH které postupně jsou následující:

07.04.03

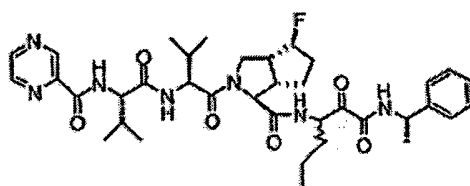




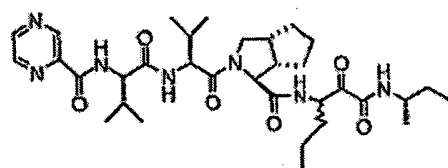
H,



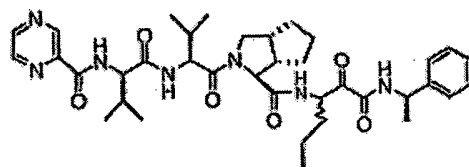
I,



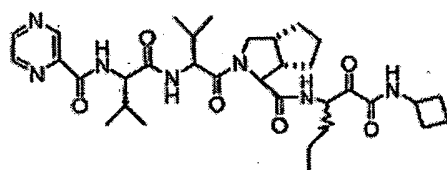
J,



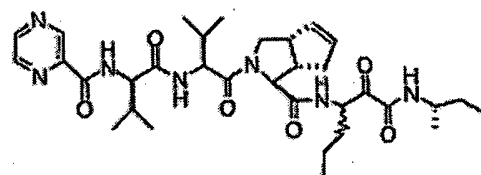
K,



L,

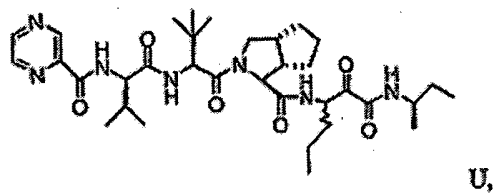
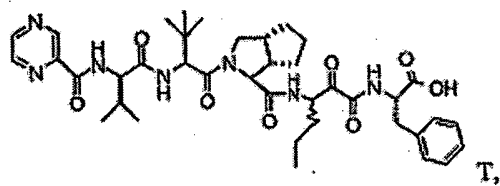
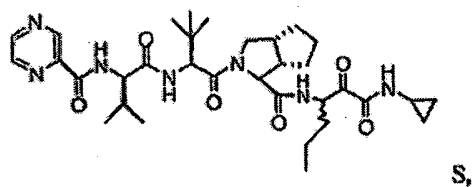
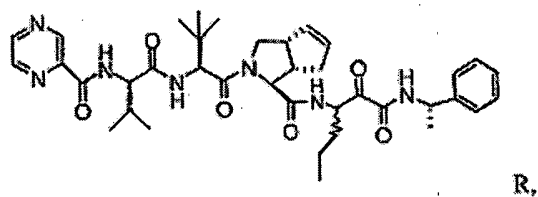
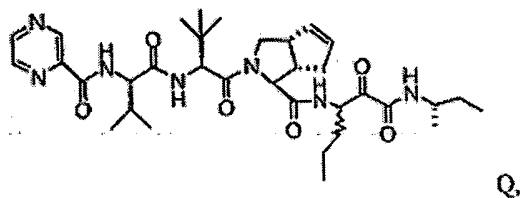
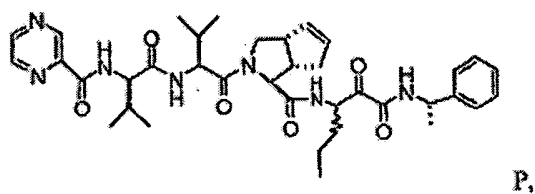
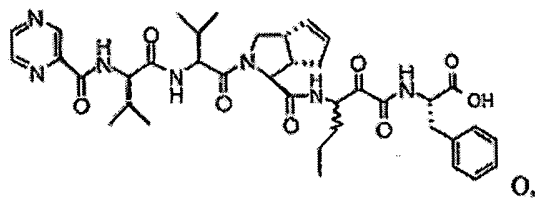


M,

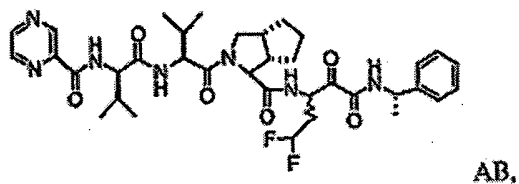
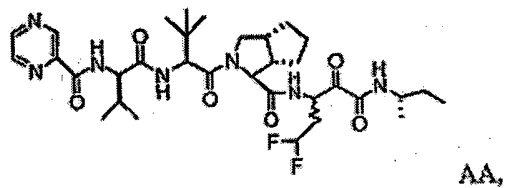
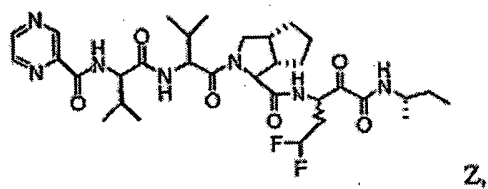
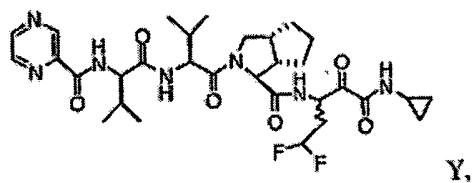
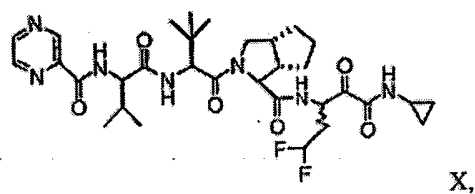
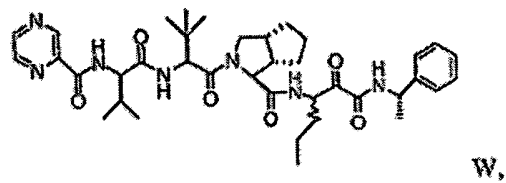
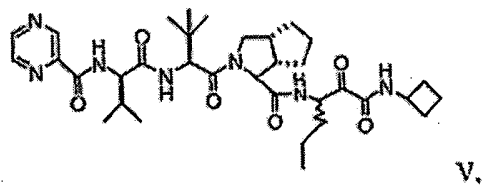


N,

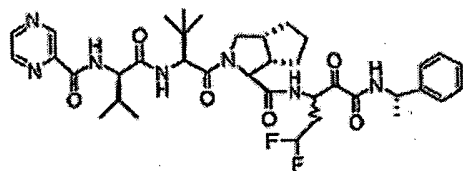
07.04.03



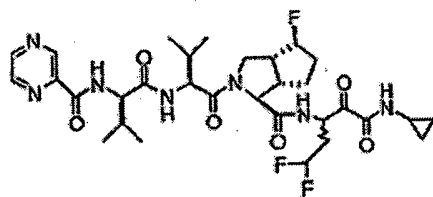
07.04.03



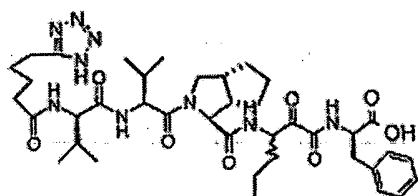
07.04.03



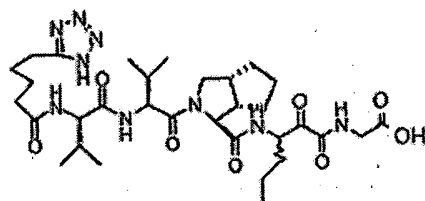
AC,



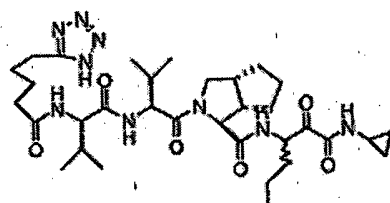
AD,



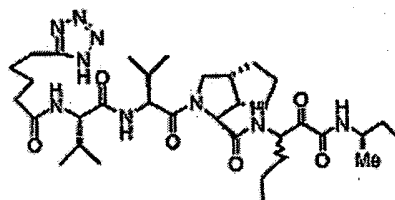
AE,



AF,

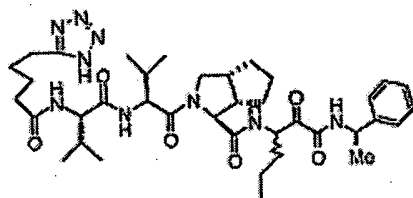


AG,

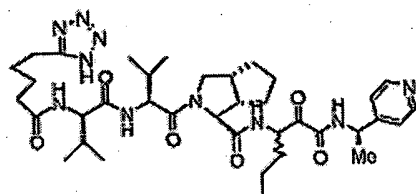


AH,

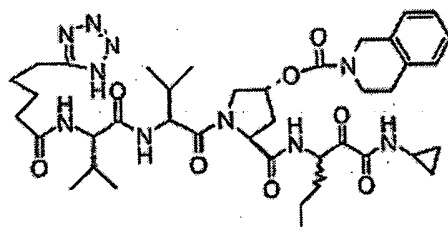
07.04.03



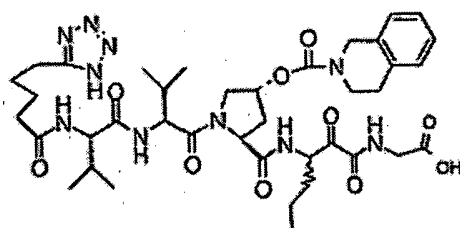
AL,



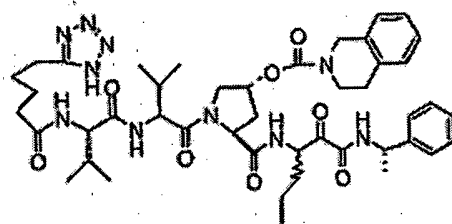
AJ,



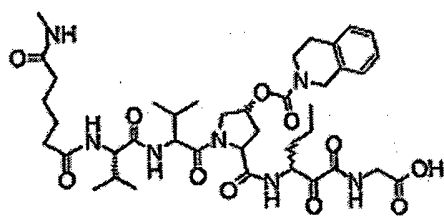
AK,



AL,

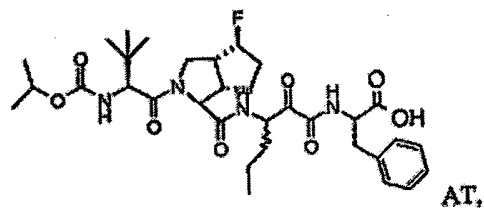
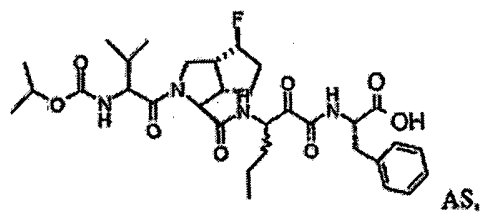
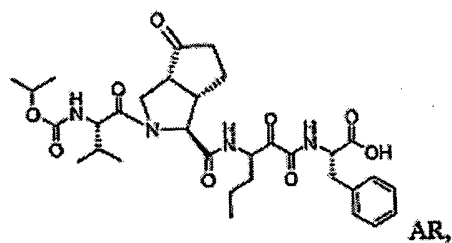
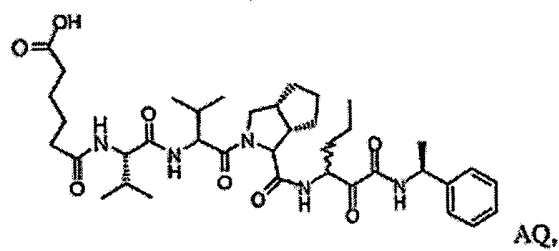
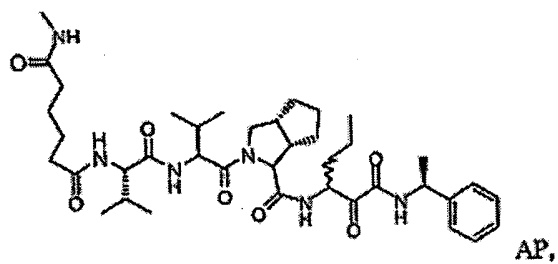
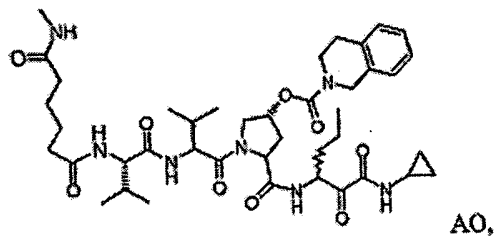


AM,

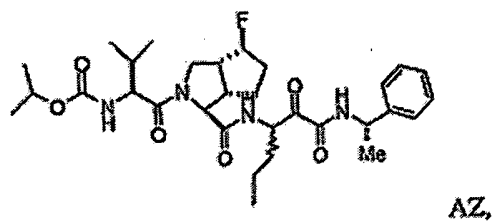
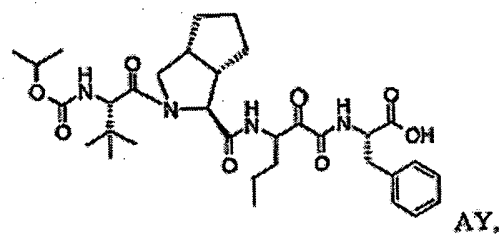
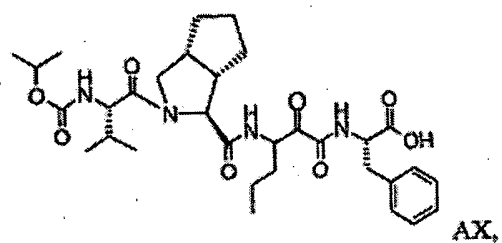
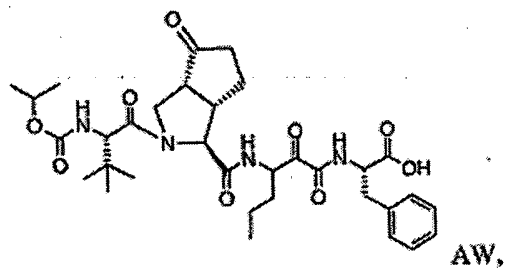
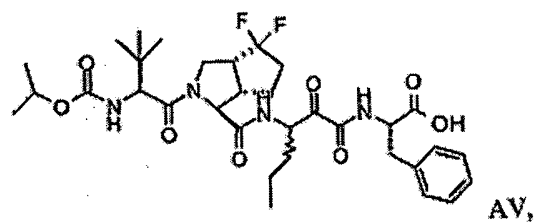
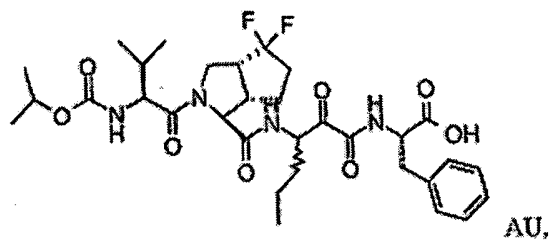


AN,

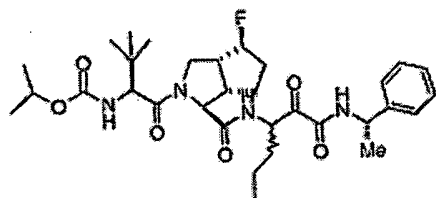
07.04.03



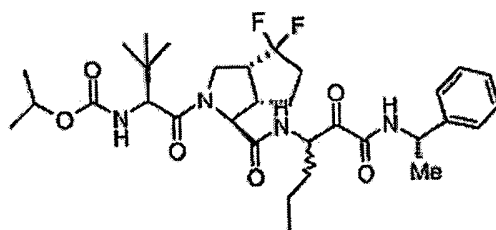
07.04.03



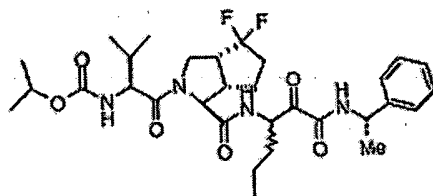
07.04.03



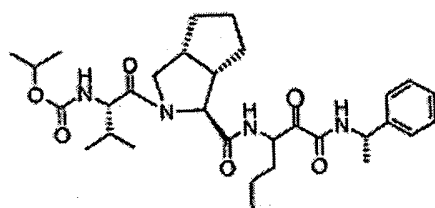
BA,



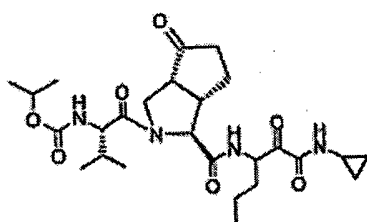
BB,



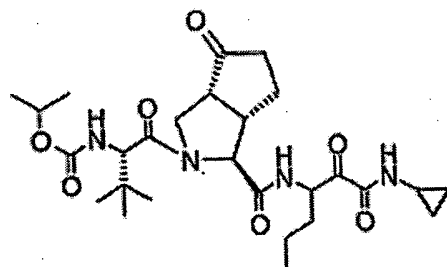
BC,



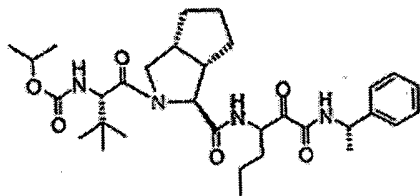
BD,



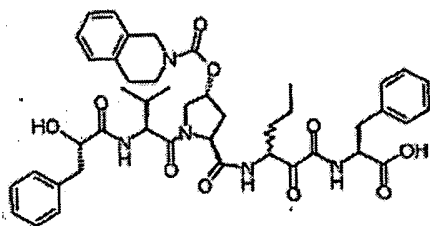
BE,



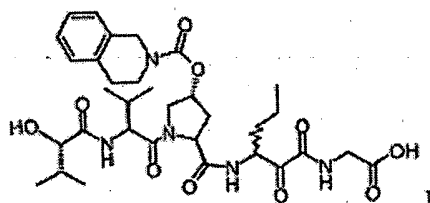
BF,



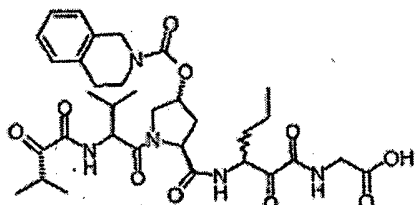
BG,



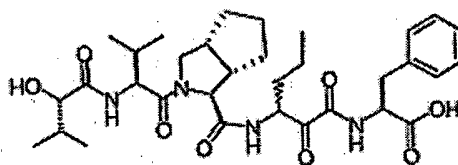
BH,



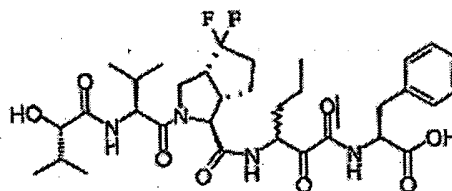
BL,



BJ,

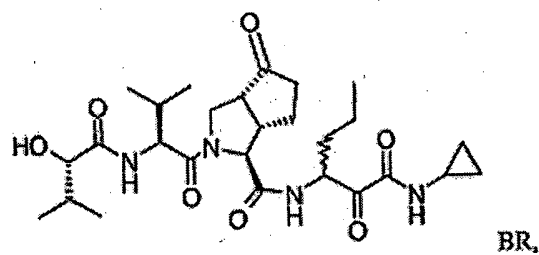
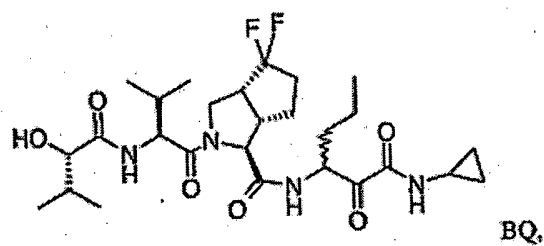
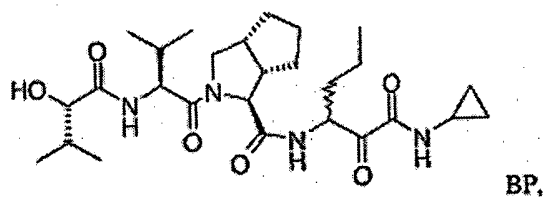
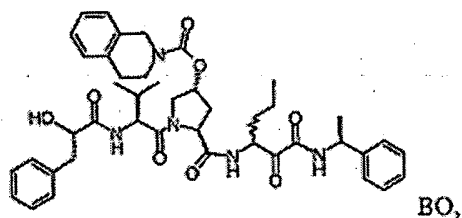
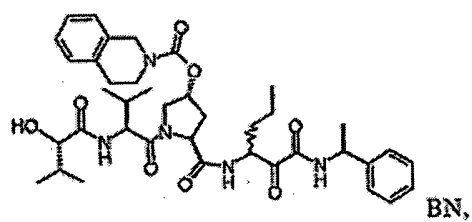
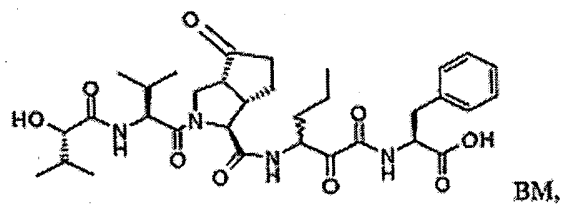


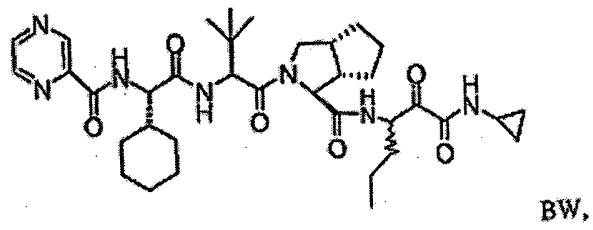
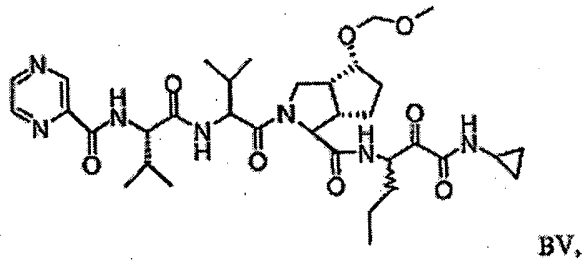
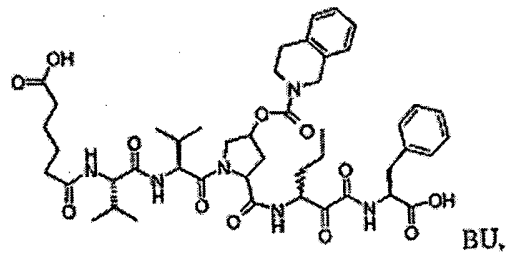
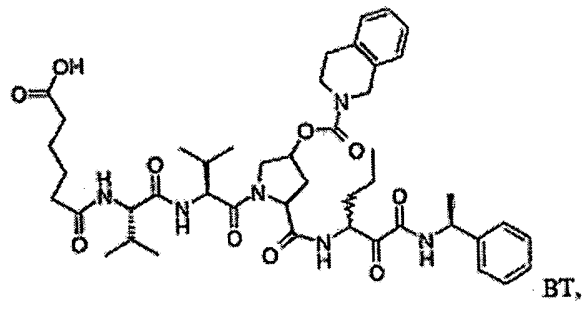
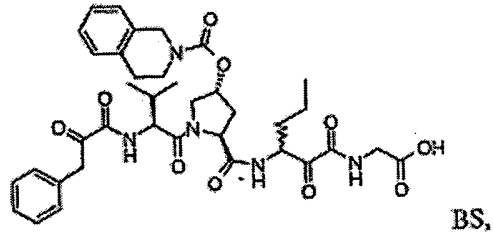
BK,

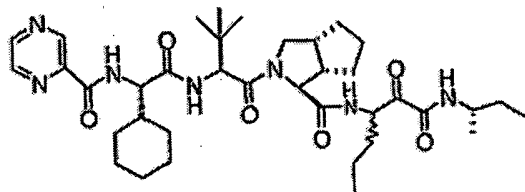


BL,

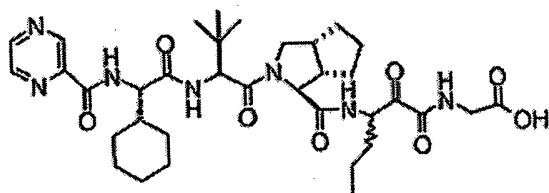
07-04-03



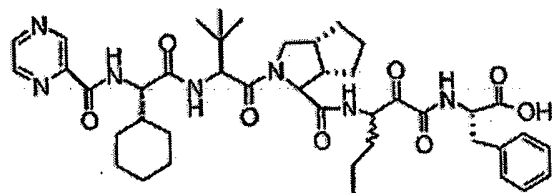




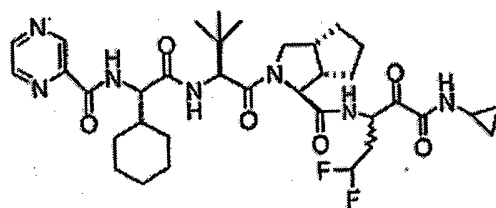
BX,



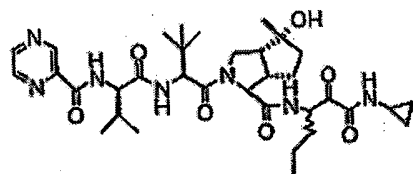
BY,



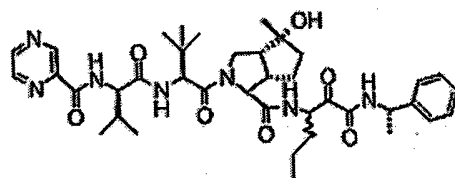
BZ,



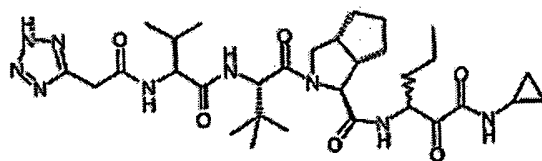
CA,



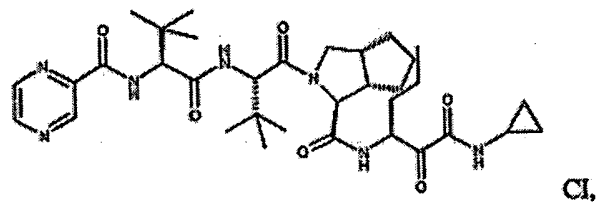
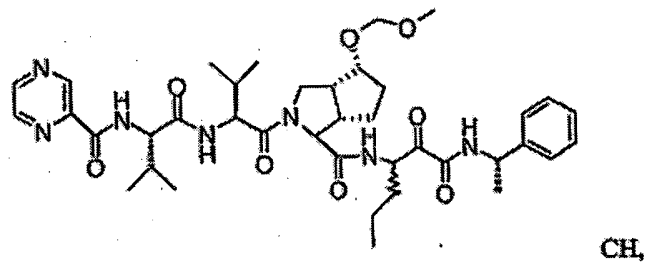
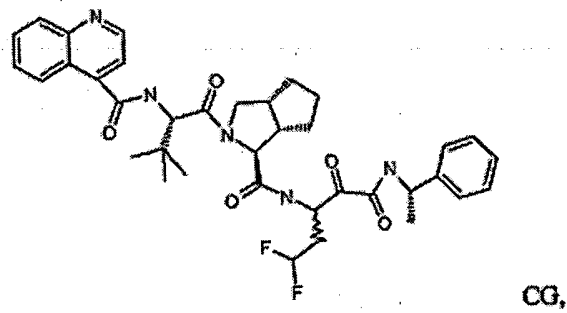
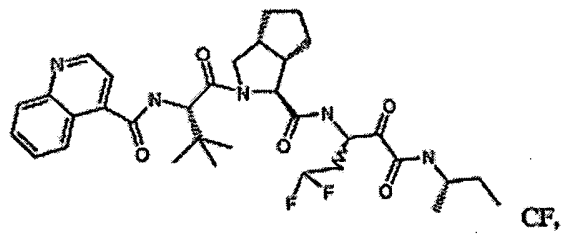
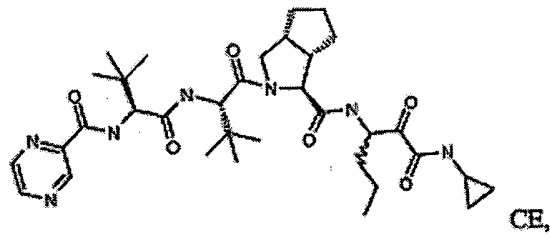
CB,

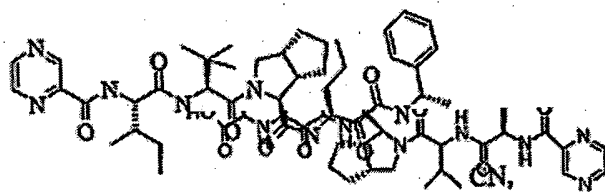
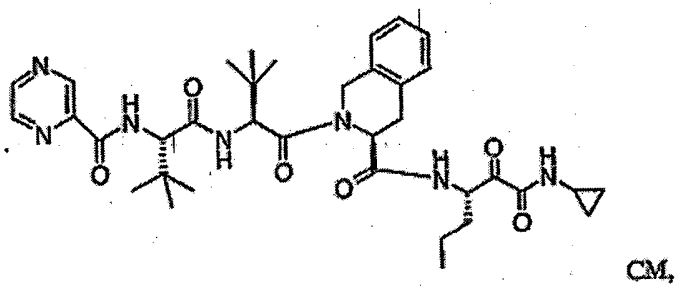
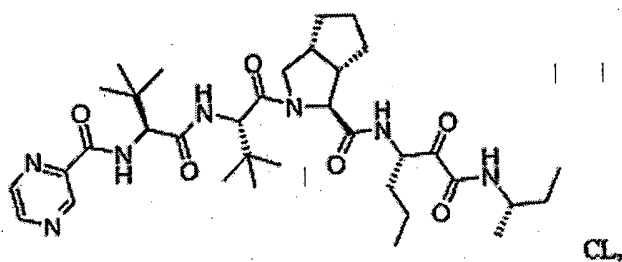
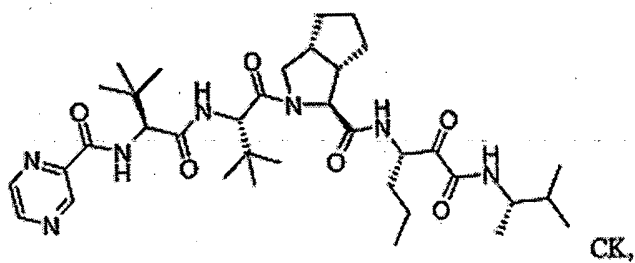
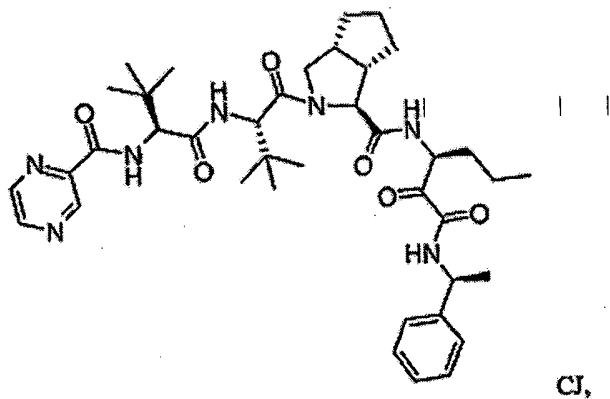


CC,

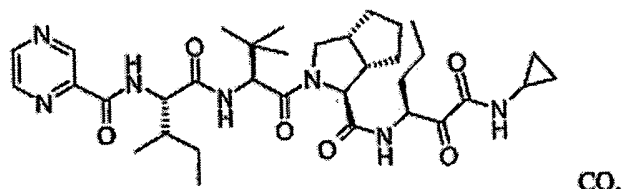


CD,

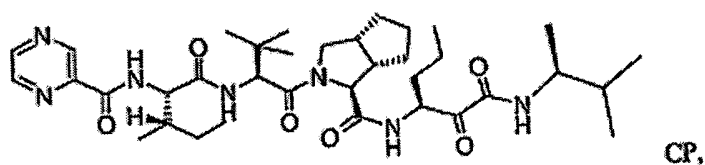




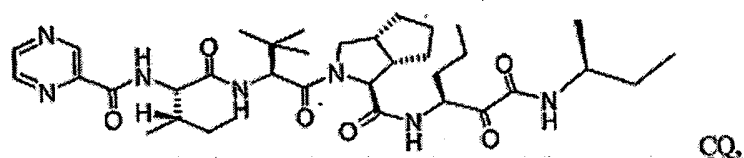
07.04.03



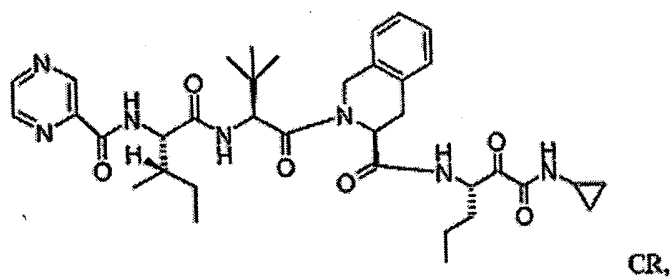
CO,



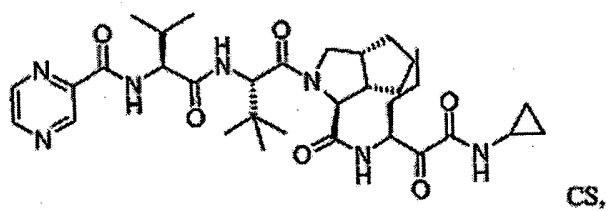
CP,



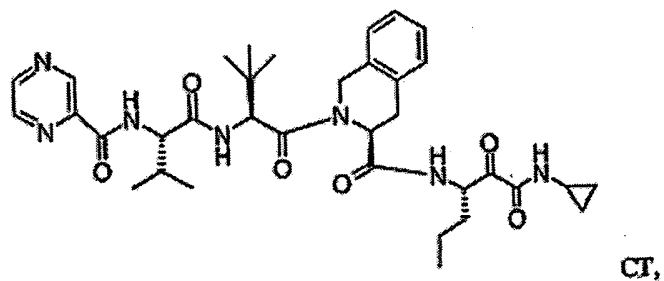
CQ,



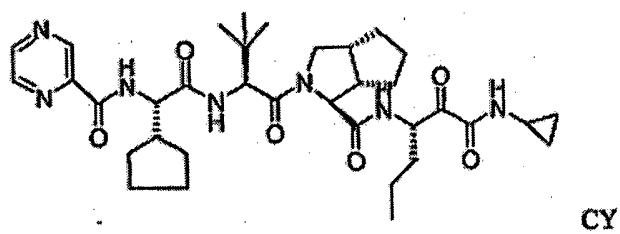
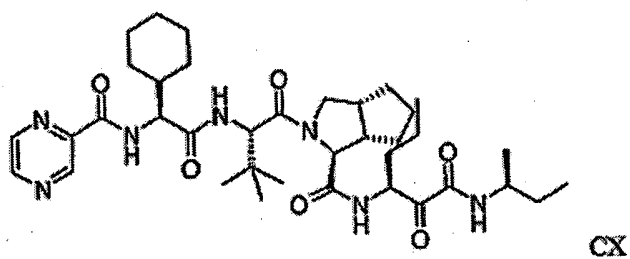
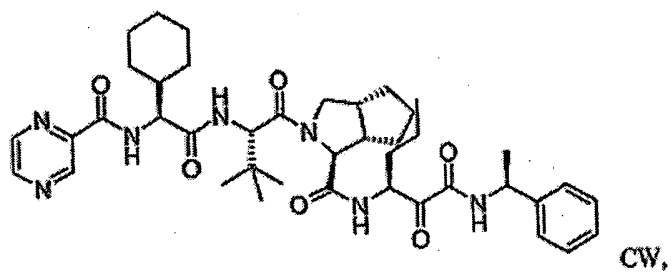
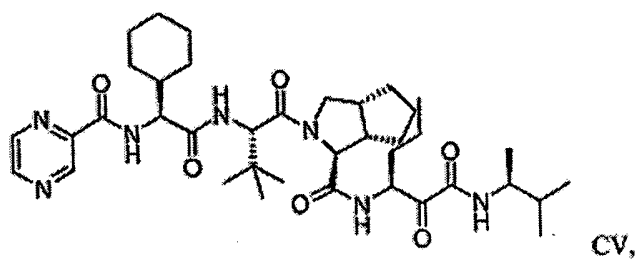
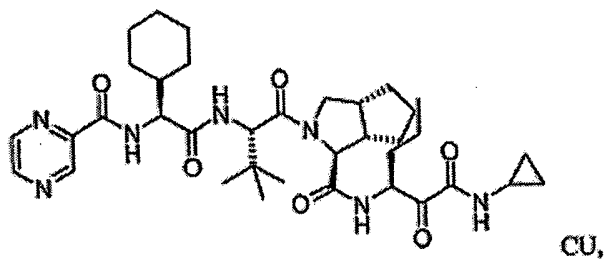
CR,



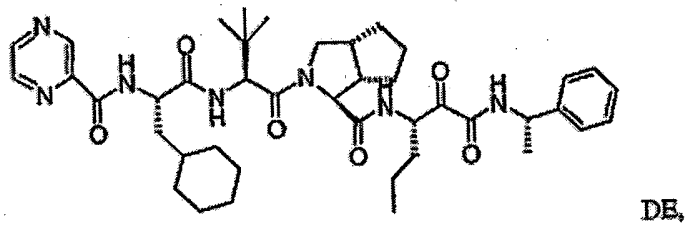
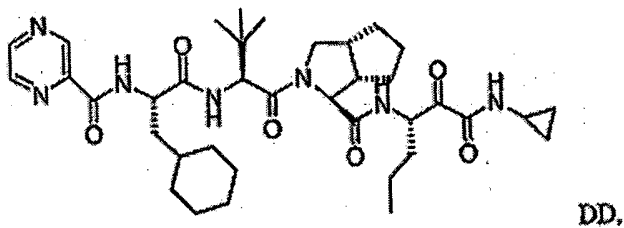
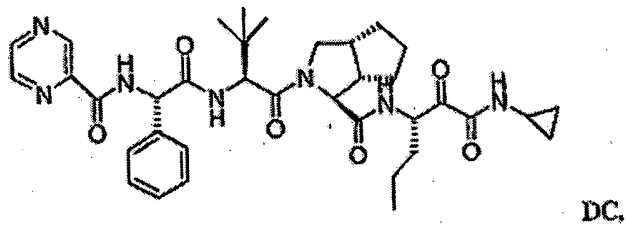
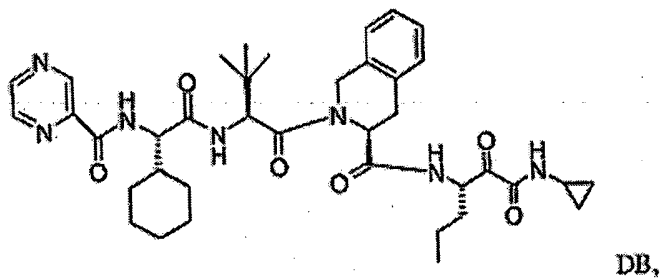
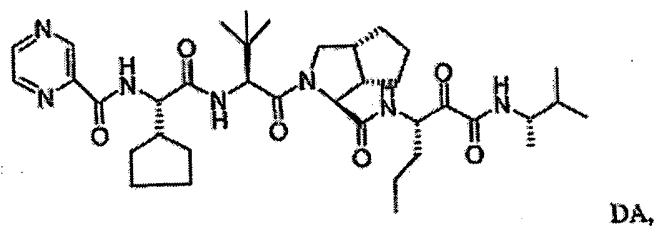
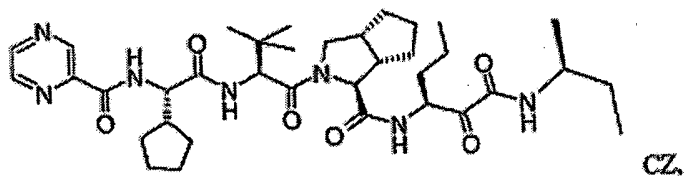
CS,

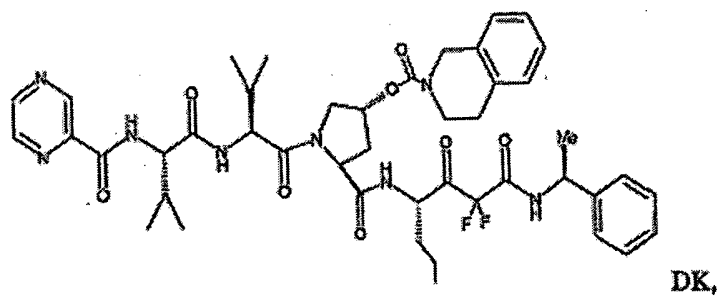
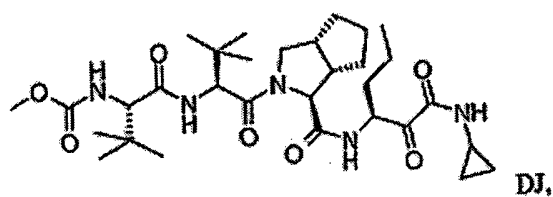
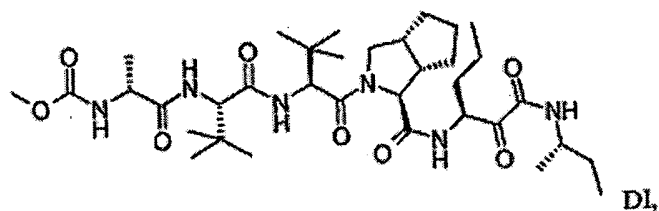
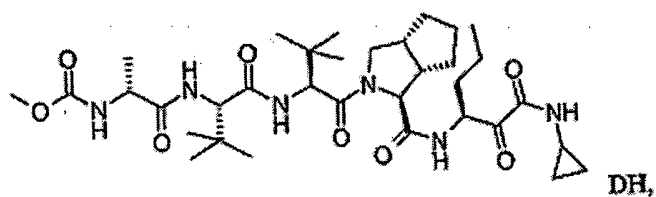
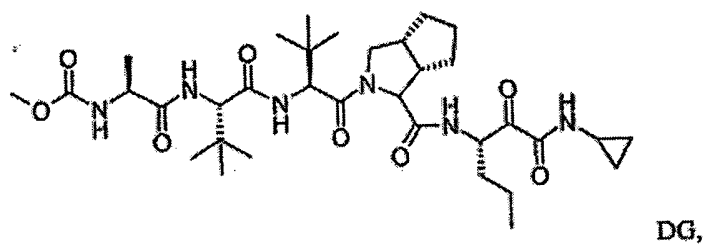
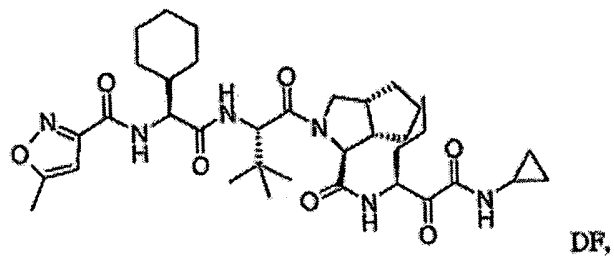


CT,

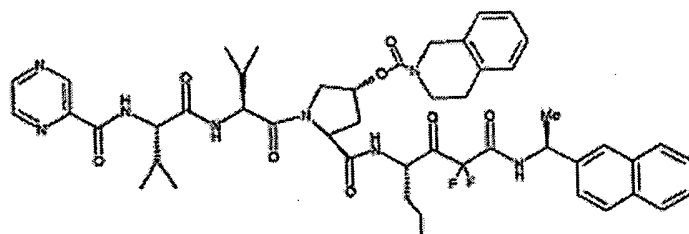


07.04.03

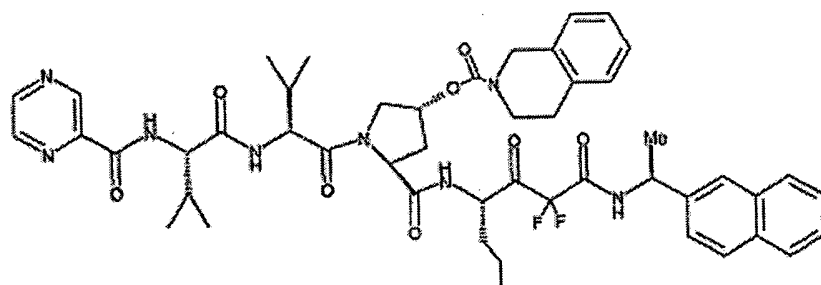




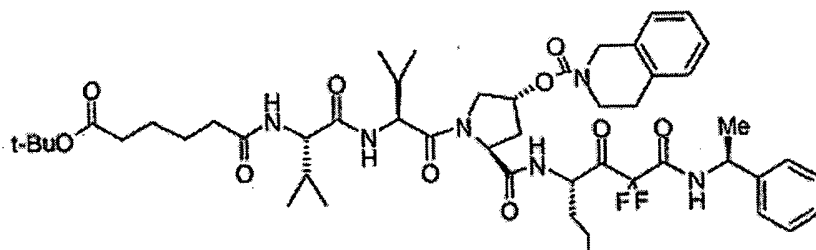
07.04.03



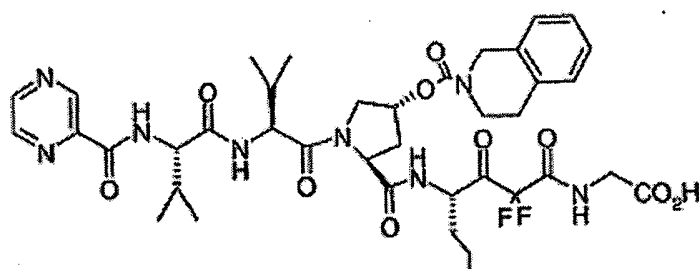
DL,



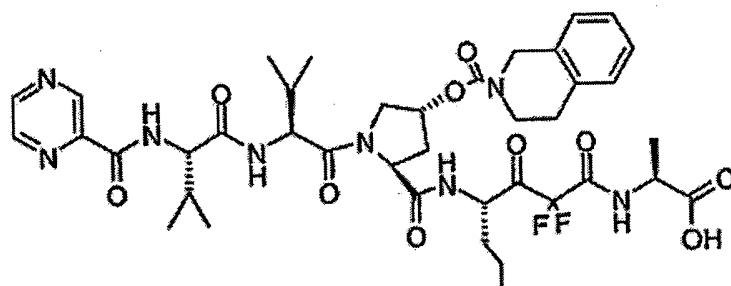
DM,



DN,

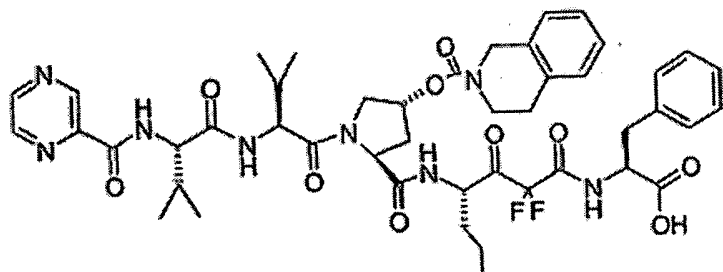


DO,

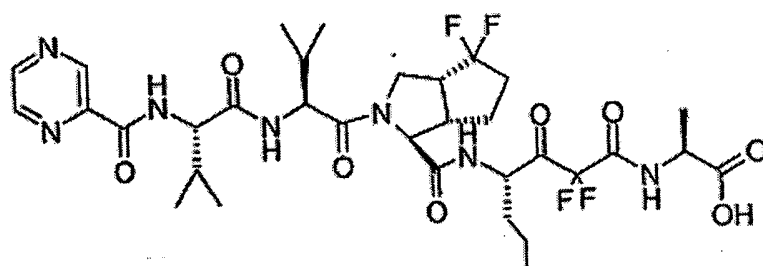


DP,

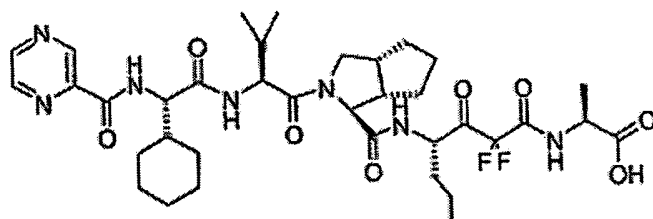
07.04.03



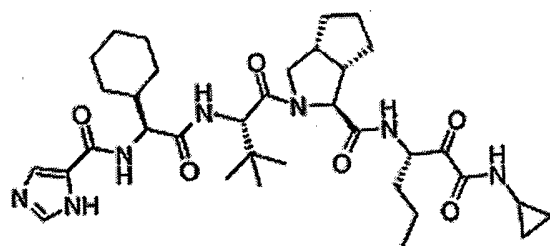
DQ,



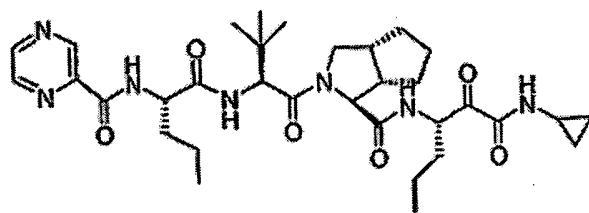
DR,



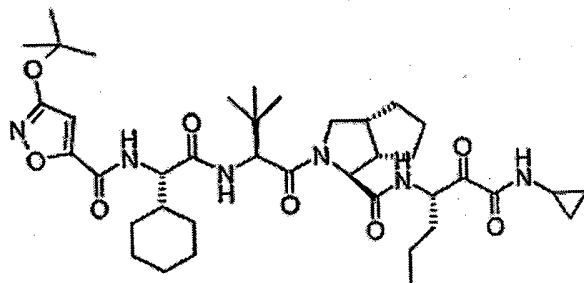
DS,



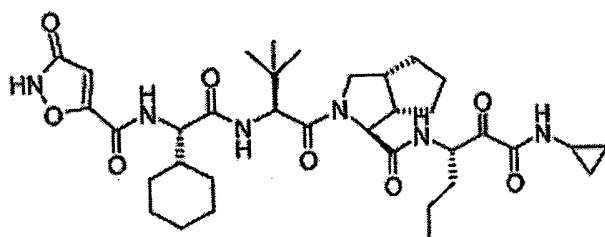
DT,



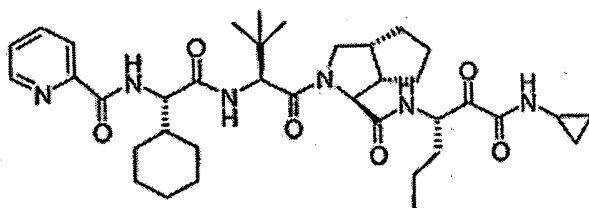
DU,



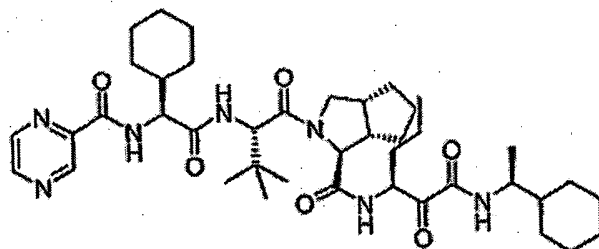
DV,



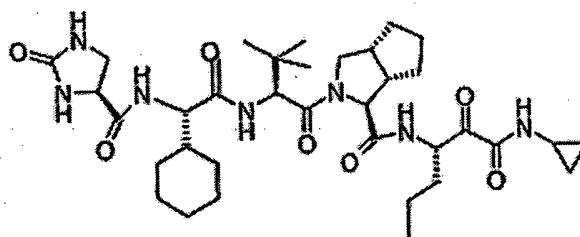
DW,



DX,

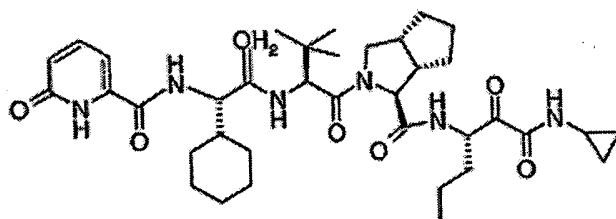


DY,

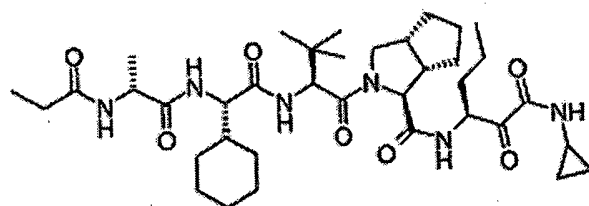


DZ,

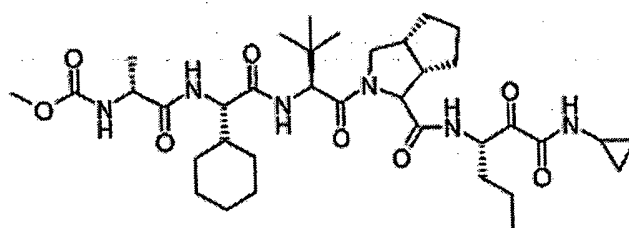
07.04.03



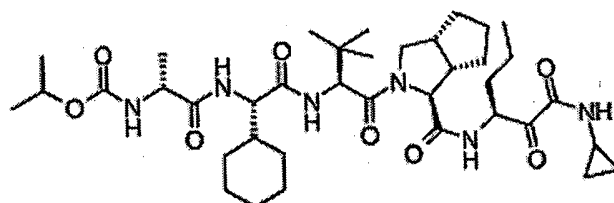
EA,



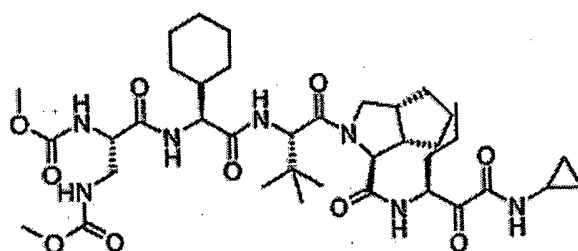
EB,



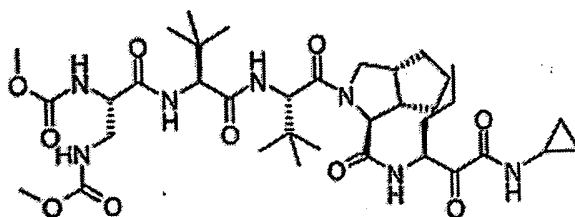
EC,



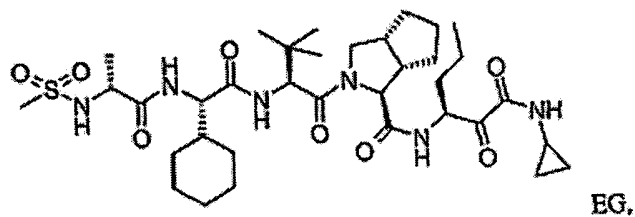
ED,



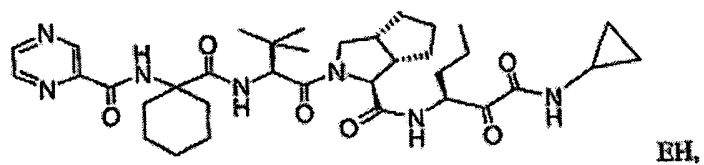
EE,



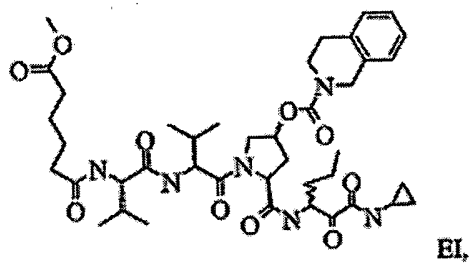
EF,



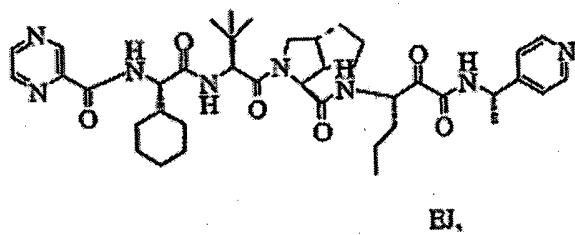
EG,



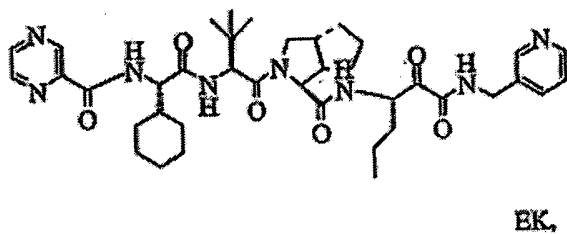
EH,



EI,

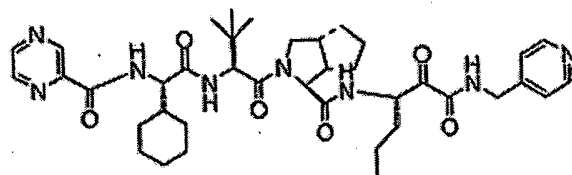


EJ,

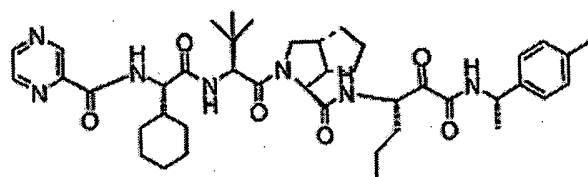


EK,

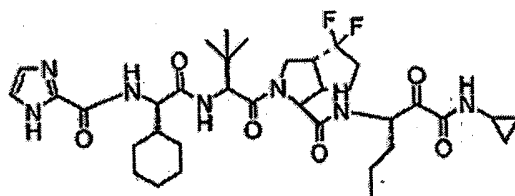
07.04.03



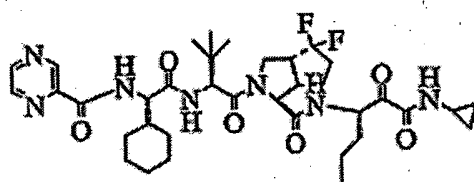
EL,



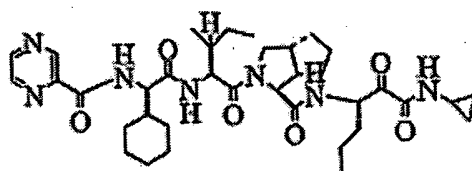
EM,



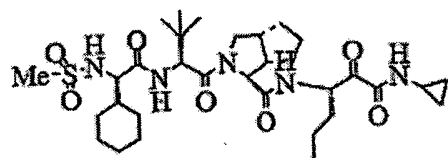
EN,



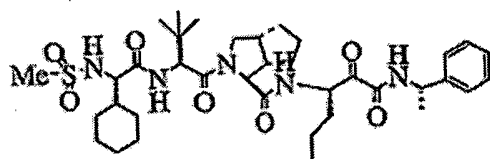
EO,



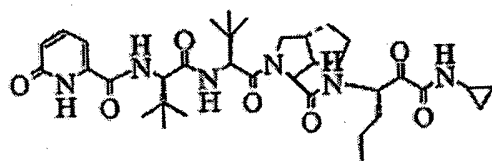
EP,



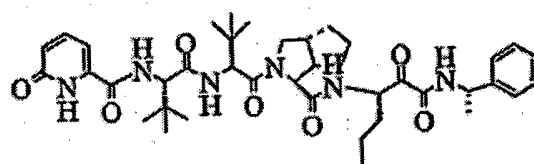
EQ,



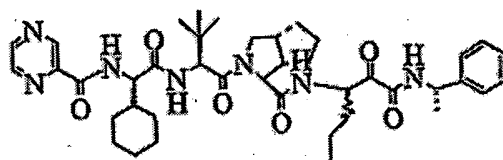
ER,



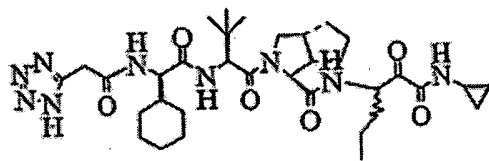
ES,



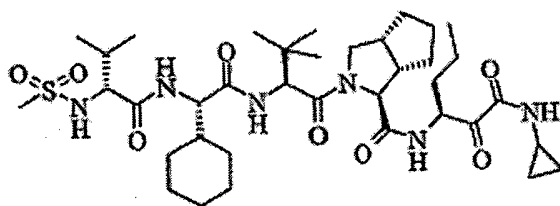
ET,



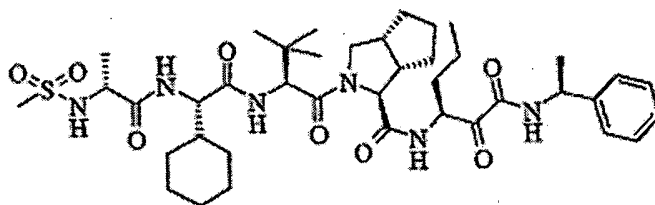
EU,



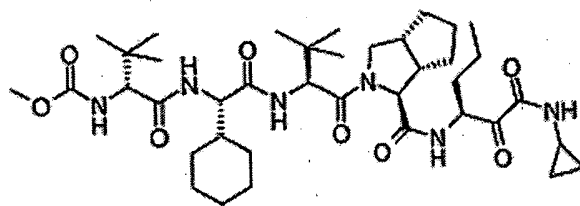
EV,



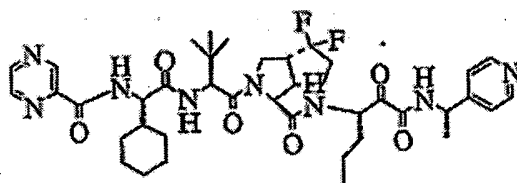
EW,



EX,

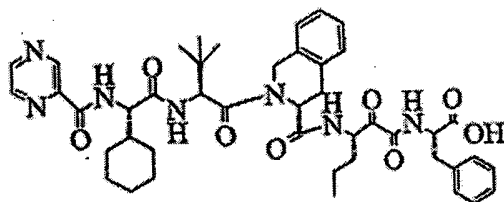


EY,

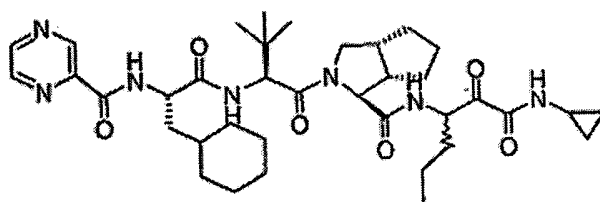


EZ,

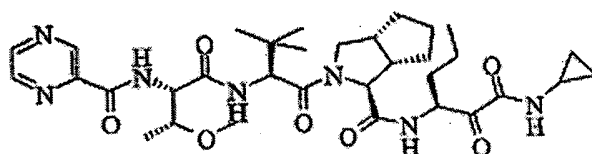
07.04.03



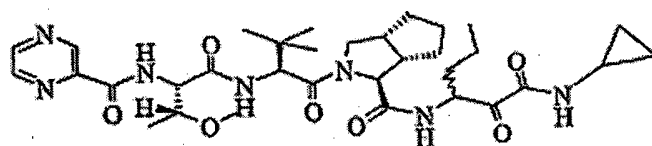
FA,



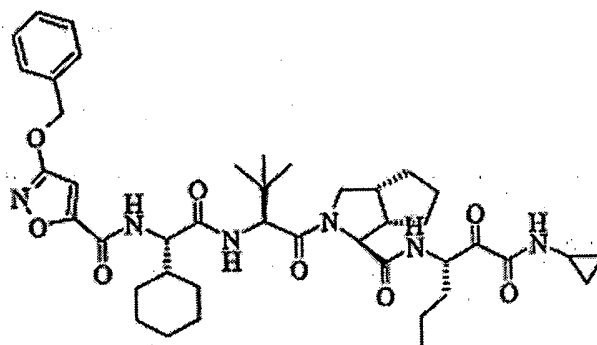
FB,



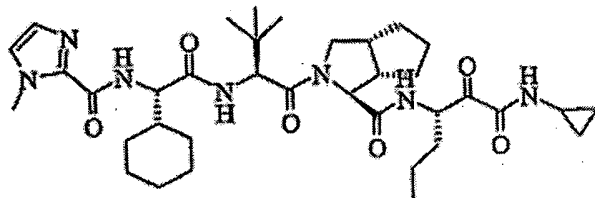
FC,



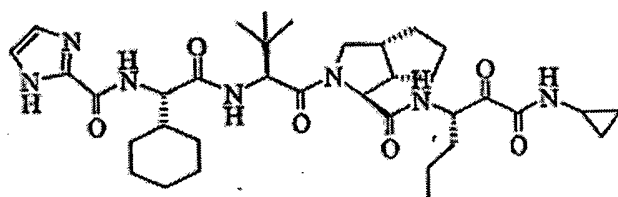
FD,



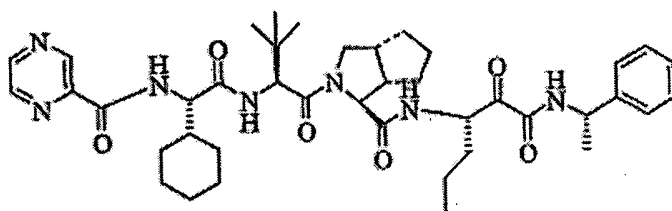
FE,



FF,



FG, and



FH,

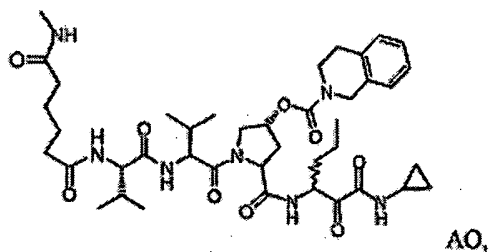
nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole nebo prekurzory
nebo solváty takových sloučenin, jejich solí nebo
prekurzorů.

Výhodná sloučenina je sloučenina zvolená ze souboru,
zahrnujícího S, U, BW, BX, BY, BZ, CE, CU, CW, CY, DZ, EA,
EC, EJ, FH, EW, EO, EZ, FG a EN a jejich farmaceuticky
přijatelné sole nebo prekurzory nebo solváty takových
sloučenin, jejich solí nebo prekurzorů.

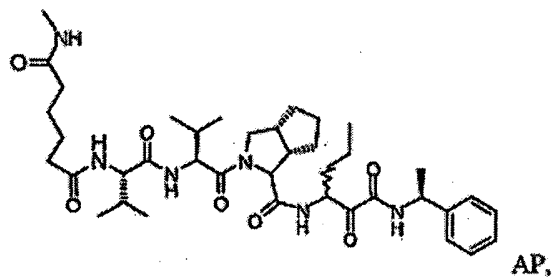
Jiná výhodná provedení předloženého vynálezu jsou zvolena
ze souboru, zahrnujícího následující skupinu sloučenin:



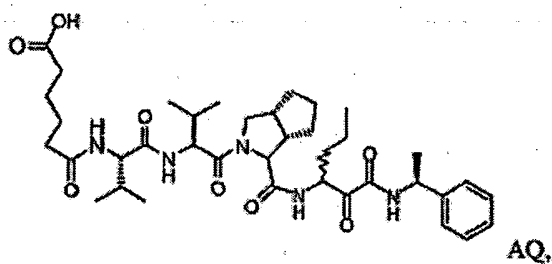
07.04.03



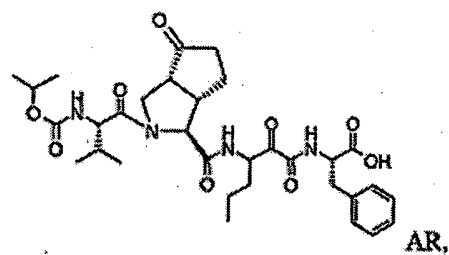
AO,



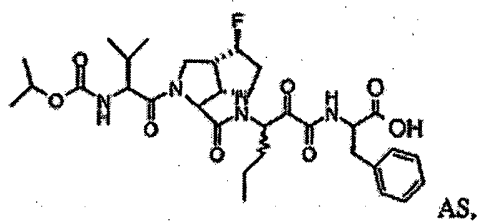
AP,



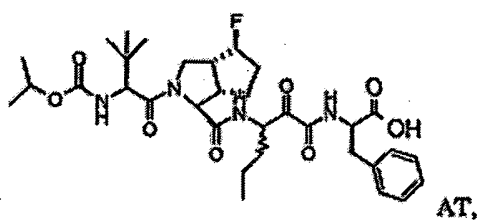
AQ,



AR,

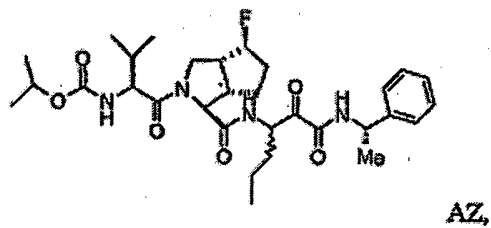
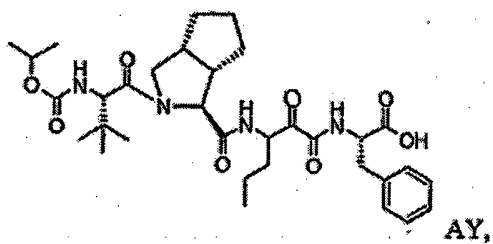
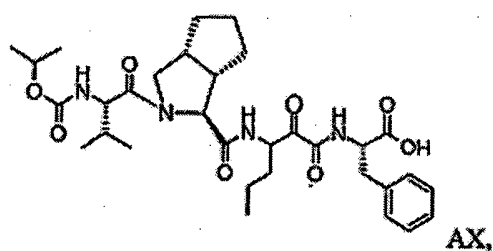
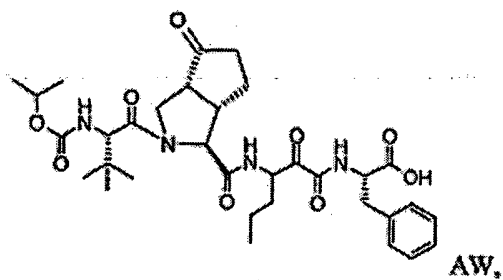
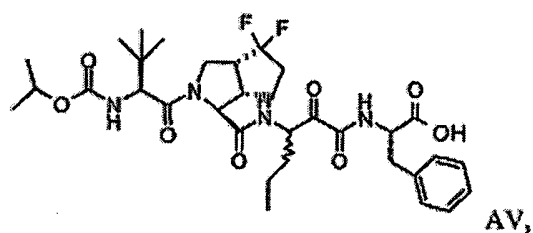
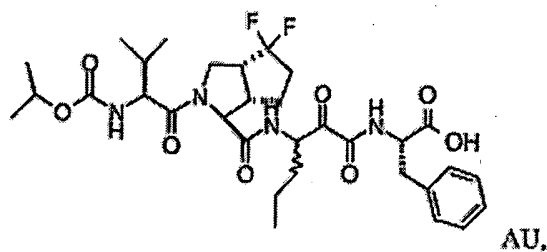


AS,

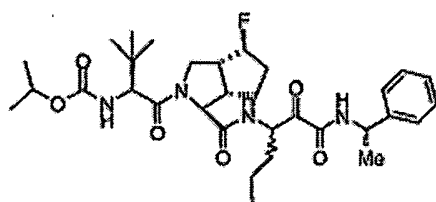


AT,

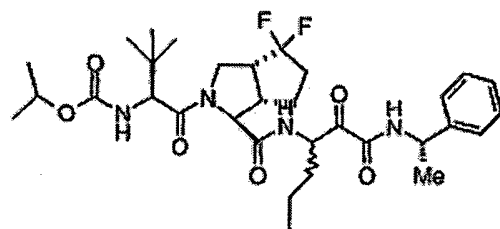
07.04.03



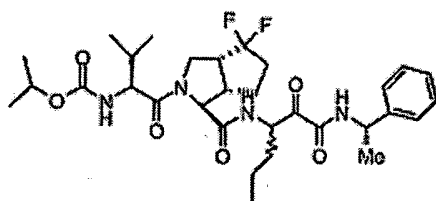
07.04.03



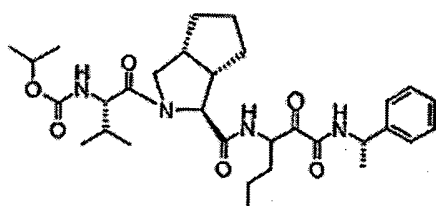
BA,



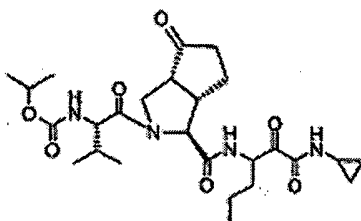
BB,



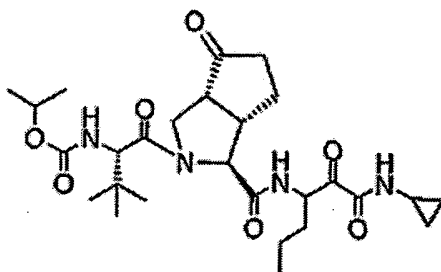
BC,



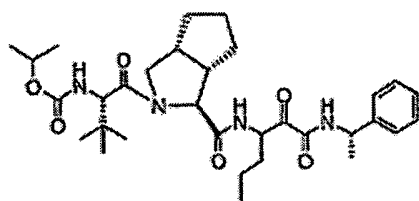
BD,



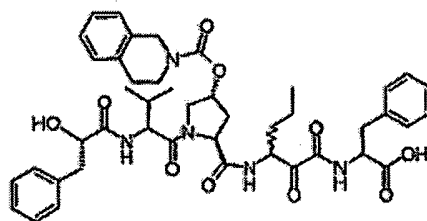
BE,



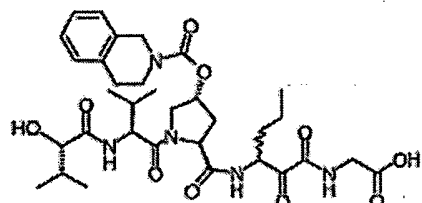
BF,



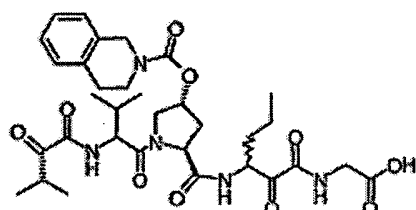
BG,



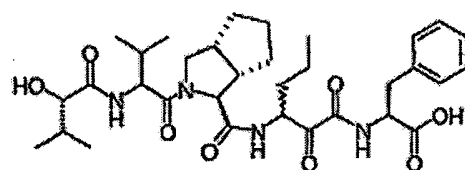
BH,



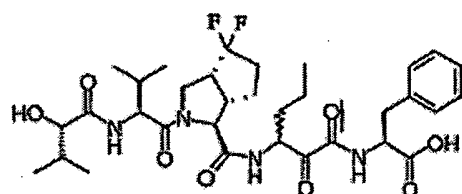
BI,



BJ,

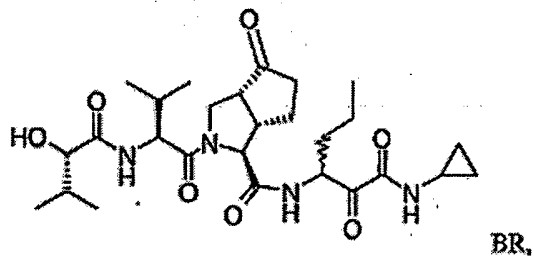
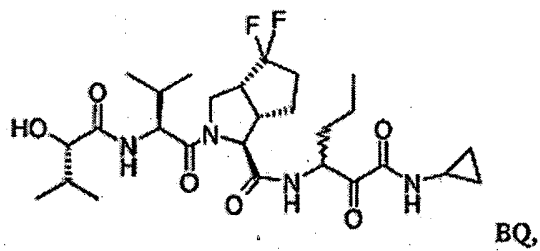
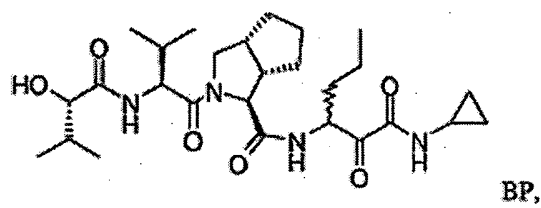
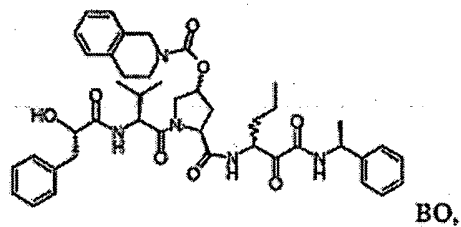
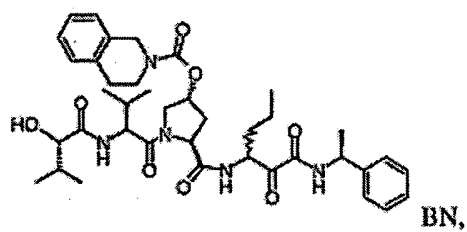
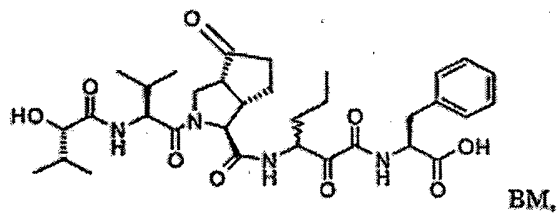


BK,

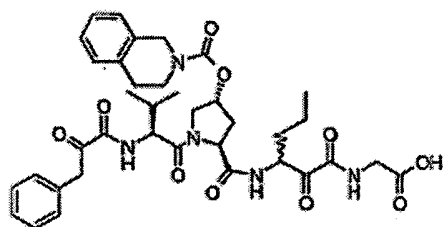


BL,

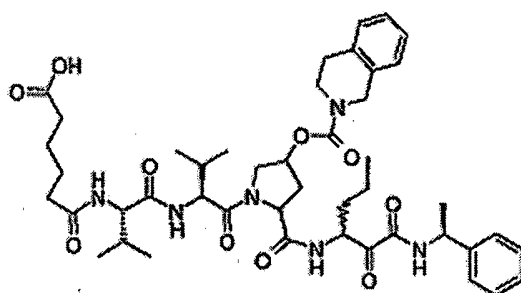
07.04.03



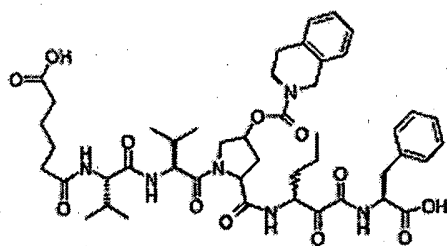
07.04.03



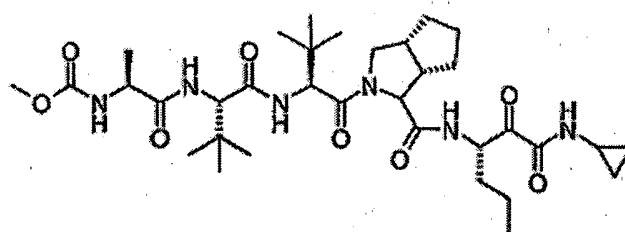
BS,



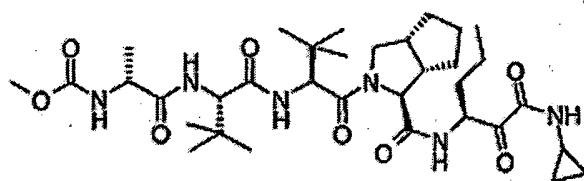
BT,



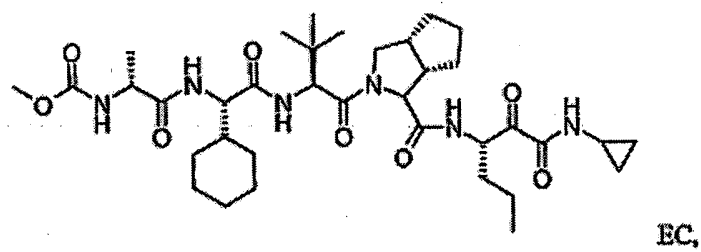
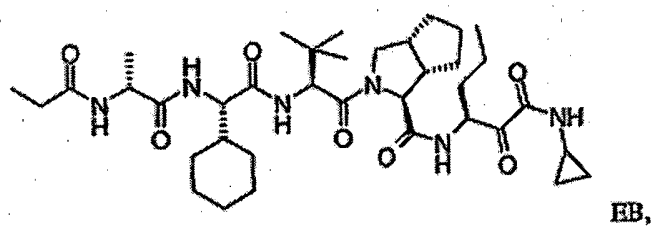
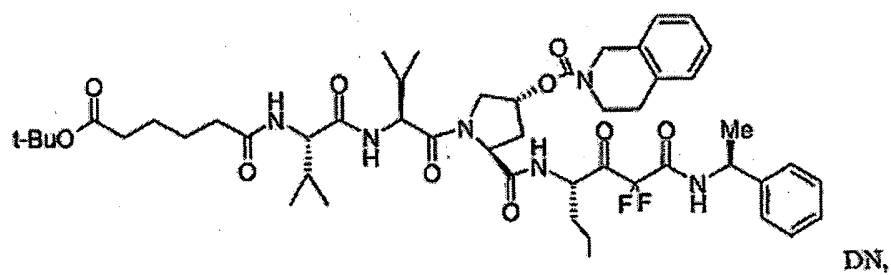
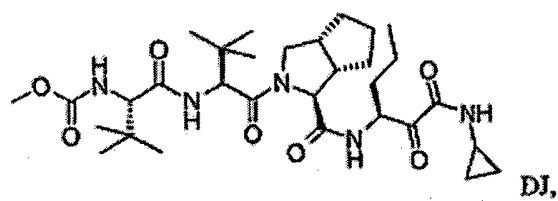
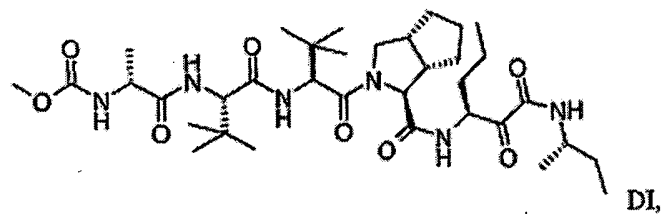
BU,

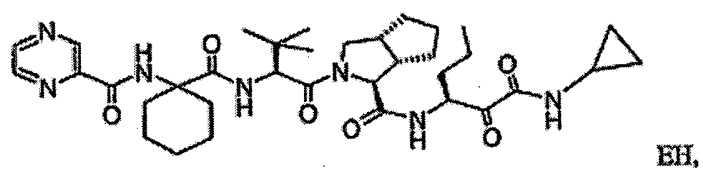
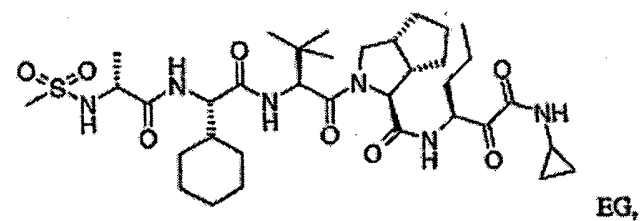
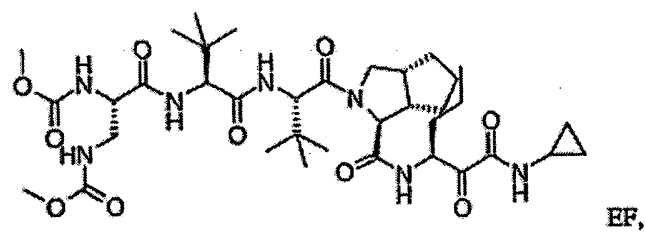
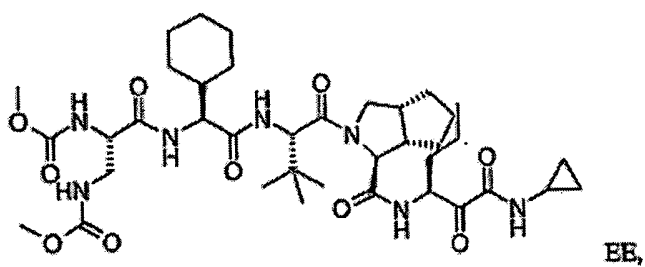
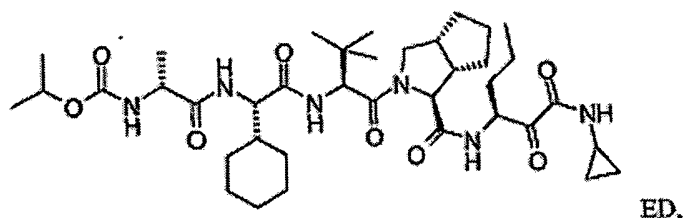


DG,

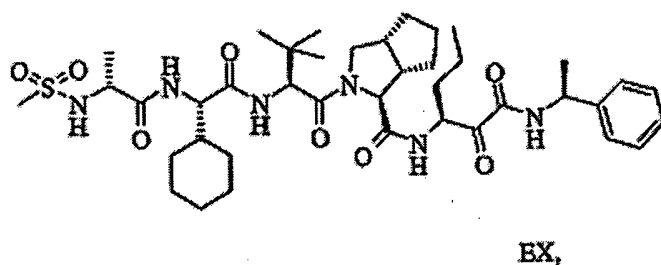
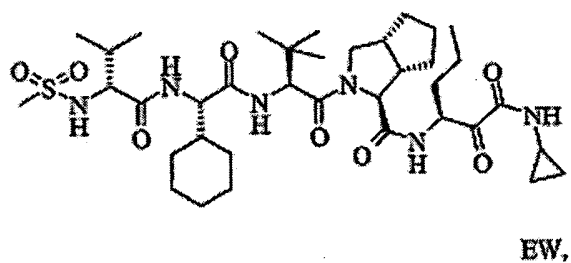
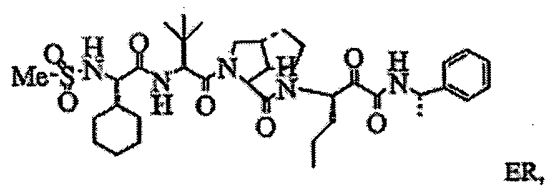
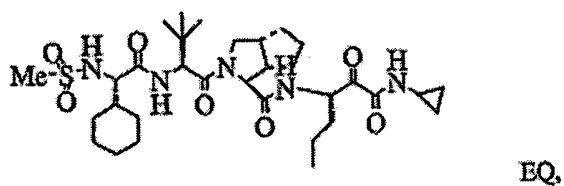
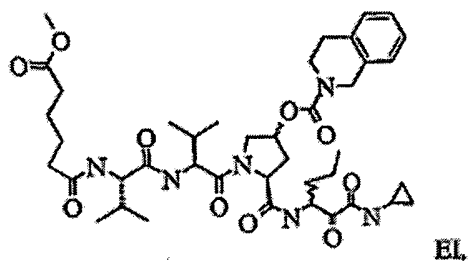


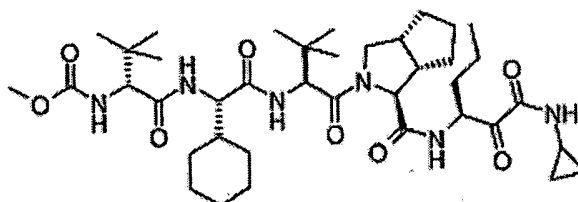
DH,





07.04.03

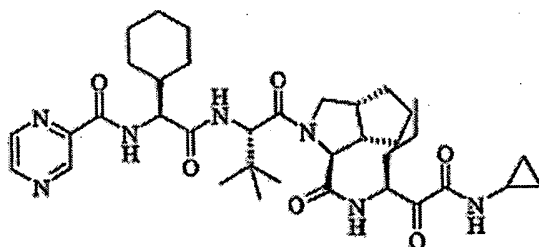




EY,

nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole nebo prekurzory
nebo solváty takových sloučenin, jejich solí nebo
prekurzorů.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina
obecného vzorce



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo
solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina
obecného vzorce 1 ve kterém:

R^0 je vazba;

R^1 je atom vodíku;

R^2 je nižší alkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 alifatickými substituenty; nebo nižší cykloalkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 cyklickými substituenty;

R^3 a R^5 jsou každý nezávisle methylen popřípadě substituovaný 1 až 3 alifatickými substituenty;

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou atom vodíku;

R^7 je methylen substituovaný skupinou cykloalkyl, nižší alkyl nebo aryl; nebo (1,1- nebo 1,2-)cykloalkenyl popřípadě substituovaný skupinou cykloalkyl, nižší alkyl nebo aryl;

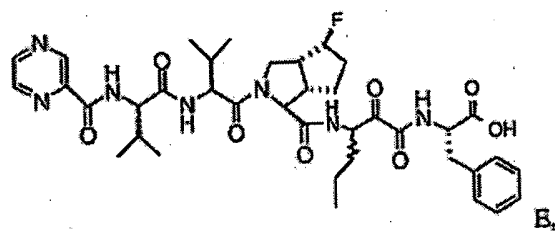
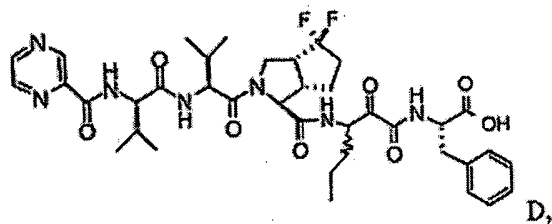
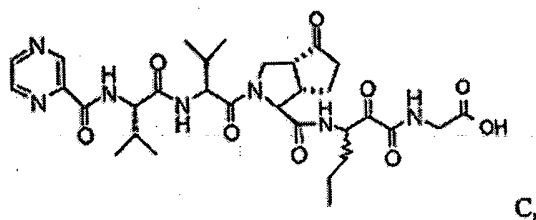
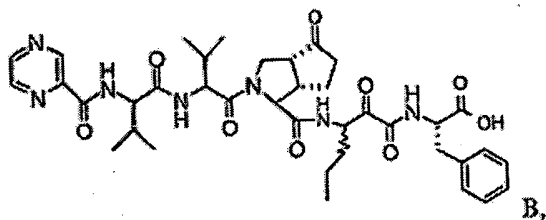
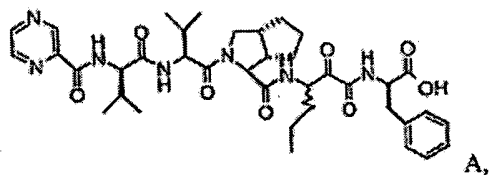
R^9 je nižší alkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 alifatickými substituenty; nebo heteroaryl popřípadě substituovaný 1 až 3 cyklickými substituenty; nebo heterocyklický popřípadě substituovaný 1 až 3 cyklickými substituenty;

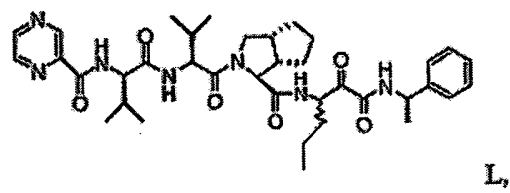
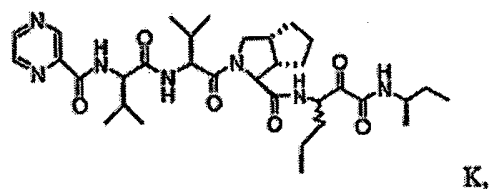
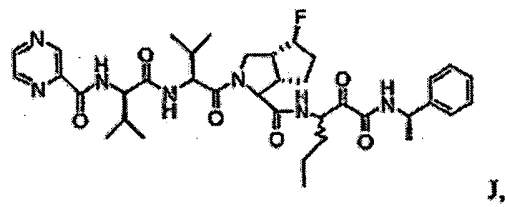
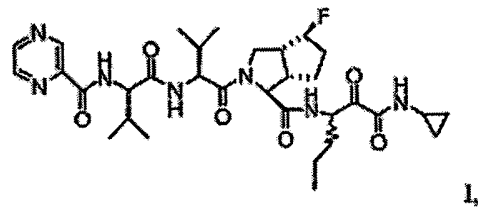
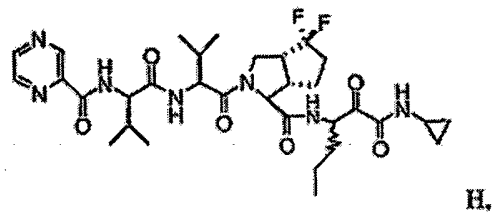
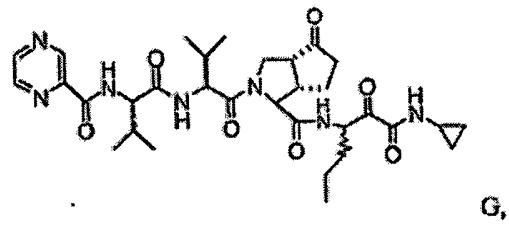
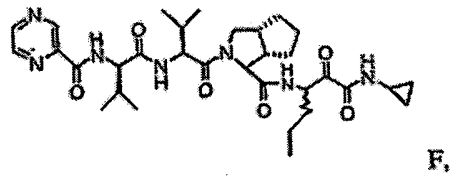


je monocyklický azaheterocyklyl, multicyklický azaheterocyklyl, nebo multicyklický azaheterocyklenyl popřípadě substituovaný 1 až 3 cyklickými substituenty; a L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$.

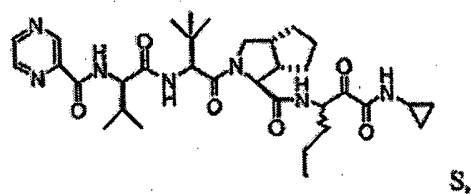
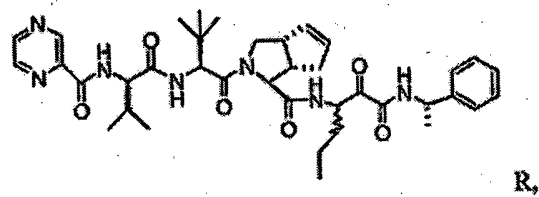
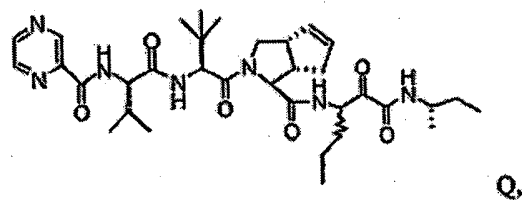
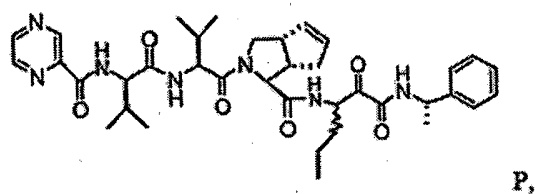
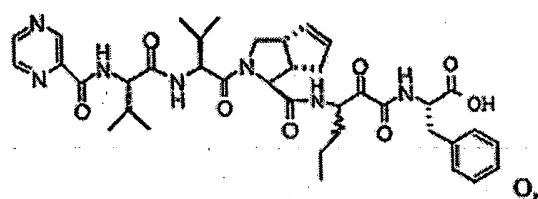
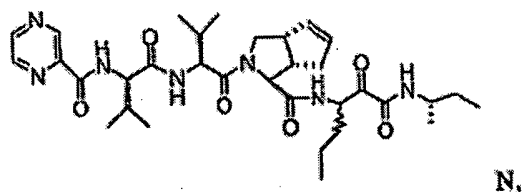
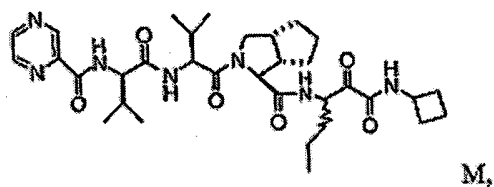
Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina zvolená ze souboru, zahrnujícího:

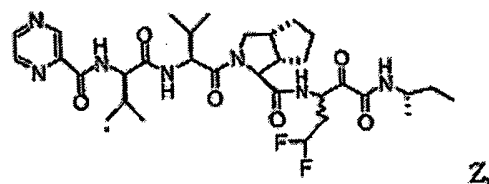
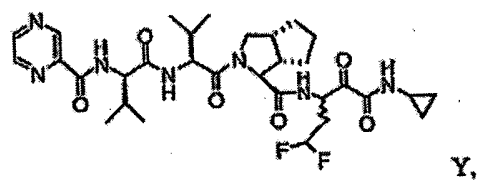
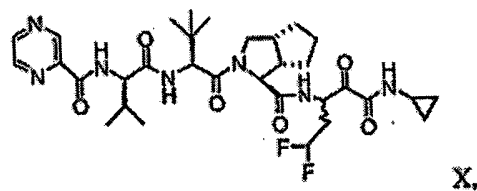
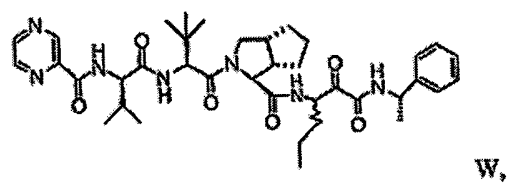
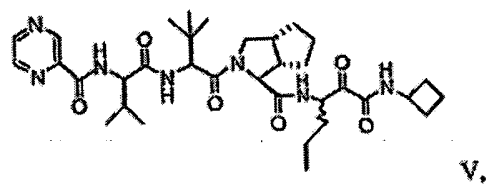
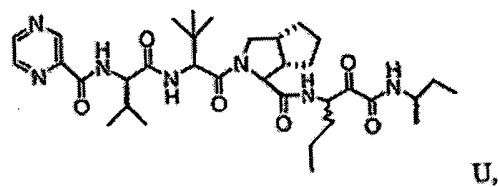
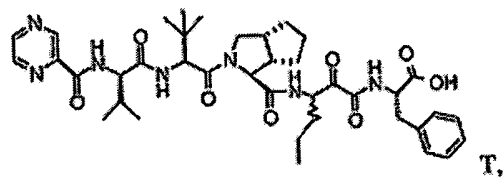
07.04.03

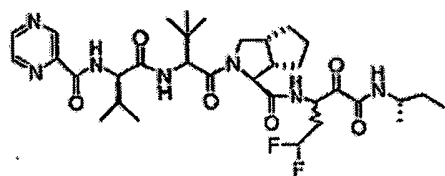




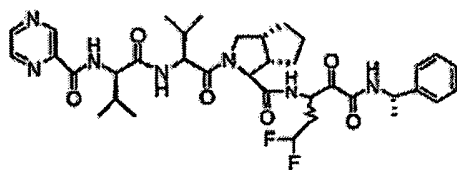
07.04.03



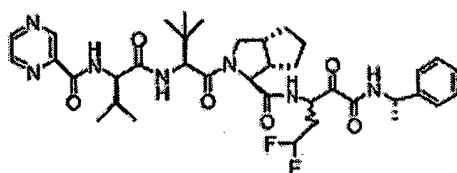




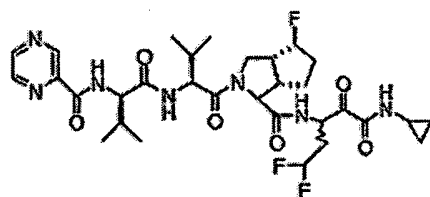
AA,



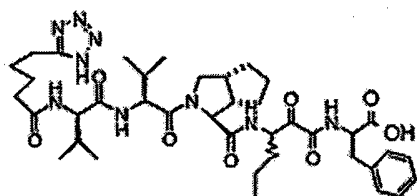
AB,



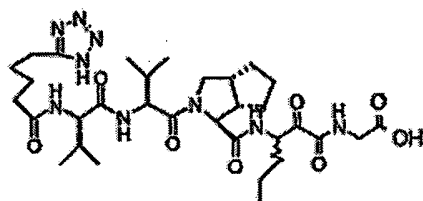
AC,



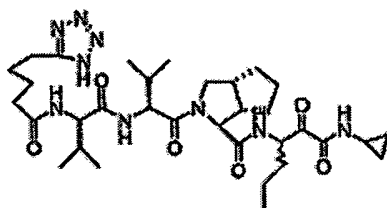
AD,



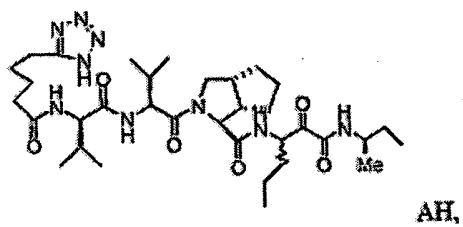
AE,



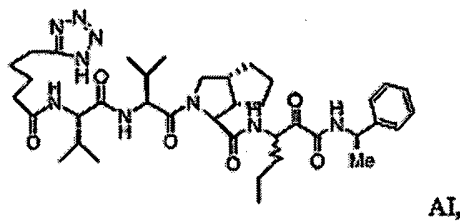
AF,



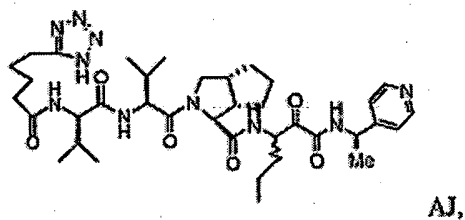
AG,



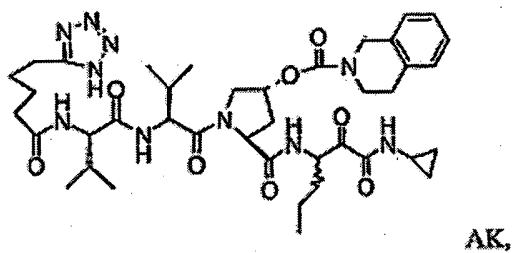
AH,



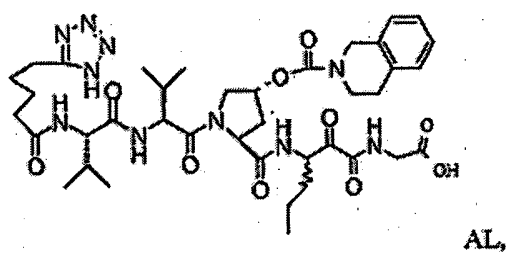
AI,



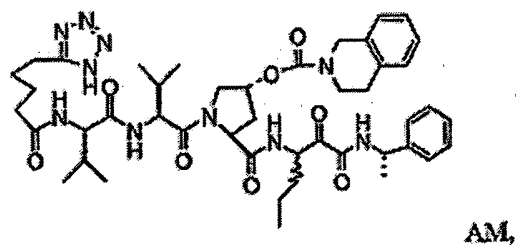
AJ,



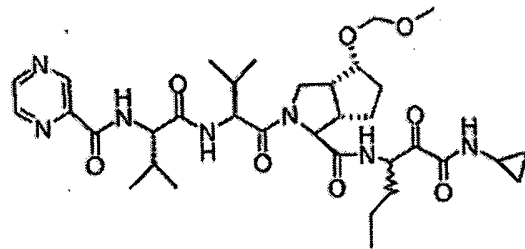
AK,



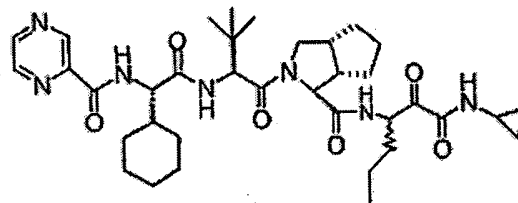
AL,



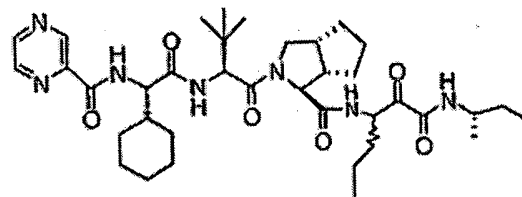
AM,



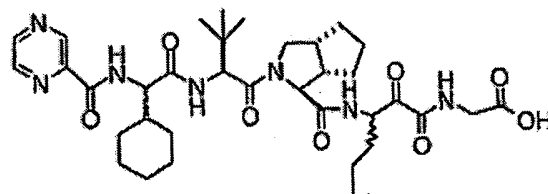
BV,



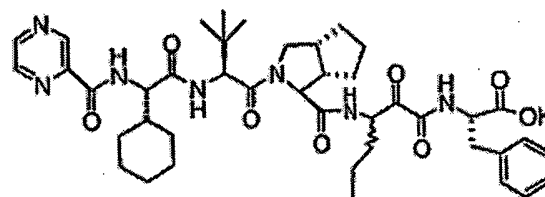
BW,



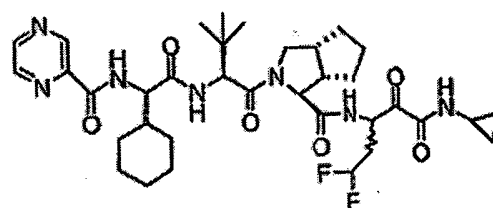
BX,



BY,

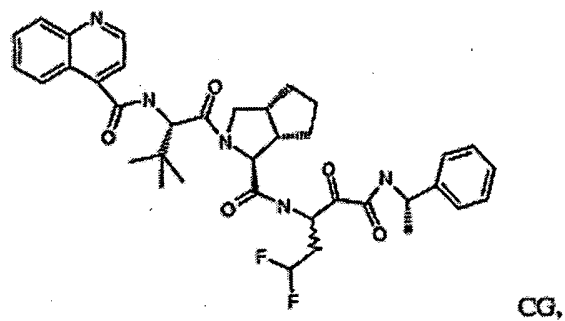
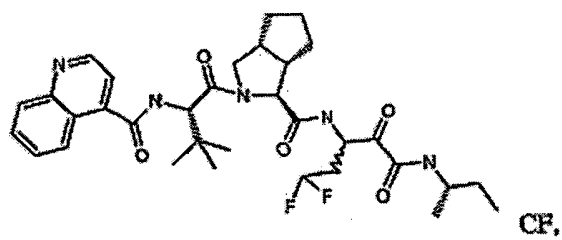
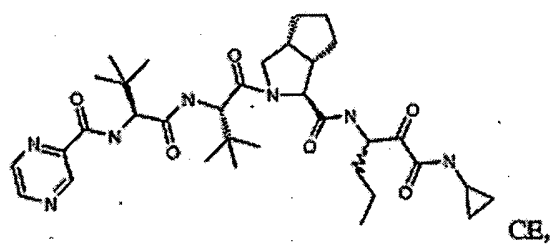
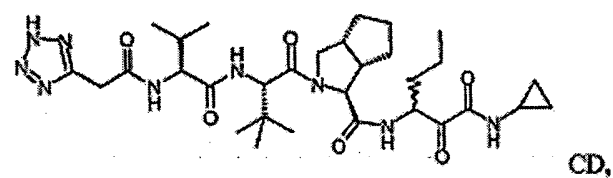
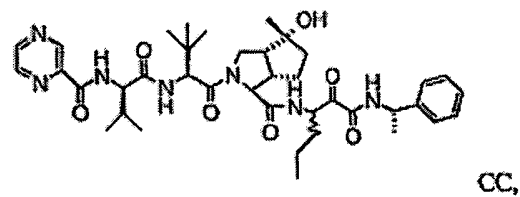
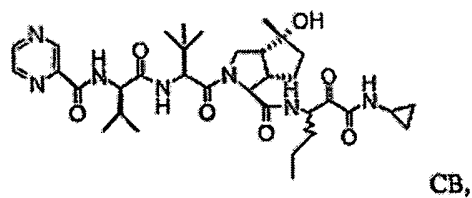


BZ,

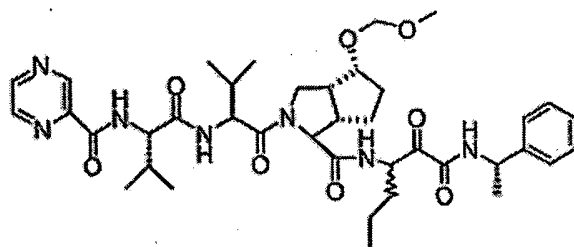


CA,

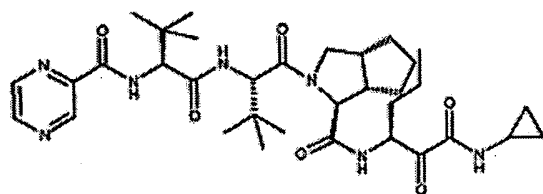
07.04.03



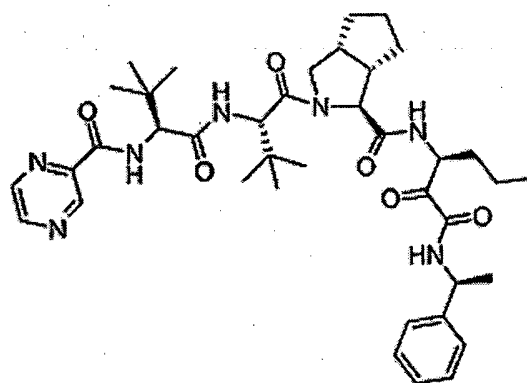
07.04.03



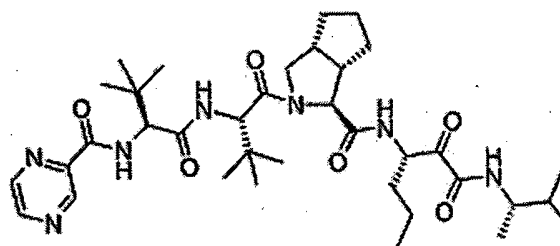
CH,



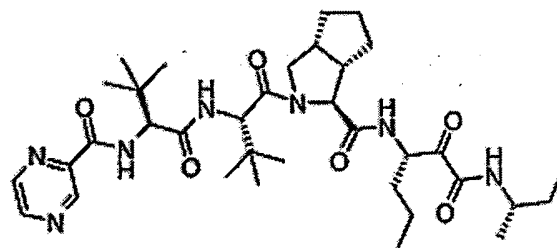
Cl,



Cl,

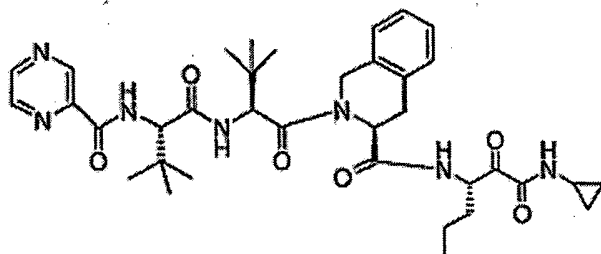


CK,

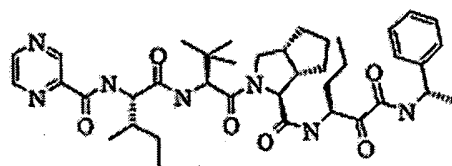


Cl,

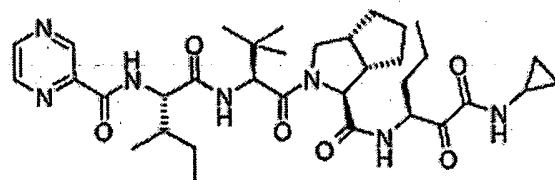
07.04.03



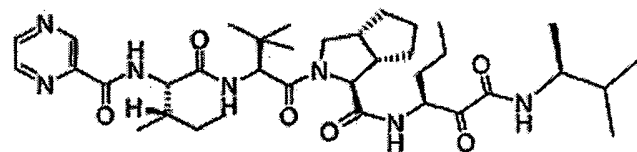
CM,



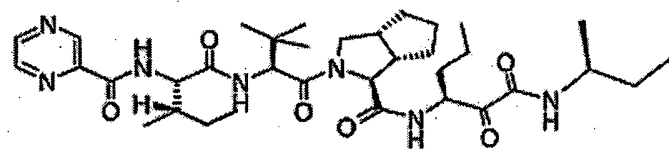
CN,



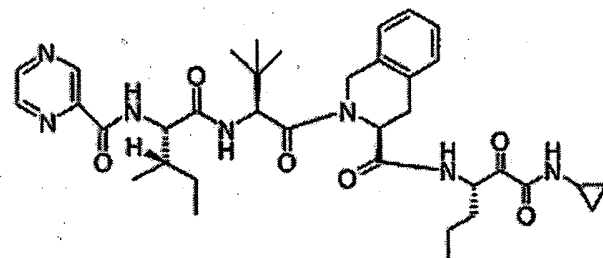
CO,



CP,

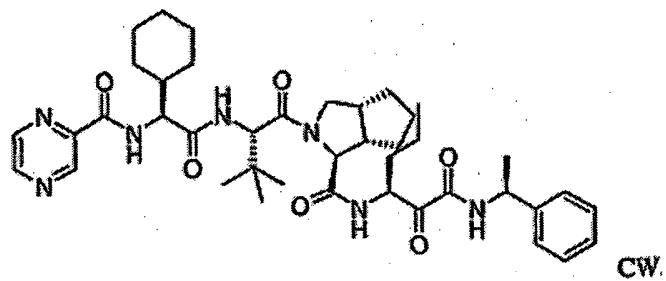
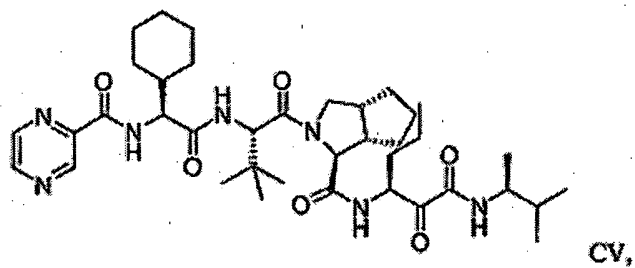
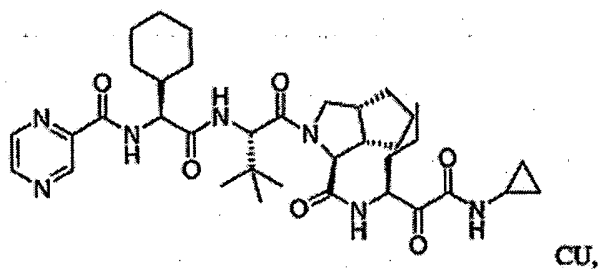
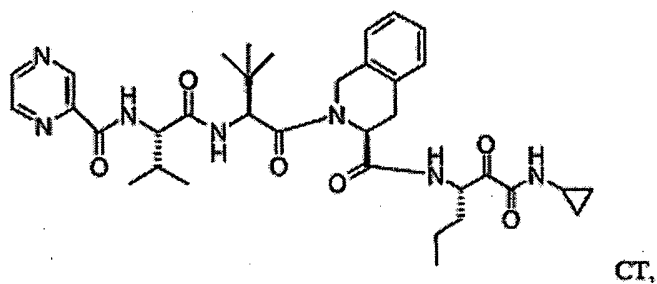
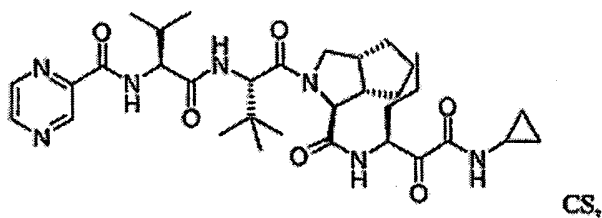


CQ,

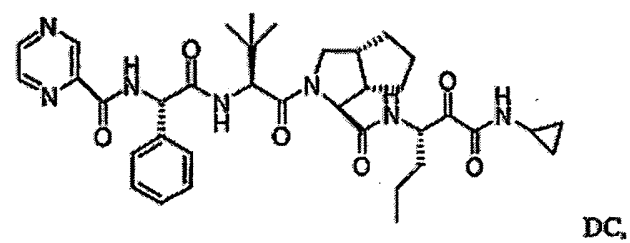
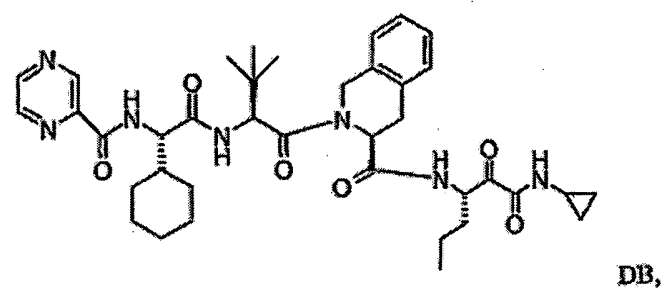
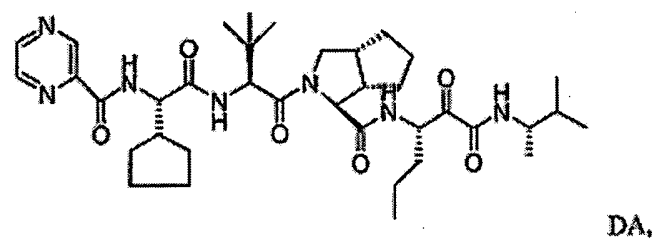
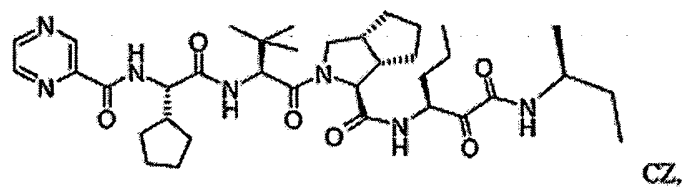
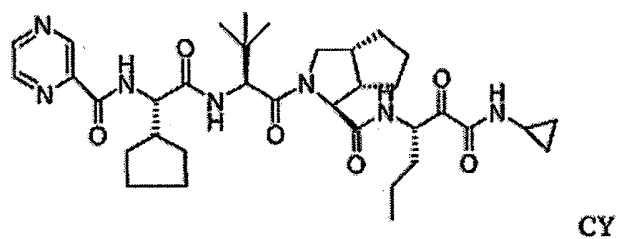
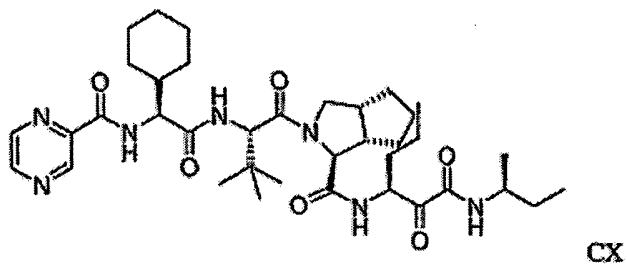


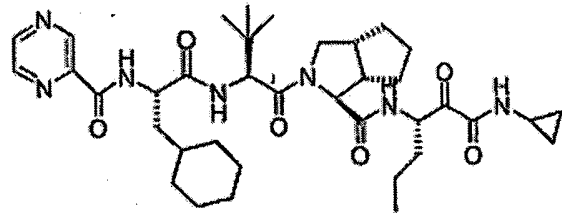
CR,

07.04.03

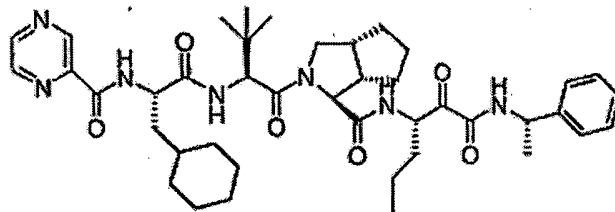


07.04.03

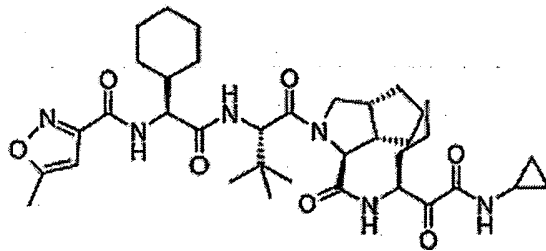




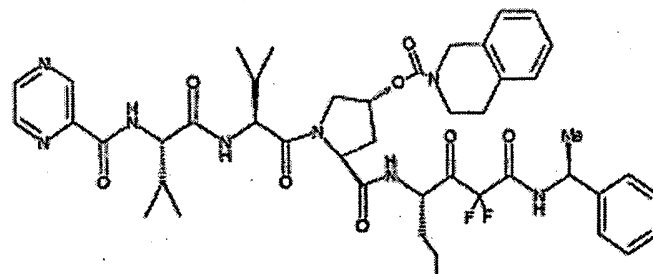
DD,



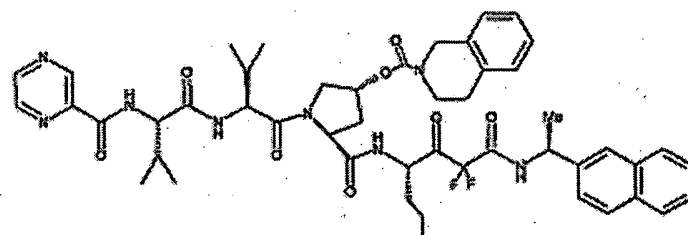
DE,



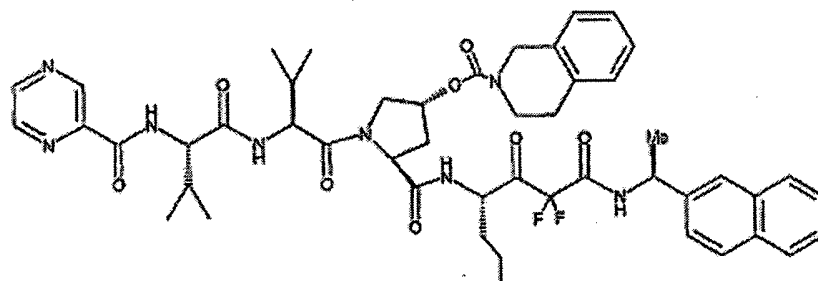
DF,



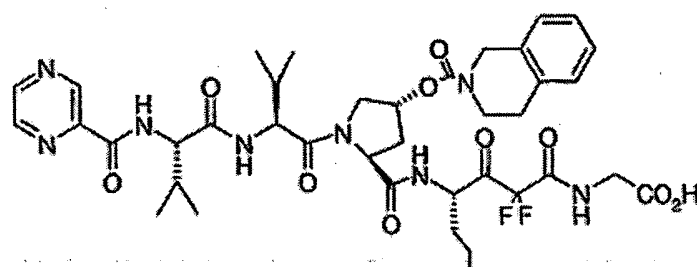
DK,



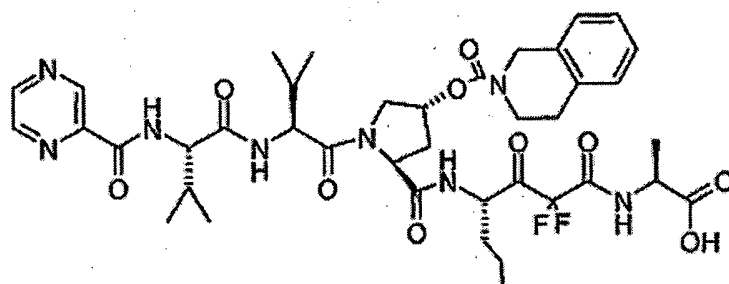
DL,



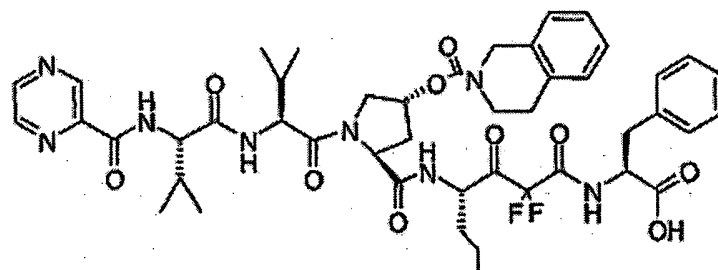
DM,



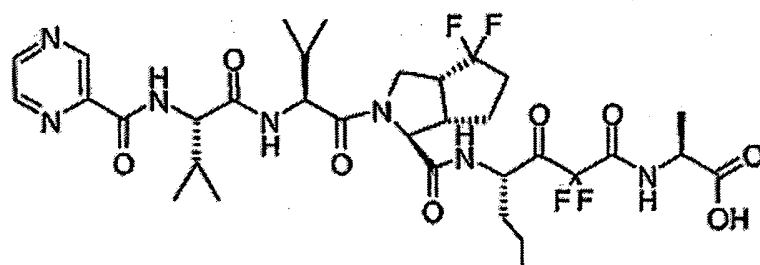
DO,



DP,

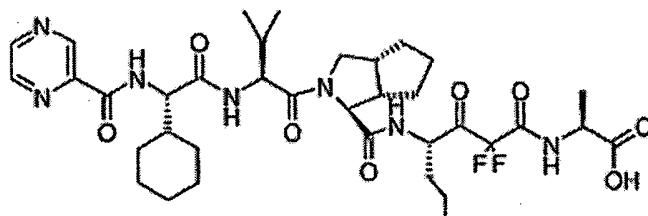


DQ,

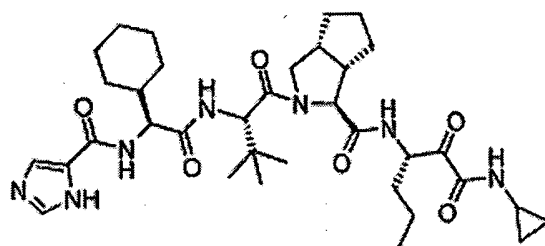


DR,

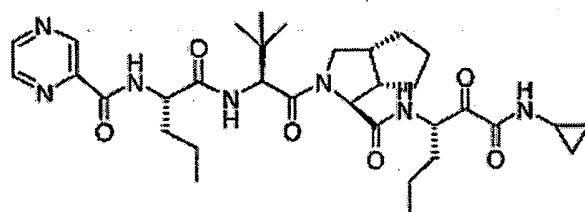
07.04.03



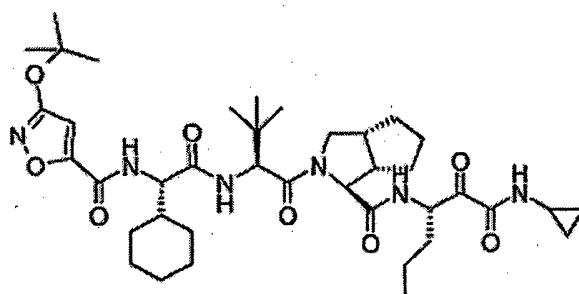
DS,



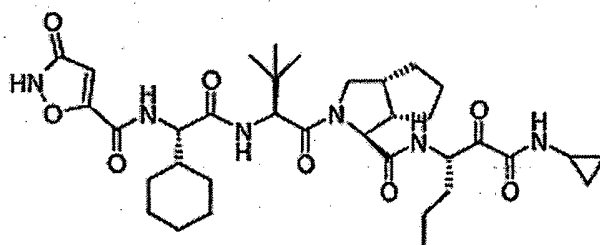
DT,



DU,

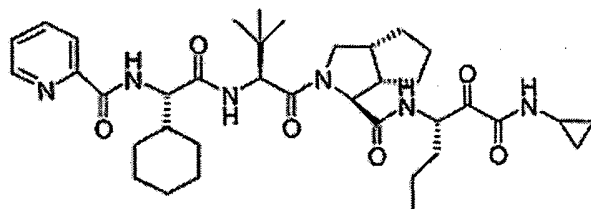


DV,

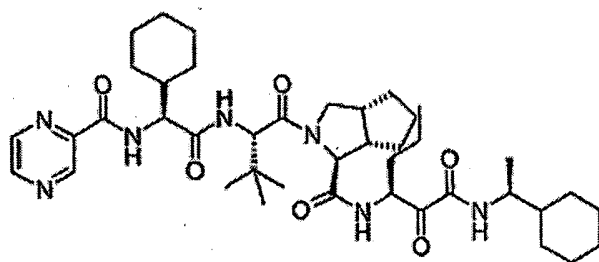


DW,

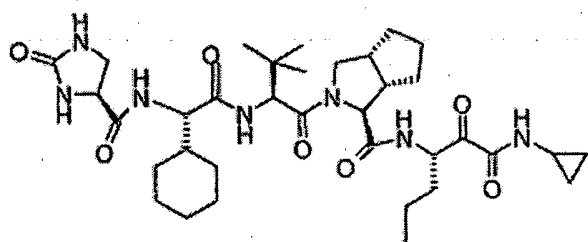
07.04.03



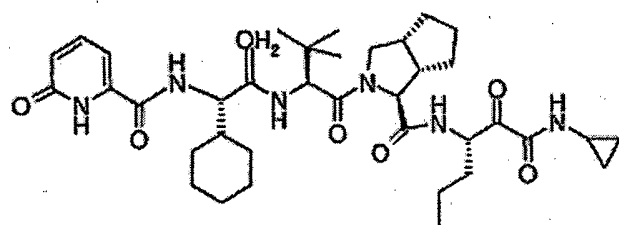
DX,



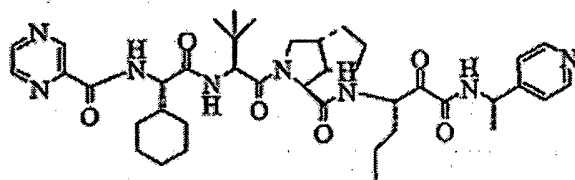
DY,



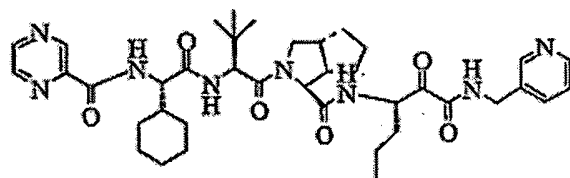
DZ,



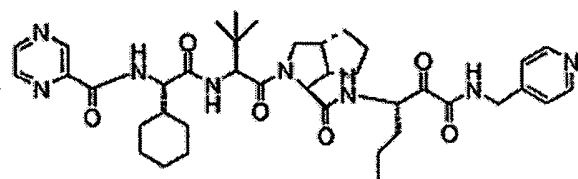
EA,



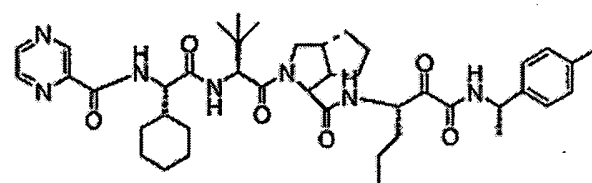
EJ,



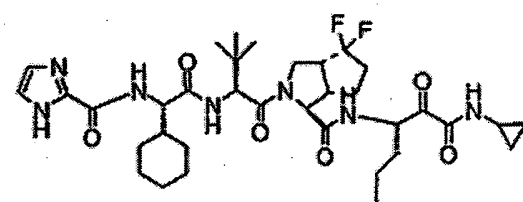
EK,



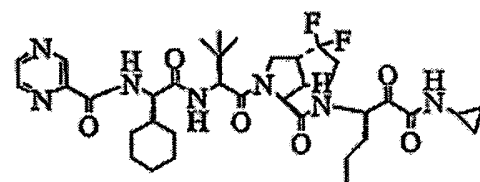
EL,



EM,

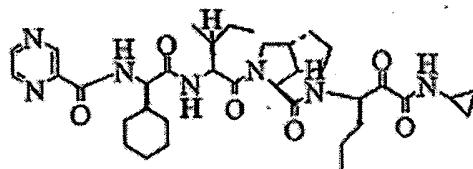


EN,

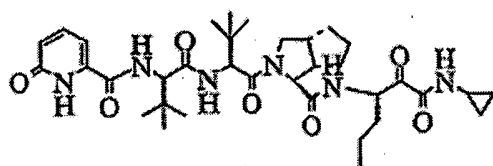


EO,

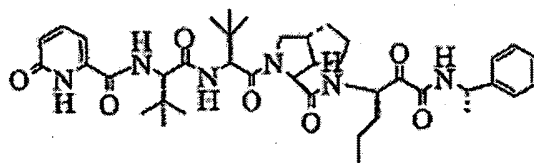
07.04.03



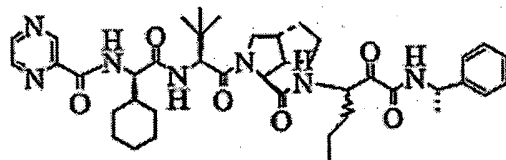
EP,



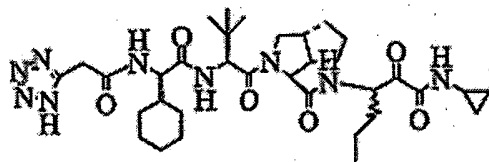
ES,



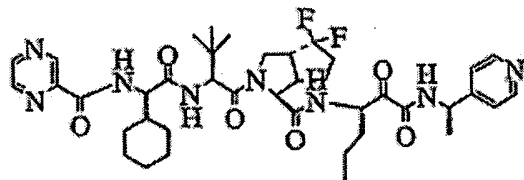
ET,



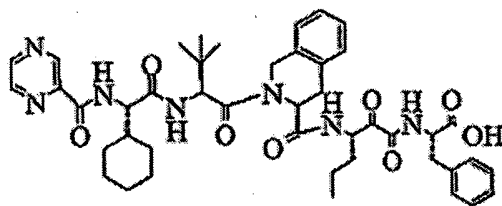
EU,



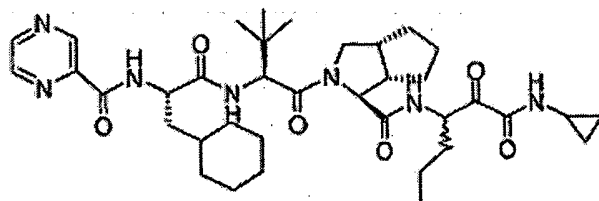
EV,



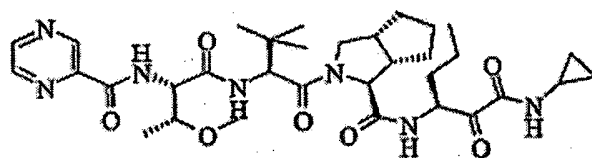
EZ,



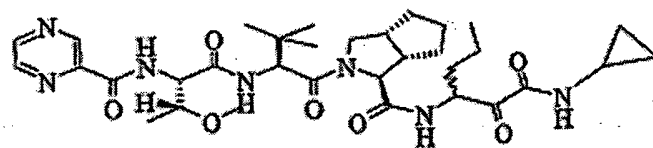
FA,



FB,

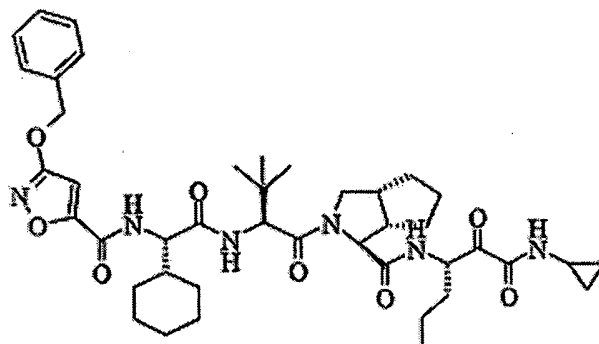


FC,

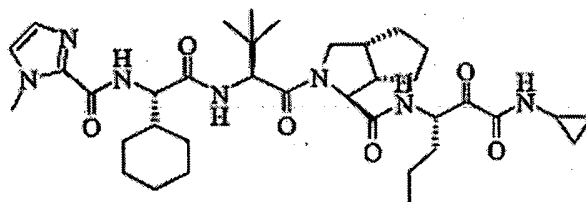


FD,

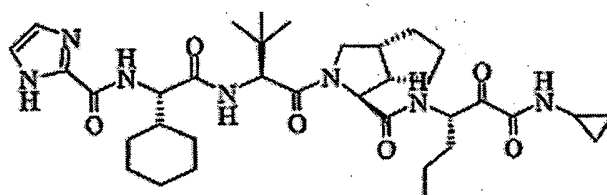
07.04.03



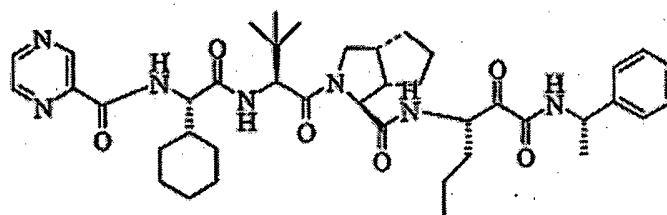
FE,



FF,



FG, and



FH,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina obecného vzorce 1, ve kterém popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina R^9 je substituovaná alespoň jedním heteroarylovým substituentem.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina obecného vzorce 1, ve kterém popřípadě substituovaná aromatická skupina R^9 je popřípadě substituovaný heteroaryl.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina obecného vzorce 1, ve kterém popřípadě substituovaná alifatická skupina R^9 je popřípadě substituovaný alkylheteroaryl.

Jiné výhodné provedení předloženého vynálezu je sloučenina, ve které popřípadě substituovaná heteroarylová skupina R^9 je pyrazinyl, tetrazolyl, chinolinyl, imidazolyl, isoxazolyl a pyradonyl, popřípadě substituovaný substituentem skupiny kruhů.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou popřípadě dodávány jako sole. Tyto sole, které jsou farmaceuticky přijatelné, jsou obzvláště zajímavé, protože jsou použitelné pro podávání uvedených sloučenin pro lékařské

účely. Sole, které nejsou farmaceuticky přijatelné, jsou užitečné ve způsobech výroby, pro izolaci a čištění a v některých případech pro použití při separaci stereoisomerních forem sloučenin podle předloženého vynálezu. Posledně uvedené je obzvláště platné pro aminové sole, připravené z opticky aktivních aminů.

Pokud sloučenina podle předloženého vynálezu obsahuje karboxy skupinu nebo dostatečně kyselý bioisoster, mohou být vytvořeny adiční sole bází a představují jednoduchou a vhodnější formu pro použití; a v praxi použití sloučenin ve formě solí přirozeně doplňuje použití ve formě volné kyseliny.

Stejně tak pokud sloučenina podle předloženého vynálezu obsahuje bázičnou skupinu nebo dostatečně bázičský bioisoster, mohou být vytvořeny adiční sole kyselin a představují jednoduchou a vhodnější formu pro použití; a v praxi použití sloučenin ve formě solí přirozeně doplňuje použití ve formě volné báze.

Výhodné provedení způsobu podle předloženého vynálezu je léčení pacienta trpícího HCV infekcí nebo fyziologickými stavy, vztahujícími se k infekci, které zahrnuje podávání farmaceuticky účinného množství sloučeniny obecného vzorce 1 pacientovi.

Jiné výhodné provedení terapeutického způsobu podle předloženého vynálezu je léčení pacienta trpícího infekcí HCV nebo fyziologickými stavy vztahujícími se k infekci

07.04.03

HCV, které zahrnuje podávání farmaceuticky účinného množství sloučeniny obecného vzorce 1 v kombinaci s farmaceuticky účinným množstvím jiné terapeutické látky s účinkem proti HCV pacientovi.

Předložený vynález se dále týká získání farmaceutických kompozic, obsahujících kromě jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz také jeden nebo více interferonů, vykazujících účinek proti HCV a/nebo jednu nebo více sloučenin, které mají účinek proti HCV, včetně imunomodulačních sloučenin, jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek, a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

Předložený vynález se dále týká získání farmaceutické kompozice, která je účinná, pro použití při příznivé kombinační terapii, protože obsahuje alespoň dvě účinné složky, které mohou být použity způsobem podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se také týká souprav nebo jednoduchých balení obsahujících dvě nebo více účinných složek použitelných při léčení nebo prevenci infekce HCV u pacienta. Souprava může poskytnout sloučeninu obecného vzorce 1 (samotnou nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem) a jako další účinnou složku (samotnou nebo v kombinaci s ředidlem nebo nosičem) další terapeutickou látku s účinkem proti HCV.

Sloučeniny obecného vzorce 1 mohou být připraveny aplikací nebo úpravou známých způsobů výroby, jak jsou zde používány nebo popsány v literatuře nebo způsoby podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se dále týká způsobů léčení nebo prevence infekce HCV u pacienta, který má jeho potřebu, které zahrnují podávání uvedenému pacientovi farmaceuticky účinného množství kombinace jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz; jednoho nebo více interferonů, vykazujících účinek proti HCV; a/nebo jedné nebo více sloučenin, které mají účinek proti HCV, včetně imunomodulačních sloučenin, jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek.

Předložený vynález se také týká použití jednoho nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz v kombinaci jedním nebo více interferony, vykazujícími účinek proti HCV a/nebo jednou nebo více sloučeninami, které mají účinek proti HCV, včetně imunomodulačních sloučenin, jako jsou imunostimulační cytokiny vykazující HCV protivirový účinek, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci infekce HCV u pacienta, který má jeho potřebu.

Předložený vynález se dále týká soupravy nebo farmaceutického balení pro léčení nebo prevenci infekce HCV u pacienta, kde souprava nebo farmaceutické balení obsahuje alespoň dvě oddělené nádobky, přičemž alespoň jedna z uvedených nádobek obsahuje jeden nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz, alespoň jedna další uvedená nádobka

obsahuje jeden nebo více interferonů nebo sloučenin, které indukují tvorbu inteferonu, které vykazuje účinek proti HCV (samotných nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem) a popřípadě alespoň jedna další uvedená nádobka obsahuje jednu nebo více sloučenin, které mají účinek proti HCV (samotné nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem), včetně imunomodulačních sloučenin jako jsou imunostimulační cytokiny, vykazující HCV protivirový účinek.

Předložený vynález se ještě dále týká způsobu inhibice replikace viru hepatitidy C v buňce, který zahrnuje uvedení uvedené buňky, inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C a popřípadě interferonu nebo sloučeniny, která indukuje tvorbu interferonu, který má účinek proti viru hepatitidy C, do vzájemného kontaktu.

Množství inhibitoru nebo inhibitorů HCV serinových proteáz, interferonu nebo interferonů nebo sloučeniny s účinkem proti HCV nebo sloučenin v libovolném z předchozích použití může být farmaceuticky účinné množství, suboptimální účinné množství proti HCV nebo jejich kombinace, pokud výsledná kombinace inhibitoru nebo inhibitorů HCV proteáz, interferonu nebo interferonů a/nebo sloučeniny nebo sloučenin s účinkem proti HCV představuje farmaceuticky účinné množství sloučenin, které je účinné při léčení nebo prevenci infekce HCV u pacienta.

07.04.03

Předložený vynález se dále týká způsobu přípravy chirální bicykloprolinátové sloučeniny, která je použitelná pro přípravu sloučeniny obecného vzorce 1.

Příprava sloučenin podle předloženého vynálezu

Výchozí materiály a meziprodukty při přípravě sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být připraveny aplikací nebo úpravou známých způsobů, například způsoby, které jsou popsány v referenčních příkladech, nebo jejich zřejmé chemické ekvivalenty.

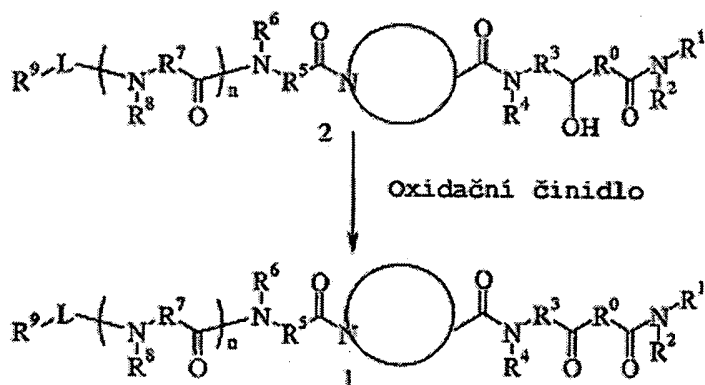
Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být připraveny aplikací nebo úpravou známých způsobů, kterými se miní způsoby uvedené v této přihlášce nebo popsané v literatuře, například způsoby popsané v publikaci R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers (1989).

Sloučenina obecného vzorce 1, ve kterém jsou proměnné a

skupina  jako bylo popsáno výše, může být připravena zpracováním sloučeniny obecného vzorce 2, ve kterém

proměnné a skupina  jsou jako bylo popsáno výše, vhodným oxidačním činidlem a za vhodných podmínek. Konkrétní oxidační činidlo je DMP. Konkrétní podmínky zahrnují provádění oxidace ve vhodném organickém

rozpouštědle jako je dichlormethan a zhruba při teplotě okolí.



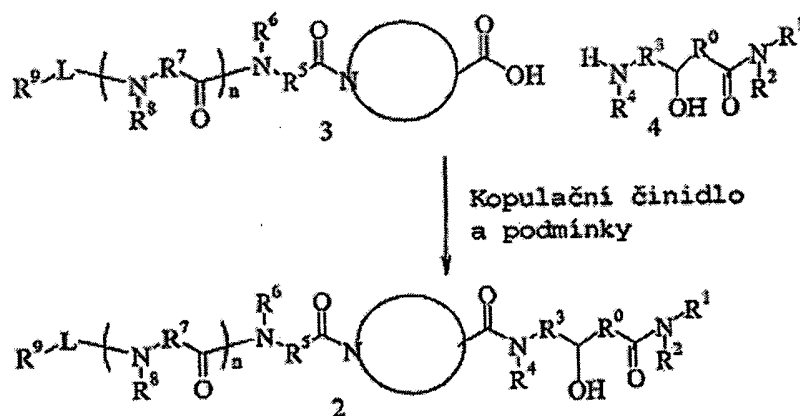
Sloučenina obecného vzorce 2, ve které proměnné a skupina



jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena kopulací sloučeniny obecného vzorce 3, ve kterém proměnné a



skupina jsou jako bylo popsáno výše, a sloučeniny obecného vzorce 4, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, použitím vhodného kopulačního činidla a za vhodných podmínek. Konkrétní kopulační činidlo a podmínky zahrnují použití DIC a HOAt ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF za teploty přibližně 0 °C nebo použití PyBop a DIPEA ve vhodném organickém rozpouštědle jako je dichlormethan zhruba při teplotě okolí.



Sloučenina obecného vzorce 3, ve kterém proměnné a skupina

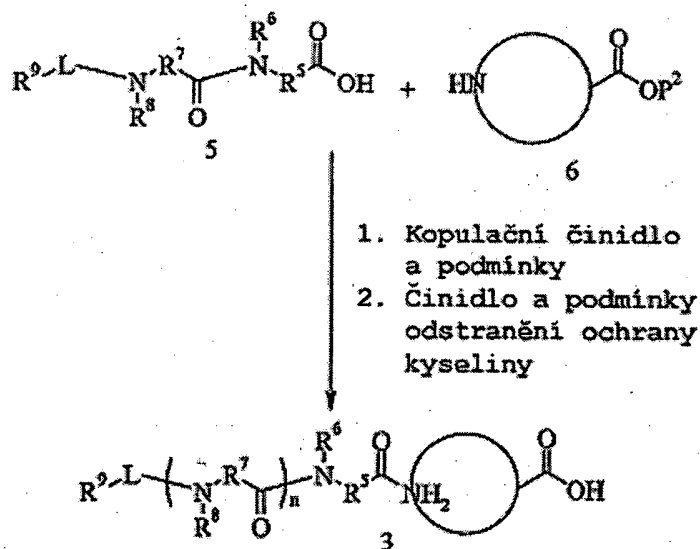


jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena kopulací sloučeniny obecného vzorce 5, jejíž proměnné jsou jako bylo popsáno výše, a sloučeniny obecného vzorce 6, kde



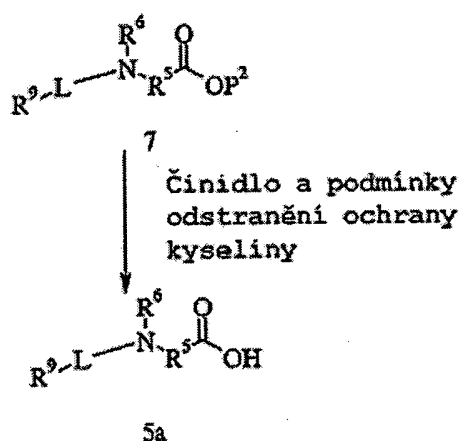
P^2 je ochranná skupina kyseliny a skupina je jako bylo popsáno výše, použitím vhodného kopulačního činidla a za vhodných kopulačních podmínek, následovaná odpovídajícím odstraněním ochranné skupiny a za vhodných podmínek pro odstranění ochranné skupiny. Konkrétní kopulační činidlo a podmínky použití DIC nebo DCC a HOAt ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF nebo dichlormethan za teploty od přibližně 0 °C do přibližně teploty okolí. Odstranění ochranné skupiny se provádí použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze ochranného činidla, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických nebo hydrogenačních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině,

která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní ochranné činidlo kyseliny je C₁-C₈ nižší alkyl; obzvláště methyl. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je anorganická báze jako je hydroxid alkalického kovu; obzvláště NaOH. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol zhruba při teplotě okolí.

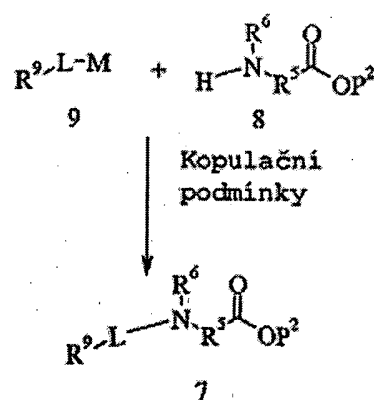


Sloučenina obecného vzorce 5, ve kterém n je 0 a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, to znamená sloučenina 5a, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 7, ve kterém P^2 je ochranná skupina kyseliny a další proměnné jsou jako bylo popsáno

výše, použitím činidla odstranění ochranné skupiny a za vhodných podmínek. Odstranění ochranné skupiny se provádí použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze ochranného činidla, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických, nebo hydrogenačních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině, která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní ochranné činidlo kyseliny je C₁-C₈ nižší alkyl; obzvláště methyl. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je anorganická báze jako je hydroxid alkalického kovu; obzvláště NaOH. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol zhruba při teplotě okolí.

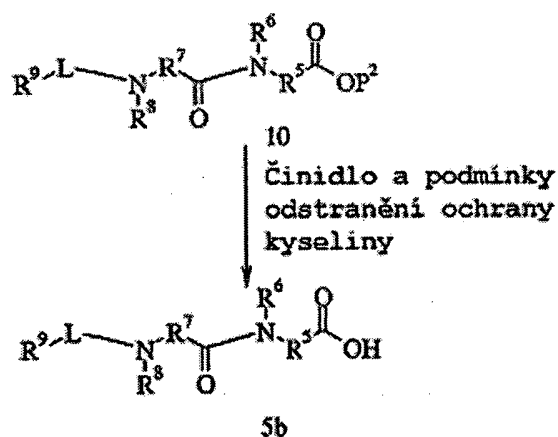


Sloučenina obecného vzorce 7, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena acylací sloučeniny obecného vzorce 8, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, sloučeninou obecného vzorce 9, kde M je přemístitelná skupina a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za vhodných podmínek. Konkrétní kopulační podmínky používají DIC nebo DCC a HOAt ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF nebo dichlormethan za teploty od přibližně 0 °C do přibližně teploty okolí, nebo PyBop a DIPEA ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF nebo dichlormethan zhruba při teplotě okolí; a výhodně posledně uvedené podmínky. Konkrétní L je karbonyl. Konkrétní M je hydroxy nebo N-oxysukcinimid.



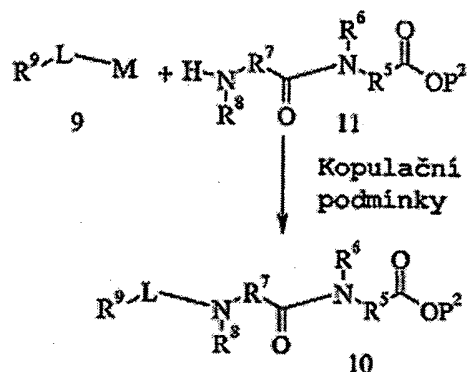
Sloučenina obecného vzorce 5, ve kterém n je 1 a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, to znamená sloučenina 5b, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučenina obecného vzorce 10, kde P² je ochranná skupina kyseliny a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za použití vhodného činidla odstranění ochranné skupiny a za vhodných podmínek. Odstranění ochranné skupiny se provádí

použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze ochranného činidla, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických, nebo hydrogenačních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině, která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní ochranné činidlo kyseliny je C₁-C₈ nižší alkyl; obzvláště methyl. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je anorganická báze jako je hydroxid alkalického kovu; obzvláště NaOH. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol zhruba při teplotě okolí.



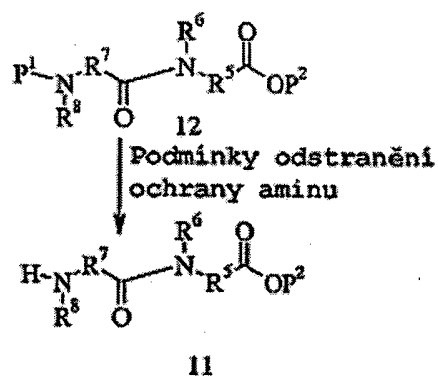
Sloučenina obecného vzorce 10, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena acylací sloučeniny obecného vzorce 11, ve kterém proměnné jsou jako bylo

popsáno výše, sloučeninou obecného vzorce 9, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za vhodných podmínek. Konkrétní kopulační podmínky používají DIC nebo DCC a HOAt ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF nebo dichlormethan za teploty od přibližně 0 °C do přibližně teplota okolí, nebo PyBop a DIPEA ve vhodném organickém rozpouštědle jako je DMF nebo dichlormethan zhruba při teplotě okolí; a výhodně posledně uvedené podmínky. Konkrétní L je karbonyl. Konkrétní M je hydroxy nebo N-oxysukcinimid.



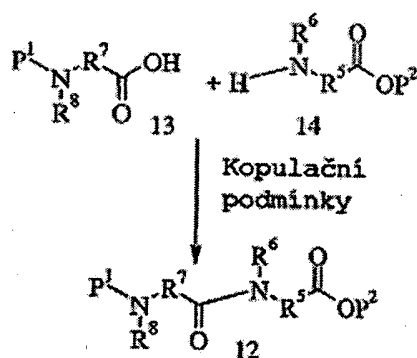
Sloučenina obecného vzorce 11, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 12, ve kterém P¹ je ochranná skupina aminu a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, pomocí vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny a za vhodných podmínek. Odstranění ochranné skupiny se provádí použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze aminového ochranného činidla, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických, nebo

hydrogenačních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině, která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní aminové ochranné činidlo je Cbz nebo BOC; obzvláště Cbz. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je kyselina jako je HCl nebo $H_2/Pd(OH)_2$; obzvláště $H_2/Pd(OH)_2$. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol nebo alkylalkanoátovém rozpouštědle jako je ethylacetát zhruba při teplotě okolí.



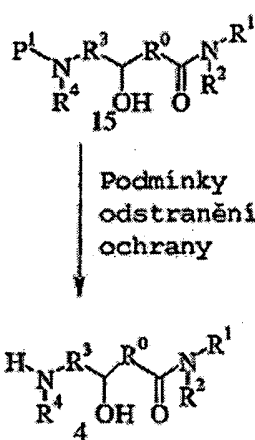
Sloučenina obecného vzorce 12, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena kopulací sloučeniny obecného vzorce 13, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, se sloučeninou obecného vzorce 14, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za vhodných podmínek. Konkrétní kopulační podmínky používají HOAt/DIC a DIPEA ve

vhodném organickém rozpouštědle jako je THF zhruba při teplotě okolí.

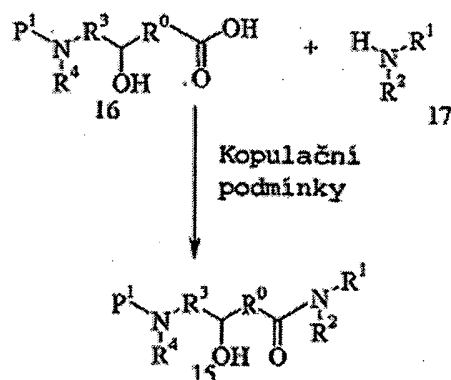


Sloučenina obecného vzorce 4, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 15, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, pomocí vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny a za vhodných podmínek. Odstranění ochranné skupiny se provádí použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze aminového ochranného činidla, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických, nebo hydrogenních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině, která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní aminové ochranné činidlo je Cbz nebo BOC; obzvláště Cbz. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je kyselina jako je HCl nebo $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$; obzvláště

H₂/Pd(OH)₂. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol nebo alkylalkanoátové rozpouštědlo jako je ethylacetát zhruba při teplotě okolí.

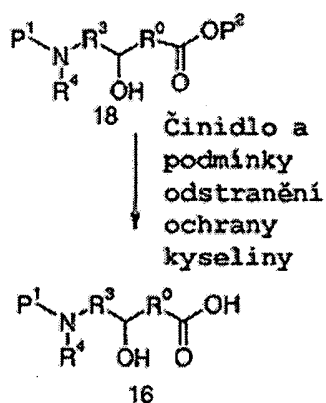


Sloučenina obecného vzorce 15, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena kopulací sloučeniny obecného vzorce 16, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, se sloučeninou obecného vzorce 17, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za vhodných podmínek. Konkrétní aminové ochranné činidlo je Cbz nebo BOC; obzvláště Cbz. Konkrétní kopulační podmínky používají HOBt, PyBop a DIPEA ve vhodném organickém rozpouštědle jako je dichlormethan za teploty od přibližně 0 °C do přibližně teplota okolí.

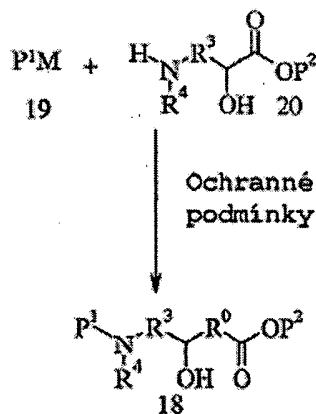


Sloučenina obecného vzorce 16, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 18, ve kterém další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, pomocí vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny a za vhodných podmínek. Odstranění ochranné skupiny se provádí použitím vhodného činidla pro odstranění ochranné skupiny, které závisí na povaze ochranného činidla kyseliny, to znamená zda je odstranitelné (labilní) za kyselých, zásadických, nebo hydrogenačních podmínek, a na dalších reaktivních skupinách ve sloučenině, která podstupuje operaci odstraňování ochranné skupiny, to znamená činidlo pro odstranění ochranné skupiny je zvoleno tak, aby provedlo odstranění požadované ochranné skupiny bez ovlivnění dalších reaktivních skupin, pokud není požadována současná další reakce. Konkrétní aminové ochranné činidlo je Cbz. Konkrétní ochranné činidlo kyseliny je C₁-C₈ nižší alkyl; obzvláště methyl. Konkrétní činidlo pro odstranění ochranné skupiny je anorganická báze jako je hydroxid alkalického kovu; obzvláště NaOH. Konkrétní podmínky pro reakci odstranění ochranné skupiny zahrnují provádění reakce v

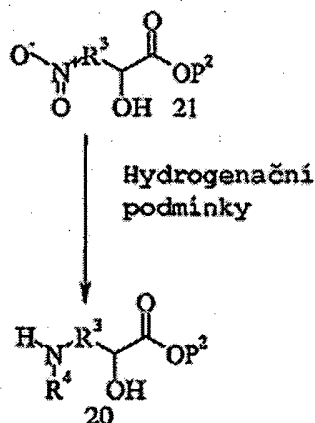
alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol zhruba při teplotě okolí.



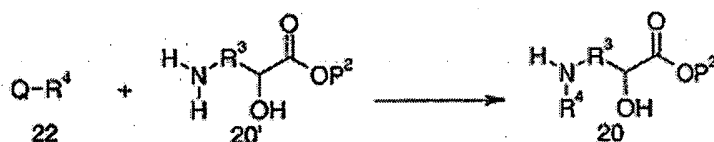
Sloučenina obecného vzorce 18, ve kterém R^0 je vazba a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena ochranou sloučeniny obecného vzorce 20, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, sloučeninou obecného vzorce 19, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, za vhodných podmínek. Konkrétní aminové ochranné činidlo je Cbz nebo BOC. Konkrétní kopulační podmínky používají vhodné organické rozpouštědlo jako je dichlormethan za teploty od přibližně 0 °C do přibližně teplota okolí.



Sloučenina obecného vzorce 20, ve kterém R^4 je atom vodíku a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena hydrogenací sloučeniny obecného vzorce 21, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, vhodným hydrogenačním činidlem a za vhodných podmínek. Konkrétní hydrogenační činidlo je $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$. Konkrétní hydrogenační podmínky zahrnují provádění hydrogenace v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol nebo alkylalkanoátové rozpouštědlo jako je ethylacetát zhruba při teplotě okolí.



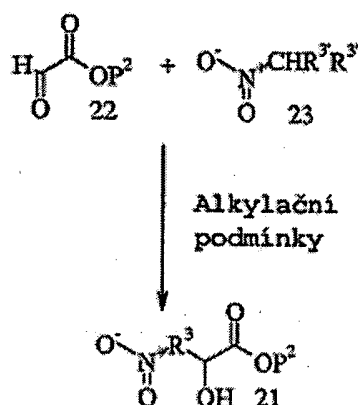
Sloučenina obecného vzorce 20, ve kterém R^4 je popřípadě substituovaný alifatický substituent a další proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena alkylací sloučeniny 20', ve které proměnné jsou jako bylo popsáno výše, sloučeninou 22 (alkylační činidlo) ve které R^4 je popřípadě substituovaný alifatický substituent a Q je přemístitelná skupina jako jsou halogenidy, tosyláty nebo sulfonáty, za vhodných podmínek.



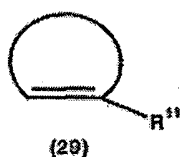
Vhodná alkylační činidla zahrnují alifatické sloučeniny (halogenidy, tosyláty nebo sulfonáty). Vhodné alkylační podmínky zahrnují provádění alkylace ve vhodném organickém rozpouštědle jako je alkoholové rozpouštědlo, například methanol nebo ethanol, nebo etherová rozpouštědla, například ether nebo tetrahydrofuran, za teploty od přibližně teploty okolí do přibližně teploty zpětného toku.

Sloučenina obecného vzorce 21, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena alkylací sloučeniny obecného vzorce 22, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, sloučeninou obecného vzorce 23, ve kterém R^3 jsou nezávisle popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina jako bylo popsáno výše, za

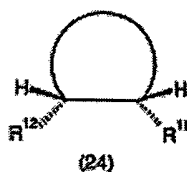
vhodných podmínek. Konkrétní alkylační podmínky zahrnují provádění alkylace použitím silné báze jako je terc.-butoxid draselný v alkoholovém rozpouštědle jako je methanol nebo ethanol zhruba při teplotě okolí.



Sloučenina obecného vzorce 24, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena provedením Michaelovy adice na Michaelovu akceptoru obecného vzorce 29, ve kterém proměnná je jako bylo popsáno výše, iminovým glycinimidovým derivátem.



↓ Michaelovy adiční podmínky



Michaelova adice zahrnuje použití vhodného aprotického polárního rozpouštědla, alkalické methyl hydroxidové báze a vhodných teplot. Pro bližší informace o Michaelově adici viz Corey, E. J.; Noe, M. C.; Xu, F. Tetrahedron Letter 1998, 39, 5347. Pro bližší informace o syntéze chirálních katalyzátorů přenosu fáze viz Corey, E. J.; Noe, M. C.; Xu, F. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 12414. Vhodná rozpouštědla zahrnují DCM, ACN nebo THF v závislosti na reakčních podmínkách. Vhodné báze zahrnují CsOH, NaOH, KOH a LiOH. Vhodné teplotní rozmezí je od přibližně -78 °C do přibližně 0 °C, obzvláště přibližně -60 °C. Iminové glycinimidy použitelné podle předloženého vynálezu jsou popsány v této přihlášce vynálezu. Výhodný iminový glycinimid je terc.-butylester N-(difenylmethylen)glycinu. Kromě toho podmínky Michaelovy adice mohou nebo nemusí zahrnovat použití katalyzátoru přenosu fáze (phase transfer catalyst - PTC) (chirální a nechirální). Výhodný PTC O-[9]allyl-N-9-anthracenylmethylcinchonidium bromid.

Sloučenina obecného vzorce 25, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena iminovým štěpením a cyklizací sloučeniny obecného vzorce 24.

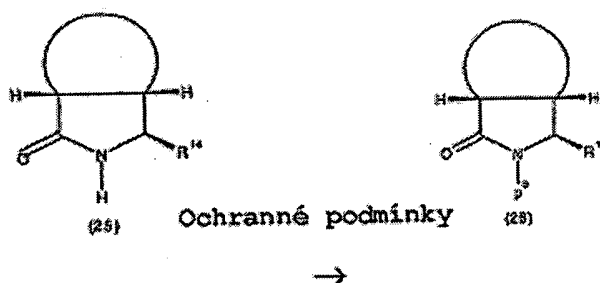


Podmínky štěpení a cyklizace

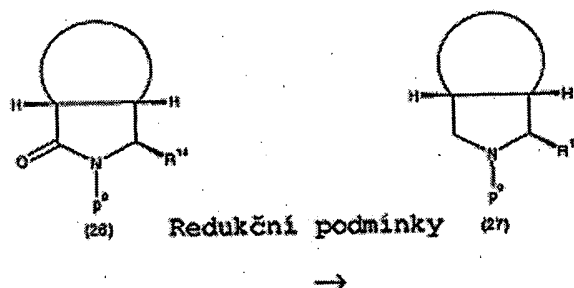


Pro procedury štěpení a cyklizace, viz Javidan, A.; Schfer, K.; Pyne, S. Synlett 1996, 100; Tatsukawa, A.; Dan, M.; Ohbatake, M.; Kawatake, K.; Fukata, T.; Wada, E.; Kanemase, S.; Kakei, S. J. Org. Chem. 1993, 58, 4221. Podmínky štěpení a cyklizace zahrnují použití polárních rozpouštědel, kyselých činidel a teploty od přibližně teploty okolí do přibližně 150 °C. Výhodné podmínky zahrnují použití EtOH, AcONa a NH₂OH.HCl a teplotu rovnou přibližně teplotě varu použitého rozpouštědla.

Sloučenina obecného vzorce 26, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena ochranou amidové sloučeniny obecného vzorce 25, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, pomocí vhodné amidové ochranné skupiny jako je BOC. Další vhodné ochranné skupiny zahrnují CBz, -CO₂alkyl. Viz také Greene, T. W.; P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1991 pro příklady dalších aminových ochranných skupin. Podmínky reakce zahrnují použití aprotických polárních rozpouštědel, organické báze jako katalyzátory a teploty v rozmezí přibližně 0 °C-100 °C. Výhodné podmínky zahrnují použití ACN, dimethylaminopyridinu a přibližně teplotu okolí.



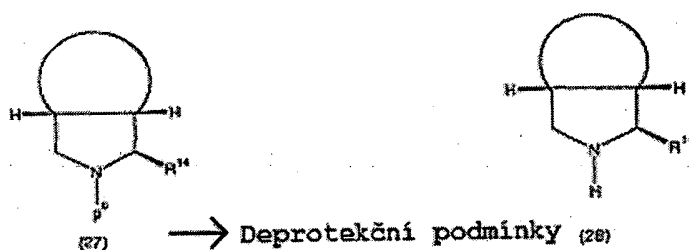
Sloučenina obecného vzorce 27, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena redukcí chráněné sloučeniny obecného vzorce 26, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše.



Ve skutečnosti se provádějí dvě redukce. První redukce je redukce amidu na hemiaminal použitím DIBALH nebo superhydridu $[\text{LiEt}_3\text{H}]$. Druhá redukce redukuje hemiaminal na amin použitím Et_3SiH a $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Viz Collado, I.; Ezquerro, J.; Mateo, A. I.; Rubio, A., J. Org. Chem. 1998, 63, 1995-2001 a Ezquerro, J.; Pedregal, °C.; Yruretagoyena, B.; Rubio, A.; Carreno, M. C.; Escribano, A.; Garcia Ruano, J. L. J. Org. Chem. 1995, 60, 2925 pro redukční podmínky.

Další obvyklé podmínky pro přeměnu pyroglutamátů na pyrrolidiny je použití $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$.

Sloučenina obecného vzorce 28, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše, může být připravena odstraněním ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 27, ve kterém proměnné jsou jako bylo popsáno výše.



Viz Gibson, F. G.; Benneier, S. C.; Rapoport, H., J. Org. Chem. 1994, 59, 3216-3218 pro podmínky pro selektivní odstranění ochranné skupiny N-BOC v přítomnosti terc.-butylesteru.

Odborník v oboru ví, že podmínky odstranění ochranné skupiny jsou závislé na volbě ochranné skupiny. Například pokud je použit CBz, může být použita hydrogenace nebo bázecké podmínky. Výhodně, pokud je použit BOC, může být použit 1 N HCl v ethylacetátu, viz Greene, T. W.; P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1991.

Průměrnému odborníkovi v oboru je zřejmé, že sloučenina obecného vzorce 3 může být připravena kopulací sloučeniny

obecného vzorce 5 se sloučeninou obecného vzorce 28 za výše popsaných podmínek.

Způsoby přípravy R^3 , R^5 nebo R^7 jako popřípadě substituovaných ethandiylových skupin jsou známy odborníkům v oboru, například jsou tyto způsoby popsány v "The Organic Chemistry of β -Lactams", editor G. Georg, VCH Publishers, Inc. (1993), například str. 240-241 a 303-305.

Schémata 1-11 která následují, uvádějí příklady vybraných způsobů pro přípravy popřípadě substituovaných multicyklických azaheterocyklylů. Způsoby v dále uvedených schématech jsou také použitelné na další popřípadě substituované multicyklické azaheterocyklyly obsahující podobné substituenty.

Schéma 1

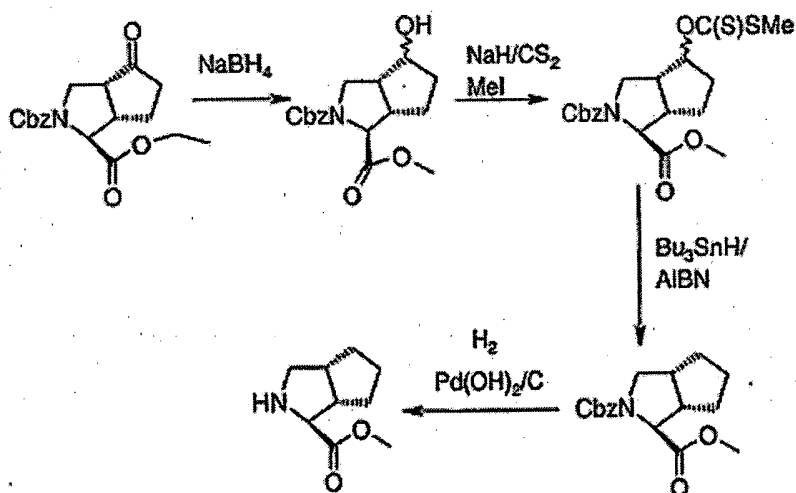


Schéma 2

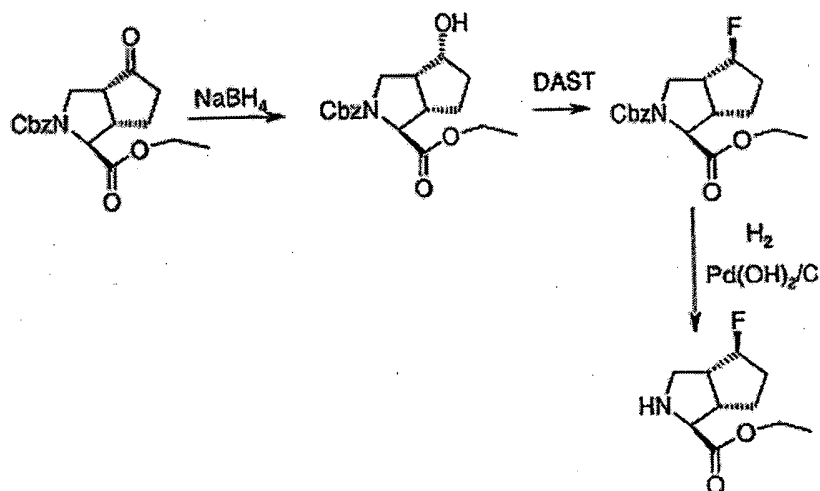


Schéma 3

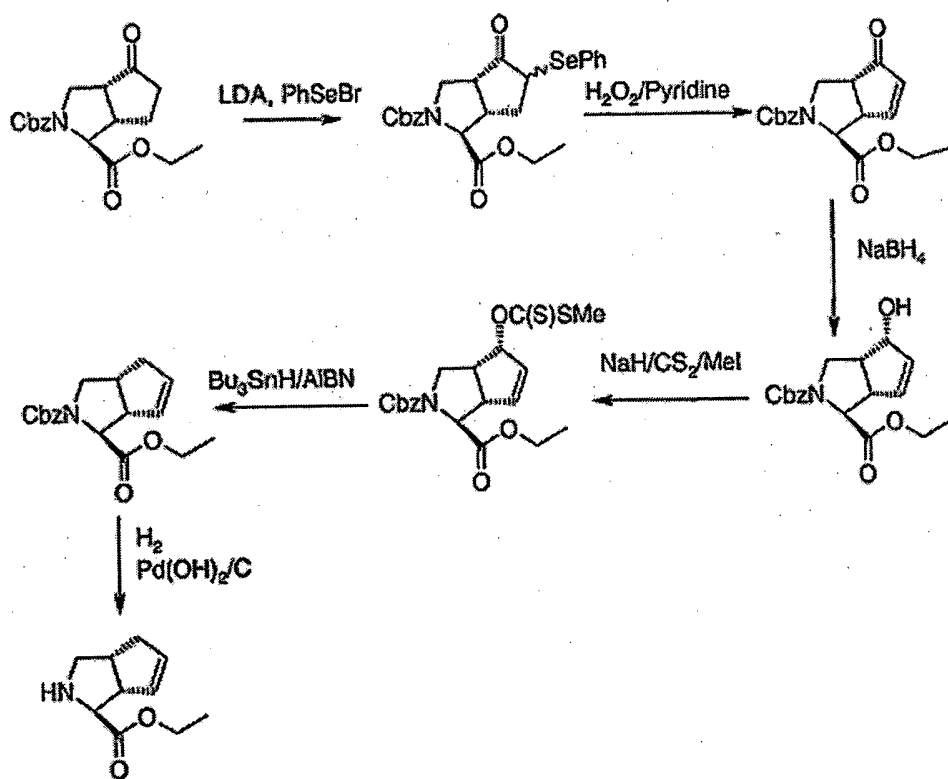
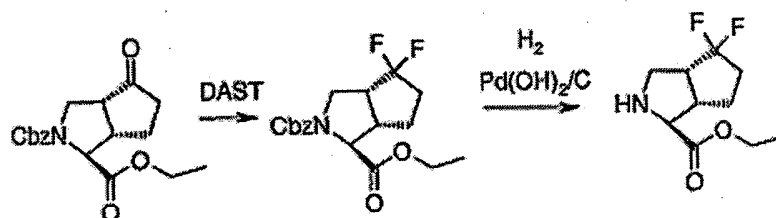


Schéma 4



SCHEME 5

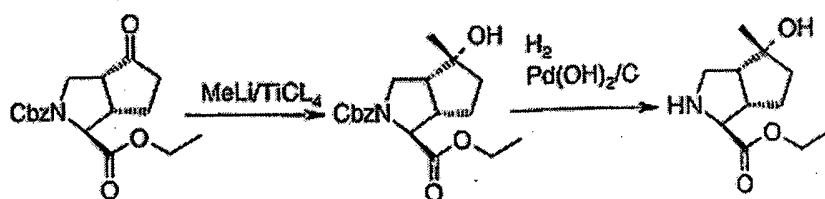
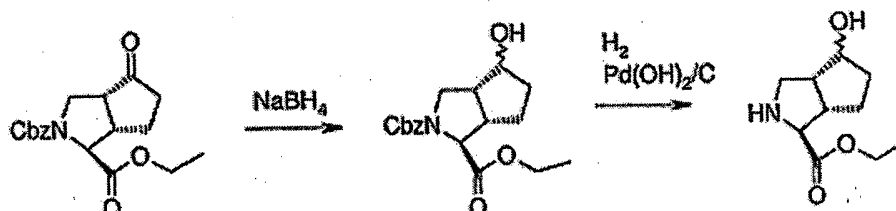


Schéma 6



07.04.03

Schéma 7

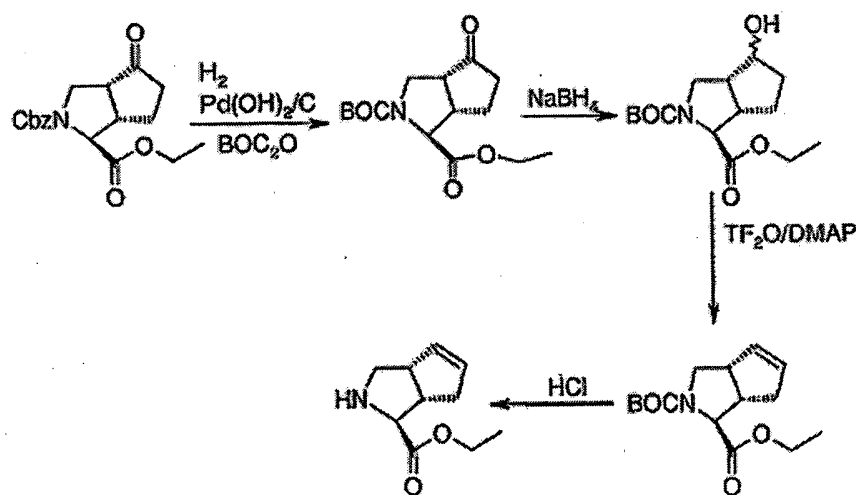


Schéma 8

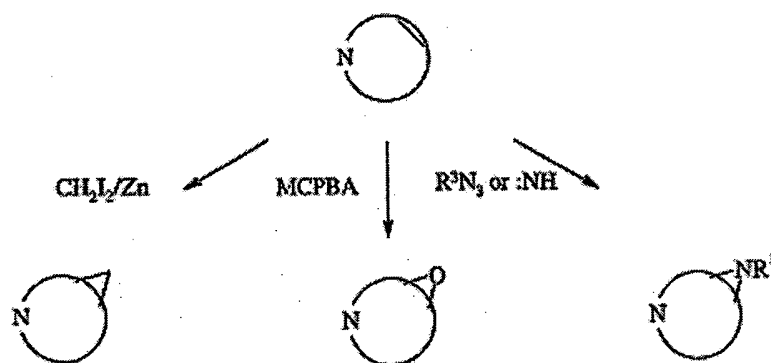


Schéma 9

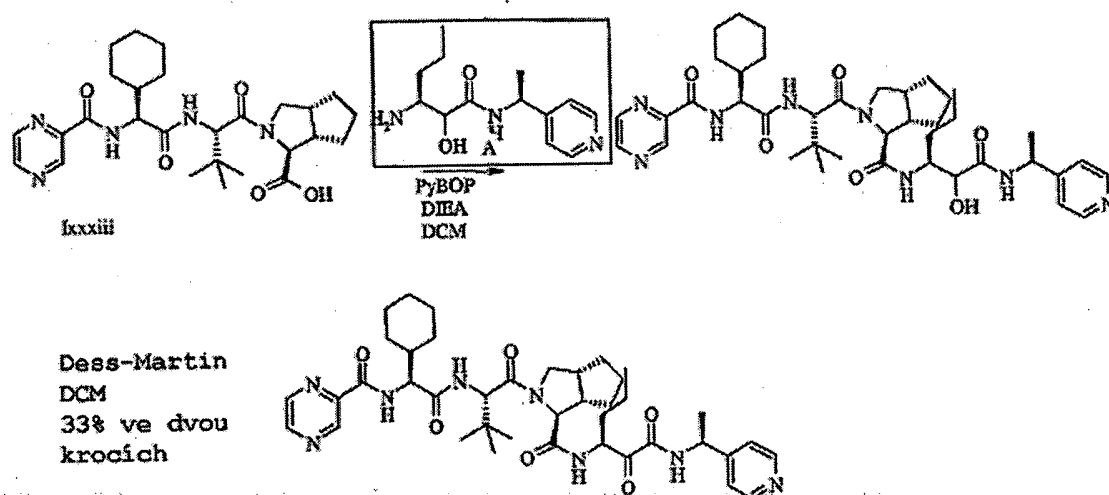


Schéma 10

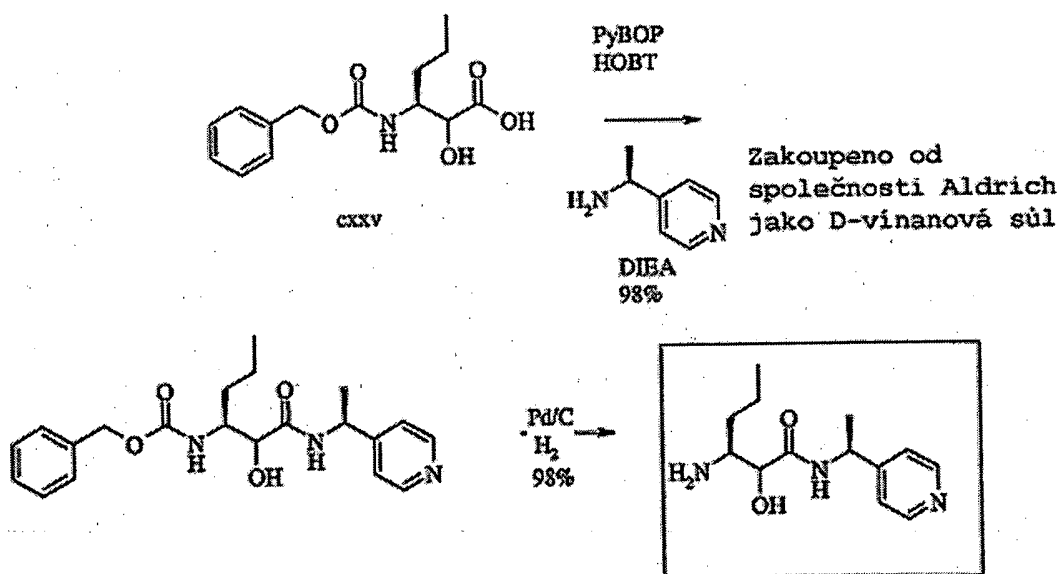
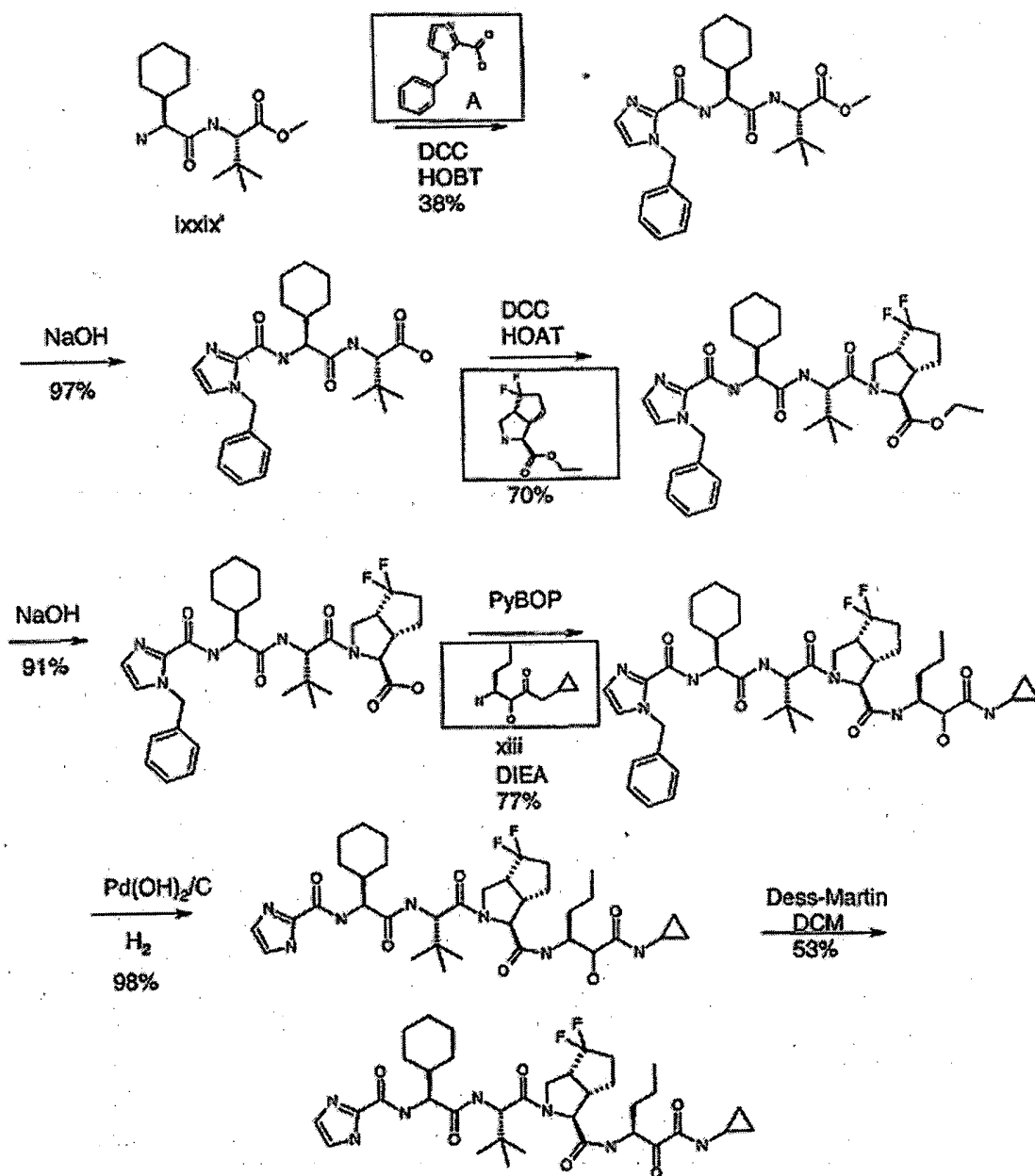


Schéma 11



Sloučenina obecného vzorce 1 zahrnující skupinu obsahující jeden nebo více atomů dusíku v kruhu, výhodně imin (=N-), může být přeměněna na odpovídající sloučeninu ve které jeden nebo více atomů dusíku v kruhu ve skupině jsou

oxidovány na N-oxid, výhodně reakcí s perkyselinou, například kyselinou peroctovou v kyselině octové nebo kyselinou m-chlorperoxybenzoovou v inertním rozpouštědle jako je dichlormethan, za teploty od přibližně teploty okolí do teploty zpětného toku, výhodně za zvýšené teploty.

Ve zde popsaných reakcích může být nutné chránit reakční funkční skupiny, například skupiny hydroxy, amino, imino, thio nebo karboxy, pokud je žádoucí, aby se nacházely v konečném produktu, pro zamezení nežádoucí účasti v reakcích. Mohou být použity obvyklé ochranné skupiny v souladu se standardní praxí, viz například T. W. Green a P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley a Sons (1991); J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, 1973.

Sloučenina, která se připraví jak bylo popsáno výše, může být izolována z reakční směsi obvyklými prostředky. Například mohou být sloučeniny izolovány oddestilováním rozpouštědla z reakční směs nebo, je-li to nutné po oddestilování rozpouštědla z reakční směsi, vlitím rezidua do vody s následnou extrakcí ze směsi voda-nemísitelné organické rozpouštědlo a oddestilováním rozpouštědla z extraktu. Navíc produkt může být, je-li to požadováno, dále čištěn různými dobře známými způsoby jako je rekrytalizace, reprecipitace nebo různé chromatografické způsoby, zejména kolonová chromatografie nebo preparativní chromatografie na tenké vrstvě.

Předložený vynález se dále týká způsobu přípravy sloučenin podle předloženého vynálezu interkonverzí jiné sloučeniny podle předloženého vynálezu.

Jako příklad interkonverze mohou být sloučeniny obecného vzorce 1, obsahující sulfoxidové vazby, připraveny oxidací odpovídajících sloučenin obsahujících -S- vazby. Například může být oxidace výhodně prováděna jako reakce s peroxykyselinou, například s kyselinou 3-chlorperbenzoovou, výhodně v inertním rozpouštědle, například dichlormethanu, výhodně za nebo v blízkosti teploty okolí, nebo alternativně prostřednictvím hydrogenperoxomonosulfátu draselného v prostředí jako je vodný methanol, pufrovaný na přibližně pH 5, za teploty mezi přibližně 0 °C a teplotou okolí. Posledně uvedený způsob je výhodný pro sloučeniny obsahující kyselinově labilní skupinu.

Jako jiný příklad interkonverze mohou být sloučeniny obecného vzorce 1, obsahující sulfonové vazby, připraveny oxidací odpovídajících sloučenin obsahujících -S- nebo sulfoxidové vazby. Například oxidace může být výhodně prováděna prostřednictvím reakce s peroxykyselinou, například kyselinou 3-chlorperbenzoovou, výhodně v inertním rozpouštědle, například dichlormethanu, výhodně za nebo v blízkosti teploty okolí.

Rozumí se, že označení aromaticnosti u arylů a heteroarylů znamená vysoce rezonační nenasycenou kruhovou strukturu. Alternativně umístění dvojných vazeb, pokud je označeno, představuje jednu možnou strukturu znázornění sloučeniny,

ale je zřejmé, že zahrnuje i další rezonanční stavy sloučeniny stejně tak jako protonované a nabitě varianty, z nichž pouze jedna může být znázorněna.

Je zřejmé, že sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou obsahovat asymetrická centra. Tato asymetrická centra mohou být nezávisle buď v R nebo v S konfiguraci. Odborníkovi v oboru je jasné, že některé sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou také vykazovat geometrickou isomerii. Rozumí se, že předložený vynález zahrnuje jednotlivé geometrické isomery a stereoisomery a jejich směsi, včetně racemických směsí, sloučenin podle předloženého vynálezu. Takové isomery mohou být separovány z jejich směsí aplikací nebo úpravou známých způsobů, například chromatografickými způsoby a rekrystalizačními způsoby nebo se odděleně připraví z vhodných isomerů jejich meziproduktů.

Pro účely popisu vynálezu se rozumí, že tautermerní formy jsou zahrnuty v popisu dané skupiny, například thioxo/merkpto nebo oxo/hydroxy.

Adiční sole kyselin je možno vytvořit ze sloučenin podle předloženého vynálezu, ve kterých je přítomna bázecká funkční skupina jako je skupina amino, alkylamino nebo dialkylamino. Farmaceuticky přijatelné, to znamená netoxické, adiční sole kyselin jsou výhodné. Zvolené sole jsou v optimálním případě zvoleny tak, aby byly slučitelné s obvyklými farmaceutickými vehikuly a upraveny pro orální nebo parenterální podávání. Adiční sole kyselin sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být připraveny reakcí

volné báze s odpovídající kyselinou aplikací nebo úpravou známých způsobů. Například adiční sole kyselin sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být připraveny buď rozpouštěním volné báze ve vodě nebo vodném roztoku alkoholu nebo v dalších vhodných rozpouštědlech obsahujících vhodnou kyselinu a izolací sole odpařením roztoku nebo reakcí volné báze a kyseliny v organickém rozpouštědle, přičemž v tomto případě se sůl separuje přímo nebo může být získána koncentrací roztoku. Některé vhodné kyseliny pro přípravu takových solí jsou kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina fosforečná, kyselina sírová, různé organické karboxylové a sulfonové kyseliny jako je kyselina octová, kyselina citrónová, propionová kyselina, kyselina jantarová, kyselina benzoová, kyselina vinná, kyselina fumarová, kyselina mandlová, kyselina askorbová, kyselina jablečná, kyselina methansulfonová, kyselina toluensulfonová, mastné kyseliny, adipáty, algináty, askorbáty, aspartáty, benzensulfonáty, benzoáty, cyklopentanpropionáty, diglukonáty, dodecylsulfáty, hydrogensířany, máselnany, mléčnany, lauráty, laurylsulfáty, maleinany, hydrojodidy, 2-hydroxyethansulfonáty, glycerofosfáty, pikrany, pivaláty, pamoáty, pektináty, persulfáty, 3-fenylpropionáty, thiokyanáty, 2-naftalensulfonáty, undekanoáty, nikotináty, hemisulfáty, heptonáty, hexanoáty, kafrany, kafrsulfonáty a další.

Adiční sole kyselin sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být regenerovány ze solí aplikací nebo úpravou známých způsobů. Například mohou být základní sloučeniny podle předloženého vynálezu regenerovány z jejich adičních

solí kyselin zpracováním alkalickou látkou, například vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného nebo vodným roztokem čpavku.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být regenerovány z jejich adičních solí bází aplikací nebo úpravou známých způsobů. Například mohou být základní sloučeniny podle předloženého vynálezu regenerovány z jejich adičních solí bází zpracováním kyselinou, například kyselinou chlorovodíkovou.

Adiční sole bází mohou být vytvořeny pokud sloučenina podle předloženého vynálezu obsahuje karboxylovou skupinu nebo dostatečně kyselý bioisoster. Báze, které mohou být použity pro přípravu adičních solí bází zahrnují výhodně takové, které pokud jsou zkombinovány s volnou kyselinou, vytvářejí farmaceuticky přijatelné sole, to znamená sole, jejichž kationty nejsou toxické pro pacienta při farmaceutických dávkách solí, takže příznivé inhibiční účinky, vlastní volné bázi, nejsou popřeny vedlejšími účinky, které je možno připsat aniontům. Farmaceuticky přijatelné sole, včetně solí odvozených od solí alkalických kovů a kovů alkalických zemin, spadající do rozsahu předloženého vynálezu, zahrnují sole, odvozené od následujících bází: hydrid sodný, hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid vápenatý, hydroxid hlinitý, hydroxid lithný, hydroxid zinečnatý, hydroxid hořečnatý, amonium, ethylendiamin, N-methyl-glukamin, lysin, arginin, ornithin, cholin, N,N'-dibenzylethylendiamin, chlorprokain, diethanolamin, prokain, N-benzylfenethylamin, diethylamin, piperazin,

tris(hydroxymethyl)-aminomethan, hydroxid tetramethylamonný a podobně.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být výhodně připraveny nebo vytvořeny v průběhu provádění způsobů podle předloženého vynálezu jako solváty (například hydráty). Hydráty sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být výhodně připraveny rekrystalizací ze směsi ve vodném/organickém rozpouštědle, použitím organických rozpouštědel jako je dioxan, tetrahydrofuran nebo methanol.

Výchozí materiály a meziprodukty mohou být připraveny aplikací nebo úpravou známých způsobů, například způsoby, které jsou popsány v referenčních příkladech nebo jejich zřejmých chemických ekvivalentech.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu, způsoby jejich použití nebo přípravy a jejich biologický účinek se stanou jasnějšími po podání následujících příkladů, které jsou uvedeny pouze jako ilustrace a nejsou zamýšleny jako omezení rozsahu předloženého vynálezu.

Vzorky byly analyzovány pomocí TLC, NMR, RP-HPLC nebo EA.

Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny podle předloženého vynálezu, způsoby jejich použití nebo přípravy a jejich biologický účinek se stanou jasnějšími po podání následujících příkladů, které jsou

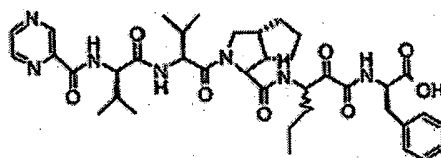
uvedeny pouze jako ilustrace a nejsou zamýšleny jako omezení rozsahu předloženého vynálezu.

Vzorky byly analyzovány pomocí TLC, NMR, RP-HPLC nebo EA.

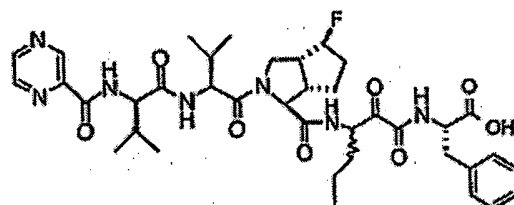
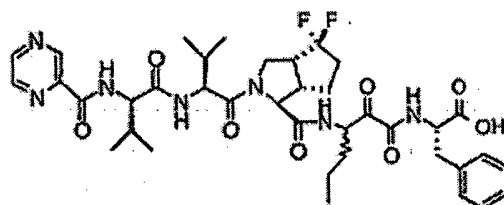
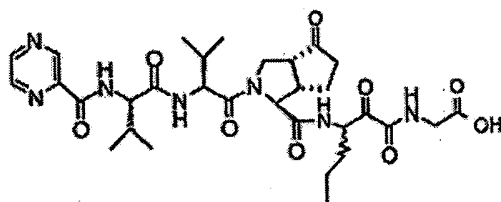
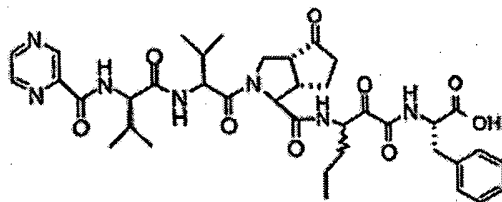
Příklad 1

Sloučeniny A-E:

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny xi (310 mg, 0,39 mmolů) se přidá TFA (4 ml). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 5 hodin. V tomto okamžiku se rozpouštědlo odstraní ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí pomocí HPLC s obrácenými fázemi pro získání 195 mg (68%) sloučeniny A,



Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny B-E:

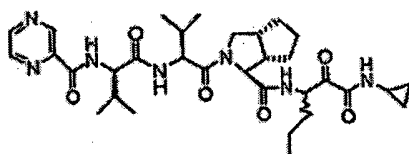


Příklad 2

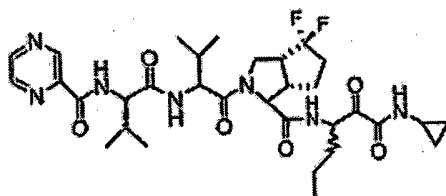
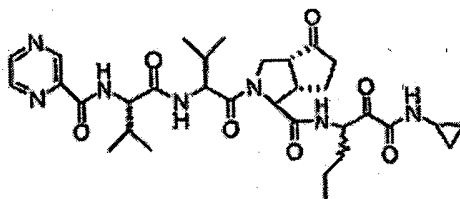
Sloučeniny F-M:

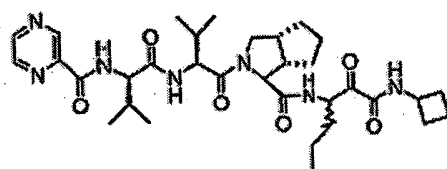
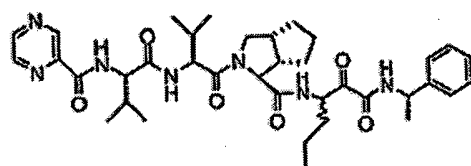
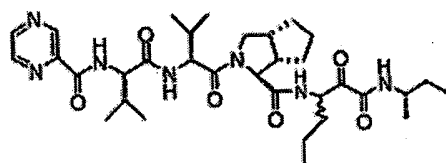
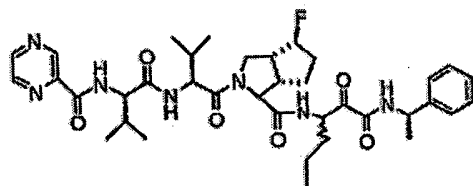
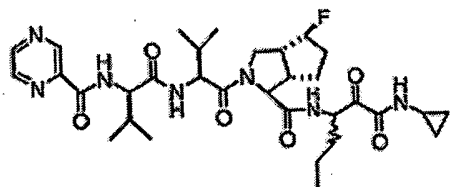
Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny xii (350 mg, 0,56 mmolů) se přidá činidlo DMP (307 mg, 0,73 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a potom se reakce zastavuje pomocí 10% Na_2SO_3 po dobu 30 minut. Reakční směs se potom extrahuje pomocí EtOAc (75 ml) a promývá solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí

chromatografií na silikagelu (80-90% EtOAc/hexan) pro získání 248 mg (71%) sloučeniny F



Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny G-M:



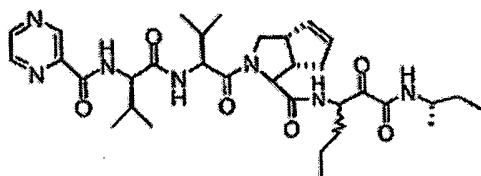


Příklad 3

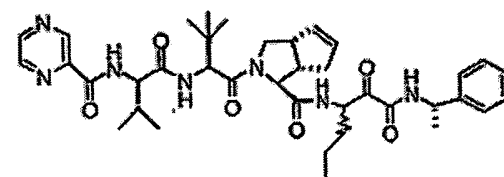
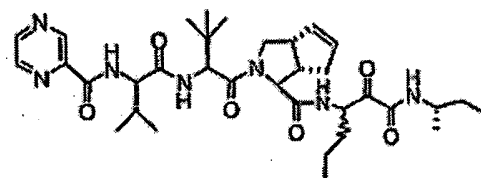
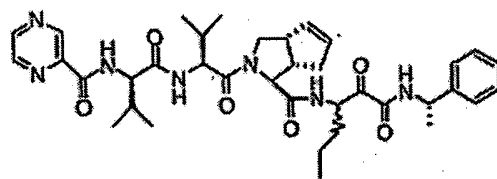
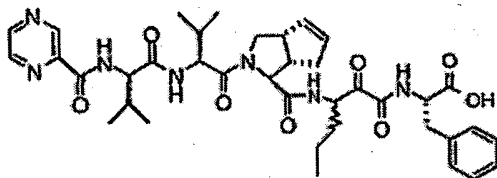
Sloučeniny N-R:

Do DCM roztoku (4 ml) sloučeniny xix (~0,22 mmolů) se přidá činidlo DMP (146 mg, 0,34 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin se reakce zastaví pomocí 10% Na_2SO_3 . Reakční směs se potom zředí pomocí DCM. Organická vrstva se separuje a promývá dvakrát 10% Na_2SO_3 a solným roztokem. Výsledná organická vrstva se suší a koncentruje

ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání 78 mg (56%) požadované sloučeniny N



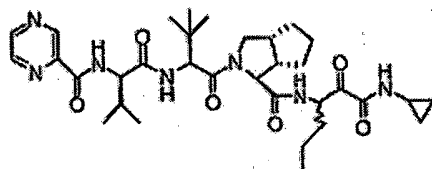
Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny O-R:



Příklad 4

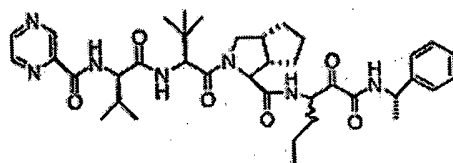
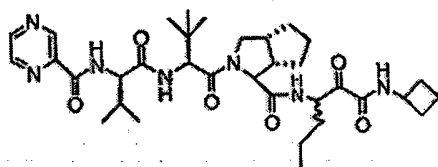
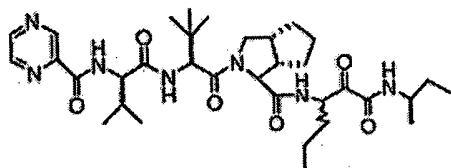
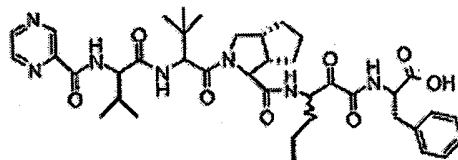
Sloučeniny S-W:

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny xxv (320 mg, 0,5 mmolů) se přidá činidlo DMP (272 mg, 0,65 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ po dobu 20 minut. Výsledná směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (80% EtOAc/hexan) pro získání 170 mg (53%) sloučeniny S,



Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny T-W:

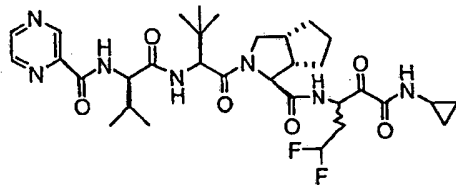
07.04.03



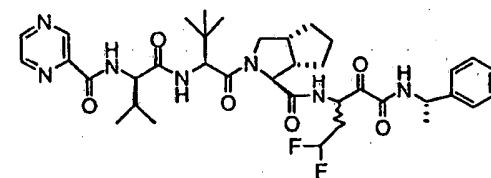
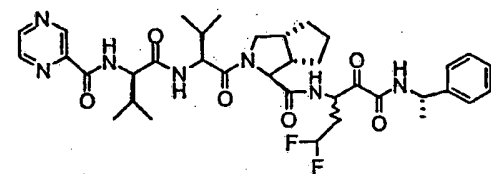
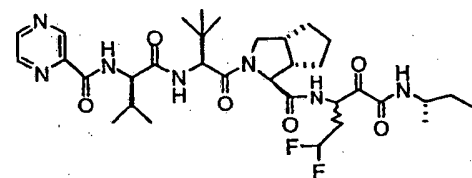
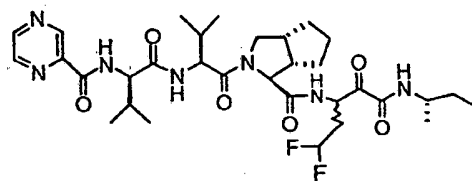
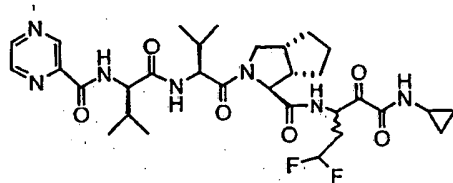
Příklad 5

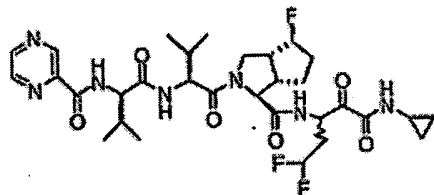
Sloučeniny X-AD:

Do DCM roztoku (20 ml) sloučeniny xxvi (400 mg, 0,6 mmolů) se přidá činidlo DMP (329 mg, 0,78 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 1,5 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ po dobu 20 minut. Výsledná směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (70-100% EtOAc/hexan) pro získání 210 mg (53%) sloučeniny X,



Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny Y-AD:

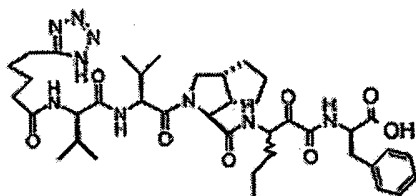




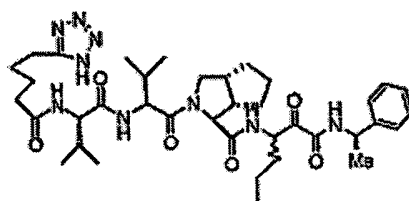
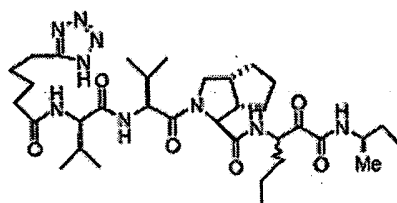
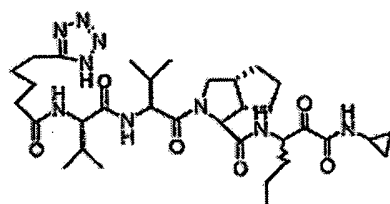
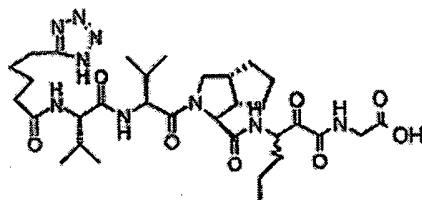
Příklad 6

Sloučeniny AE-AI:

Sloučenina xxxiii (150 mg; 0,076 mmolů) se rozpustí v 5 ml TFA a míchá se dva dny. Produkt se čistí pomocí RP-HPLC pro získání 40 mg (33% výtěžek) sloučeniny AE,



Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny AF-AI:

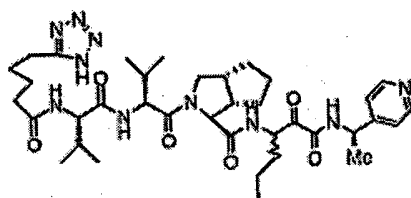


Příklad 7

Sloučenina AJ:

Sloučenina xxxviii (180 mg, 0,21 mmolů) se rozpustí v bezvodém TFA (5 ml) a ponechá se v klidu po dobu 3 dnů zhruba při teplotě okolí. V tomto okamžiku se reakční směs koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí pomocí HPLC s obrácenými fázemi pro získání 50 mg (32%) sloučeniny AJ,

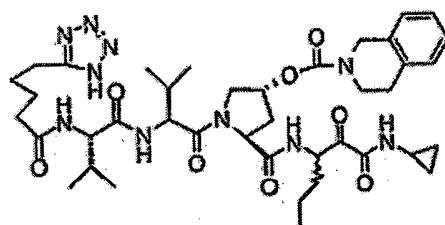
07.04.03



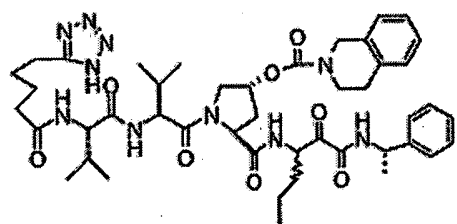
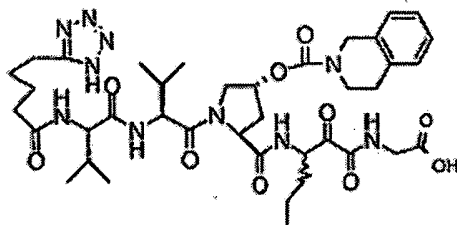
Příklad 8

Sloučeniny AK-AM

Sloučenina xxxxi (150 mg; 0,16 mmolů) se rozpustí v 4,5 ml TFA a míchá po tři dny. Produkt se čistí pomocí RP-HPLC pro získání 70 mg (54% výtěžek) sloučeniny AK,



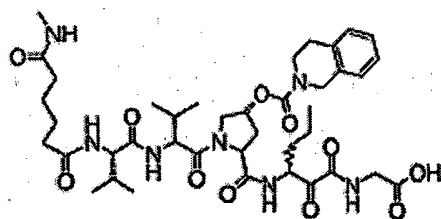
Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny AL-AM:



Příklad 9

Sloučeniny AN:

Sloučenina lii (80 mg) se rozpustí v 3 ml TFA a 3 ml DCM. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 5 hodin. Rozpouštědlo se odstraní odpařením. Výsledné reziduum se čistí pomocí HPLC pro získání 62 mg (83%) sloučeniny AN,

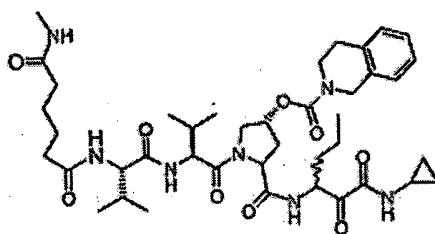


Příklad 10

Sloučenina AO:

07.04.03

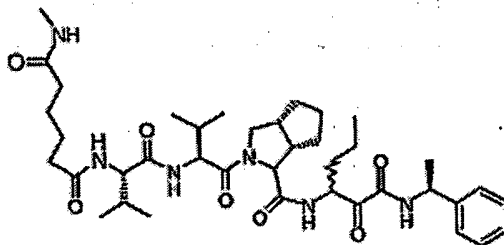
Sloučenina liii (160 mg; 0,2 mmolů) se rozpustí v 5 ml DCM a přidá se činidlo DMP (170 mg; 0,4 mmolů). Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po tři hodiny. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a reziduum se rozpustí ve směsi 50% acetonitril/voda a čistí se pomocí RP-HPLC pro získání 51 mg (32%) sloučeniny AO,



Příklad 11

Sloučenina AP:

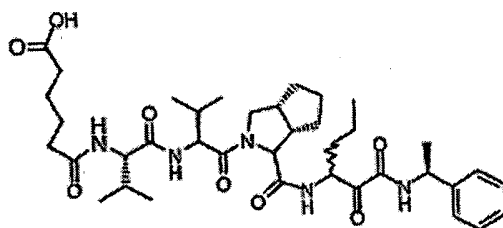
Sloučenina lix (162 mg; 0,22 mmolů) se rozpustí v 8 ml DCM a přidá se činidlo DMP (189 mg; 0,44 mmolů). Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a produkt se čistí pomocí RP-HPLC pro získání 41 mg (25%) sloučeniny AP,



Příklad 12

Sloučenina AQ:

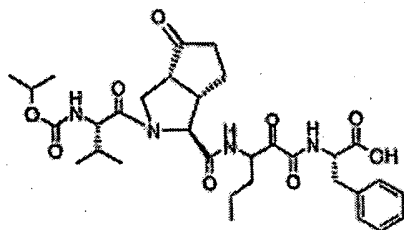
Sloučenina lx (70 mg; 0,09 mmolů) se rozpustí v 5 ml TFA a 5 ml DCM. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a reziduum se rozpustí ve směsi 50% acetonitril/voda a lyophilizuje se pro získání sloučeniny AQ ve formě prášku,



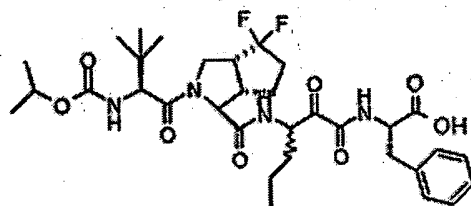
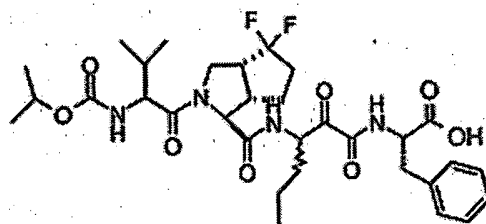
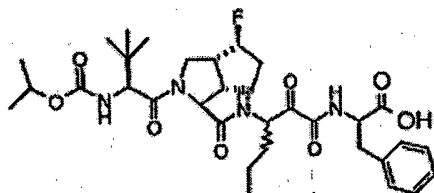
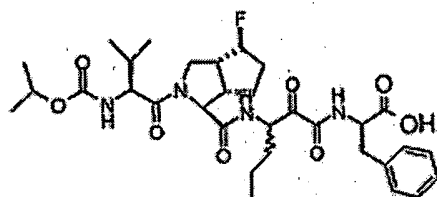
Příklad 13

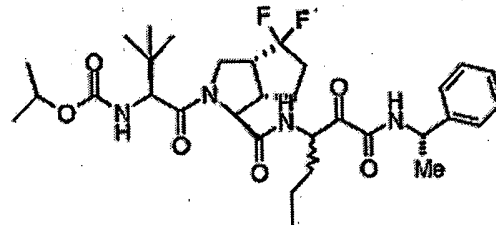
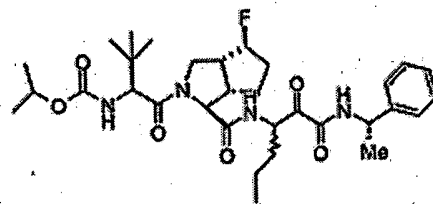
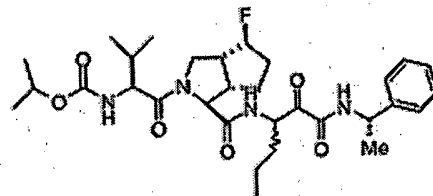
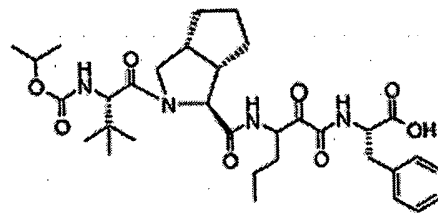
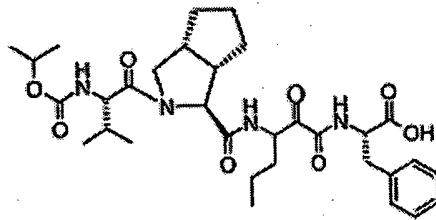
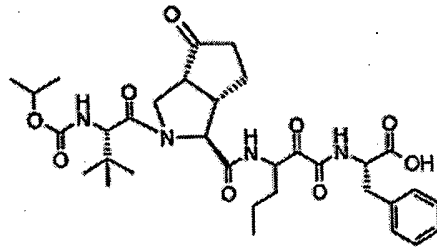
Sloučeniny AR-BG:

Sloučenina lxvi (223 mg, 0,326 mmolů) se míchá v roztoku TFA (5 ml) a DCM (5 ml) po dobu 4 hodin. TLC (silikagel: 2% MeOH/EtOAc) ukázala úplnou přeměnu na pomalejší produkt. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku a produkt se lyofilizuje pro získání 198 mg (97%) sloučeniny AR,

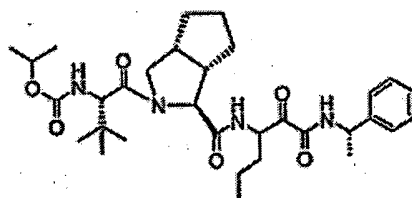
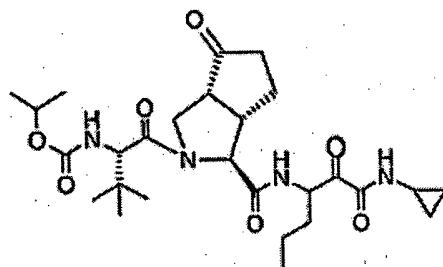
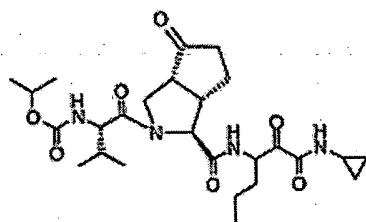
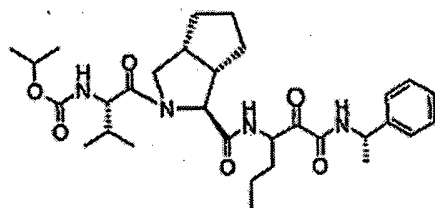
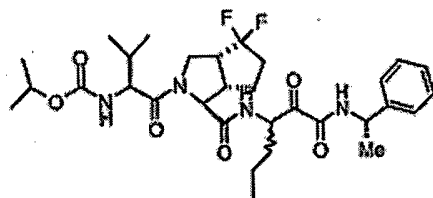


Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny AS-BG:





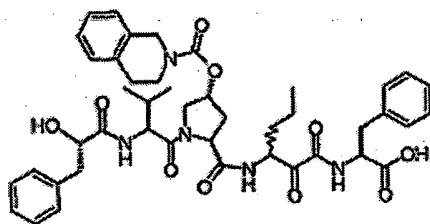
07.04.03



Příklad 14

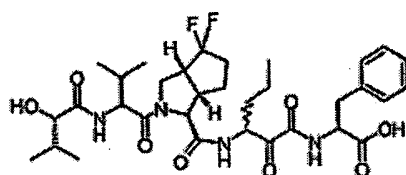
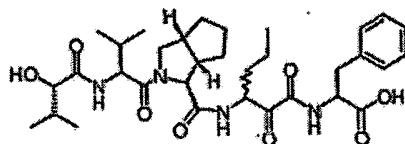
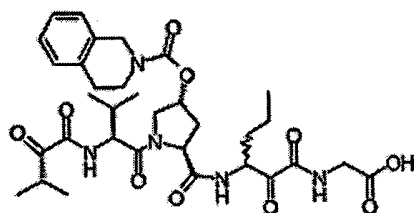
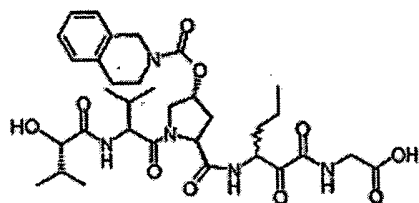
Sloučeniny BH-BS:

Sloučenina lxxiii (150 mg, 0,15 mmolů) se vyjme v DCM (3 ml). Do tohoto roztoku se přidá TFA (1,5 ml). Výsledný roztok se míchá přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs koncentruje ve vakuu pro získání rezidua. Reziduum se čistí pomocí HPLC s obrácenými fázemi a lyofilizuje se pro získání 60 mg (50%) sloučeniny BH,

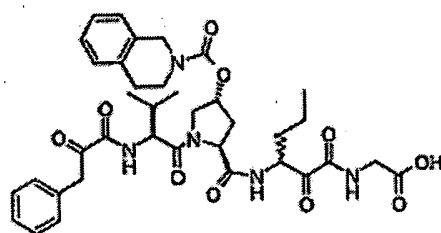
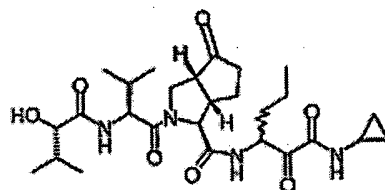
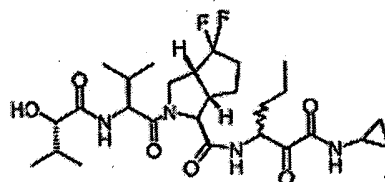
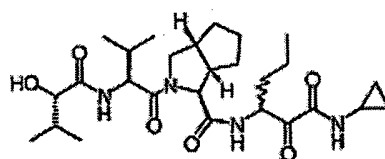
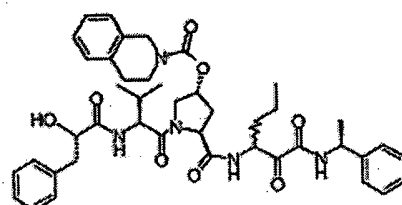
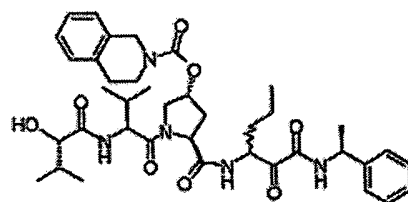
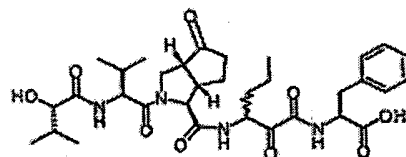


Postupující výše uvedeným způsobem a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny BI-BS:

07.04.03



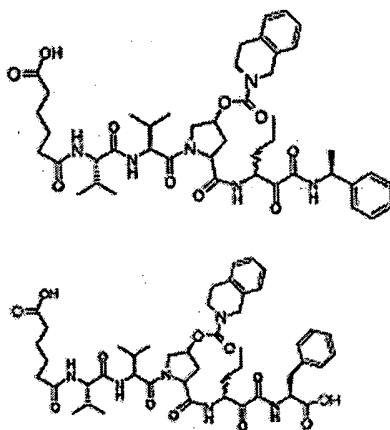
07.04.03



Příklad 15

Sloučeniny BT-BU:

Postupem podle Příkladu 12 a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny BT-BU:

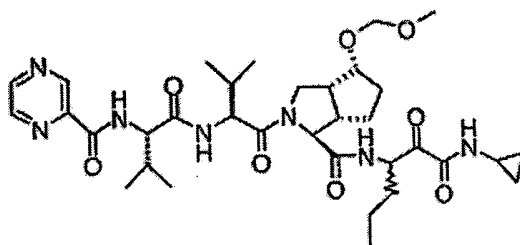


Příklad 16

Sloučenina BV:

Do dichlormethanového roztoku (4,2 ml) sloučeniny lxxvii (143 mg, 0,21 mmolů) se přidá činidlo DMP (165 mg, 0,39 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na_2SO_3 (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší se nad MgSO_4 a koncentruje na žlutý olej. Čištění chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) poskytne 124 mg (79%) sloučeniny BV,

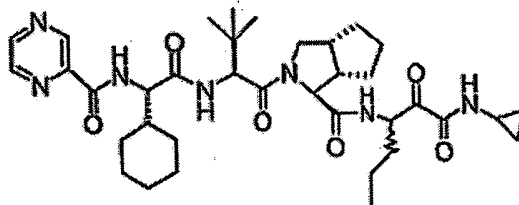
07.04.03



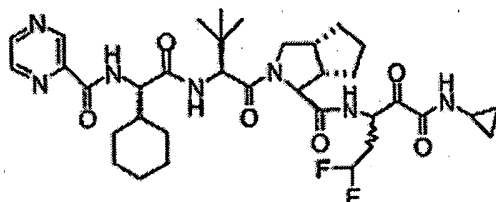
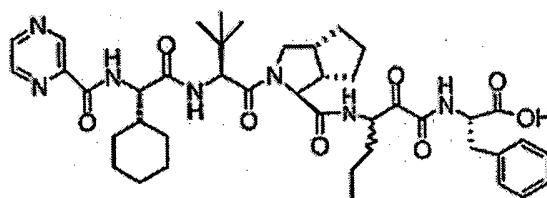
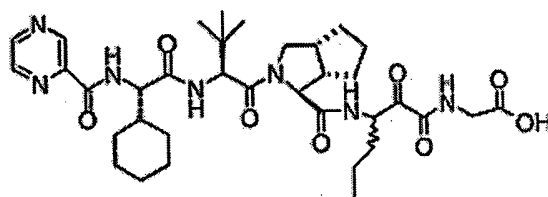
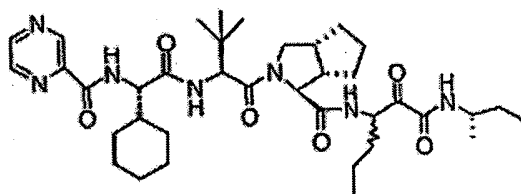
Příklad 17

Sloučeniny BW-CA:

Do dichlormethanového roztoku (20 ml) sloučeniny lxxxix (420 mg, 0,62 mmolů) se přidá činidlo DMP (342 mg, 0,81 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po 1 hodinu a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ po dobu 20 minut. Výsledná směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (80% EtOAc/hexan) pro získání 208 mg (50%) sloučeniny BW,



Postupující výše uvedeným způsobem, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů, se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny BX-CA:

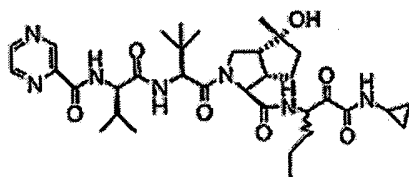


Příklad 18

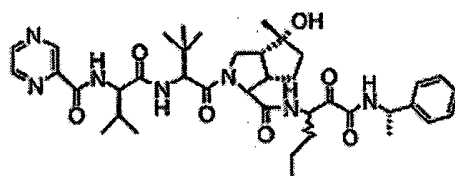
Sloučeniny CB-CC:

Do dichlormethanového roztoku (6,5 ml) sloučeniny lxxxvii (200 mg, 0,3 mmolů) se přidá činidlo DMP (227 mg, 0,54 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na_2SO_3 (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší se

nad MgSO_4 a koncentruje na žlutý olej. Čištění chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) dává 138 mg (70%) sloučeniny CB,



Postupujíce výše uvedeným způsobem, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučenina CC:

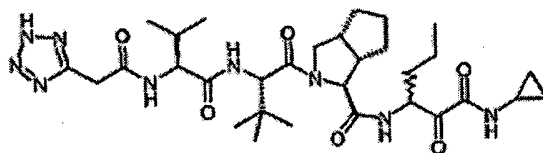


Příklad 19

Sloučenina CD:

Sloučenina lxxxxviii (40 mg, 0,05 mmolů) se vyjme v TFA (3 ml). Roztok se míchá po dvě noci a koncentruje. Reziduum se čistí HPLC s obrácenými fázemi pro získání 25 mg (74%) sloučeniny CD,

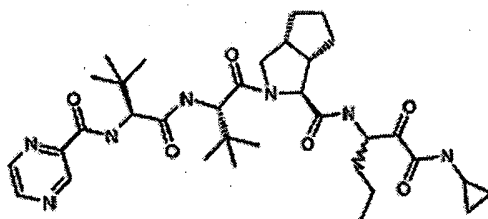
07.04.03



Příklad 20

Sloučenina CE:

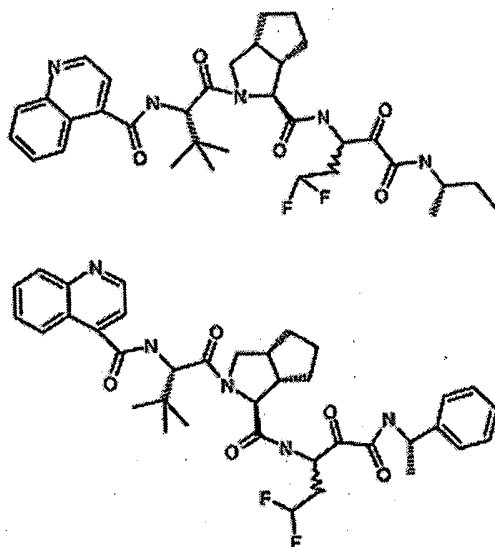
Postupem podle Příkladu 17 a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující sloučenina CE:



Příklad 21

Sloučeniny CF-CG:

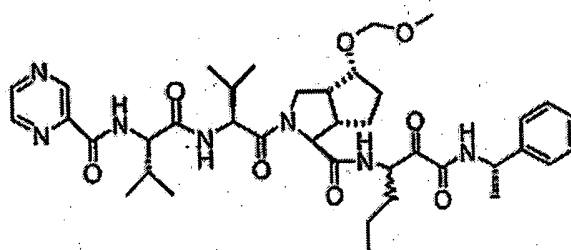
Postupem podle Příkladu 14 a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny CF-CG:



Příklad 22

Sloučenina CH:

Postupem podle Příkladu 16 a použitím vhodných výchozích materiálů se připraví následující sloučenina CH:

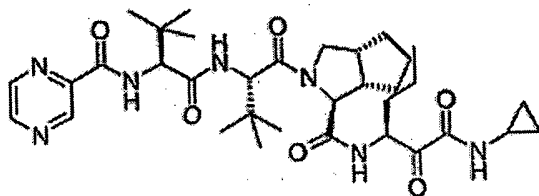


Příklad 23

Sloučeniny CI-CM

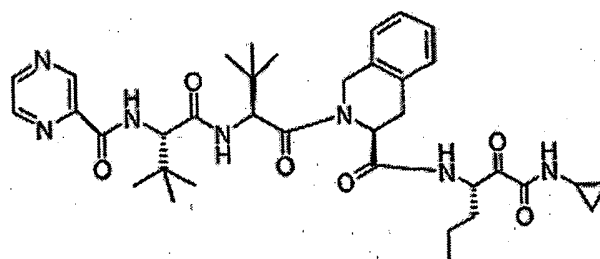
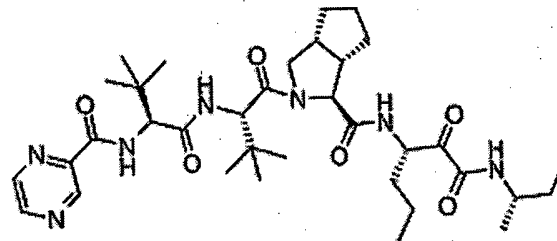
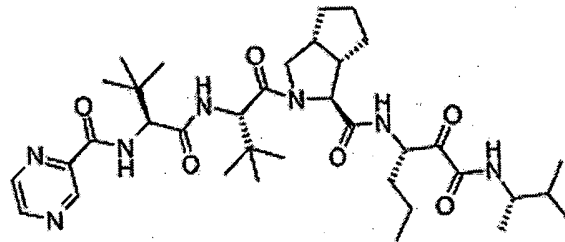
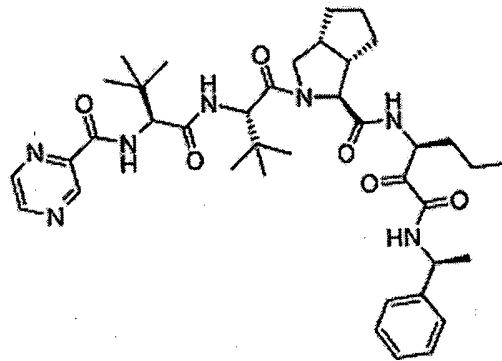
Sloučenina cxi (490 mg, 0,75 mmolů) se rozpustí v DCM (6 ml), do tohoto roztoku se přidá činidlo DMP (380 mg, 0,9

mmolů) a míchá se 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáváním 10% Na_2SO_3 roztoku a potom se organická fáze promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí směsí 70% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny CI (325 mg, 66,4%).



Postupujíce výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproductů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny CJ-CM:

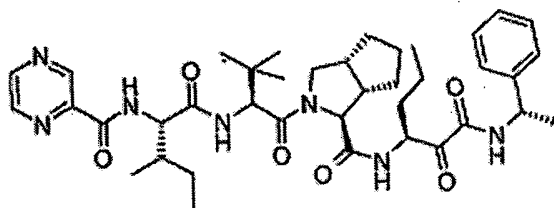
07.04.03



Příklad 24

Sloučenina CN

Do DCM/THF roztoku (3 ml/3 ml) sloučeniny cxviii (335 mg, 0,46 mmolů) se přidá činidlo DMP (300 mg, 0,69 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická fáze se promývá solným roztokem, suší se nad MgSO₄ a koncentruje pro získání žlutého oleje. Čištění chromatografií na silikagelu (80% EtOAc/hexan) dává sloučeninu CN (220 mg, 67%).

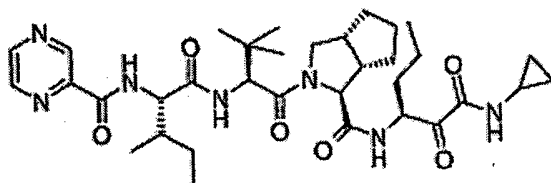


Příklad 25

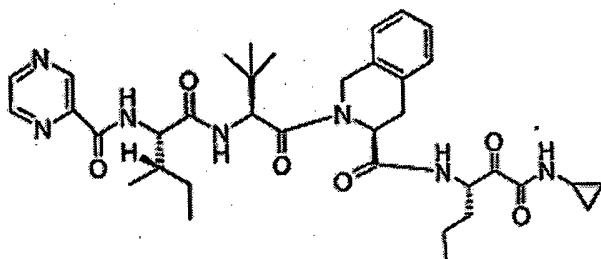
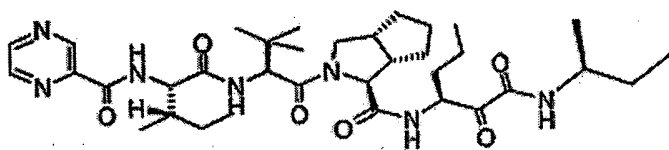
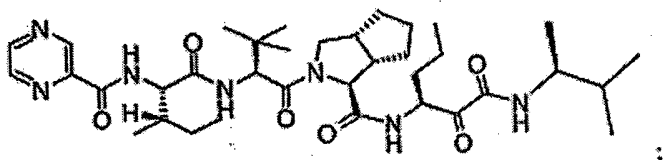
Sloučeniny CO-CR

Do DCM/THF roztoku (1,5 ml/1,5 ml) sloučeniny cxix (164 mg, 0,25 mmolů) se přidá činidlo DMP (159 mg, 0,38 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická fáze se promývá solným roztokem, suší se nad MgSO₄ a koncentruje na žlutý olej. Čištění chromatografií na

silikagelu (70% EtOAc/hexan) dává sloučeninu CO (100 mg, 61%).



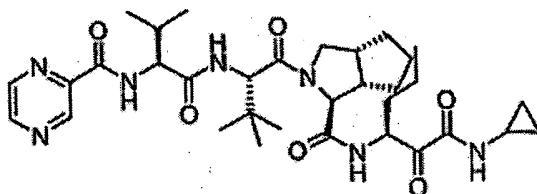
Postupujíce výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny CP-CR:



Příklad 26

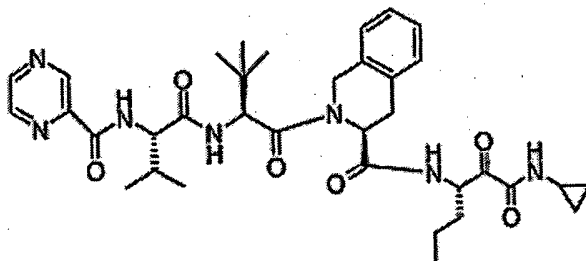
Sloučeniny CS-CT

Sloučenina cxx se rozpustí v DCM (3 ml), do roztoku se přidá činidlo DMP (180 mg, 0,41 mmolů) a potom míchá po 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním 10% Na₂SO₃ a potom se organická fáze promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se reziduum chromatograficky čistí pomocí 100% EtOAc pro získání sloučeniny CS (95 mg, 43,7%).



Postupujícе výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučenina CT:

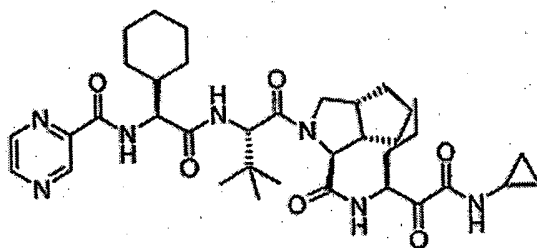
146



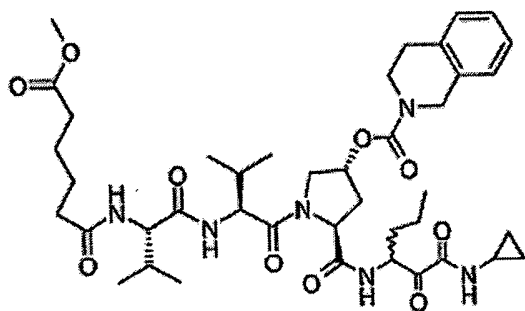
Příklad 27

Sloučeniny CU, EI, EK-EM, EO-EZ a FA-FG

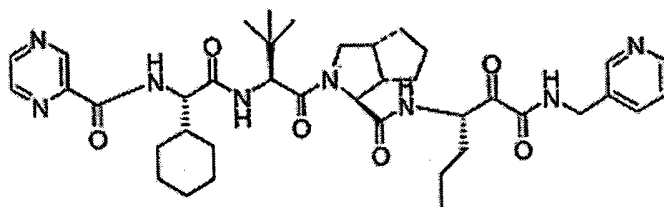
Sloučenina cxxviii (356 mg, 0,52 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml), do tohoto roztoku se přidá činidlo DMP (270 mg, 0,63 mmolů) a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním 10% Na₂SO₄ a potom se organická fáze separuje a promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organického rozpouštědla se reziduum chromatograficky čistí pomocí 100% EtOAc pro získání sloučeniny CU (200 mg, 56,3%). teplota tání 225-235 °C.



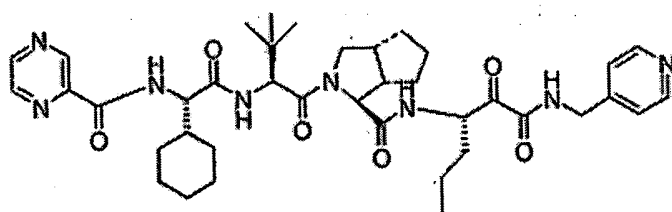
Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproductů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny EI, EK-EM, EO-EZ a FA-FH:



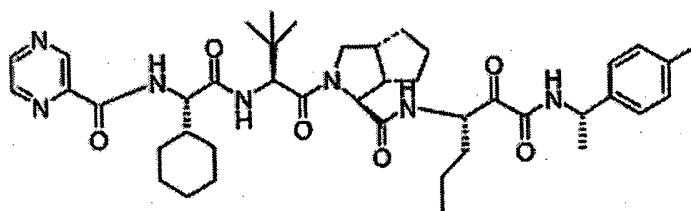
EL



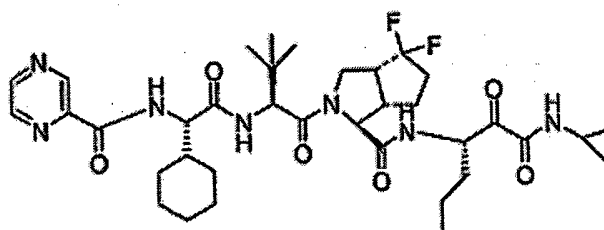
EK,



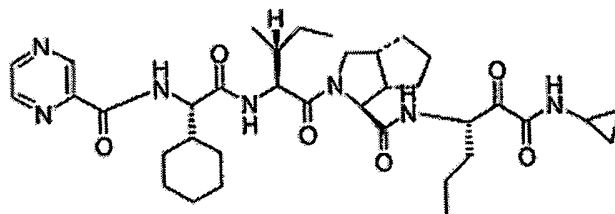
EL,



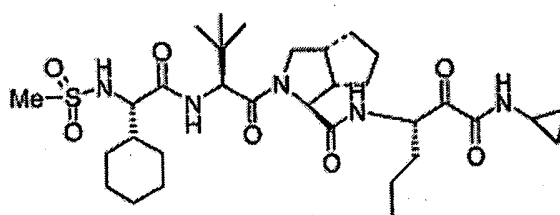
EM,



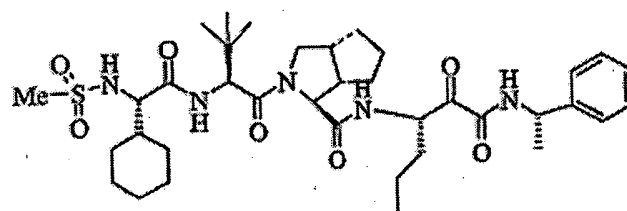
EO,



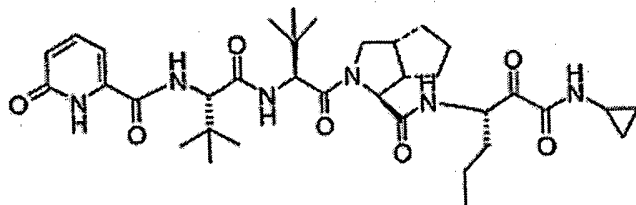
EP,



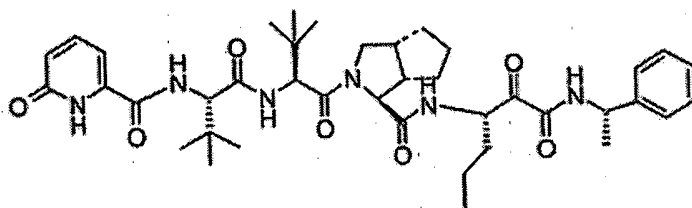
EQ,



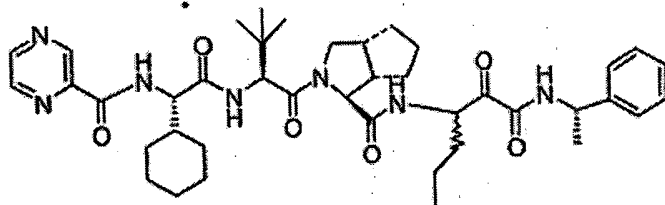
ER,



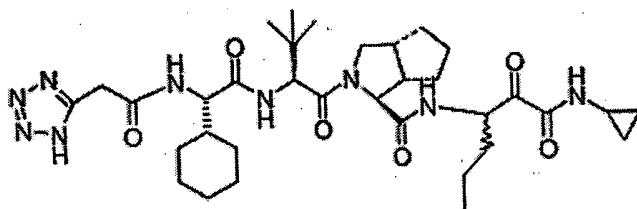
ES,



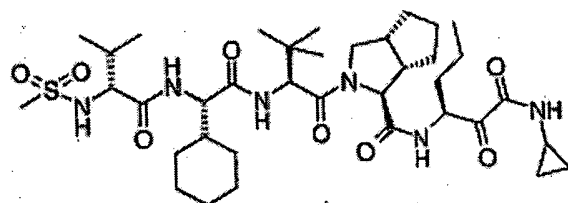
ET,



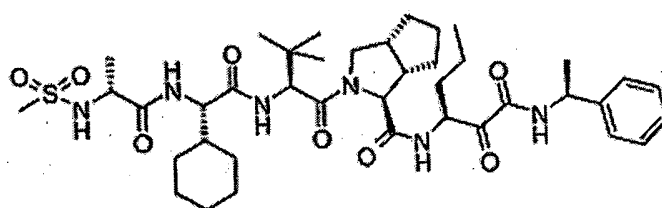
BU,



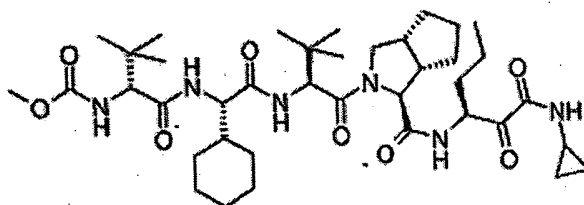
EV,



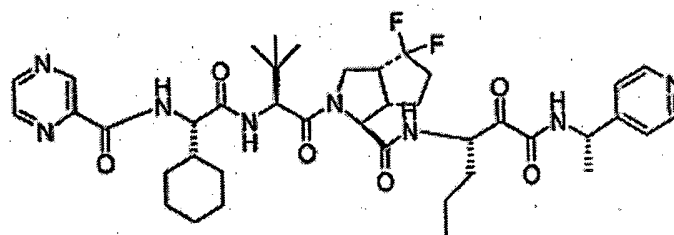
BW,



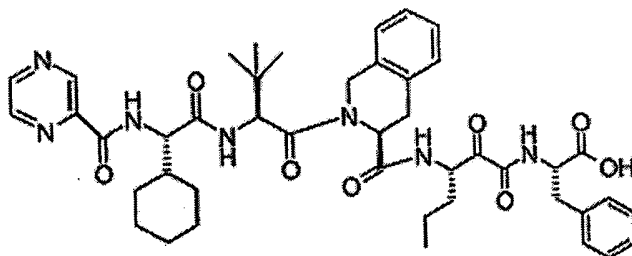
EX,



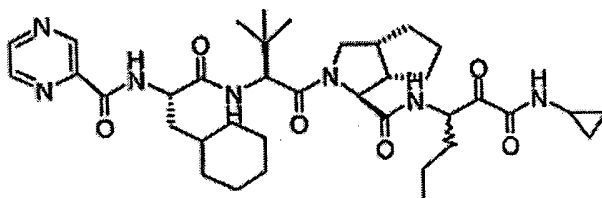
EY,



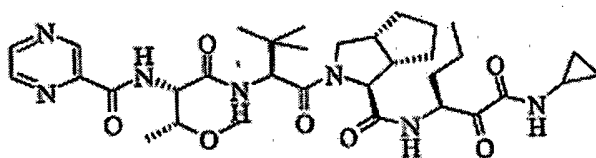
EZ,



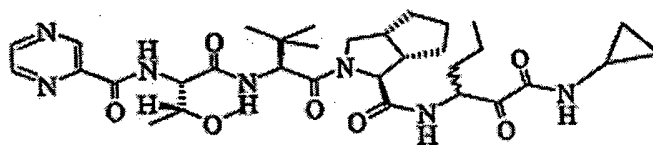
FA,



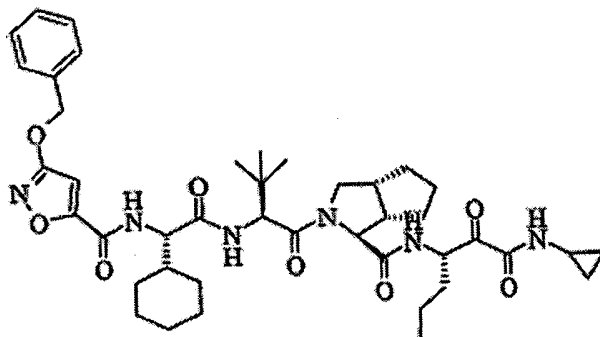
FB,



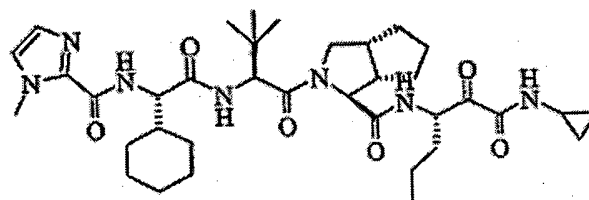
FC,



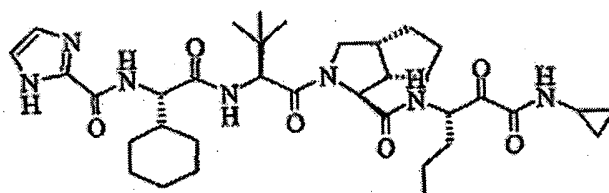
FD,



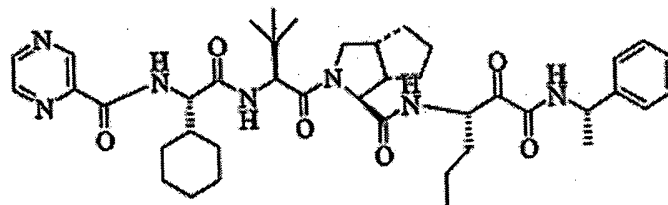
FE,



FF,



FG, and

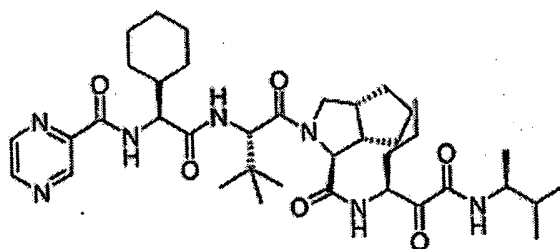


FH.

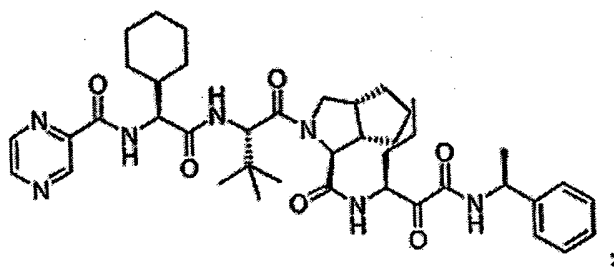
Příklad 28

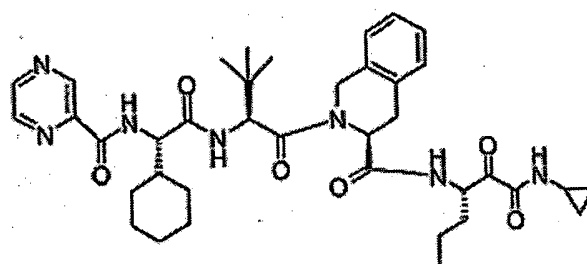
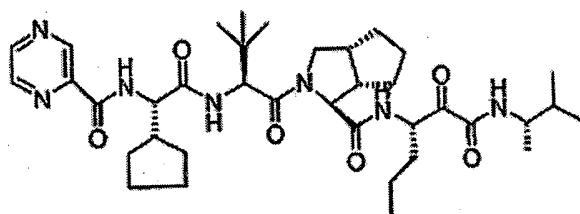
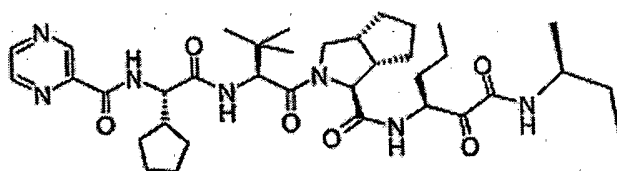
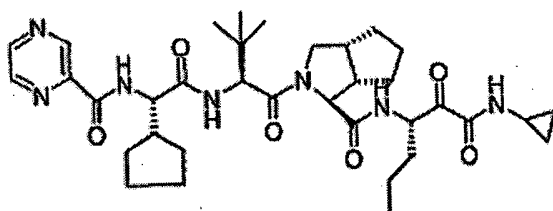
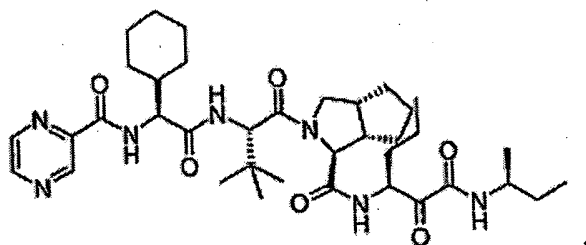
Sloučeniny CV-DC

Sloučenina cxxx (330 mg, 0,46 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml), do tohoto roztoku se přidá činidlo DMP (240 mg, 0,56 mmolů) a míchá 1 hodiny. Reakce se zastaví přidáním 10% Na₂SO₃ a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí pomocí 100% EtOAc pro získání sloučeniny cxxx (280 mg, 85,9%).

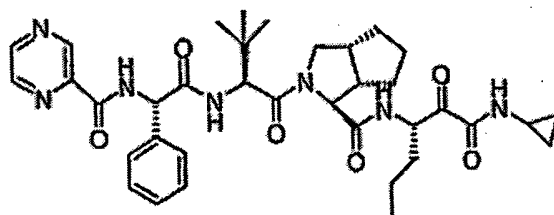


Postupujícе výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny CW-DC:





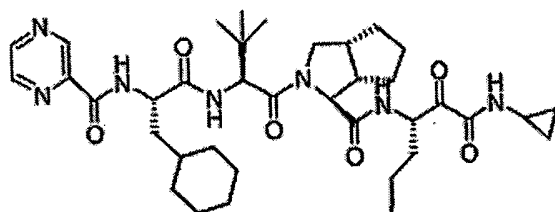
; and



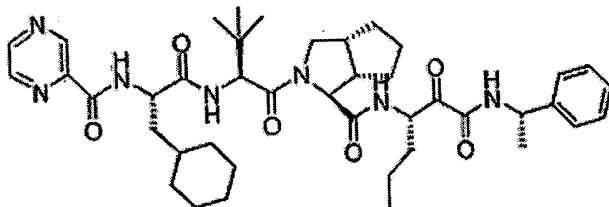
Příklad 29

Sloučeniny DD-DE

Do DCM roztoku (6 ml) sloučeniny cxxxviii (400 mg, 0,57 mmolů) se přidá činidlo DMP (362 mg, 0,85 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem, suší se nad MgSO₄ a koncentruje pro získání žlutého oleje. Čištění silikagelem (70% EtOAc/hexan) dává sloučeninu DD (201 mg, 51%).



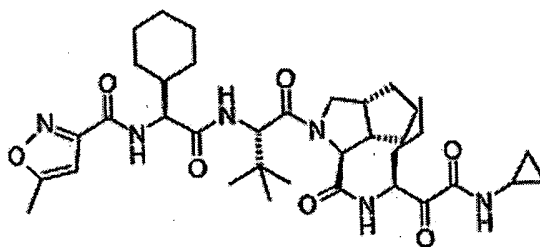
Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproductů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučenina DE:



Příklad 30

Sloučenina DF

Sloučenina cxxxxiii (165 mg, 0,24 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml), do roztoku se přidá činidlo DMP (125 mg, 0,29 mmolů) a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním 10% Na₂SO₃ a organická fáze promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum čistí chromatograficky směsí 70% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny DF (108 mg, 65,6%).

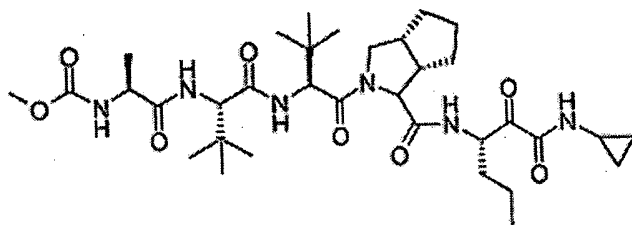


Příklad 31

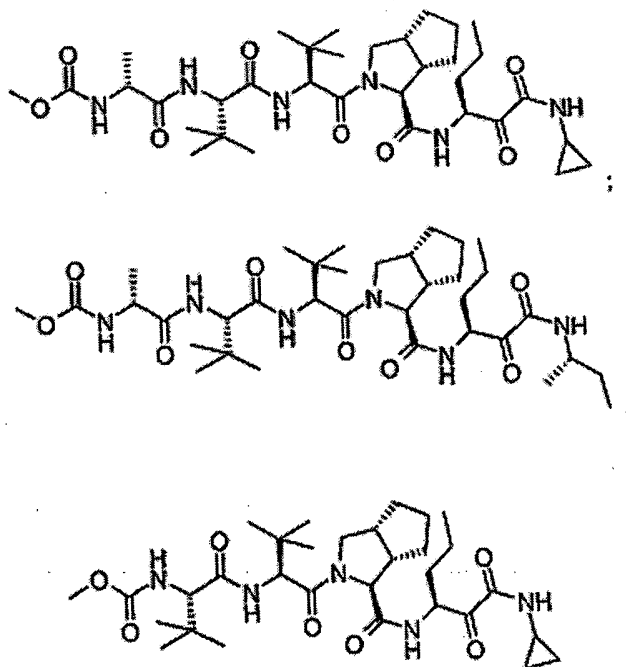
Sloučeniny DG-DJ

Do roztoku sloučeniny cil (0. 350 g, 0,516 mmolů) v DCM (15 ml) ochlazené v ledové lázni se přidá činidlo DMP (0,281 g,

0,671 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin, potom se reakce zastaví pomocí 10% Na_2SO_3 roztoku a míchá po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí DCM (3x20 ml) a organický extrakt se suší (MgSO_4). Po filtraci pro odstranění MgSO_4 se filtrát koncentruje a čistí se kolonovou chromatografií (70% ethylacetát/hexan) pro získání konečné sloučeniny DG (0,265 g, 76%) ve formě bílé pevné látky.



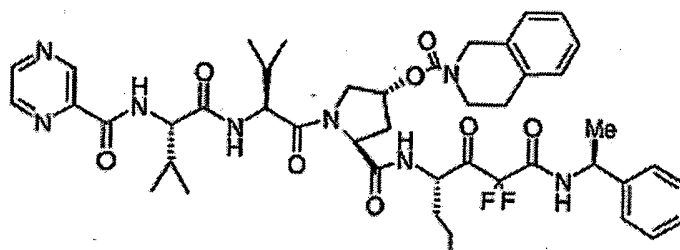
Postupujíce výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny DH-DJ:



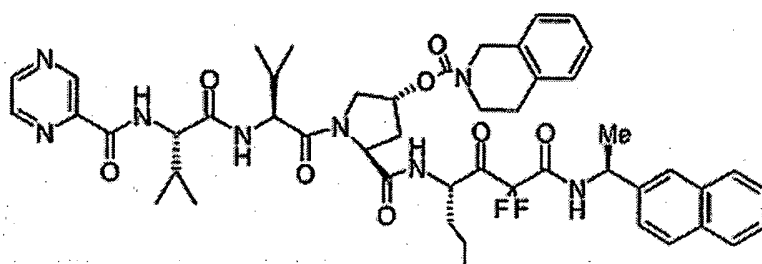
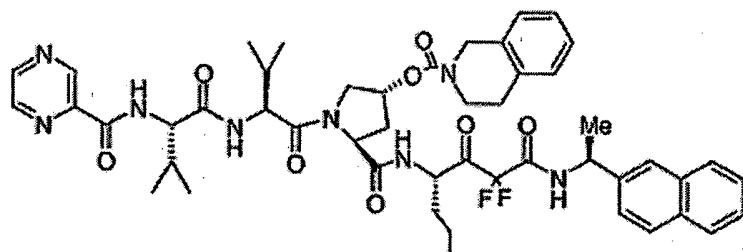
Příklad 32

Sloučeniny DK-DN

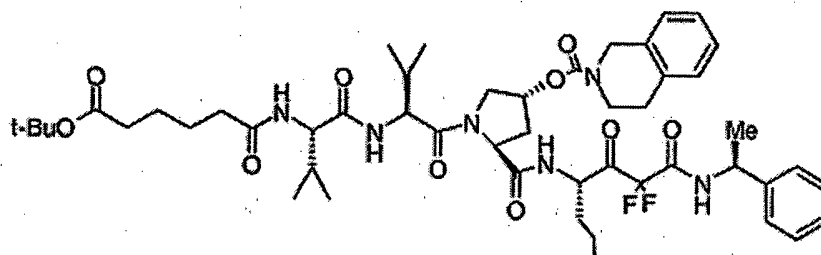
DCM roztok sloučeniny clx (108 mg, 0,123 mmolů) se zpracovává činidlem DMP (78 mg, 0,185 mmolů). Po míchání za teploty okolí po 1 hodinu se reakční směs zředí EtOAc (50 ml) a potom se reakce zastaví pomocí 10% Na₂SO₃. Po míchání po dobu 30 minut se organická fáze separuje a promývá NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze se suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (80% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny DK (84 mg, 78%).



Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučeniny DL-DN.



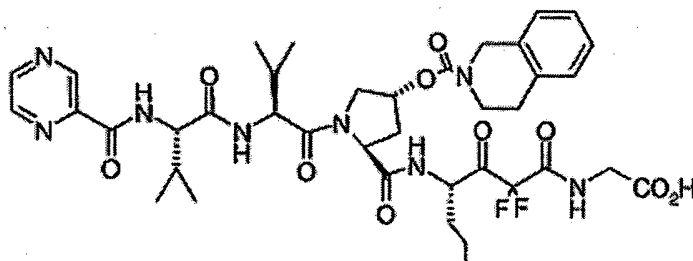
; and



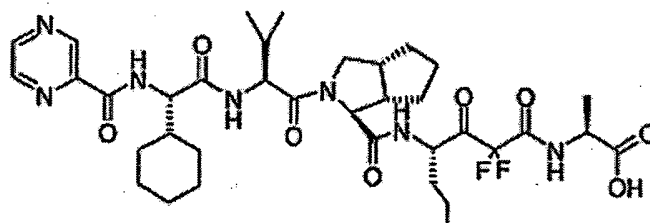
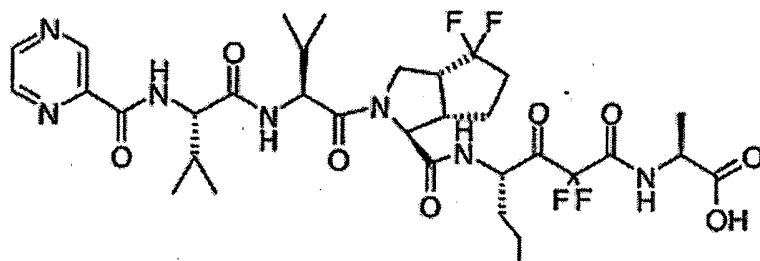
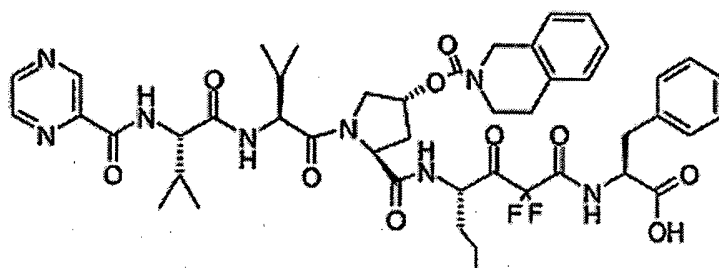
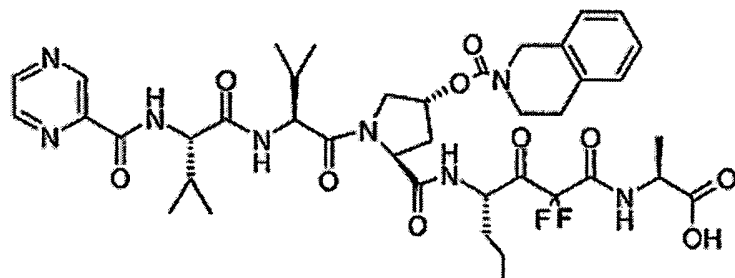
Příklad 33

Sloučeniny DO-DS

EtOH roztok (10 ml) sloučeniny clxii (174 mg, 0,189 mmolů) se hydrogenuje použitím Pd/C (30% ekv., 60 mg, 10% obsah paládia) po dobu 2,5 hodin. Katalyzátor se potom odfiltruje. Výsledný filtrát se koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí semipreparativní chromatografií s obrácenými fázemi a lyofilizuje pro získání sloučeniny DO s 70 % výtěžkem.



Postupujíce výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproductů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny DP-DS.



Příklad 34

Sloučenina CW:

Sloučenina clxiii (175 mg, 0,24 mmolů) se vyjme v DCM (3 ml), do tohoto roztoku se přidá činidlo DMP (120 mg, 0,28 mmolů) a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním 10%

07.04.03

Na_2SO_3 a promývá se nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Čištění směsí 70% EtOAc dává sloučeninu CW (134 mg, 75%).

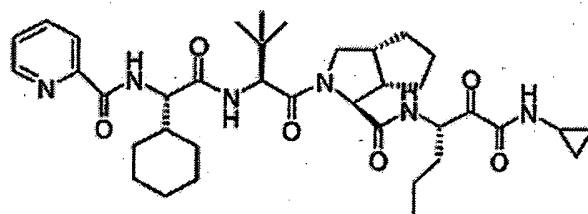
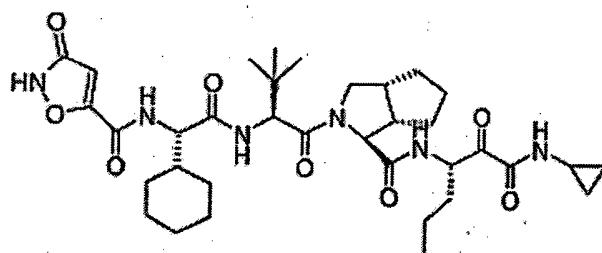
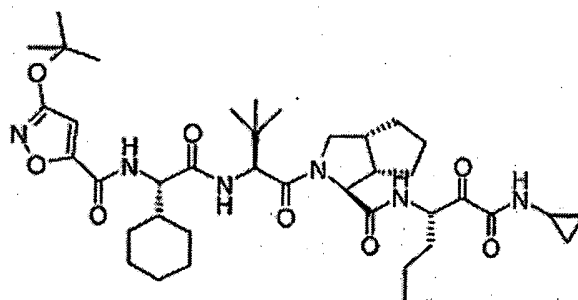
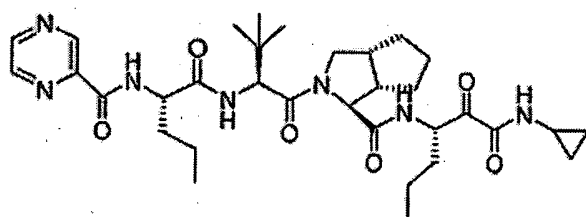
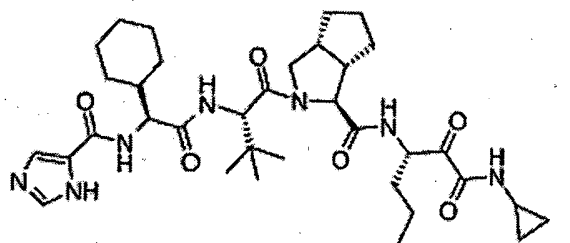
Příklad 35

Sloučeniny CY a DT-DX:

Do DCM roztoku (15 ml) clxxii (290 mg, 0,43 mmolů) se přidá činidlo DMP (239 mg, 0,56 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po 1 hodinu a reakce se zastaví přidáváním 10% Na_2SO_3 po dobu 20 minut. Výsledná směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (8-100% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny CY (151 mg, 52%).

Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující po sobě jdoucí sloučeniny DT-DX.

07.04.03

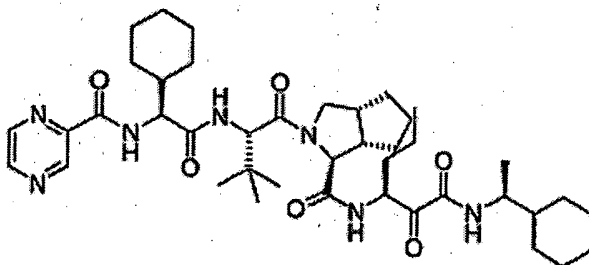


Příklad 36

Sloučenina DY:

Sloučenina lxxxv (1,17 mmolů) se vyjme v DCM (5 ml). Činidlo DMP (545 mg, 1,3 mmolů) se přidá do tohoto roztoku a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním P-Na₂SO₃ (1,5 mmol/g pryskyřice) a mícháním jednu hodinu. Přidá se P-TBD vychytávací pryskyřice* (2,5 mmol/g pryskyřice) a míchá 45 minut. Výsledná směs se filtruje a čistí se pomocí 50 % EtOAc pro získání sloučeniny DY (440 mg, 50,2% ve dvou krocích).

*Reference pro P-TBD vychytávací pryskyřici: J. Parlow a kol. Tetrahedron, 55,6785-6796 (1999).

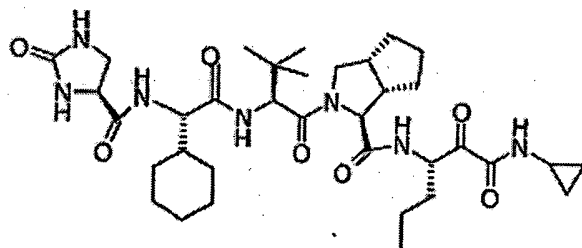


Příklad 37

Sloučenina DZ:

Výchozí materiál, sloučenina clxxxxi (94 mg, 0,14 mmolů), se rozpustí ve směsi THF (10 ml) a DCM (20 ml). Potom se přidá činidlo DMP (118 mg, 0,28 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 2 hodin. Reakční směs se odvede do

separační nálevky obsahující Dri Solv THF (120 ml). Reakční směs se promývá 10% Na₂SO₃ (50 ml) a potom solným roztokem (75 ml). Organická vrstva se potom separuje, suší se nad MgSO₄ a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Po chromatografii (silikagel: vymývání směsí 50% Dri Solv THF/EtOAc a potom 4% MeOH/THF) se frakce zkoumají pomocí MS. Vhodné frakce se lyofilizují pro získání sloučeniny DZ (38,8 mg, 41%).

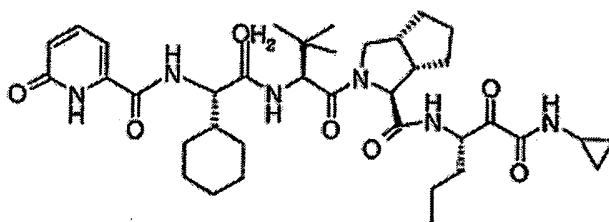


Příklad 38

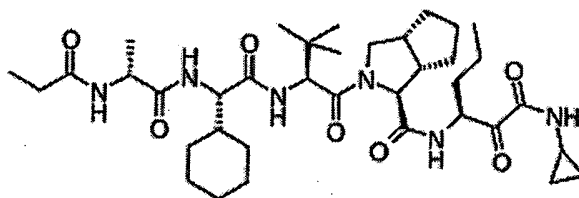
Sloučeniny EA-EB:

Výchozí sloučenina clxxxxv (185 mg, 0,26 mmolů) se rozpustí v THF (20 ml). Potom se přidá činidlo DMP (219 mg, 0,52 mmolů). Po míchání za teploty okolí po 1 hodinu TLC ukazuje úplnou přeměnu na keton (5% MeOH/THF). Reakční směs se odvede do separační nálevky obsahující Dri Solv THF (120 ml). Reakční směs se promývá 10% Na₂SO₃ (50 ml) a potom solným roztokem (75 ml). Organická vrstva se potom separuje, suší se nad MgSO₄ a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku pro získání rezidua, které se čistí chromatografií (silikagel: vymývání směsí 50% Dri Solv THF/EtOAc a potom 4% MeOH/THF) a frakce se kontrolují UV a

MS. Vhodné frakce se lyofilizují pro získání sloučeniny EA (159 mg, 88%).



Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučenina EB:

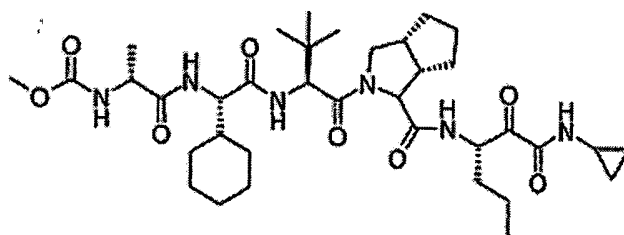


Příklad 39

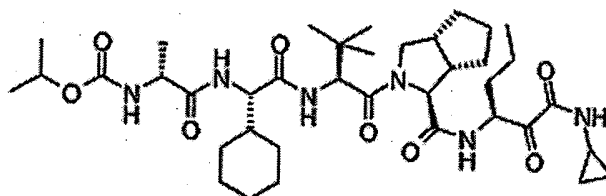
Sloučeniny EC-ED:

Do roztoku sloučeniny clxxxxviii (0,341 g, 0,503 mmolů) v DCM (15 ml) ochlazeného v ledové lázni se přidá činidlo DMP (0,277 g, 0,654 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin, potom se reakce zastaví pomocí 10% Na₂SO₃ roztoku a míchá po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí DCM (3x20 ml) a organický extrakt se suší

(MgSO₄). Po filtraci pro odstranění MgSO₄ se filtrát koncentruje a čistí se kolonovou chromatografií (70% EtOAc/Hexan) pro získání sloučeniny EC (0,183 g, 54%) ve formě bílé pevné látky.



Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučenina ED:

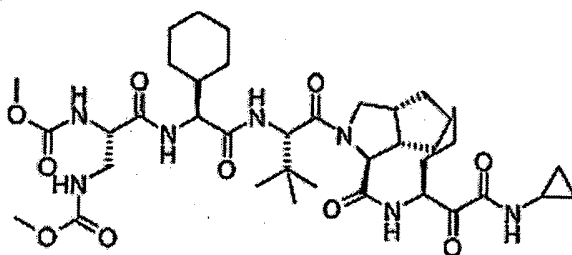


Příklad 40

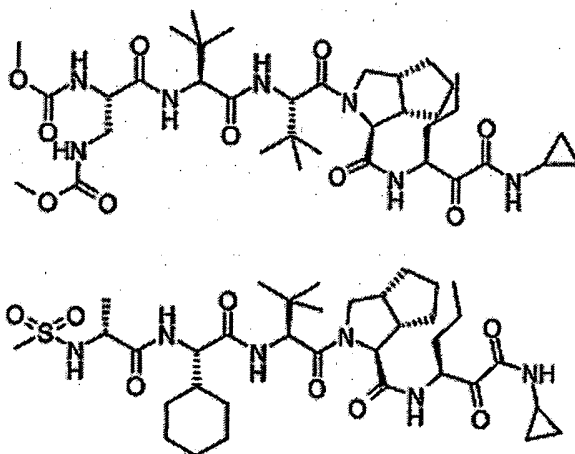
Sloučeniny BE-EG:

Sloučenina ccii (290 mg, 0,37 mmolů) se vyjme v DCM (5 ml). Činidlo DMP (175 mg, 0,41 mmolů) se přidá do tohoto roztoku a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví přidáním P-Na₂SO₃ (1,5 mmol/g pryskyřice) a míchá 1 hodinu. Reakce se zastaví a

čínidlo DMP se vychytává pomocí P-TBD (2,5 mmol/g pryskyřice) a míchá 1 hodinu. Výsledná směs se filtruje, proplachuje DCM před koncentrací na reziduum. Výsledné reziduum se čistí pomocí 50% EtOAc/Hex pro získání sloučeniny EE (440 mg, 28%).



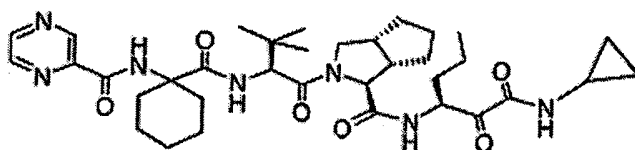
Postupující výše uvedeným způsobem pro přípravu výše uvedené sloučeniny a způsoby vztahujícími se k přípravě jejích meziproduktů, ale s použitím odpovídajících výchozích materiálů se připraví následující sloučeniny EF-EG:



Příklad 41

Sloučenina EH:

Do DCM roztoku (3 ml) sloučeniny cciii (140 mg, 0,2 mmolů) se přidá činidlo DMP (133 mg, 0,3 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin a reakce se zastaví přidáváním 10% Na₂SO₃ (vodný) po dobu 20 minut. Výsledná směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem, suší se nad MgSO₄, koncentruje na žlutý olej, které se čistí silikagelem (70% EtOAc/hexan) a potom lyofilizuje pro získání sloučeniny EH (50 mg, 38%).

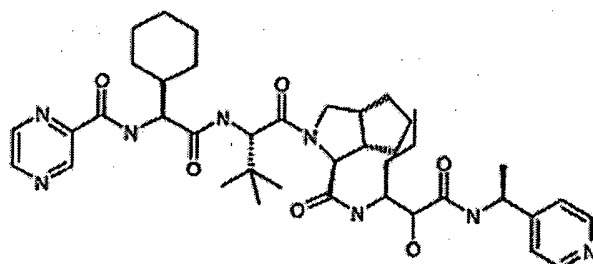


Příklad 42

Sloučenina EJ

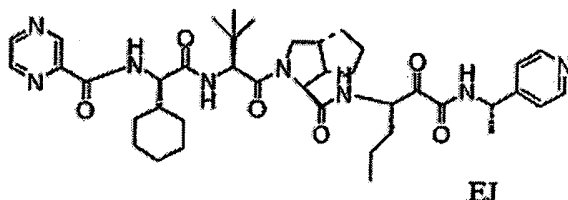
Sloučenina ixixiii (520 mg, 1 mmolů) se vyjme v DCM (5 ml), do výše uvedeného roztoku se přidá PyBOP (624 mg, 1,2 mmolů) a míchá po dobu 5 minut. Sloučenina cdviii (300 mg, 1,2 mmolů) v THE (5 ml) se přidá po kapkách do tohoto roztoku, následovaní DIPEA (0,22 ml, 1,2 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc pod dusíkovou atmosférou. V tomto okamžiku se reakční směs zředí EtOAc, promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze

se suší nad MgSO_4 , filtruje a koncentruje pro získání surového meziproduktu cdix.



cdix

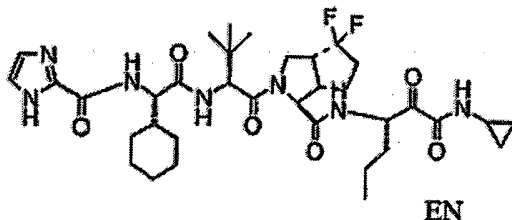
Tento meziprodukt cdix (~1 mmolů) se vyjme v DCM (10 ml). Do tohoto roztoku se přidá Dess-Martin periodinan (466 mg, 1,1 mmolů). Po míchání po 1 hodinu za teploty okolí se reakce zastaví pomocí polymerově vázaného Na_2SO_3 (740 mg, 1,5 mmolů DMP/g pryskyřice) a míchá 45 minut. Potom se reakční směs vychytává polymerově vázanou TBD pryskyřicí (440 mg, 2,5 mmol DMP/g pryskyřice). Výsledná směs se míchá po dobu 45 minut a potom filtruje. Čištění je dosaženo ve směsi 5% EtOH/EtOAc pro získání sloučeniny EJ (245 mg, 32% ve dvou krocích). Reference z literatury pro závěrečné zpracování může být nalezena v Tetrahedron 55 (1999) 6785-6796.



Příklad 43

Sloučenina EN

Meziproduktová sloučenina cdvii (415 mg, 0,59 mmolů) se vyjme v DCM (10 ml) a THF (10 ml). Přidá se t-BuOH (300 μ l), následovaný Dess-Martinovým periodinánem (750 mg, 1,77 mmolů). Reakční směs se míchá 50 minut a potom se reakce zastaví pomocí P- Na_2SO_3 (1,5 mmol DMP/g pryskyřice). Po míchání po dobu 20 minut za teploty okolí se reakční směs vychytává pomocí P-TBD (2,5 mmol DMP/g pryskyřice). Po míchání po 1 hodinu se výsledná směs filtruje a koncentruje. Produkt se čistí chromatografií na silikagelu (50% to 70% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny EN (220 mg, 53%).



07.04.03

Hmotnostní spektra [M] byla získána pro následující sloučeniny jak je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1	
Příklad	Nalezená hmotnost
A	733,3
B	747,2
C	657,2
D	769,4
E	733,4
F	625,4
G	639,3
H	661,4
I	643,4
J	707,3
K	641,3
L	689,3
M	639,3
N	639,4
O	731,4
P	687,4
Q	653,4
R	701,4
S	639,3
T	747,1
U	655,4
V	653,4
W	703,4
X	661,3

07.04.03

Y	647,3
Z	663,3
AA	667,4
AB	711,4
AC	725,4
AD	647,3
AE	779,4
AF	689,3
AG	671,4
AK	806,4
AH	687,5
AI	735,4
AJ	736,5
AM	870,4
AN	813,3
AP	724,4
AQ	653,4
AR	628,2
AW	642,2
AX	614,2
AY	628,3
BD	570,3
BE	520,2
BF	534,3
BG	584,3
BU	890,3
BV	685,4
BW	679,3
BX	695,3
BY	697,3

07.04.03

BZ	787,4
CA	701,3
CB	669,4
CC	733,5
CD	643,3
CE	653,5
CH	749,4
CI	653,3
CJ	717,5
CK	683,4
CL	669,3
CM	675,2
CN	717,2
CO	653,3
CP	683,3
CQ	669,3
CR	675,2
CT	661,8
CS	639,3
CU	679,2
CV	709,3
CW	743,3
CX	695,3
CY	665,2
CZ	681,3
DA	695,3
DB	701,2
DC	673,3
DD	693,3
DE	757,4

07.04.03

DF	682,3
DG	676,3
DH	676,2
DI	692,5
DJ	605,2
DK	874,4
DL	924,5
DM	924,2
DN	952,7
DO	830
DP	842,5
DT	667,4
DU	639,2
DV	740,3
DW	684,2
DX	678,5
DY	749,3
DZ	685,3
EA	649,3
EB	700,3
EC	702,3
ED	730,3
EE	775,3
EF	749,3
EG	722,3
EH	665,2
EI	796,4
EJ	744,3
EK	730,5
EL	730,5

07.04.03

EM	757,3
EN	703,5
EO	715,5
EP	679,2
EQ	651,3
ER	715,3
ES	668,5
ET	732,5
EU	743,3
EV	683,3
EW	750,4
EX	786,4
EY	744,5
EZ	780,4
FB	693,4
FC	655,3
FD	655,3
FE	774,4
FF	681,5
FG	667,5

Hmotová spektroskopie s vysokým rozlišením (HRMS) dala následující hodnoty pro získané sloučeniny, uvedené v Tabulce 2.

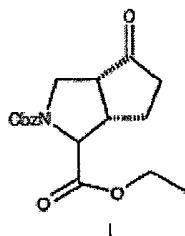
Tabulka 2

Příklad	Molekulární vzorec	Vypočteno MS	Nalezena hmotnost
	(M+1)	(M+1)	(M+1)
L	C37H52N7O6	690,3979	690,3986
M	C33H50N7O6	640,3822	640,3822
Z	C32H48F2N7O6	664,3634	664,3627
AB	C36H48F2N7O6	712,3634	712,3649
CE	C34H52N7O6	654,3979	654,3967
EN	C35H52N7O6F2	704,3947	704,3945
EK	C37H63N6O8S	751,4428	750,4350 (M)
EC	C36H59N6O8	703,4395	703,4382
CA	C35HSON7O6F2	702,3790	702,3801
EZ	C40H55N8O6F2	781,4213	781,4196
EU	C36H52N7O6F2	716,3947	716,3929
CY	C35H52N7IO6	666,3979	666,3966
BX	C37H58N7O6	696,4448	696,4432
S	C33H50N7O6	640,3823	640,3831
BW	C36H54N7O6	680,4136	680,4126
CU	C36H54N7O6	680,4136	680,4128
EJ	C40H57N8O6	745,4401	745,4417
EM	C35H54N7O6	668,4136	668,4139
Žádný	C41H58N7O6	744,4448	744,4691

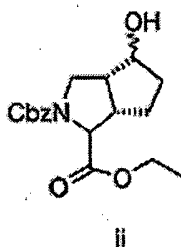
Příklad meziprojektu 1

Sloučenina ii

Do ethanolového roztoku (40 ml) sloučeniny i (8,1 g, 24,4 mmolů) se přidá NaBH₄



(924 mg, 24,4 mmolů) za teploty -10°C . Reakční směs se míchá za této teploty po dobu 30 minut a potom se reakce zastaví pomocí AcOH (3 ml). Reakční směs se zředí pomocí EtOAc (250 ml) a promývá se NaHCO_3 a solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (50% EtOAc/hexan) pro získání 7,85 g (97%) sloučeniny ii,

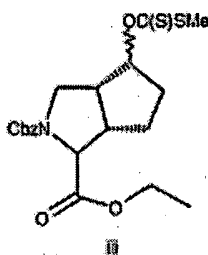


Příklad meziproduktu 2

Sloučenina iii

Do THF roztoku (70 ml) sloučeniny ii (4,48 g, 13,4 mmolů) se přidá za teploty 0°C NaH (699 mg, 60%, 17,42 mmolů). Po míchání za této teploty po dobu 40 minut se přidá bezvodý MeI (1,25 ml, 20,1 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakce opatrně

zastaví nasyceným roztokem NH_4Cl za teploty $0\text{ }^\circ\text{C}$. Reakční směs se extrahuje pomocí Et_2O a EtOAc . Organická vrstva se promývá vodou, solným roztokem a suší nad Na_2SO_4 . Takto získaná organická vrstva se koncentruje ve vakuu pro získání xanthátové sloučeniny iii,

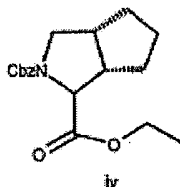


Příklad meziprojektu 3

Sloučenina iv

Xanthátová sloučenina iii ($\sim 13,4$ mmolů) se rozpustí v toluenu (100 ml). Do tohoto roztoku se přidá AIBN (216 mg, 1,34 mmolů). Výsledný roztok se odplyní suchým dusíkem a potom se zpracovává $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$ (5,4 ml, 20,1 mmolů). Reakční směs se zahřívá na teplotu $90\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hodin.

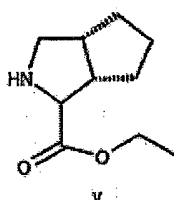
V tomto okamžiku se reakční směs ochladí na teplotu okolí a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (15-20% EtOAc /hexan) pro získání 2,8 g (66% celkově ze sloučeniny ii) sloučeniny iv,



Příklad meziprojektu 4

Sloučenina v

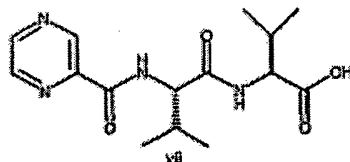
Do ethanolového roztoku (21 ml) sloučeniny iv (1 g, 3,15 mmolů) se přidá $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (655 mg, 20%, 0,95 mmolů) pod proudem dusíku. Výsledná reakční směs se vystaví standardní hydrogenaci (1,5 atm). Po 5 hodinách se zdroj vodíku odstraní a reakční směs se filtruje. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání volné aminové sloučeniny v,



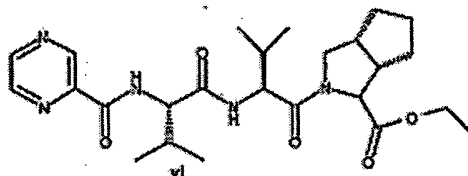
Příklad meziprojektu 5

Sloučenina vi

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny vii (629 mg, 1,95 mmolů)



se přidá za zhruba teploty okolí HOAt (265 mg, 1,95 mmolů), následovaný 1 M DCC roztokem v DCM (1,95 ml, 1,95 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut se přidá DCM roztok (3 ml) sloučeniny v (1,5 mmolů) do výše uvedené HOAt-aktivované kyseliny. Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs filtruje přes Celit. Filtráty se zředí pomocí EtOAc (75 ml) a promývají vodou a solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (70-80% EtOAc/hexan) pro získání 620 mg (85%) sloučeniny vi,

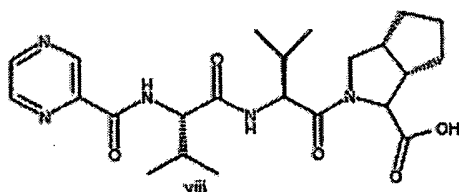


Příklad meziprojektu 6

Sloučenina viii

Do ethanolového roztoku (10 ml) sloučeniny vi (615 mg, 1,26 mmolů) se přidá 2 N NaOH vodný roztok (1,26 ml, 2,52 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí a potom okyselí na pH 3 použitím kyselých pryskyřic Dowex. Pevné látky se odfiltrují a filtráty se koncentrují

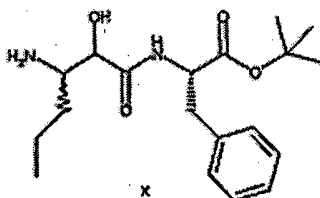
ve vakuu pro získání rezidua, které se znovu rozpustí ve směsi 1: 1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$. Tento roztok se vystaví lyofilizaci pro získání 495 mg (85%) sloučeniny viii,



Příklad meziprojektu 7

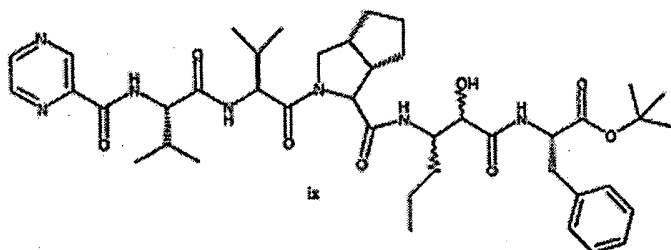
Sloučenina ix

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny viii (230 mg, 0,5 mmolů) se přidá PyBop (417 mg, 0,8 mmolů). Reakční směs se míchá



zhruba při teplotě okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá THF roztok (5,25 ml) sloučeniny x (263 mg, 0,75 mmolů) a následovaný DIPEA (0,174 ml, 1 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (30 ml) po dobu 30 minut. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc (100 ml). Organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí

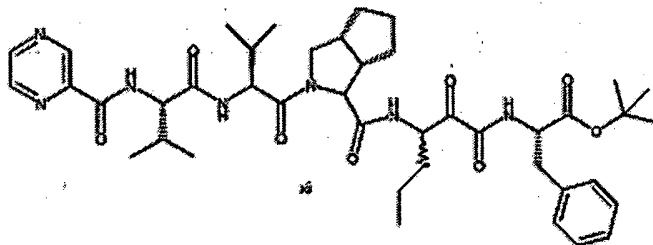
chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání
~400 mg (100%) sloučeniny ix,



Příklad meziproduktu 8

Sloučenina xi

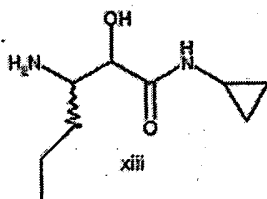
Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny ix (396 mg, 0,5 mmolů) se přidá činidlo DMP (278 mg, 0,65 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po 1 hodinu a potom se reakce zastavuje pomocí 10% Na₂SO₃ po dobu 30 minut. Reakční směs se potom extrahuje pomocí EtOAc (75 ml) a promývá solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (70% EtOAc/hexan) pro získání 320 mg (81%) sloučeniny xi,



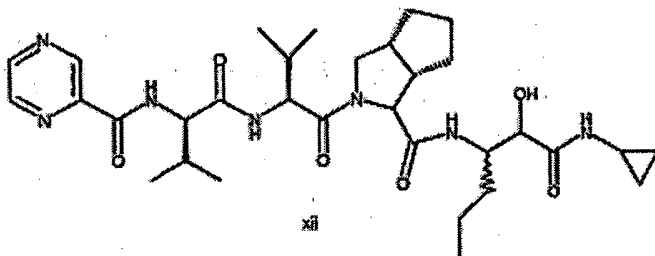
Příklad meziprojektu 9

Sloučenina xii

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny viii (230 mg, 0,5 mmolů) se přidá PyBop (417 mg, 0,8 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá THF roztok (3,5 ml) sloučeniny xiii



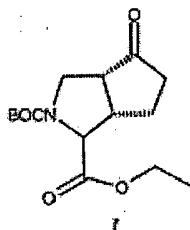
(140 mg, 0,75 mmolů) a následovaný DIPEA (0,174 ml, 1 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (30 ml) po dobu 30 minut. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc (75 ml). Organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání kvantitativního výtěžku sloučeniny xii,



Příklad meziproduktu 10

Sloučenina i'

Do methanolového roztoku (30 ml) sloučeniny i (5 g, 15,1 mmolů) se přidá $(\text{BOC})_2\text{O}$ (3,3 g, 15,1 mmolů) a $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (1,6 g, 10% obsah Pd). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a potom filtruje přes Celit dvakrát. Celitový polštář se proplachuje DCM. Zkombinované filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání olejovitého rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (40% EtOAc/hexan) pro získání 3,8 g (85%) sloučeniny i',

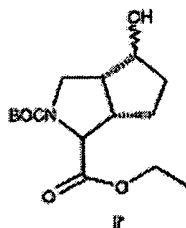


Příklad meziproduktu 11

Sloučenina ii'

Do methanolového roztoku (111 ml) sloučeniny i' (3,7 g, 12,5 mmolů) se přidá za teploty 0 °C NaBH_4 (0,805 g, 21 mmolů). Po míchání za teploty 0 °C po dobu 2,5 hodin se reakční rozpouštědlo pomalu odpařen za vakua pro získání rezidua, které se zředí EtOAc. Tento roztok se potom promývá dvakrát vodou. Vodná vrstva se extrahuje pomocí EtOAc. Zkombinované organické vrstvy se sušení nad MgSO_4 a filtrují a koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které

se čistí chromatografií pro získání 3,76 g (99%) sloučeniny ii',



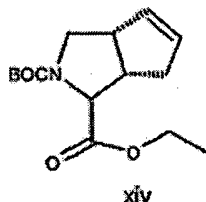
Příklad meziproduktu 12

Sloučenina xiv

Do DCM roztoku (180 ml) sloučeniny ii' (3,76 g, 12,3 mmolů) se přidá za teploty 0 °C

DMAP (5 g, 40,1 mmolů) potom následovaný Tf₂O (4 ml, 23,7 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty 0 °C po 1 hodinu a zhruba při teplotě okolí po další 1,5 hodiny. Reakční směs se potom promývá dvakrát 5% NaHCO₃ a suší nad MgSO₄. Takto získaná organická vrstva se koncentruje ve vakuu pro získání surového triflátu. Výsledný triflát (2,7 g, 6 mmolů) se rozpustí v DCM (120 ml). Do tohoto roztoku se přidá DMAP (2. 5 g, 20,5 mmolů). Výsledná reakční směs se zahřívá na teplotu zpětného toku přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs ochladí na teplotu okolí a promývá dvakrát 5% NaHCO₃. Reakční směs se suší nad MgSO₄, filtruje a koncentruje ve vakuu pro získání hnědavého olejovitého rezidua, které se čistí (1% MeOH/DCM) pro získání 500 mg (30%) sloučeniny xiv,

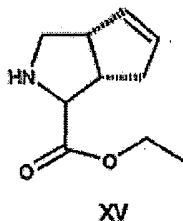
07.04.03



Příklad meziproduktu 13

Sloučenina xv

Sloučenina xiv (500 mg, 1,8 mmolů) se rozpustí v 4 N HCl v dioxanu (6,75 ml). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí asi 4 hodiny. V tomto okamžiku se rozpouštědlo odstraní ve vakuu. Výsledné reziduum se titruje dvakrát diethyletherem pro získání takřka kvantitativního výtěžku HCl soli sloučeniny xv,

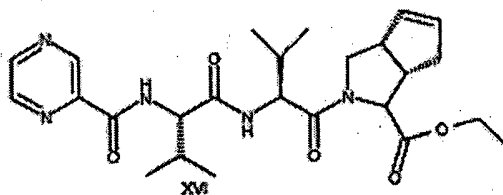


Příklad meziproduktu 14

Sloučenina xvi

Do THF roztoku (7 ml) sloučeniny vii (579 mg, 1,8 mmolů) se přidá HOAt (245 mg, 1,8 mmolů) a DCC (1,8 ml, 1 M v DCM). Vznikne suspenze. Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 15 minut se do výše uvedené suspenze přidá THF roztok

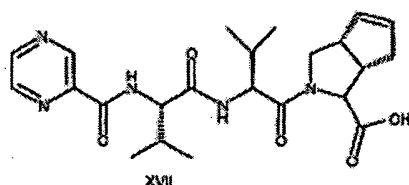
(6 ml) sloučeniny xv (1,8 mmolů) a DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmolů). Další DIPEA (0,8 ml) se přidá později. Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí. V tomto okamžiku se takto vytvořená bílá pevná látka odfiltruje. Bílá pevná látka se proplachuje THF. Zkombinované filtráty a promyté látky se koncentrují ve vakuu pro získání surového produktu, který se čistí chromatografií na silikagelu (100% EtOAc) pro získání 665 mg (76%) sloučeniny xvi,



Příklad meziproductu 15

Sloučenina xvii

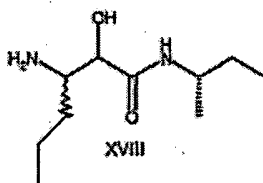
Do ethanolového roztoku (8 ml) of 7 (665 mg, 1,37 mmolů) se přidá 1 N vodný NaOH (2,4 mmolů) za teploty 0 °C. Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí a potom se okyselí na pH 3 použitím kyselých pryskyřic Dowex. Pevné látky se filtrují. Výsledné filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání bledě žlutého rezidua, které se znovu rozpustí ve směsi 1:1 CH₃CN/H₂O a lyofilizuje se pro získání 467 mg (74%) sloučeniny xvii,



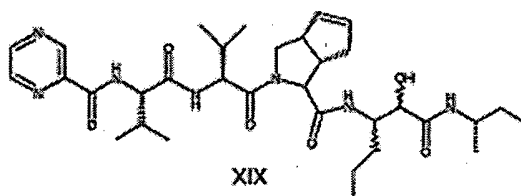
Příklad meziproduktu 16

Sloučenina xix

DCM roztok (4 ml) sloučeniny xvii (100 mg, 0,22 mmolů) se zpracovává PyBop (207 mg, 0,4 mmolů) zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut. V tomto okamžiku se výše uvedený roztok zpracovává THF roztokem (2,6 ml) sloučeniny xviii (65 mg, 0,32 mmolů), následovaný DIPEA



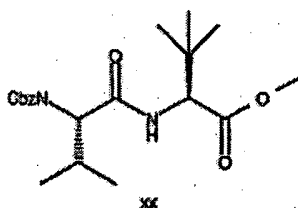
(0,076 ml). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 7 hodin se reakce zastaví vodou. Reakční směs se zředí pomocí DCM (60 ml). Organická vrstva se separuje a promývá dvakrát solným roztokem a suší nad MgSO_4 . Po filtraci, koncentraci a chromatografii na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) se získá 148 mg (~100%) sloučeniny xix.



Příklad meziproduktu 17

Sloučenina xx

Do THF roztoku (100 ml) N-Cbz-L-valinu (14,4 g, 57,2 mmolů) se přidá HOBt (7,72 g, 57,2 mmolů) a EDCI (10,98 g, 57,2 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se přidá do výše uvedeného roztoku THF roztok (50 ml) obsahující hydrochlorid methylesteru terc.-L-leucinu (10,4 g, 57,2 mmolů) a DIPEA (11,9 ml, 68,7 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Po standardním vodném zpracování a chromatografii na silikagelu (30% EtOAc/hexan) se obdrží 14 g (64%) sloučeniny xx.

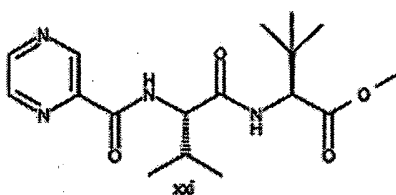


Příklad meziproduktu 18

Sloučenina xxi

07.04.03

Do methanolového roztoku (80 ml) xx (6,71 g, 17,7 mmolů) se přidá (pod proudem N₂) Pd/C (1,88 g, 10% obsah Pd). Reakční nádobka se vystaví hydrogenaci (1 atm H₂) přes noc zhruba při teplotě okolí. V tomto okamžiku se reakční směs filtruje přes vrstvu Celitu a koncentruje ve vakuu pro získání odpovídající surového volného aminu pro následující krok. THF roztok tohoto aminu (~17,7 mmolů) se přidá do THF (46 ml) a DMF (5 ml) roztoku obsahujícího 2-pyrazinkarboxylovou kyselinu (2,85 g, 23 mmolů), Hobbit (3,12 g, 23 mmolů) a EDCI (4,41 g, 23 mmolů). Do výsledné směsi se potom přidá DIPEA (3,08 g, 17,7 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí a potom se reakce zastaví vodou. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (40-50% EtOAc/hexan) pro získání 3,9 g (63%) sloučeniny xxi,

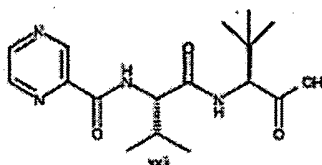


Příklad meziprojektu 19

Sloučenina xxii

Do methanolového roztoku (40 ml) sloučeniny xxi (4,67 g, 13,34 mmolů) se přidá 2 N NaOH (10 ml, 20 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin. V

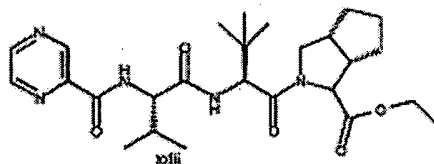
tomto okamžiku se přidá do reakční směsi dodatečné množství 2 N NaOH (3,3 ml, 6,67 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se reakční směs okyselí na pH 3 použitím kyselé pryskyřice. Reakční směs se potom filtruje a filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se rozpustí v 1: 1 CH₃CN/H₂O po lyofilizaci. Získá se 4,15 g (93%) sloučeniny xxii.



Příklad meziproduktu 20

Sloučenina xxiii

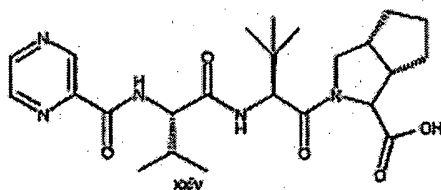
DCM roztok (10 ml) sloučeniny xxii (917 mg, 2,73 mmolů) se zpracovává HOAt (371 mg, 2,73 mmolů) a DCC (2,73 ml, 1 M, 2,73 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (10 ml) sloučeniny v (500 mg, 2,73 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se bílé pevné látky (močovina) filtrují. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (60-70% EtOAc/hexan) pro získání 1,06 g (77%) sloučeniny xxiii,



Příklad meziproduktu 21

Sloučenina xxiv

Ethanolový roztok (20 ml) sloučeniny xxiii (1,06 g, 2,11 mmolů) se zpracovává 2 N NaOH (2,11 ml, 4,23 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se reakční směs okyselí na pH 3 kyselou pryskyřicí. Pevné látky se odfiltrují. Výsledné filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se lyofilizuje pro získání g (100%) sloučeniny xxiv,

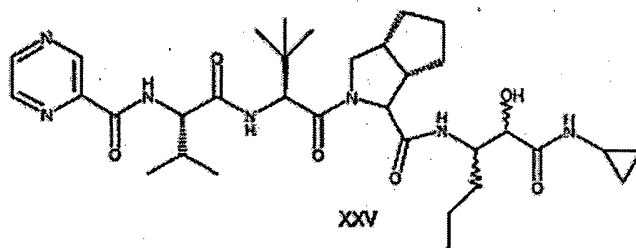


Příklad meziproduktu 22

Sloučenina xxv

DCM roztok (10 ml) sloučeniny xxiv (236,7 mg, 0,5 mmolů) se zpracovává PyBop (417 mg, 0,8 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se reakční směs zpracovává DMF roztokem (5,6 ml) sloučeniny xiii (139,5 mg, 0,75

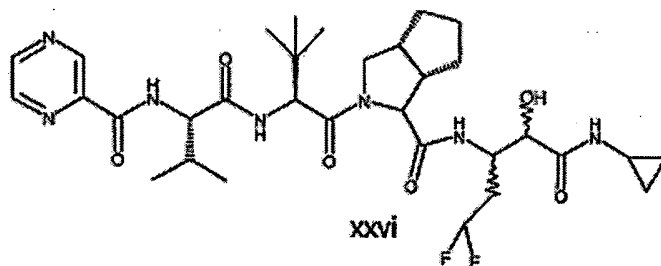
mmolů), následovaným DIPEA (0,174 ml, 1 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 8 hodin se reakce zastaví vodou a směs se extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání ~320 mg (100%) sloučeniny xxv,



Příklad meziproduktu 23

Sloučenina xxvi

DCM roztok (15 ml) sloučeniny xxiv (355 mg, 0,75 mmolů) se zpracovává PyBop (622 mg, 1,2 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (10 ml) sloučeniny xxvii' (156 mg, 0,75 mmolů), následovaným DIPEA (0,26 ml, 1,5 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se reakce zastaví vodou a reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (2% EtOH/EtOAc) pro získání ~400 mg (80%) sloučeniny xxvi,



Příklad meziproduktu 24

Methyl-5-kyanopentanoát

Kyanidddraselný (4 g, 61,44 mmolů) se rozpustí v 70 ml vody a 200 ml methanolu. Do roztoku se přidá 10 g (51,2 mmolů) methyl-5-brompentanoátu a směs se zahřívá na teplotu zpětného toku přes noc. Reakční směs se koncentruje do sucha. Do reziduum, 100 ml se přidá EtOAc pro extrakci produktu. Organická látka se promývá třikrát vodou, suší a koncentruje pro získání 5,37 g (74%) methyl-5-kyanopentanoátu ve formě oleje.

Příklad meziproduktu 25

Methyl-5-tetrazol-5-ylpentanoát

Methyl-5-kyanopentanoát (4,8 g, 34 mmolů) se rozpustí v toluenu, přidají se triethylamoniumchlorid (14 g, 102 mmolů) a azid sodný (6,63,102 mmolů). Směs se zahřívá na teplotu zpětného toku přes noc. Reakční směs se ochladí na teplotu okolí, se přidá voda pro extrahování (3x100 ml) methyl-5-tetrazol-5-ylpentanoátu z organické látky. Do

vodné fáze se přidá koncentrovaný HCl pro úpravu pH na hodnotu 2. Produkt se extrahuje z vodného roztoku pomocí EtOAc (3x50 ml). Organická látka se zkombinuje, suší a koncentruje pro získání 4,25 g (68%) methyl-5-tetrazol-5-ylpentanoátu.

Příklad meziproduktu 26

Methyl-5-[N-(1,1-dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanoát

Methyl-5-tetrazol-5-ylpentanoát (4,23 g, 23 mmolů) a trichloroctová kyselina (8,69 g, 53 mmolů) se rozpustí v 50 ml CHCl_3 . α -methylstyren (2,72,23 mmolů) se přidá do roztoku po kapkách a reakční směs se ponechá za míchání zhruba při teplotě okolí přes noc. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc na 200 ml a organická vrstva se promývá 10% vodným KOH a solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje. Produkt se čistí mžikovou kolonovou chromatografií pro získání 6,6 g (95%) methyl-5-[N-(1,1dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanoátu.

Příklad meziproduktu 27

5-[N-(1, 1-dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanová kyselina

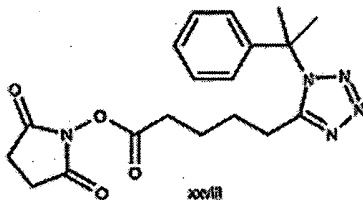
Methyl-5-[N-(1,1-dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanoát (6,6 g, 21,8 mmolů) se rozpustí v methanolu (100 ml) a přidá se 23 ml 1 N vodného NaOH. Směs se míchá přes noc a koncentruje pro odstranění methanolu. Reziduum se rozpustí ve vodě (100 ml) a roztok se neutralizuje přidáním ekvivalentu 1 N vodného HCl. Produkt se extrahuje pomocí EtOAc (3x50 ml). Organická látka se suší a koncentruje pro

získání 4,75 g (75%) 5-[N-(1,1-dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanové kyseliny.

Příklad meziproduktu 28

Sloučenina xxviii

5-[N-(1,1-dimethylbenzyl)tetrazol-5-yl]pentanová kyselina (4,75 g, 16,5 mmolů) se rozpustí v DCM (100 ml) a přidá se 4,8 g (24,8 mmolů) EDCI a 6 ml DIPEA. Do směsi se přidá N-hydroxysukcinimid (3,8 g, 33 mmolů). Reakční směs se míchá po tři hodiny zhruba při teplotě okolí. Směs se zředí pomocí DCM na 200 ml a roztok se promývá třikrát vodou. Organická látka se suší a koncentruje pro získání 4,79 g (75%) sloučeniny xxviii,

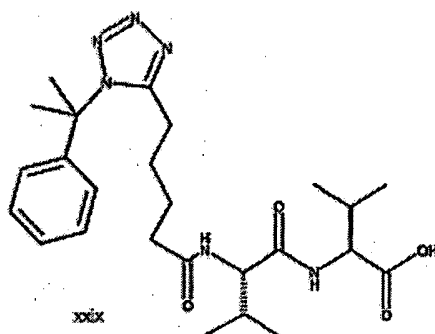


Příklad meziproduktu 29

Sloučenina xxix

Dipeptid H-Val-Val-OH (3,22 g, 14,9 mmolů) se suspenduje v 50 ml N,N-dimethylformamidu (DMF) a 4,75 g (12,42 mmolů) sloučeniny xxviii se přidá následovano adicí 3,4 ml (18,63 mmolů) diisopropylethylaminu (DIPEA). Směs se zahřívá na teplotu 40 °C a míchá se přes noc. Rozpouštědlo se odpaří

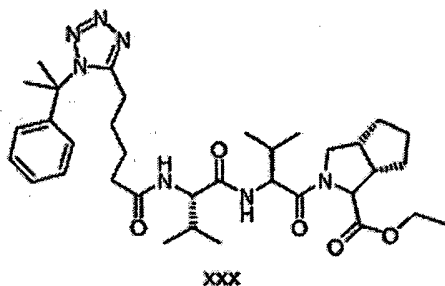
za vysokého vakua. Reziduum se rozpustí v EtOAc a promývá 1 N HCl a solným roztokem pro získání 5.52 g (91%) sloučeniny xxix,



Příklad meziproduktu 30

Sloučenina xxx

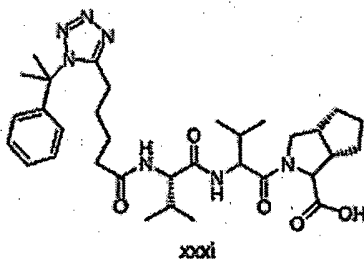
1,6 g (3,29 mmolů) sloučeniny xxix se rozpustí v 20 ml DCM, přidá se 3,3 ml 1 M roztoku DCC v THF. Do směsi se přidá 500 mg (2,73 mmolů) sloučeniny v. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Směs se zředí EtOAc na 100 ml a promývá 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem. Čištění kolonovou chromatografií (50% EtOAc/hexan) dává 1,02 g (58%) sloučeniny xxx,



Příklad meziprojektu 31

Sloučenina xxxi

Sloučenina xxx (1,02 g, 1,57 mmolů) se rozpustí v 10 ml MeOH a přidá se 2 ml 1 N vodného NaOH. Směs se míchá přes noc. Methanol se odstraní odpařením a reziduum se rozpustí ve vodě a neutralizuje 2 ml HCl. Po extrakci pomocí EtOAc se obdrží 1,00 g (~100%) sloučeniny xxxi.

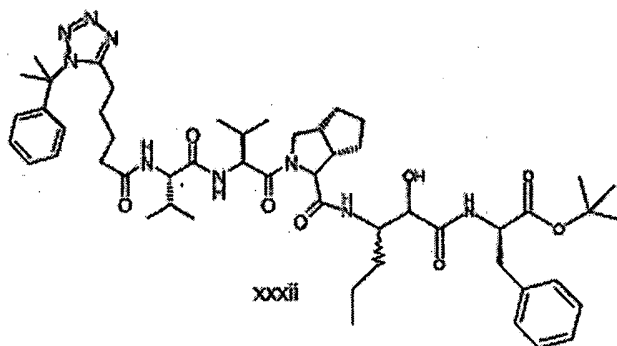


Příklad meziprojektu 32

Sloučenina xxxii

Sloučenina xxxi (300 mg, 0,48 mmolů) a PyBop (300 mg, 0,58 mmolů) se rozpustí v 10 ml DCM. Do roztoku se přidá sloučenina x (201 mg, 0,58 mmolů) a potom DIPEA (104 μ l).

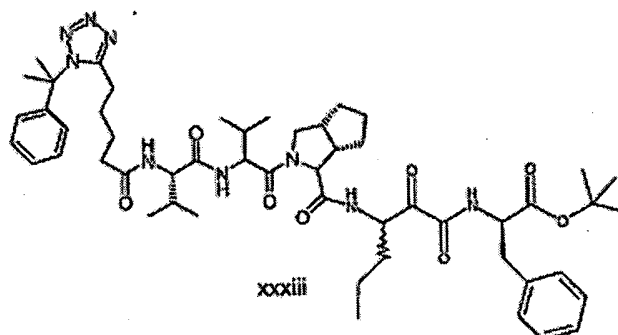
Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Reakční směs se potom zředí pomocí EtOAc na 100 ml a promývá dvakrát 1 N HCl, dvakrát NaHCO₃ a třikrát solným roztokem. Organická látka se suší a koncentruje. Reziduum se čistí kolonovou chromatografií (100% EtOAc) pro získání 450 mg (98%) sloučeniny xxxii,



Příklad meziprojektu 33.

Sloučenina xxxiii

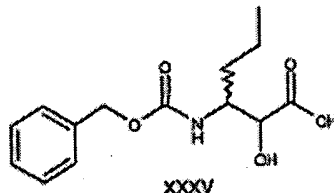
Sloučenina xxxii 360 mg (0,38 mmolů) se rozpustí v 8 ml DCM a přidá se 240 mg (0,57 mmolů) činidla DMP. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po tři hodiny. Směs se zředí EtOAc na 50 ml a promývá třikrát solným roztokem. Produkt se čistí kolonovou chromatografií (25% ethanol/EtOAc) pro získání 300 mg (83%) sloučeniny xxxiii,



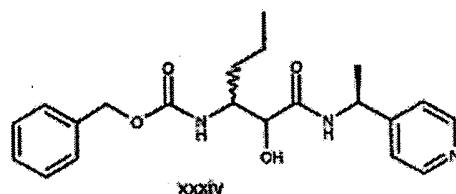
Příklad meziproduktu 34

Sloučenina xxxiv

Do DCM roztoku (10 ml) xxxv (790 mg, 2,80 mmolů) se přidá



PyBop (1,7 g, 3,36 mmolů) a Hobbit (450 mg, 3,36 mmolů). Výsledný roztok se ochladí na teplotu 0 °C a zpracovává DCM roztokem (3 ml) (s)- α -(4-pyridyl)ethylaminu (410 mg, 3,36 mmolů). To je následováno adicí DIPEA (0,5 ml, 3,36 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí. V tomto okamžiku se reakční směs zředí pomocí EtOAc. Celek se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Takto získaná organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání 630 mg (58%) sloučeniny xxxiv,

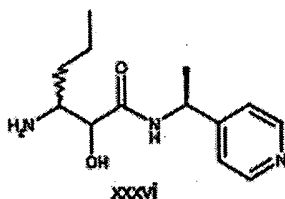


Upozornění: (s)- α -(4-pyridyl) ethylamin se získá z jeho D-vínanové soli promýváním báží (1 N NaOH) a následnou extrakcí EtOAc. Výtěžek je 89%.

Příklad meziproduktu 35

Sloučenina xxxvi

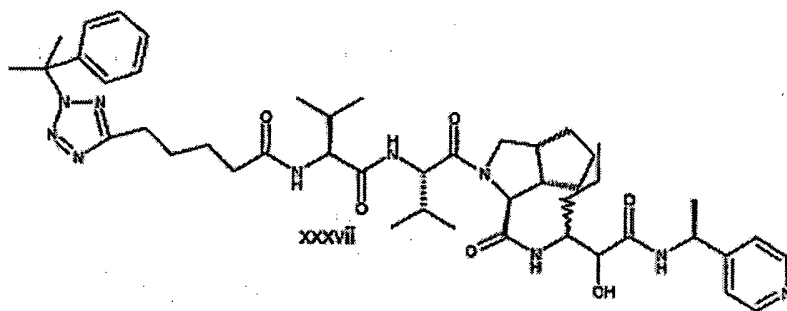
Do methanolového roztoku (15 ml) sloučeniny xxxiv (630 mg, 1,64 mmolů) se přidá pod dusíkovou atmosférou Pd/C (150 mg, 10% obsah paládia). Reakční směs se míchá pod vodíkovou atmosférou přes noc. Reakční směs se filtruje přes vrstvu Celitu® 521. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání 420 mg (~100%) sloučeniny xxxvi,



Příklad meziproduktu 36

Sloučenina xxxvii

Do DCM roztoku (3 ml) sloučeniny xxxi (270 mg, 0,43 mmolů) se přidá PyBop (270 mg, 0,52 mmolů). To je následováno přidáním sloučeniny xxxvi (160 mg, 0,64 mmolů) a DIPEA (0,09 ml, 0,52 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs zředí EtOAc a promývá 0,1N HCl, následovaným nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Výsledná organická vrstva se suší a koncentruje pro získání sloučeniny xxxvii (430 mg celková hmotnost) pro následující krok

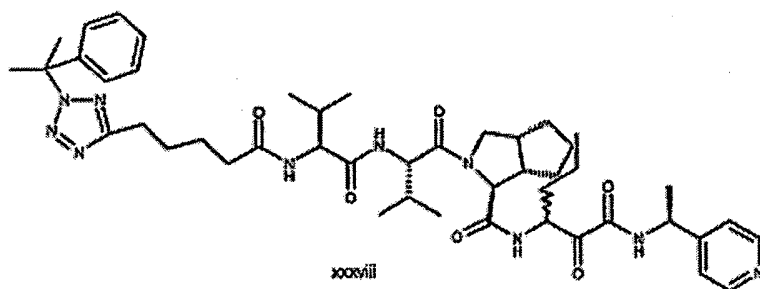


Příklad meziproduktu 37

Sloučenina xxxviii

Do DCM roztoku (3 ml) sloučeniny xxxvii (370 mg, 0,43 mmolů) se přidá činidlo DMP (280 mg, 0,65 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin a potom se reakce zastaví pomocí 10% Na₂SO₃. Po míchání po dobu 30 minut se reakční směs extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Výsledná organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií

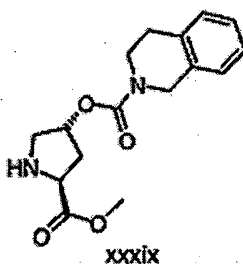
na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání 180 mg (49% pro dva kroky) sloučeniny xxxviii,



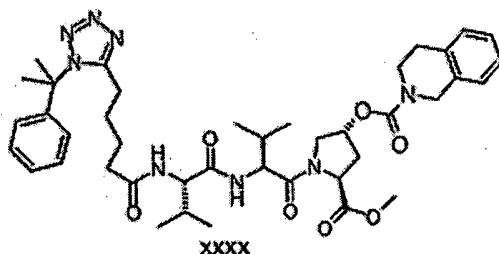
Příklad meziprojektu 38

Sloučenina xxxx

Sloučenina xxix (2,5 g, 5 mmolů) se rozpustí v 40 ml DCM, do roztoku se přidá 5,1 ml 1 M roztoku DCC v THF. Do směsi se přidá 1,08 g (3,53 mmolů) sloučeniny xxxix. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc.



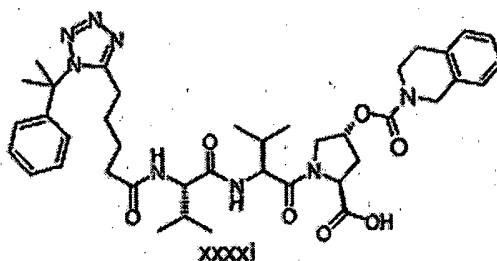
Směs se zředí EtOAc na 100 ml, promývá se postupně 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem a potom čistí kolonovou chromatografií (80% EtOAc/hexan) pro získání 2,59 g (95%) sloučeniny xxxx,



Příklad meziprojektu 39

Sloučenina xxxxi

Sloučenina xxxx (2,59g, 3,35 mmolů) se rozpustí v 20 ml MeOH a přidá se 4 ml 1 N vodného NaOH. Směs se míchá přes noc a potom rotačně odpaří a zanechá reziduum. Reziduum se rozpustí ve vodě a neutralizuje 2 ml HCl. Neutralizovaný roztok se potom extrahuje EtOAc pro získání 2,49 g (~100%) sloučeniny xxxxi,

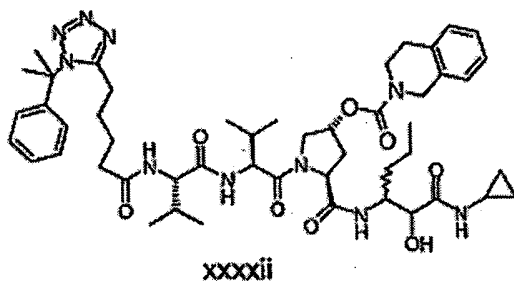


Příklad meziprojektu 40

Sloučenina xxxxii

Sloučenina xxxxi (847 mg, 1,16 mmolů) a 724 mg (1,39 mmolů) PyBop se rozpustí v 10 ml DCM. Do roztoku se přidá sloučenina xiii (260 mg, 1,39 mmolů) a potom následuje

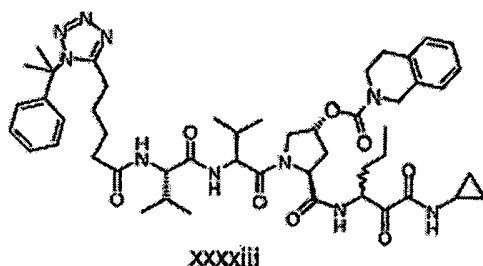
adice DIPEA (209 μ l). Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Reakční směs se potom zředí pomocí EtOAc na 100 ml a promývá dvakrát 1 N HCl, dvakrát NaHCO₃ a třikrát solným roztokem. Organická látka se suší a koncentruje. Reziduum se čistí kolonovou chromatografií (5% ethanol/EtOAc) pro získání 930 mg (86%) sloučeniny xxxxi,



Příklad meziprojektu 41

Sloučenina xxxxi

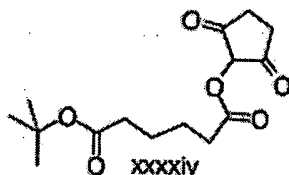
Sloučenina xxxxi (350 mg, 0,38 mmolů) se rozpustí v 10 ml DCM a přidá se 242 mg (0,57 mmolů) činidla DMP. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po tři hodiny. Směs se zředí EtOAc na 50 ml a promývá třikrát solným roztokem. Produkt se čistí kolonovou chromatografií (100% EtOAc) pro získání 180 mg (51%) sloučeniny xxxxi,



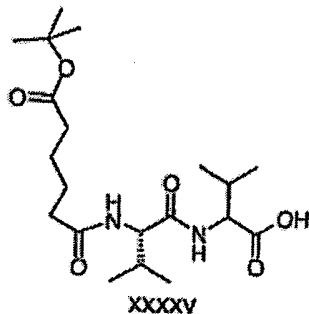
Příklad meziproduktu 42

Sloučenina xxxxv

H-Val-Val-OH (5 g, 23 mmolů) se suspenduje v 100 ml DMF, přidá se sloučenina xxxxiv



(8,3 g, 27,6 mmolů) a potom se přidá 6,2 ml (35,5 mmolů) DIPEA. Směs se míchá za teploty 40 °C po dva dny. Rozpouštědlo se odstraní za vysokého vakua a reziduum se rozpustí v 100 ml EtOAc a promývá třikrát 1 N HCl a dvakrát solným roztokem. Získá se 9,14 g (99%) sloučeniny xxxxv.

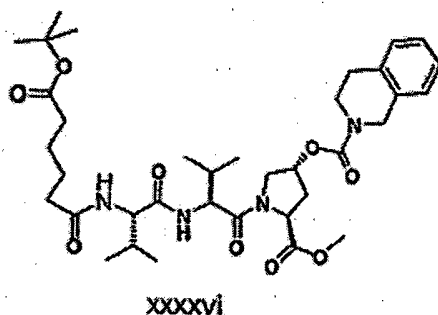


Příklad meziprojektu 43

Sloučenina xxxxiv

Sloučenina xxxxiv (2,8 g, 7 mmolů) a 954 mg (7 mmolů) HOAt se rozpustí v 100 ml

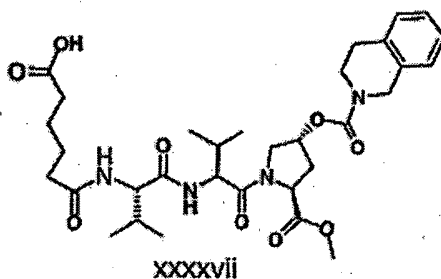
DCM. Přidá se 7 ml 1 M DCC/DCM. Do reakční směs se přidá sloučenina xxxix (2,15 g) a reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Směs se koncentruje do sucha a reziduum se rozpustí v EtOAc a čistí se kolonovou chromatografií (100% EtOAc) pro získání 4: 57 g (95%) sloučeniny xxxvii,



Příklad meziprojektu 44

Sloučenina xxxxvii

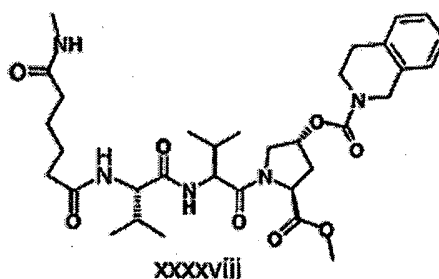
Sloučenina xxxxvi (4,57 g, 6,65 mmolů) se rozpustí v 10 ml TFA a 10 ml DCM. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 4 hodin. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a reziduum se rozpustí ve směsi 50:50 acetonitril/voda a lyofilizuje se pro získání sloučenina xxxxvii ve formě prášku



Příklad meziprojektu 45

Sloučenina xxxxviii

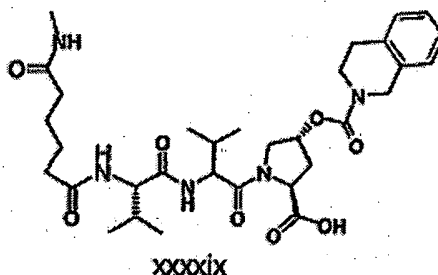
Sloučenina xxxxvii (1 g, 1,59 mmolů) a 990 mg (2,28 mmolů) PyBop se rozpustí v 20 ml DCM a přidá se 1,6 ml 1 M methylaminu v THF. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 4 hodin. Reakční směs se zředí na 100 ml EtOAc a promývá 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem. Reziduum se čistí mžikovou kolonovou chromatografií (10% EtOH/EtOAc) pro získání 1 g (98%) sloučeniny xxxxviii,



Příklad meziprojektu 46

Sloučenina xxxix

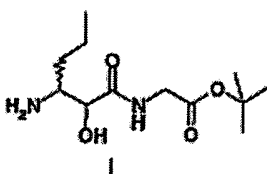
Sloučenina xxxviii (1 g, 1,55 mmolů) se rozpustí v 10 ml of MeOH a přidá se 2 ml 1 N NaOH. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Rozpouštědlo se odstraní odpařením. Reziduum se rozpustí ve vodě, neutralizuje a extrahuje EtOAc pro získání 960 mg (98%) sloučeniny xxxix,



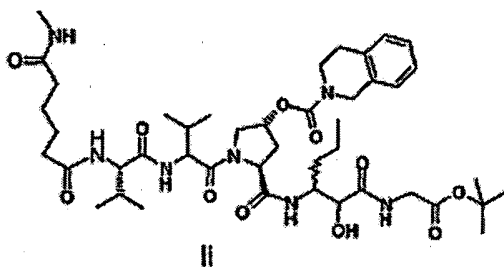
Příklad meziprojektu 47

Sloučenina li

mg, 0,6 mmolů) a 108 μ l DIPEA. Směs



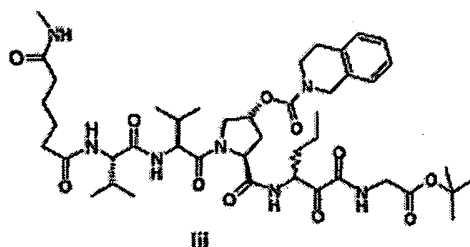
se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc a zředí se na 100 ml EtOAc a promývá 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem. Čištění kolonovou chromatografií (15% EtOH/EtOAc) umožní získání 400 mg (92%) sloučeniny li,



Příklad meziproduktu 48

Sloučenina lii

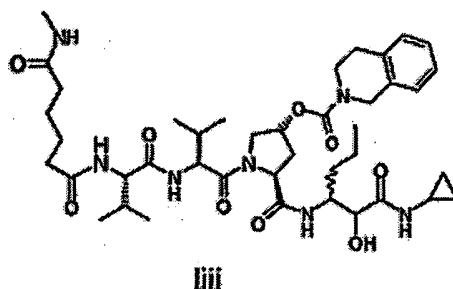
Sloučenina li (400 mg, 0,46 mmolů) se rozpustí v 10 ml of DCM a přidá se 292 mg (0,69 mmolů) činidlo DMP. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a produkt se čistí pomocí RP-HPLC pro získání 130 mg (32%) sloučeniny lii,



Příklad meziprojektu 49

Sloučenina liii

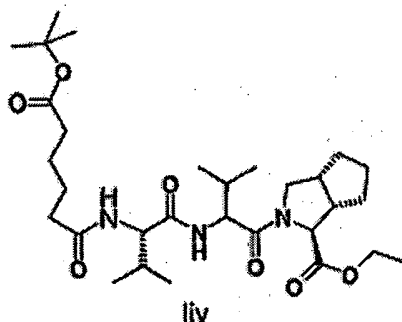
Sloučenina xxxix (210 mg, 0,33 mmolů) a 208 mg (0,4 mmolů) PyBop se rozpustí v 10 ml DCM. Sloučenina xiii (154 mg, 0,83 mmolů) se přidá do roztoku s následnou adicí DIPEA (72 μ l, 0,4 mmolů). Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Reakční směs se zředí na 100 ml pomocí EtOAc, promýván 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem a potom čistí mžikovou kolonovou chromatografií (10% EtOH/EtOAc) pro získání 250 mg (95%) sloučeniny liii,



Příklad meziprojektu 50

Sloučenina liv

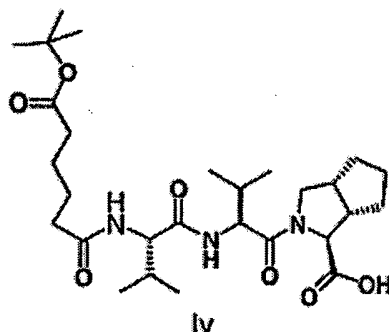
Sloučenina xxxv (755 mg, 1,88 mmolů) a 255 mg (1.88 mmolů) HOAt se rozpustí v 20 ml DCM. Přidá se 1,88 ml 1 MK DCC/DCM. Do reakční směs se přidá sloučenina v (288 mg) a reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Směs se koncentruje do sucha a reziduum se rozpustí v EtOAc a čistí se kolonovou chromatografií (80% EtOAc/hexan) pro získání 800 mg (90%) sloučeniny liv,



Příklad meziprojektu 51

Sloučenina lv

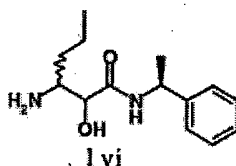
Sloučenina liv (800 mg, 1,41 mmolů) se rozpustí v 10 ml MeOH a přidá se 2 ml NaOH. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a reziduum se rozpustí ve vodě a neutralizuje 2 ml 1 N HCl. Produkt se extrahuje pomocí EtOAc. Odpaření extrakčního rozpouštědla dává 760 mg (~100%) lv,



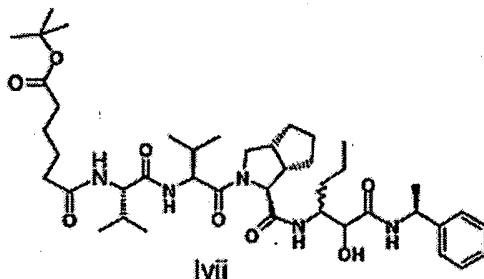
Příklad meziproduktu 52

Sloučenina lvii

Sloučenina lv (760 mg, 1,41 mmolů) a 880 mg (1,69 mmolů) PyBop se rozpustí v 5 ml DCM. Do roztoku se přidá sloučenina lvi (530 mg, 2,12 mmolů) a potom 0,31



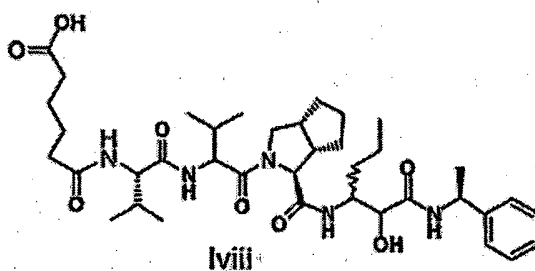
DIPEA. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Reakční směs se zředí na 100 ml pomocí EtOAc, promývá se 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem a potom čistí mžikovou kolonovou chromatografií (100% EtOAc) pro získání 870 mg (80%) sloučeniny lvii,



Příklad meziproduktu 53

Sloučenina lviii

Sloučenina lvii (350 mg, 0,45 mmolů) se rozpustí v 5 ml TFA a 5 ml DCM a směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a produkt se čistí pomocí RP-HPLC pro získání 220 mg (69%) sloučeniny lviii,

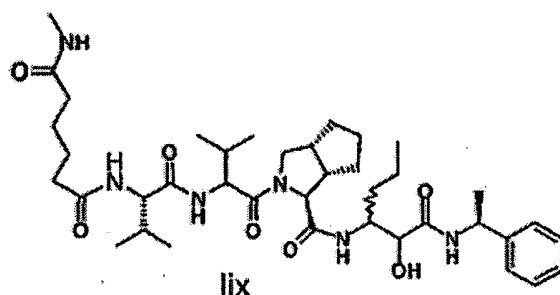


Příklad meziproduktu 54

Sloučenina lix

Sloučenina lviii (200 mg, 0,28 mmolů) a 218 mg (0,42 mmolů) PyBop se rozpustí v 5 ml DCM. Přidá se methylamin (0,28 ml 2 M v THF). Směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes

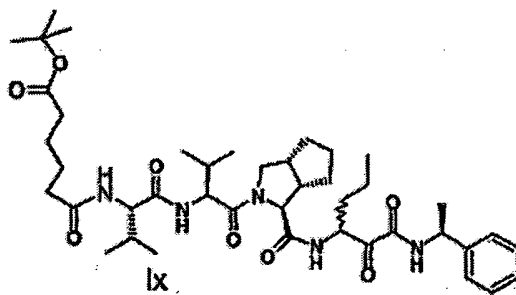
noc. Směs se zředí na 100 ml pomocí EtOAc, promýván 1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem a potom čistí kolonovou chromatografií (15% EtOH/EtOAc) pro získání 168 mg (79%) sloučeniny lix,



Příklad meziproduktu 55

Sloučenina lx

Sloučenina lviii (200 mg, 0,26 mmolů) se rozpustí v 4 ml DCM a přidá se 165 mg (0,39 mmolů) činidla DMP. Směs se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odstraní odpařením. Reziduum se rozpustí ve směsi 50% acetonitril/voda a čistí pomocí RP-HPLC pro získání 140 mg (70%) sloučeniny lx,



Příklad meziprojektu 56

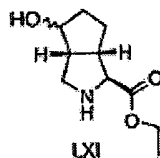
Sloučenina ii

DCM (30 ml) a EtOH (30 ml) roztok sloučeniny i (4 g, 12,1 mmolů) se pod dusíkovou atmosférou ochladí na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přidá se NaBH_4 (458 mg, 12,1 mmolů) a roztok se míchá při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 50 minut. TLC (50% EtOAc/Hexan) ukázala přeměnu na pomaleji běžící skvrnu. Reakce se opatrně zastaví přidáním ledu a potom studeného nasyceného roztoku NH_4Cl (10 ml). Směs je vleje do DCM (300 ml). Organická vrstva se promývá jednou nasyceným roztokem NH_4Cl (60 ml) a dvakrát solným roztokem (60 ml). Organická vrstva se potom separuje, suší se nad MgSO_4 a koncentruje ve vakuu pro získání 3,5 g sloučeniny ii (87%).

Příklad meziprojektu 57

Sloučenina lxi

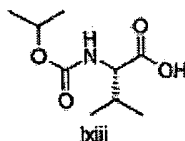
V 250 ml kulaté baňce vybavené H_2 balónem se ethanolový roztok (50 ml) sloučeniny ii (3,5 g, 10,5 mmolů) vystaví standardním hydrogenačním podmínkám [20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (1,47 g, 2,1 mmolů)] po dobu 5 hodin zhruba při teplotě okolí. Katalyzátor se odfiltruje přes Celit a promývá DCM. Rozpouštědlo se potom odstraní za sníženého tlaku pro získání 2 g (96%) sloučeniny lxi,



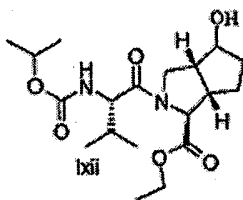
Příklad meziproduktu 58

Sloučenina lxii

Pod inertní atmosférou se roztok sloučeniny lxi (200 mg, 1 mmolů), sloučenina lxiii,



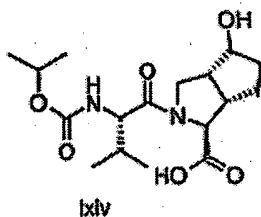
(233 mg, 1,1 mmolů), HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol) (156 mg, 1,15 mmolů) v bezvodém DMF (6 ml) míchá po dobu 20 minut. Teplotase potom sníží na 0 °C s následnou adicí DIC (0. 18 ml, 1,15 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí. Roztok se zředí EtOAc a potom promývá dvakrát 1 N HCl, dvakrát nasyceným vodný NaHCO₃ a solným roztokem. Organická vrstva se separuje, suší se nad MgSO₄ a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Reziduum se čistí chromatografií (silikagel: 70% EtOAc/DCM) pro získání sloučeniny lxii s 45% výtěžkem.



Příklad meziproduktu 59

Sloučenina **lxiv**

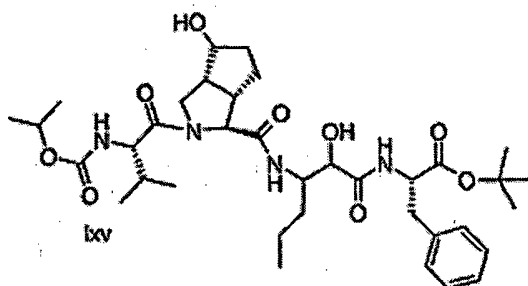
Roztok sloučeniny **lxii** (777 mg, 2 mmolů) v dioxanu (6 ml) a 0,5 M NaOH (6 ml) se míchá po dobu 5 hodin zhruba při teplotě okolí. Přezkoumání pomocí TLC (100% EtOAc) ukazuje úplnou přeměnu. Reakční směs se ochladí ledovou lázní s následnou adicí 1 N HCl (4 ml). Potom se přidá pevný NaCl a celá směs se extrahuje dvakrát EtOAc (2x150 ml). Organické extrakty se potom zkombinují, suší se nad MgSO₄ a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku pro získání sloučeniny **lxiv** s 92% výtěžkem.



Příklad meziproduktu 60

Sloučenina **lxv**

Pod inertní atmosférou se roztok sloučeniny x (203 mg, 0,58 mmolů), sloučeniny lxiv (276 mg, 0,775 mmolů), HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol) (126 mg, 0,93 mmolů) v bezvodém DMF (6 ml) míchá po dobu 20 minut. Teplota se potom sníží na 0 °C, s následnou adicí DIC (0,14 ml, 0,93 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí. Roztok se zředí pomocí EtOAc a potom promývá dvakrát 1 N HCl, dvakrát nasyceným vodným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická vrstva se separuje a suší nad MgSO₄ a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Reziduum se čistí chromatografií (silikagel: 50% EtOAc/DCM až 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH) pro získání sloučeniny lxv s 62% výtěžkem.

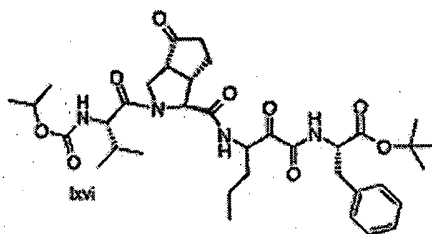


Příklad meziprojektu 61

Sloučenina lxvi

Pod inertní atmosférou se přidá do roztoku sloučeniny lxv (287mg, 0,42 mmolů) v bezvodém DCM (15 ml) činidlo DMP (605 mg, 1,43 mmolů). Reakční směs se míchá po dobu 2 hodin zhruba při teplotě okolí. (Poznámka: zdvojení množství činidla DMP a reakční doby je pro zajištění, aby obě alkoholové skupiny byly úplně oxidovány na odpovídající keto skupiny). Přezkoumání pomocí TLC (silikagel: 2%

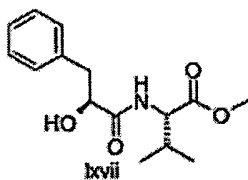
MeOH/EtOAc) ukazuje úplnou přeměnu na rychlejší produkt. Reakční směs se zředí DCM (150 ml) a potom promývá dvakrát 10% vodným roztok siřičitanu sodného (2X 50 ml), dvakrát nasyceným vodným NaHCO_3 a solným roztokem. Organická vrstva se separuje a suší se nad MgSO_4 a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Reziduum se čistí chromatografií (silikagel: 50% EtOAc/DCM až 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH) pro získání sloučeniny lxvi s 77% výtěžkem.



Příklad meziprojektu 62

Sloučenina lxvii

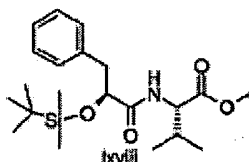
Do DCM roztoku (60 ml) L-3-fenylmléčné kyseliny (2 g, 12 mmolů) se přidá PyBOP (7,5 g, 14,4 mmolů). Do tohoto roztoku se přidá DCM roztok (20 ml) obsahující hydrochlorid methylesteru L-valinu (2,4 g, 14,4 mmolů) a DIPEA (2,6 ml, 14,4 mmolů). Výsledná reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí. V tomto okamžiku se reakční směs zředí EtOAc (30 ml), promývá se NaHCO_3 (30 ml) a solným roztokem (15 ml). Organická vrstva se suší nad Na_2SO_4 , filtruje a koncentruje. Čištění se provádí v 50% EtOAc/Hex na silikagelu pro získání 2,97 g (89%) sloučeniny lxvii,



Příklad meziproduktu 63

Sloučenina lxviii

Sloučenina lxvii (2,97 g, 10,6 mmolů) se vyjme v DCM (50 ml) a ochladí se ledovou lázní. Do tohoto roztoku se přidá TBSCl (2,1 g, 13,8 mmolů) následovaný imidazolem (0,94 g, 13,8 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc. Reakční směs se potom zředěn EtOAc (50 ml), promývá NaHCO_3 a solným roztokem. Organická vrstva se suší nad Na_2SO_4 , filtruje a koncentruje. Čištění se provádí ve směsi 20% EtOAc/hexan na silikagelu pro získání 3,79 g (90%) sloučeniny lxviii,

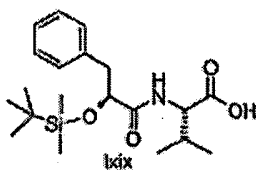


Příklad meziproduktu 64

Sloučenina lxix

Do methanolového (50 ml) roztoku sloučeniny lxviii (3,78 g, 9,6 mmolů) se přidá 1 N vodný NaOH (14,4 ml, 14,4 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc. Rozpouštědlo se částečně odstraní ve vakuu. pH reakční směsi se potom sníží na 3

použitím vodného roztoku 1 N HCl. Roztok se zředí EtOAc a solným roztokem. Požadovaný produkt se extrahuje pomocí EtOAc (3x50ml). Organické vrstvy se zkombinují, suší se nad Na₂SO₄, filtrují a koncentrují pro získání 3,5 g (96%) sloučeniny lxix,

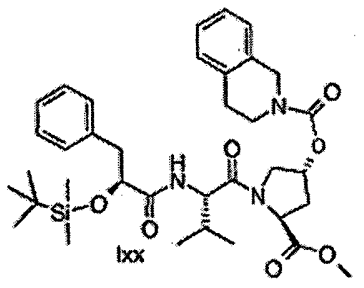


Příklad meziprojektu 65

Sloučenina lxx

Do DCM (15 ml) roztoku obsahujícího sloučeninu lxix (1,1 g, 2,9 mmolů) se přidá HOAt (0,44 g, 3,2 mmolů) následovaný 1 M roztokem DCC (3,2 ml, 3,2 mmolů) v DCM. Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se přidá DCM (15 ml) roztok sloučeniny xxxix (970 mg, 3,2 mmolů). Tato reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se potom zředí EtOAc (30 ml), filtruje přes vrstvu silikagelu, promývá 0,1 N HCl, NaHCO₃ a solným roztokem. Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, filtruje a koncentruje ve vakuu.

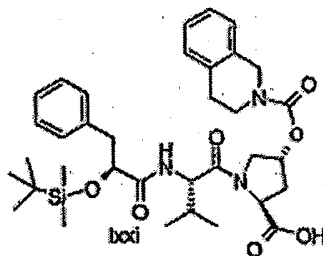
Čištění se provádí v 50% EtOAc/Hex na silikagelu pro získání 1,5 g (77%) sloučeniny lxx,



Příklad meziprojektu 66

Sloučenina lxxi

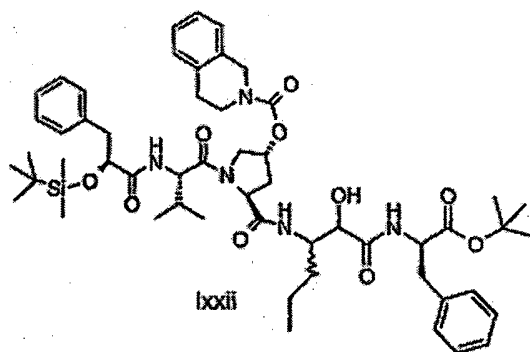
Do methanolového roztoku (30 ml) sloučeniny xx (1,5 g, 2,4 mmolů) se přidá 1 N vodný NaOH (3,6 ml, 3,6 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc. V tomto okamžiku se rozpouštědlo částečně odstraní a pH reakční směsi se upraví na 3 použitím 1 N vodný HCl. Reakční směs se potom zředí EtOAc (50 ml) a solným roztokem (20 ml). Vodná vrstva se extrahuje pomocí EtOAc (3x50 ml). Organická vrstvy se zkombinují, suší se nad Na₂SO₄, filtrují a koncentrují pro získání 1,3 g (92%) sloučeniny lxxi,



Příklad meziprojektu 67

Sloučenina lxxii

Do roztoku DCM (2 ml) obsahujícího sloučeninu lxxi (180 mg, 0,28 mmolů) se přidá PyBOP (175 mg, 0,34 mmolů) a DIPEA (0,06 ml, 0,34 mmolů), následované DCM roztokem (3 ml) sloučeniny x (150 mg, 0,41 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se potom zředí EtOAc (30 ml), promývá NaHCO_3 a solným roztokem. Organická vrstva se suší nad Na_2SO_4 , filtruje a koncentruje. Čištění se provádí v 100% EtOAc na silikagelu pro získání 270 mg (98%) sloučeniny lxxii,

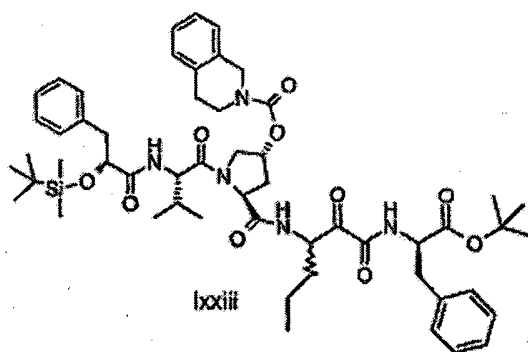


Příklad meziprojektu 68

Sloučenina lxxiii

Do DCM (3 ml) roztoku sloučeniny lxxii (270 mg, 0,27 mmolů) se přidá činidlo DMP (140 mg, 0,33 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 1,5 hodin se reakce zastaví pomocí 10% Na_2SO_3 (10 ml). Reakční směs se zředí EtOAc (30 ml) a míchá po dobu 10 minut. Organická vrstva se promývá NaHCO_3 a solným roztokem. Organická vrstva se suší

nad Na_2SO_4 , filtruje a koncentruje. Čištění se provádí v 60% EtOAc/hexan pro získání 150 mg (56%) sloučeniny lxxiii,



Příklad meziprojektu 69

Sloučenina lxi

Do ethanolového roztoku (50 ml) sloučeniny ii (3,5 g, 10,5 mmolů) se přidá pod proudem dusíku $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (1,47 g, 20% obsah Pd, 2,1 mmolů). Reakce se vystaví hydrogenaci pod tlakem 1 atm. Po ukončení se katalyzátory filtrují přes vrstvu

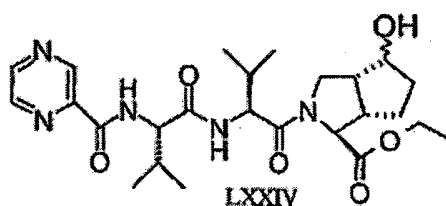
Celitu a promývají dichlormethanem. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání 2 g (96%) sloučeniny lxi.

Příklad meziprojektu 70

Sloučenina lxxiv

Do DMF roztoku (60 ml) sloučeniny vii (9,1 g, 28,2 mmolů) se přidá HOAt (4 g, 29,4 mmolů) a 1,3-diisopropylkarbodiimid (3,7 g, 29,4 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 30 minut se přidá do výše

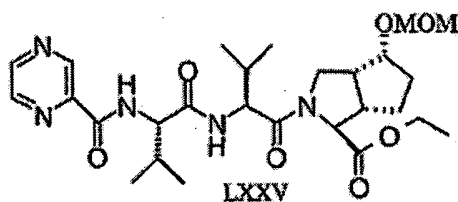
uvedeného roztoku DMF roztok (10 ml) sloučeniny lxi (5,1 g, 25,6 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se bílé pevné látky odfiltrují. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu pro získání 9,5 g (67%) sloučeniny lxxiv,



Příklad meziprojektu 71

Sloučenina lxxv

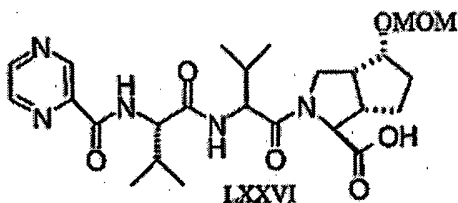
Do roztoku sloučeniny lxxiv (1,5 g, 3 mmolů) v bezvodém THF (25 ml) se přidá Et_2NPr_2 (0,78 ml, 4,5 mmolů) zhruba při teplotě okolí. Směs se ochladí na teplotu 0 °C a po kapkách se přidá MOMCl (1,5 ml, 19,7 mmolů). Reakční směs se ponechá zahřát se na teplotu okolí a míchá se přes noc. Roztok se potom zředí etherem a promývá vodou (3 krát). Vodné vrstvy se extrahují dále etherem a všechny organické vrstvy se suší se nad MgSO_4 před koncentrací pro získání žlutého oleje. Požadovaný isomer sloučeniny lxxv se izoluje chromatografií na silikagelu ($\text{EtOAc}/\text{hexan}$ 5/2) s 40% výtěžkem s jasnou separací diastereomerů.



Příklad meziprojektu 72

Sloučenina lxxvi

Do roztoku sloučeniny lxxv (502 mg, 0,9 mmolů) v EtOH (5 ml) se po kapkách přidá 2 N vodný NaOH (0,9 ml, 1,8 mmolů) za teploty 0 °C. Reakční směs se ponechá zahřát se na teplotu okolí a míchá se přes noc. Po ukončení saponifikace se roztok okyselí na pH 3 kyselou pryskyřicí Dowex 50W8X-200. Pevné látky se odfiltrují a výsledný filtrát se koncentruje ve vakuu pro získání olejovitého rezidua, které se lyofilizuje pro získání 370 mg (80 %) sloučeniny lxxvi,

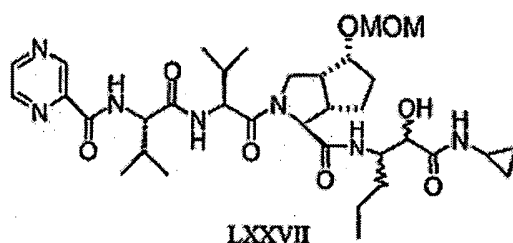


Příklad meziprojektu 73

Sloučenina lxxvii

Dichlormethanový roztok (4 ml) sloučeniny lxxvi (110 mg, 0,21 mmolů) se zpracovává PyBOP (200 mg, 0,38 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 30 minut, se

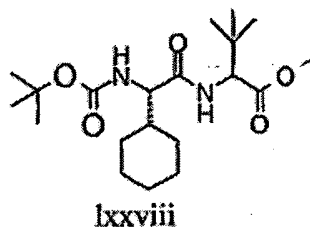
reakční směs vloží do THF roztoku (3,2 ml) sloučeniny xiii (60 mg, 0,32 mmolů), následované $\text{Et}_3\text{Pr}_2\text{N}$. Po míchání přes noc zhruba při teplotě okolí se reakce zastaví vodou a reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO_4 před koncentrací na žlutý olej. Čištění chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) dává 143mg (100%) sloučeniny lxxvii,



Příklad meziproduktu 74

Sloučenina lxxviii

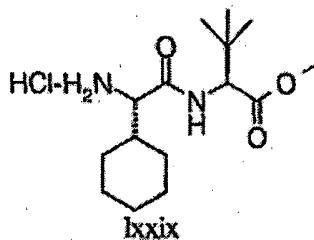
Do THF roztoku (50 ml) H-Chg-OH 2 (5 g, 19,4 mmolů) se přidá HOBt (2,63 g, 19,4 mmolů) a EDCI (3,72 g, 19,4 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se přidá do výše uvedeného roztoku THF (19 ml) a DMF (10 ml) roztok obsahující hydrochlorid methylesteru terc.-L-leucinu (19,4 mmolů) a DIPEA (6,75 ml, 38,8 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. Standardní vodné zpracování a chromatografie na silikagelu (15-20% EtOAc/Hexans) poskytuje 2,27 g (30%) sloučeniny lxxviii,



Příklad meziprojektu 75

Sloučenina lxxix

Do THF roztoku (12 ml) sloučeniny lxxviii (2,27 g, 5,91 mmolů) se přidá 4 N HCl roztok v dioxanu (7,38 ml, 29,5 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se rozpouštědlo odstraní za sníženého tlaku pro získání sloučeniny lxxix, která se používá přímo pro další reakci.

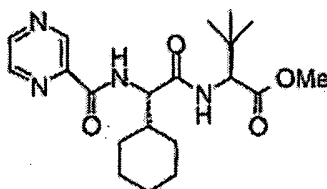


Příklad meziprojektu 76

Sloučenina lxxx

Do THF roztoku sloučeniny lxxix (5,9 mmolů) se přidá THF (20 ml) roztok obsahující 2-pyrazinkarboxylovou kyselinu (878 mg, 7,08 mmolů), HOBT (957 mg, 7,08 mmolů) a

EDCI (1,36 g, 7,08 mmolů). Do výsledné směsi se potom přidá DIPEA (2,05 ml, 11,8 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí a potom se reakce zastaví vodou. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (40-50% EtOAc/hexan) pro získání 1 g (36%) sloučeniny lxxx,

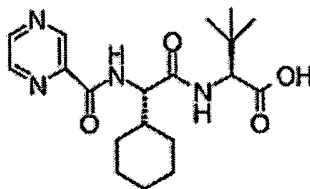


lxxx

Příklad meziproduktu 77

Sloučenina lxxxi

Do methanolového roztoku (20 ml) sloučeniny lxxx (1 g, 2,56 mmolů) se přidá 2. N NaOH 3,2 ml, 6,4 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs okyselí na pH 3 použitím 5 N HCl. Reakční směs se zředí EtOAc (75 ml) a promývá vodou a solným roztokem. Takto získaná organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se rozpustí v 1: 1 směsi CH₃CN/H₂O po lyofilizaci. Celkově se získá 1 g (100%) sloučeniny lxxxi.



lxxxi

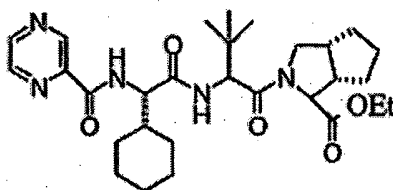
Příklad meziproduktu 78

Sloučenina lxxxii

Dichlormethanový roztok (10 ml) sloučeniny lxxxi (2,56 mmolů) se zpracovává

HOAt (348 mg, 2,56 mmolů) a DCC (2,56 ml, 1M, 2,56 mmolů).

Po míchání po dobu 30 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (5 ml) sloučeniny v (2,56 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se bílé pevné látky (močovina) odstraní by filtrací. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu pro získání 1,4 g (100%) sloučeniny lxxxii,

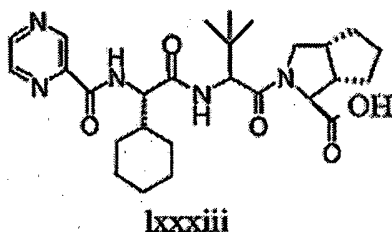


lxxxii

Příklad meziproduktu 79

Sloučenina lxxxiii

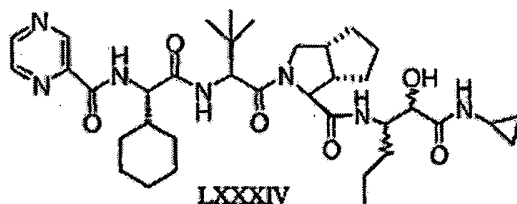
Ethanolový roztok (15 ml) sloučeniny lxxxii (1,4 g, 2,58 mmolů) se zpracovává pomocí 2 N NaOH (2,58 ml, 5,17 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí přes noc se reakční směs okyselí na pH 3 kyselou pryskyřicí. Pevné látky se odfiltrují. Výsledné filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se lyofilizuje pro získání 1,32 g (~100%) sloučeniny lxxxiii,



Příklad meziprojektu 80

Sloučenina lxxxiv

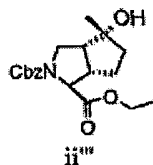
Dichlormethanový roztok (15 ml) sloučeniny lxxxiii (360 mg, 0,7 mmolů) se zpracovává pomocí PyBOP (582 mg, 1,12 mmolů). Po míchání zhruba při teplotě okolí po dobu 20 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (10 ml) sloučeniny xiii (195,6 mg, 1,05 mmolů), následovaným DIPEA (0,25 ml, 1,40 mmolů). Po míchání přes noc zhruba při teplotě okolí se reakce zastaví vodou a reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (3% EtOH/EtOAc) pro získání 420 mg (88%) sloučeniny lxxxiv,



Příklad meziproduktu 81

Sloučenina ii'''

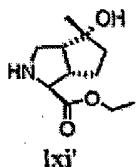
Směs bezvodého dichlormethanu a etheru (20 ml:20 ml) se ochladí na teplotu -78°C pod dusíkovou atmosférou (g). Do roztoku se přidá TiCl_4 (1 M v dichlormethanu, 10 ml, 10 mmolů) a potom se následně přidává MeLi (1,4 M v etheru, 7,1 ml, 10 mmolů) za míchání po dalších 30 minut za teploty -78°C . Roztok sloučeniny i (2 g, 6 mmolů) v 10 ml dichlormethan se přidá do směsi po kapkách za stejné teploty během 15 minut. Roztok se pomalu zahřívá na -40°C po 10 minut a potom se míchá za teploty 0°C po dobu 2 hodin. Reakce se zastaví vlitím směsi do směsi voda/ether (1: 1) a potom se vrstvy ponechají oddělit. Vodná vrstva se dále extrahuje dvakrát etherem. Všechny organické vrstvy se promývají vodou, solným roztokem a suší se nad MgSO_4 před koncentrací na žlutý olej. Požadovaná sloučenina ii''' se izoluje chromatografií na silikagelu (EtOAc/hexan 2/1) s 83% výtěžkem.



Příklad meziproduktu 82

Sloučenina lxi'

Do sloučeniny ii''' (1,7 g, 5 mmolů) se přidá 10 % hmot. Pd/C (0,53 g, 0,5 mmolů), následované adicí MeOH (17 ml). Plynný vodík se profukuje reakční směs a plynný vodík se udržuje v reakci za teploty 1 atm přes noc. Reakční směs se potom filtruje a koncentruje pro získání 929 mg (87%) sloučeniny lxi' ve formě bezbarvého oleje.

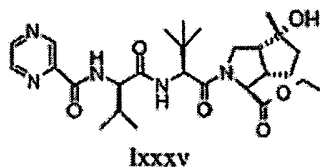


Příklad meziproduktu 83

Sloučenina lxxxv

Do THF roztoku (16 ml) sloučeniny xxii (1 g, 3 mmolů) se přidá zhruba při teplotě okolí HOAt (0,41 g, 3 mmolů) a následovaný 1 M DCC roztokem dichlormethanu (3 ml, 3 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut zhruba při teplotě okolí se do výše uvedené HOAt-aktivované kyseliny přidá dichlormethanový roztok (6 ml) sloučeniny lxi'. Reakční

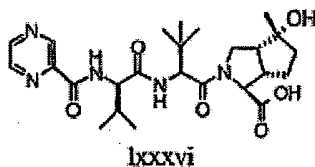
směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs filtruje přes Celit. Filtrát se zředí EtOAc (120 ml) a promývá vodou a potom solným roztokem. Organická vrstva se suší a koncentruje na žlutý olej, který se čistí chromatografií na silikagelu (100% EtOAc) pro získání 1 g (65%) sloučeniny lxxxv,



Příklad meziprojektu 84

Sloučenina lxxxvi

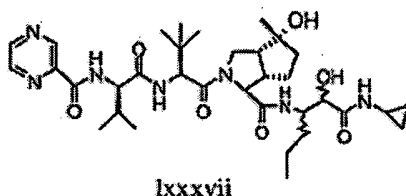
Do ethanolového roztoku (8 ml) sloučeniny lxxxv (920 mg, 1,7 mmolů) se přidá 2 N NaOH vodný roztok (1,7 ml, 3,4 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc zhruba při teplotě okolí a potom se okyselí na pH 3 kyselou pryskyřicí Doves. Pevné látky se odfiltrují a filtrát se koncentruje pro získání bezbarvého oleje, který se znovu rozpustí v 1: 1 CH₃CN/H₂O a lyofilizuje se pro získání 800 mg (93%) sloučeniny lxxxvi. HPLC ukazuje jediný produktový pík.



Příklad meziprojektu 85

Sloučenina lxxxvii

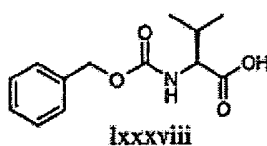
Do dichlormethanového roztoku (4 ml) sloučeniny lxxxvi (150 mg, 0,3 mmolů) se přidá PyBOP (250 mg, 0,47 mmolů). Roztok se míchá zhruba při teplotě okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá THF (4,5 ml) roztok sloučeniny xiii (84 mg, 0,45 mmolů) následovaný Et₃Pr₂N (0,1 ml, 0,6 mmolů). Reakční směs se míchá zhruba při teplotě okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (25 ml) po dobu 30 minut. Směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO₄ před koncentrací na žlutý olej. Čištění chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) dává 200 mg (100%) sloučeniny lxxxvii,



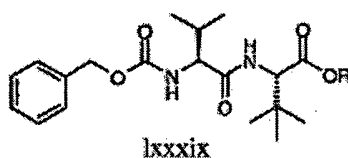
Příklad meziprojektu 86

Sloučenina lxxxix

Sloučenina lxxxviii, N-Cbz-L-valin, (2,5 g, 9,9 mmolů) se vyjme v THF (30 ml).



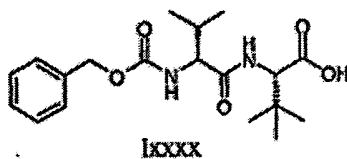
Přidají se EDCI (2,29 g, 11,9 mmolů) a HOBt (1,62 g, 11,9 mmolů) a směs se míchá pět minut. Přidá se hydrochlorid methylesteru L-terc.-leucinu (2,17 g, 11,9 mmolů) v THF (23,9 ml) následovaný DIPEA (2.,1 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí ethylacetátem, promývá se 1 N HCl, nasyceným hydrogenuhlíčitanem sodný a solným roztokem. Organická fáze se suší nad síranem sodným, filtruje a koncentruje. Koncentrované reziduum se čistí ve směsi 25% ethylacetát/hexan pro získání 1,1 g (29%) sloučeniny lxxxix,



Příklad meziprojektu 87

Sloučenina lxxxx

Sloučenina lxxxix se hydrolyzuje za standardních podmínek použitím methylalkoholu (0,3 M) a 1 N NaOH (1,5 ekv.) pro získání 1,03 g (95%) sloučeniny lxxxx,

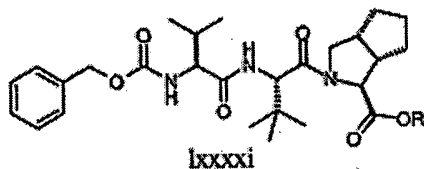


07.04.03

Příklad meziproduktu 88

Sloučenina lxxxxi

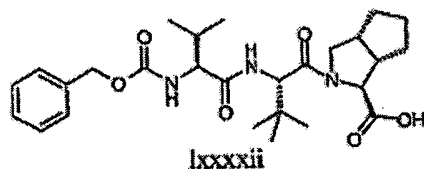
Sloučenina lxxxx (385mg, 1,06 mmolů) se vyjme v dichlormethanu (3 ml). Přidá se DCC (1,4 mmolů) následovaný HOAt (190 mg, 1,4 mmolů). Sloučenina v (260 mg, 1,4 mmolů) se potom přidán v dichlormethanu (3 ml). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí ethylacetátem, filtruje se přes silikagel a koncentruje. Reziduum se čistí ve směsi 50% ethylacetát/hexan pro získání 440 mg (80%) sloučeniny lxxxxi,



Příklad meziproduktu 89

Sloučenina lxxxxii

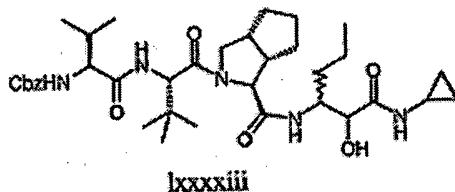
Sloučenina lxxxxi se hydrolyzuje za standardních podmínek použitím ethylalkoholu (0,3 M) a 1 N NaOH (1,5 ekv.) pro získání 390 mg sloučeniny lxxxxii,



Příklad meziproduktu 90

Sloučenina lxxxxiii

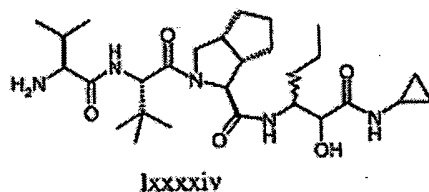
Sloučenina lxxxxii (350 mg, 0,7 mmolů) se vyjme v dichlormethan (3 ml). Přidá se PyBOP (480 mg, 0,91 mmolů) následovaný sloučeninou xiii (170 mg, 0,91 mmolů). Přidá se DIPEA (0,16 ml, 0,91mmol) a reakční směs se míchá přes noc. Reakční směs se koncentruje a čistí se v 100% ethylacetátu pro získání 420 mg (90%) sloučeniny lxxxxiii,



Příklad meziproduktu 91

Sloučenina lxxxxiv

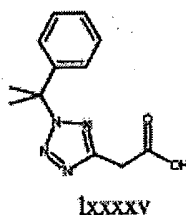
Sloučenina lxxxxiii se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (1% molů) v methylalkoholu pod vodíkovou atmosférou pro získání 335 mg (100%) sloučeniny lxxxxiv,



Příklad meziproduktu 92

Sloučenina lxxxxv

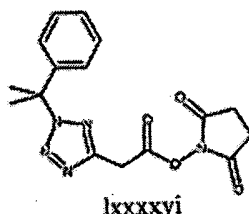
Ethyl-1H-tetrazol-5-acetát (5 g, 32 mmolů) se vyjme v chloroformu (80 ml). Přidá se trichloroctová kyselina (12,03 g, 73,65 mmolů) následovan alfa-methylstyrenem (3,78 g, 32 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc. Následující den se roztok zředí ethylacetátem, promývá 10% KOH a solným roztokem. Organická fáze se suší nad síranem hořečnatým, filtruje a koncentruje pro získání 8 g (96%) odpovídajícího N-chráněného ethyl-tetrazol-5-acetátu. Tento materiál se vystaví standardním podmínkám hydrolýzy použitím ethylalkoholu (0,3 M) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání 7 g (99%) sloučeniny lxxxxv,



Příklad meziproduktu 93

Sloučenina lxxxxvi

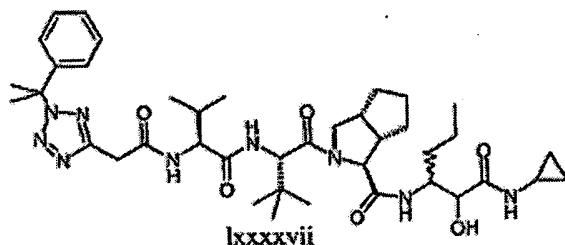
Sloučenina lxxxxv (3,62 g, 14,7 mmolů) se vyjme v dichlormethan (50 ml). Přidají se EDCI (4,32 g, 22,1 mmolů) a DIPEA (5,1 ml, 29,4 mmolů) a míchají se pět minut. Přidá se N-hydroxysukcinimid (3,38 g, 29,4 mmolů) a míchá se tři hodiny. Reakční směs se zředí dichlormethanem a promývá třikrát vodou. Organická fáze se suší nad síranem sodným, filtruje a koncentruje pro získání 3,66 g (73%) sloučeniny lxxxxvi,



Příklad meziprojektu 94

Sloučenina lxxxxvii

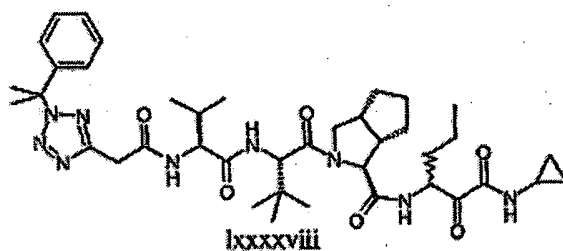
Sloučenina lxxxxiv (335 mg, 0,62 mmolů) a sloučenina lxxxxvi (343 mg, 1 mmolů) se vyjmou v dichlormethanu (6 ml). Přidá se DIPEA (0,17 ml, 1 mmolů) a reakční směs se míchá přes noc. Reakční směs se zředí ethylacetátem, promývá nasyceným hydrogenuhličitanem sodným, solným roztokem a koncentruje. Reziduum se čistí v 5% esměsi ethylalkohol/ethylacetát pro získání 80 mg (16%) sloučeniny lxxxxvii,



Příklad meziproduktu 95

Sloučenina lxxxxviii

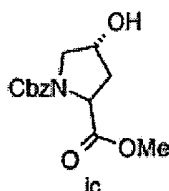
Sloučenina lxxxxvii (80 mg, 0.1 mmol) se vyjme v dichlormethanu (3 ml). Přidá se činidlo DMP (55 mg, 0.13 mmolů) a míchá se jednu hodinu. Reakční směs se zředí ethylacetátem a reakce se zastaví přidáním 10% roztoku siřičitanu sodného. Organická fáze se promývá nasyceným hydrogenuhličitanem sodným a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje a vzniklé reziduum se čistí v 100% ethylacetátu pro získání 40 mg (48%) sloučeniny lxxxxviii,



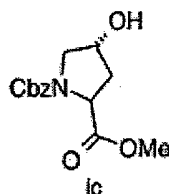
Příklad meziproduktu 96

Sloučenina xxxix

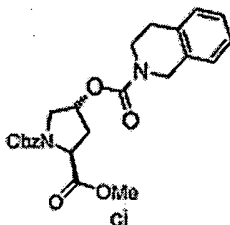
Sloučenina ic, N-Cbz-4-hydroxy Pro methylester, (2,1 g, 7,9 mmolů je připravena



s kvantitativním výtěžkem ze sloučeniny c, N-Cbz-4-hydroxy Pro), se rozpustí v DCM (25 ml). Do roztoku se přidají CDI



(1,54 g, 9,5 mmolů) a DIPEA (1,7 ml, 9,5 mmolů) a míchají se po dobu 10 minut. 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (TIQ) (1,2 ml, 9,5 mmolů) se přidá po kapkách do reakční směs a míchá pět hodin. Organická fáze se promývá vodou, 1 N HCl a solným roztokem. Po koncentraci tří organických fází se výsledné reziduum chromatograficky čistí směsí 40% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny ci, N-Cbz-4-TIQ-karboxyloxy-Pro, methylester, (2,5 g, 75%).

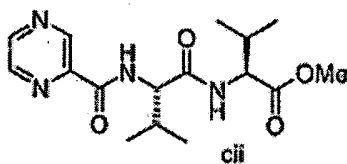


Sloučenina ci (2,5 g, 5,9 mmolů) se rozpustí v MeOH (75 ml). Roztok je profukuje N_2 a přidá se Pd/C (10%, 300 mg). Reakční směs je profukuje H_2 a míchá se přes noc. Reakční směs se filtruje přes Celit a koncentruje pro získání sloučeniny xxxix, 4-(TIQ-karbonyloxy)-Pro, methylesteru, (1,49 g, 83%).

Příklad meziproduktu 97

Sloučenina vii

Sloučenina cii, N-pyrazin-2-ylkarbonyl-Val-Val methylester, (10,9 g, 32,4 mmolů)



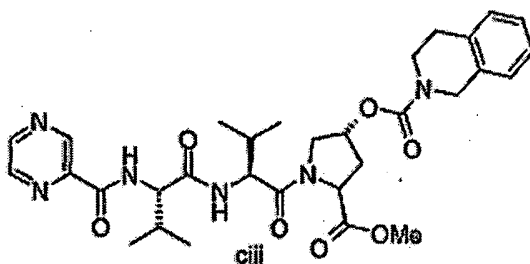
se rozpustí v THF (80 ml) a potom se přidá vodný NaOH (48,6 ml, 48,6 mmolů). Výsledná směs se míchá 48 hodin a potom se přidá další NaOH (16,3 ml, 16,3 mmolů) a směs se zahřívá na 40 °C po tři hodiny. pH reakční směsi se potom sníží na 3 a vodná fáze se extrahuje EtOAc a potom koncentruje pro

získání surové sloučeniny vii, kyseliny N-pyrazin-2-ylkarbonyl-Val-Val (10,6 g, 100%).

Příklad meziprojektu 98

Sloučenina ciii

Sloučenina cii (4,1 g, 12,7 mmolů) se rozpustí v DCM (20 ml). Do tohoto roztoku se přidají HOAt (1,73 g, 12,7 mmolů) a DCC (12,7 mmolů) a roztok se míchá jednu hodinu. Sloučenina xxxix (3,22 g, 10,6 mmolů) se přidá do reakční směsi v DCM (10 ml). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se filtruje přes silikagel a koncentruje se. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (gradient 50% až 80% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny ciii, methylesteru kyseliny N-pyrazin-2-ylkarbonyl-Val-Val-4-(TIQ-karbonyloxy)-Pro, (5,27 g, 81,7%).

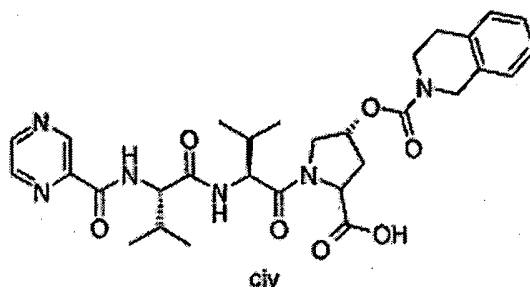


Příklad meziprojektu 99

Sloučenina civ

Sloučenina ciii (650 mg, 1,29 mmolů) se rozpustí v THF (5 ml). Do roztoku se přidá vodný NaOH (1,42 ml, 1,42 mmolů) a

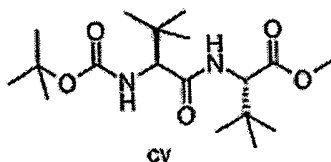
potom se míchá přes noc. pH roztoku se sníží na 3 a organická fáze se izoluje a koncentruje pro získání rezidua. Reziduum se čistí použitím HPLC s obrácenými fázemi ve směsi acetonitril/voda pro získání sloučeniny **civ**, kyseliny N-pyrazin-2-ylkarbonyl-Val-Val-4-(TIQ-karbonyloxy)-Pro, (600 mg, 95%).



Příklad meziproduktu 100

Sloučenina **cv**

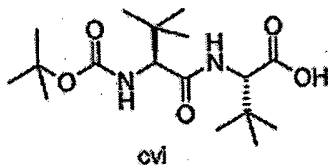
N-Boc-L-terc.-Leucin (2,3 g, 10 mmolů) a hydrochlorid methylesteru L-terc.-leucinu (2 g, 11 mmolů) se zkombinují v DMF (30 ml). Potom se do roztoku přidá HOAt (1,6 g, 11,5 mmolů). Výsledná směs se míchá po dobu 20 minut pod dusíkovou atmosférou a potom se teplota sníží na 0 °C a poté se přidají DIC (1,8 ml, 11,5 mmolů) a 2,4,6-colidin (1,45 ml, 11 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc za zahřívání na teplotu okolí. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí gradientem směsi 20%-30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny **cv** (3,3 g, 92%).



Příklad meziproduktu 101

Sloučenina cvi

Sloučenina cv (3,3 g, 9,2 mmolů) se hydrolyzuje použitím dioxanu (40 ml) a 0,5 N NaOH (37 ml, 18,4 mmolů) pro získání sloučeniny cvi (2,9 g, 92%).

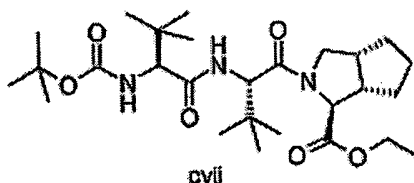


Příklad meziproduktu 102

Sloučenina cvii

Sloučenina cvi (2 g, 5,8 mmolů) a sloučenina v (1 g, 5,5 mmolů) se rozpustí v DMF (20 ml). Přidá se HOAt (832 mg, 6,6 mmolů) a DIC (1,1 ml, 6,6 mmolů) se potom přidají do roztoku. Výsledný roztok se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné

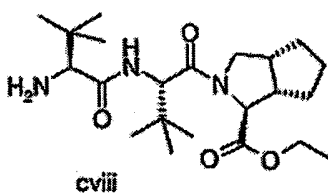
reziduum chromatograficky čistí gradientem 20%-30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cvii (2,4 g, 81%).



Příklad meziproduktu 103

Sloučenina cviii

Sloučenina cvii (2,4 g, 4,72 mmolů) se rozpustí v DCM (10 ml). Do roztoku se přidá TFA (10 ml). Výsledný roztok se míchá po dobu 4 hodin. Reakční směs se koncentruje, rozpustí v EtOAc a potom se organická fáze promývá 1 N NaOH a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje pro získání sloučeniny cviii (1,084 g, 56,1%).

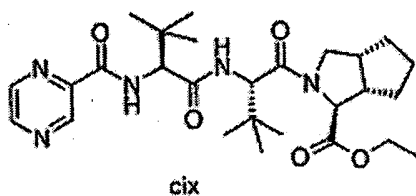


Příklad meziproduktu 104

Sloučenina cix

2-Pyrazinkarboxylová kyselina (181 mg, 1,46 mmolů) a sloučenina cviii (541 mg, 1,325 mmolů) se rozpustí v DMF (15 ml). Do roztoku se přidají HOAt (207 mg, 1,52 mmolů) a

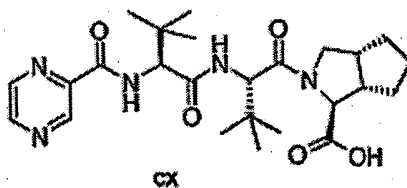
DIC (0,24 ml, 1,52 mmolů). Výsledný roztok se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí gradientem 20%-30%-35% směsi EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cix (430 mg, 63%).



Příklad meziprojektu 105

Sloučenina cx

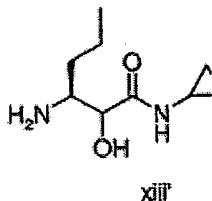
Sloučenina cix se hydrolyzuje použitím EtOH (7 ml) a 1 N NaOH (4,7 ml, 4,7 mmolů) pro získání sloučeniny cx (700 mg, 91,6%).



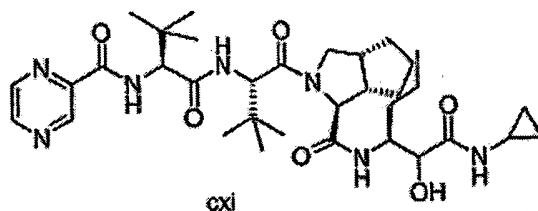
Příklad meziprojektu 106

Sloučenina cxi

Sloučenina cx (690 mg, 1,42 mmolů) se rozpustí v DCM (9 ml). Do roztoku se potom přidá PyBOP (890 mg, 1,7 mmolů) s následnou adicí sloučeniny xiii' (320 mg, 1,7 mmolů).



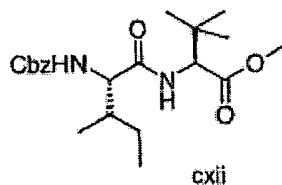
Do výsledné směsi se přidá DIPEA (0,3 ml, 1,7 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se potom zředí pomocí EtOAc, promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí pomocí 100% EtOAc pro získání sloučeniny cxi (490 mg, 52,7%).



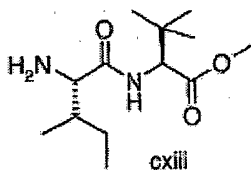
Příklad meziprojektu 107

Sloučenina cxiv

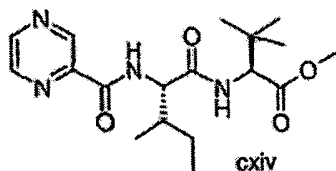
Sloučenina cxii (1,2 g, 3,06 mmolů) se rozpustí v MeOH (12 ml). Po důkladném propláchnutí N₂ se přidá 10 % hmotn.



$\text{Pd}(\text{OH})_2$ na uhlí (0,6 g) a směs se hydrogenuje přes noc, poté se ukončení reakce ve směsi prokáže pomocí TLC (30% EtOAc/hexan). Roztok se oddělí od pevného materiálu filtrací a koncentruje na odpovídající ochrany zbavenou sloučeninu cxiii ve formě bezbarvého oleje (100%), která se použije v dalším kroku bez dalšího čištění.



2-Pyrazinkarboxylová kyselina (400 mg, 3,2 mmolů, 1,1 ekv.) se rozpustí v DCM/THF (4 ml/4 ml) a potom se přidají HOAt (440 mg, 3,2 mmolů) a DCC (343 ml, 1 M v DCM). Po míchání za teploty okolí po dobu 20 minut se sloučenina cxiii (0,96 g, 3,2 mmolů) získaná dříve rozpustí v DCM (6,4 ml) a přidá se do aktivované směsi. Po míchání přes noc za teploty okolí se reakční směs filtruje přes Celit a sloučenina cxiv se čistí kolonovou chromatografií (30% EtOAc/hexan) pro získání bílé pevné látky (0,8 g, 80%).

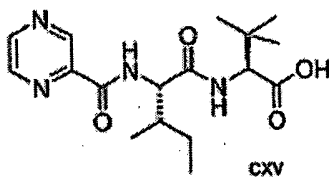


Příklad meziproduktu 108

Sloučenina cxv

Sloučenina cxiv (0,8 g, 2,2 mmolů) se rozpustí v MeOH (10 ml) a potom se přidá 2 N NaOH (vodný) (3,3 ml, 6,6 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí přes noc, poté je ukončení reakce ve směsi indikováno pomocí TLC (50% EtOAc/hexan).

Okyselení na pH 3 pomocí 5 N HCl a zředění pomocí EtOAc je následováno extrakcí organické fáze. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad $MgSO_4$ pro získání sloučeniny cxv (0,74,95%) po koncentraci.



Příklad meziproduktu 109

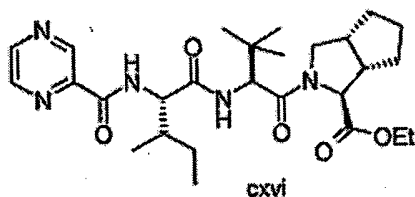
Sloučenina cxvi

Do DCM roztoku (6 ml) sloučeniny cxv (0,74 g, 2,1 mmolů) se za teploty okolí přidá HOAt (290 mg, 2,1 mmolů) s následnou adicí roztoku 1 M DCC v DCM (2,2 ml, 2,2 mmolů). Po míchání

07.04.03

po dobu 30 minut za teploty okolí se přidá do výše uvedené HOAt-aktivované kyseliny THF roztok (10,5 ml, 0,2 M) sloučeniny v (2,1 mmolů).

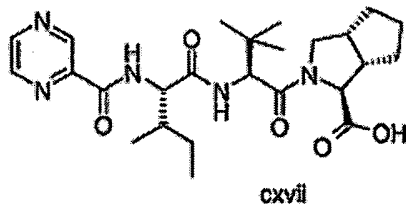
Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. V tomto okamžiku se reakční směs filtruje přes Celit. Filtrát se zředí pomocí EtOAc (120 ml) a promývá vodou a solným roztokem. Organická fáze se suší a koncentruje na žlutý olej, který se čistí chromatografií na silikagelu (50% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cxvi (0,714 g, 66%).



Příklad meziprojektu 110

Sloučenina cxvii

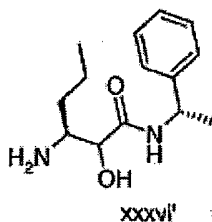
Do EtOH roztoku sloučeniny cxvi (0,7 g, 1,4 mmolů) se přidá 2 N NaOH vodný roztok (2 ml, 4 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí, potom se okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl a zředění pomocí EtOAc je následováno extrakcí organické fáze. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO_4 pro získání sloučeniny cxvii (95%) po koncentraci.



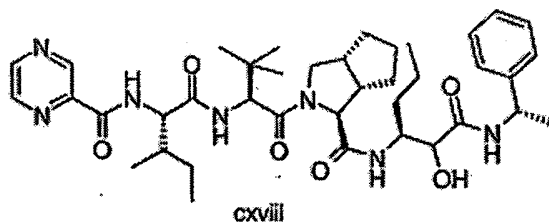
Příklad meziproduktu 111

Sloučenina cxviii

Do DCM/THF roztoku (10 ml/2 ml) sloučeniny cvii (300 mg, 0,6 mmolů) se přidá PyBOP (416 mg, 0,8 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá sloučenina xxxvi' (200 mg, 0,8 mmolů),



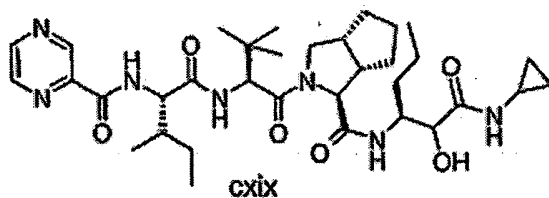
následovaná DIPEA (0,22 ml, 1,2 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (25 ml) po dobu 30 minut. Směs se potom extrahuje použitím EtOAc. Výsledná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO_4 před koncentrací pro získání žlutého oleje. Čištění chromatografií na silikagelu (3-5% EtOH/EtOAc) dává sloučeninu cxviii (335 mg, 76%).



Příklad meziproduktu 112

Sloučenina cxix

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny cxvii (340 mg, 0,6 mmolů) se přidá PyBOP (470 mg, 0,9 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá sloučenina xiii' (170 mg, 0,9 mmolů), následovaná DIPEA (0,24 ml, 1,2 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (25 ml) po dobu 30 minut. Směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad $MgSO_4$ před koncentrací na žlutý olej. Čištění chromatografií na silikagelu (3-5% EtOH/EtOAc) dává sloučeninu cxix (164 mg, 36%).



Příklad meziproduktu 113

Sloučenina xx

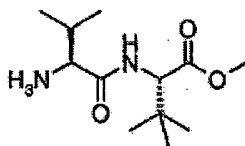
07.04.03

N-Cbz-L-valin (6,28 g, 25 mmolů) se rozpustí v DCM (30 ml). Do tohoto roztoku se přidají HOBt (3,38 g, 25 mmolů) a DCC (25 ml, 1 M roztok) a míchají se pět minut. Do této směsi se přidá hydrochlorid methylesteru L-terc.-leucinu (25 ml, 1 M roztok) a míchá se přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc, promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze se suší nad Na₂SO₄, filtruje a koncentruje. Reziduum se chromatograficky čistí směsí 20%-30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny xx (2,96g, 31%).

Příklad meziprojektu 114

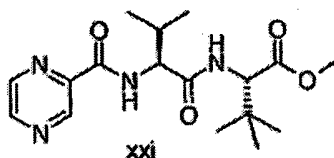
Sloučenina xxi

Sloučenina xx (2,95 g, 7,8 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (800 mg) v MeOH (40 ml) pod vodíkovou atmosférou pro získání dále uvedeného odpovídajícího volného aminu (1,9g, 100%).



2-Pyrazin-karboxylová kyselina (970 mg, 7,8 mmolů) se rozpustí v DCM (20 ml). Do tohoto roztoku se přidá PyBOP (4,06 g, 7,8 mmolů). Volný amin (1,9 g, 7,8 mmolů) v DCM (15 ml) se přidá do roztoku a potom se přidá DIPEA (1,36 ml, 7,8 mmolů). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a

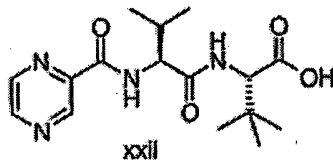
organická fáze se promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se reziduum chromatograficky čistí směsí 30%-40% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny xxi (2,07g, 75,8%).



Příklad meziprojektu 115

Sloučenina xxii

Sloučenina xxi se hydrolyzuje použitím MeOH (20 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny xxii (1,82g, 93,9%).



Příklad meziprojektu 116

Sloučenina xxiii

Sloučenina xxii (895 mg, 2,66 mmolů) se rozpustí v DCM (10 ml). Do roztoku se přidá DCC (3,2 mmolů) a potom se přidá HOAt (435 mg, 3,2 mmolů). Potom se přidá sloučenina v (3,2 mmolů) v THF (16 ml). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc,

filtruje přes silikagel a koncentruje. Výsledné reziduum se chromatograficky čistí směsí 50% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny xxiii (730 mg, 54,8%).

Příklad meziproduktu 117

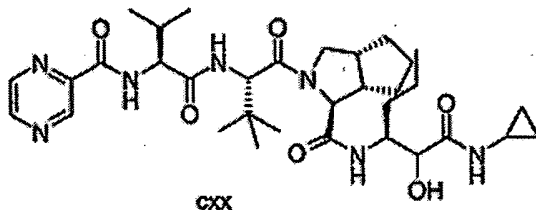
Sloučenina xxiv

Sloučenina xxiii se hydrolyzuje použitím EtOH (5 ml) a 1 N NaOH (1,5 ekv.) pro získání sloučeniny xxiv (690 mg, 100%).

Příklad meziproduktu 118

Sloučenina cxx

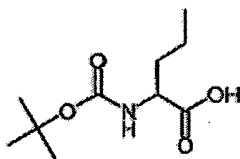
Sloučenina xxiv (245 mg, 0,52 mmolů) se rozpustí v DCM (3 ml). Do roztoku se přidá PyBOP (330 mg, 0,62 mmolů) a potom se přidá sloučenina xiii' (120 mg, 0,62 mmolů). Do výsledné směsi se přidá DIPEA (0,11 ml, 0,62 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se reziduum chromatograficky čistí směsí 5% EtOH/EtOAc pro získání sloučeniny cxx (220 mg, 60%).



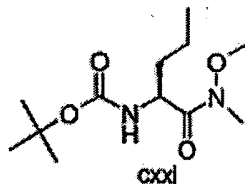
Příklad meziproduktu 119

Sloučenina xiii'

Boc-NVA-OH (24,96 g, 114,9 mmolů) se rozpustí v THF (200 ml). CDI (22,35, 137,8 mmolů) se přidá po částech do

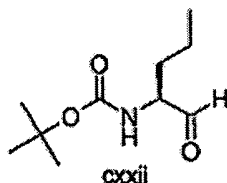


roztoku a roztok se míchá po dobu 30 minut. Hydrochlorid N,O-dimethylhydroxylaminu (12,33 g, 126,4 mmolů) se rozpustí v DMF (50 ml) a potom se přidá do roztoku DIPEA (22 ml, 126,4 mmolů). DMF roztok se ponechá za míchání za teploty okolí po dobu 20 minut a potom se přidá do THF roztoku. Výsledná směs se míchá přes víkend pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se koncentruje ve vakuu na celkový objem 100 ml. Tato organická fáze se promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje pro získání surové sloučeniny cxxi (25,3 g).

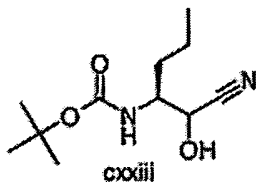


Do suché jednolitrové kulaté baňky se přidá pod dusíkovou atmosférou LAH (107,3 mmolů) v 1 M Et₂O roztoku. Tento roztok se ochladí na 0 °C a potom se přidá po kapkách

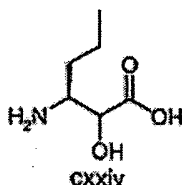
sloučenina cxxi (97,5 mmolů) v Et₂O (100 ml). Po ukončení přidávání se výsledná směs míchá po dobu 30 minut. Reakce se zastaví za teploty 0 °C pomalým přidáním EtOAc (50 ml), následovaným pomalým přidáním 5% KHSO₄ (50 ml) roztoku. Tato směs se míchá po dobu 30 minut. Organická fáze se promývá 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje pro získání surové sloučeniny cxxii (22,28 g).



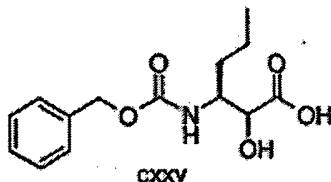
Sloučenina cxxii se rozpustí v MeOH (100 ml). Na₂S₂O₄ (16,82 g, 96,6 mmolů) se rozpustí ve vodě (100 ml) a potom přidá do roztoku sloučeniny cxxii za teploty 0 °C. Tato směs je se uchovává v ledničce (5 °C) přes noc. Do reakční směsi se přidá KCN (7,53 g, 115,9 mmolů) ve vodě (100 ml) a míchá po dobu 1,5 hodin za teploty okolí. Sloučenina se extrahuje pomocí EtOAc (3x100 ml). Organická fáze se promývá solným roztokem (3x50 ml), suší se nad MgSO₄, filtruje a koncentruje pro získání surové sloučeniny cxxiii (15,86g).



Sloučenina cxxiii (15,86 g) se rozpustí v dioxanu (100 ml). Do tohoto roztoku se přidá koncentrovaný HCl (37%, 100 ml) následovaný anisolem (10 ml) a udržuje se zahřívání na teplotu zpětného toku (110 °C). Reakční směs se míchá po dobu 1,5 hodin. Když se reakční směs ochladí na teplotu okolí, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu pro získání bezvodé pasty. Reziduum se suší přes noc za vysokého vakua pro získání surové sloučeniny cxxiv.

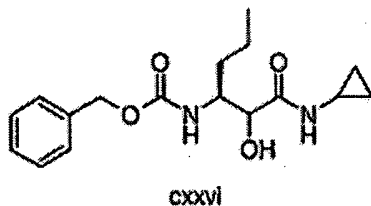


Sloučenina cxxiv (69,6 mmolů) se rozpustí v DMF (60 ml) a THF (60 ml). Do směsi se přidá N-(benzyloxykarbonyloxy)sukcinimid (17,33 g, 69,6 mmolů) s následnou adicí DIPEA (12,1 ml, 69,6 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Směs se koncentruje na snížený objem (50 ml) a zředí se EtOAc. Organická fáze se promývá 0,1 N HCl (2x100 ml) a solným roztokem pro získání sloučeniny cxxv (17,5 g, 54,2% v pěti krocích).

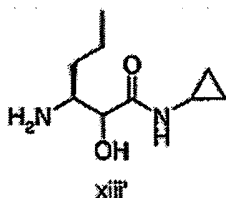


Sloučenina cxxv (5,66 g, 20,14 mmolů) se rozpustí v DCM (60 ml). Do tohoto roztoku se přidají PyBOP (12,57 g, 24,2 mmolů) a HOBT (3. 27 g, 24,2 mmolů) a míchají se pět minut.

Výsledná směs se ochladí na teplotu 0 °C, a potom se přidají cyklopropylamin (1,67 ml, 24,2 mmolů) a DIPEA (4,2 ml, 24,2 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za zahřátí na teplotu okolí. Reakční směs se promývá 0,1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická fáze se potom koncentruje a chromatograficky čistí směsí 70% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxvi (3,18 g, 49,3%).



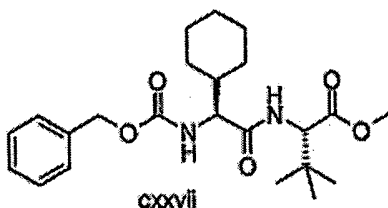
Sloučenina cxxvi (3,18 g, 9,94 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (600 mg) v MeOH (70 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou, filtruje přes Celit a koncentruje pro získání surové sloučeniny xiii' (2,1 g, 100%).



Příklad meziproduktu 120

Sloučenina cxxvii

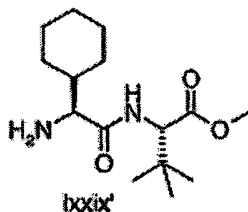
N-Cbz-L-cyklohexylglycin (3 g, 10,3 mmolů) se rozpustí v DCM (36 ml). Do tohoto roztoku se přidají HOAt (1,5 g, 11,28 mmolů) a DCC (11,28 ml, 11,28 mmolů) a míchají se pět minut. Hydrochlorid methylesteru L-terc.-leucinu (103 ml, 1 M roztok, 10. 3 mmolů) se přidá do této směsi a míchá se přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se filtruje přes Celit, proplachuje EtOAc a koncentruje na reziduum, které se čistí chromatograficky směsí 20%30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxvii (2,2 g, 52%).



Příklad meziproduktu 121

Sloučenina lxxix'

Sloučenina cxxvii (2,2 g, 5,2 mmolů) se hydrogenuje použitím 20% Pd(OH)₂/C (1 g) v MeOH (15 ml) pod vodíkovou atmosférou pro získání sloučeniny lxxix' (1,4 g, 98%).



Příklad meziproduktu 122

Sloučenina lxxx

2-Pyrazinkarboxylová kyselina (360 mg, 2,9 mmolů) se rozpustí v DCM (10 ml). Do roztoku se přidá PyBOP (1,81 g, 3,5 mmolů). Do roztoku se potom přidá sloučenina lxxix' (825 mg, 2,9 mmolů) v THF (10 ml) s následnou adicí DIPEA (0,5 ml, 2,9 mmolů). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Reziduum vzniklé koncentrací organické fáze se chromatograficky čistí směsí 30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny lxxx (780 mg, 69%).

Příklad meziproduktu 123

Sloučenina lxxxi

Sloučenina lxxx se hydrolyzuje použitím MeOH (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny lxxxi (615 mg, 81,8%).

Příklad meziproduktu 124

Sloučenina lxxxii

Sloučenina lxxxi (610 mg, 1,6 mmolů) se rozpustí v DCM (10 ml). Do roztoku se potom přidá DCC (1,94 ml, 1,94 mmolů) s následnou adicí HOAt (270 mg, 1,94 mmolů). Do roztoku se potom přidá sloučenina v (1,94 mmolů) v THF (19,4 ml). Výsledná směs se míchá po dvě noci pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc, filtruje přes silikagel a koncentruje. Výsledné reziduum se čistí chromatograficky směsí 40% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny lxxxii (450 mg, 83,4%).

Příklad meziprojektu 125

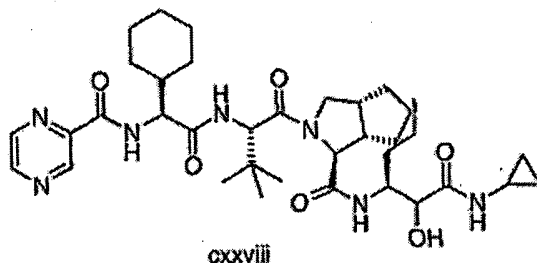
Sloučenina lxxxiii

Sloučenina lxxxi se hydrolyzuje použitím EtOH (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny lxxxiii (650 mg, 99%).

Příklad meziprojektu 126

Sloučenina cxxviii

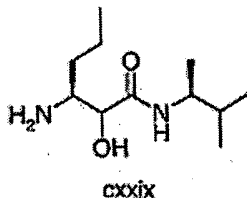
Sloučenina lxxxiii (400 mg, 0,78 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml). Do roztoku se přidá PyBOP (610 mg, 1,2 mmolů) následovaný sloučeninou xiii' (230 mg, 1,2 mmolů). Do výsledné směsi se přidá DIPEA (0,2 ml, 1,2 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se reziduum chromatograficky čistí pomocí gradientu 100% EtOAc až 5% EtOH/EtOAc pro získání sloučeniny cxxviii (365 mg, 68,7%).



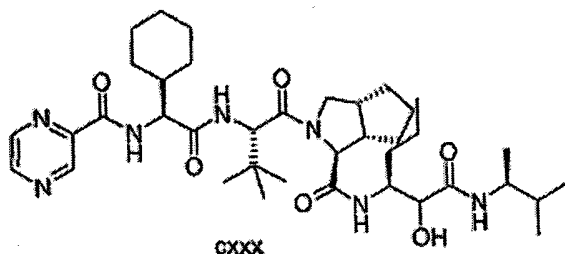
Příklad meziprojektu 127

Sloučenina cxxx

Sloučenina lxxxiii (365 mg, 0,7 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml). Do roztoku se přidá PyBOP (440 mg, 0,84 mmolů) s následnou adicí sloučeniny cxxix (0,84 mmolů)



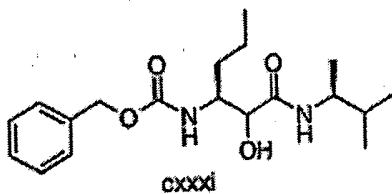
v THF (8,4 ml). Do výsledné směsi se přidá DIPEA (0,1 ml, 0,84 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí pomocí 100% EtOAc pro získání sloučeniny cxxx (350 mg, 70%).



Příklad meziprojektu 128

Sloučenina cxxxi

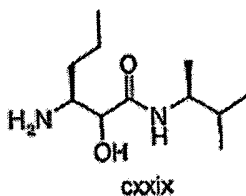
Sloučenina cxxv (2,54 g, 9,05 mmolů) se rozpustí v DCM (30 ml). PyBOP (5,65 g, 10,9 mmolů) a HOBT (1,47 g, 10,9 mmolů) se přidají do roztoku, který se míchá pět minut. Výsledná směs se ochladí na teplotu 0 °C, potom se přidají (S)-(+)-3-Methyl-2-butylamin (1,27 ml, 10,9 mmolů) a DIPEA (1,9 ml, 10,9 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za zahřátí na teplotu okolí. Organická fáze se promývá 0,1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí směsí 30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxxi (1,44 g, 45,5%).



Příklad meziprojektu 129

Sloučenina cxxix

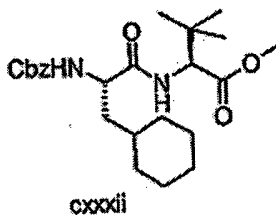
Sloučenina cxxxi (1,3 g, 3,7 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (500 mg) v MeOH (40 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou. Reakční směs se filtruje přes Celit a organická fáze se koncentruje pro získání surové sloučeniny cxxix (800 mg, 100%).



Příklad meziprojektu 130

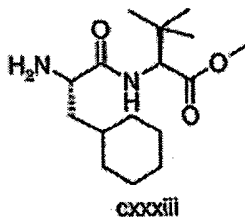
Sloučenina cxxxiv

Sloučenina cxxxii (1,6 g, 3,7 mmolů) se rozpustí v MeOH (12 ml). Po důkladném propláchnutí N₂, se přidá 10 % hmotn.

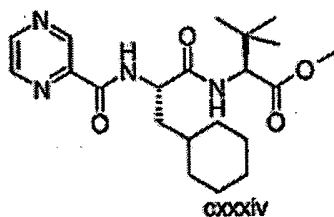


Pd(OH) na uhlí (0,74 g) a směs se hydrogenuje přes noc, poté se ukončení reakce ve směsi prokáže pomocí TLC (30% EtOAc/hexan). Roztok se izoluje od pevného materiálu filtrací a koncentruje pro získání sloučeniny cxxxiii ve

formě bezbarvého oleje (100%), která se používá v následujícím kroku bez dalšího čištění.



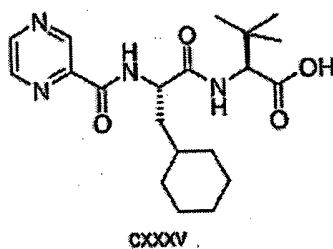
2-pyrazinkarboxylová kyselina (400 mg, 3,2 mmolů, 1,1 ekv.) se rozpustí v DCM/THF (4 ml/4 ml) a potom se přidají HOAt (440 mg, 3,2 mmolů) a DCC (3,3 ml, 1 M v DCM). Po míchání za teploty okolí po dobu 20 minut se dříve získaná sloučenina cxxxiii (0,96 g, 3,2 mmolů) rozpustí v DCM (6,4 ml) a přidá se do aktivované směsi. Po míchání po dva dny za teploty okolí se reakční směs filtruje přes Celit a koncentruje na reziduum, které se čistí kolonovou chromatografií (50% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cxxxiv ve formě bílé pevné látky (1,06 g, 83%).



Příklad meziprojektu 131

Sloučenina cxxxv

Sloučenina cxxxiv (1,06 g, 2,6 mmolů) se rozpustí v MeOH (10 ml) a potom se přidá 2 N NaOH (vodný) (4 ml, 8 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí přes noc, poté se ukončení hydrolýzy indikuje pomocí TLC (50% EtOAc/hexan). Roztok se okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl, zředí se EtOAc a potom se organická fáze extrahuje. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO_4 pro získání sloučeniny cxxxv (100%) po koncentraci.

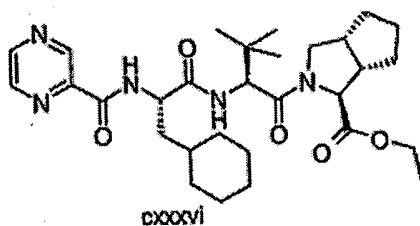


Příklad meziprojektu 132

Sloučenina cxxxvi

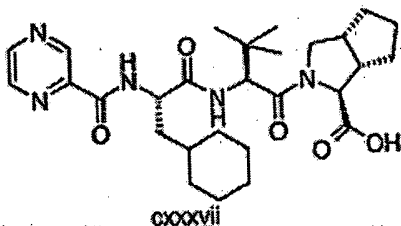
Do DCM roztoku (8 ml) sloučeniny cxxxv (1,44 g, 3,7 mmolů) se za teploty okolí přidá HOAt (500 mg, 3,7 mmolů) a potom se přidá 1 M DCC roztok v DCM (3,7 ml, 3,7 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut za teploty okolí se do výše uvedené HOAt-aktivované kyseliny přidá THF roztok (18,5 ml, 0,2 M) sloučeniny v (3,7 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. Reakční směs se filtruje přes Celit. Filtráty se zředí pomocí EtOAc (120 ml) a promývají vodou a solným roztokem. Organická fáze se suší a koncentruje pro získání žlutého oleje, který se čistí

chromatografií na silikagelu (70% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cxxxvi (1 g, 71%).



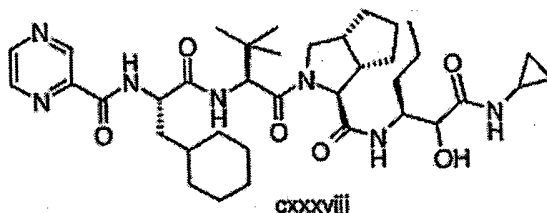
Příklad meziprojektu 133
Sloučenina cxxxvii

To an EtOH roztok (8 ml) sloučeniny cxxxvi (1 g, 1,8 mmolů) se přidá 2 N NaOH vodný roztok (2,7 ml, 5,4 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí, potom se okyselí na pH 3 pomocí 5 N HCl, zředí EtOAc a potom se organická fáze extrahuje. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO₄ pro získání sloučeniny cxxxvii (88%) po koncentraci.



Příklad meziprojektu 133
Sloučenina cxxxviii

Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny cxxxvii (350 mg, 0,6 mmolů) se přidá PyBOP (450 mg, 0,86 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá sloučenina xiii' (160 mg, 0,86 mmolů) následovaná DIPEA (0,23 ml, 1. 3 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (25 ml) po dobu 30 minut. Směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO_4 před koncentrací pro získání žlutého oleje. Čištění chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) dává sloučeninu cxxxviii (407 mg, 88%).

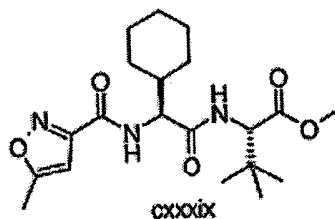


Příklad meziprojektu 134

Sloučenina cxxxix

5-methylisoxazol-3-karboxylová kyselina (200 mg, 2,05 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml). Do roztoku se přidá PyBOP (1,07 g, 2,05 mmolů). Do roztoku se přidá sloučenina lxxix' (582 mg, 2,05 mmolů) v DCM (5 ml) s následnou adicí DIPEA (0. 36 ml, 2,05 mmolů). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc, a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje a vzniklé reziduum

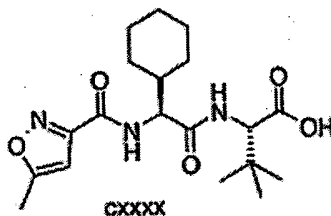
se čistí chromatograficky směsí 30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxxix (495 mg, 61,4%).



Příklad meziproduktu 135

Sloučenina cxxxx

Sloučenina cxxxix se hydrolyzuje použitím MeOH (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny cxxxx (430 mg, 90%).

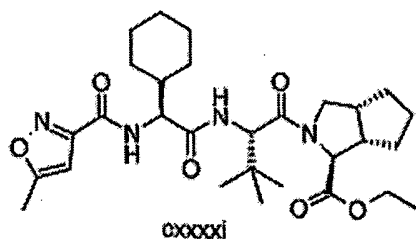


Příklad meziproduktu 136

Sloučenina cxxxxi

Sloučenina cxxxx (380 mg, 1 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml). Do roztoku se potom přidá DCC (1,2 mmolů) s následnou adicí HOAt (165 mg, 1,2 mmolů). Sloučenina v (1,2 mmolů) se potom přidá v THF (12 ml). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí

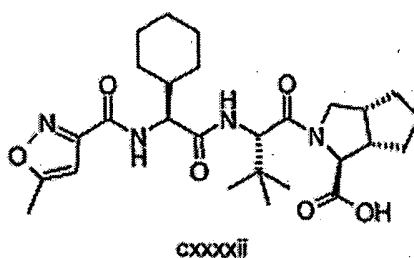
EtOAc, filtruje se přes silikagel a koncentruje. Vzniklé reziduum se chromatograficky čistí směsí 35% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxxxi (320 mg, 58%).



Příklad meziprojektu 137

Sloučenina cxxxxii

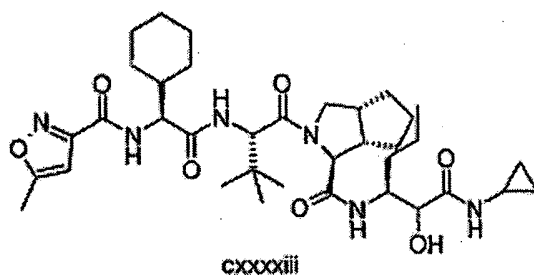
Sloučenina cxxxxi se hydrolyzuje použitím EtOH (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny cxxxxii (730 mg, 94,3%).



Příklad meziprojektu 138

Sloučenina cxxxxiii

Sloučenina cxxxxii (240 mg, 0,46 mmolů) se rozpustí v DCM (5 ml). Do roztoku se potom přidá PyBOP (295 mg, 0,56 mmolů) s následnou adicí sloučeniny xiii' (110 mg, 0,56 mmolů). Do výsledné směsi se přidá DIPEA (0,1 ml, 0,56 mmolů). Reakční směs se míchá po dvě noci pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc, a organická fáze se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Po koncentraci organické fáze se výsledné reziduum chromatograficky čistí směsí 90% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cxxxxiii (168 mg, 53%).



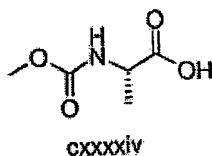
Příklad meziprojektu 139

Sloučenina cxxxxiv

Do roztoku NaOH (2N, 42,1 ml, 84,2 mmolů) se za teploty 5 °C přidá L-alanin (5,00 g, 56,1 mmolů). Po míchání po dobu 10 minut se přidají současně po kapkách methyl chloroformát (6,5 ml, 84,2 mmolů) a NaOH (2 N, 42,1 ml, 84,2 mmolů). Roztok se míchá v ledové lázni po dobu 2 hodin, potom za teploty okolí po 1 hodinu. Směs se promývá Et₂O (2 x 50 ml), vodná vrstva se neutralizuje na pH 2 přidáním 5 N HCl a extrahuje se pomocí EtOAc (3 x 50 ml). Extrahovaná organická fáze se promývá solným roztokem, suší nad MgSO₄ a

07.04.03

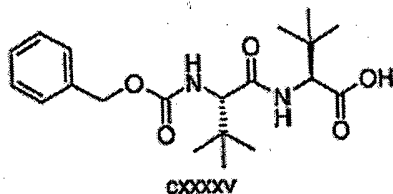
koncentruje pro získání sloučeniny cxxxxiv, N-karbomethoxy-L-alanin, (4,54 g, 54%), ve formě bezbarvého oleje.



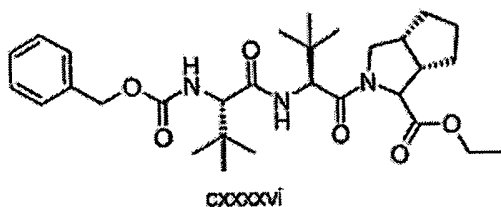
Příklad meziproduktu 140

Sloučenina cxxxxvi

Roztok sloučeniny cxxxxv (3,57 g, 9,44 mmolů) v THF se za



teploty 5 °C zpracovává pomocí HOAt (1,28 g, 9,44 mmolů) a potom se přidá DCC (9,50 ml, 9,50 mmolů). Po míchání v ledové lázni po dobu 45 minut se přidá roztok sloučeniny v (104 ml, 10,4 mmolů) v THF. Směs se míchá za teploty okolí přes noc. Směs se ochladí na teplotu 5 °C a reakce se zastaví nasyceným NaHCO₃. Po filtraci pro odstranění precipitovaného DCU se směs rozpustí v EtOAc (100 ml), promývá nasyceným NaHCO₃, solným roztokem a potom suší nad MgSO₄ a koncentruje na reziduum čištěné kolonovou chromatografií na oxidu křemičitém (25% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cxxxxvi (2,91 g, 57%) ve formě gumovité pěny.



Příklad meziproduktu 141

Sloučenina cviii

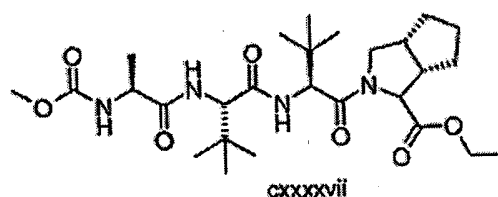
Do roztoku sloučeniny cxxxxvi v MeOH (25 ml), ochlazeném v ledové lázni, se pod proudem N_2 přidá pomalu Pd/C. Směs se hydrogenuje za tlaku 1 atm. přes noc. Katalyzátor se odstraní filtrací, filtrát se zkombinuje s 5 ml DMF a suší za vakua pro získání sloučeniny cviii.

Příklad meziproduktu 142

Sloučenina cxxxxvii

Roztoku sloučeniny cxxxxiv (0,298 g, 2,03 mmolů) a HOAt (0,276 g, 2,03 mmolů) v THF, ochlazený v ledové lázni, se zpracovává pomocí DCC (2,05 ml, 2,05 mmolů). Po míchání v ledové lázni po dobu 0,5 hodiny se přidá roztok sloučeniny cviii v THF a potom DIPEA (0,39 ml, 2,2 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí přes noc, potom se ochladí v ledové lázni a reakce se zastaví nasyceným $NaHCO_3$. Precipitovaný DCU se filtruje a filtrát se rozpustí v EtOAc (100 ml). Organická fáze se promývá nasyceným $NaHCO_3$, solným roztokem a potom suší nad $MgSO_4$. Po odstranění organického

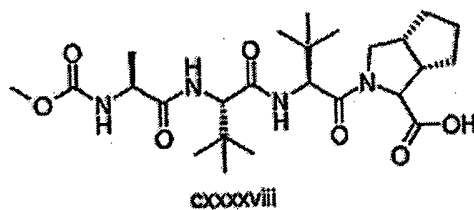
rozpouštědla se reziduum čistí kolonovou chromatografií na oxidu křemičitém (60% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cxxxxxvii (0,47 g, 48%) ve formě gumovité pěny.



Příklad meziprojektu 143

Sloučenina cxxxxxviii

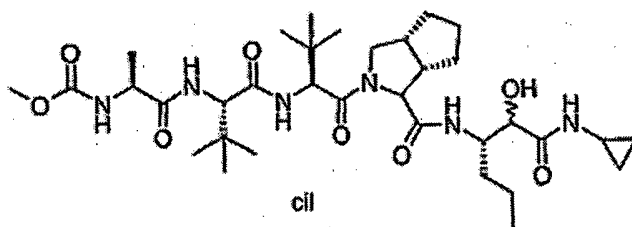
Do roztoku sloučeniny cxxxxxvii (0,47 g, 0,847 mmolů) v EtOH (5 ml) se za teploty 5 °C přidá NaOH (2 N, 1,31 ml, 2,62 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí po dobu 4 hodin. Roztok se okyselí na pH 2 přidáním HCl (1N) a EtOH se odstraní rotačním odpařením. Směs se extrahuje pomocí EtOAc (3x30 ml) a zkombinovaný extrakt se promývá solným roztokem a potom suší nad MgSO₄. Rozpouštědlo se odstraní a reziduum se suší za vakua pro získání sloučeniny cxxxxxviii (0,366 g, 82%) ve formě gumovité pěny.



Příklad meziprojektu 144

Sloučenina cil

Roztok sloučeniny cxxxxviii (0,366 g, 0,718 mmolů) v DCM se ochladí v ledové lázni a zpracovává PyBop (0,599 g, 1,15 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 0,5 hodiny se směs ochladí ledovou lázní a zpracovává roztokem sloučeniny xiii' (0,200 g, 1,08 mmolů) v THF a DIPEA (0,250 ml, 1,44 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí přes noc a potom se reakce zastaví roztokem NH_4Cl . Rozpouštědlo se koncentruje a směs se rozpustí v EtOAc (100 ml). Organická fáze se promývá nasyceným NaHCO_3 , solným roztokem a potom suší nad MgSO_4 . Po odstranění organického rozpouštědla se reziduum čistí kolonovou chromatografií (5% EtOH/EtOAc) pro získání sloučeniny cil (0,35 g, 72%).



Příklad meziprojektu 145

Sloučenina cxxi

Do THF roztoku (85 ml) N-Boc-Nva-OH (sloučenina 1) (8,68 g, 40 mmolů) se přidá CDI (7,79 g, 48 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 30 minut se výše uvedený roztok se zpracovává roztokem DMF (25 ml) obsahujícím hydrochlorid N,

O-dimethyl-hydroxylaminu (4,25 g, 44 mmolů) a DIPEA (7,66 ml, 44 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí. Reakční směs se potom koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se zředí EtOAc (300 ml). Tento roztok se promývá postupně 0,1 N HCl (50 ml), nasyceným NaHCO₃ (3 x 50 ml) a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (40% EtOAc/hexan) na sloučeninu cxxi (9,38 g, 94%).

Příklad meziprojektu 146

Sloučenina cxxii

Do diethyl Et₂O roztoku (50 ml) sloučeniny cxxi (9,38 g, 31,9 mmolů), ochlazeného na teplotu 0 °C, se přidá (pomalu) LAH (34,7 ml, 1 M, 34,7 mmolů). Teplota reakční baňky se udržuje pod 5 °C během přidávání LAH. Po ukončení přidávání se do reakční směsi přidá EtOAc (20 ml) pro odstranění přebytku LAH. Vodný KHSO₄ (5%, 20 ml) se potom přidá po kapkách pro udržení teploty pod 5 °C. Organická fáze se separuje a potom promývá postupně 1 N HCl (3 x 30 ml), nasyceným NaHCO₃ (3 x 30 ml) a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje a suší ve vakuu pro získání surové sloučeniny cxxii (5. 18 g, 69%).

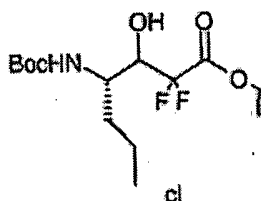
Příklad meziprojektu 147

Sloučenina cl

Do THF (25 ml) suspenze Zn (2,75 g, 42 mmolů) se přidá za teploty zpětného toku 0,2 ml EtOC(O)CF₂Br. Potom následuje

07.04.03

pomalé přidání THF roztoku (25 ml) sloučeniny cxxii (3,05 g, 15,0 mmolů) a $\text{EtOC(O)CF}_2\text{Br}$ (4,84 ml, 37,5 mmolů). Po ukončení přidávání obou činidel se reakční směs dále zahřívá na teplotu zpětného toku po dobu 30 minut. Reakční směs se ochladí na teplotu okolí a zředí se DCM (200 ml). Organická fáze se promývá pomocí 1 N KHSO_4 . Organická fáze se koncentruje a suší ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (20% EtOAc /hexan) pro získání sloučeniny cl (2,78 g, 57%).

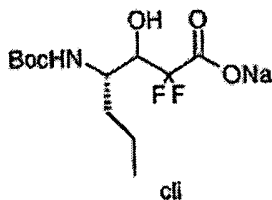


Tato příprava je v zásadě stejná jako postup, který popsal Thaisrivongs a kol., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986).

Příklad meziprojektu 148

Sloučenina cli

THF roztok (40 ml) sloučeniny cl (2,78 g, 8,53 mmolů) se zpracovává 1 N NaOH (12,8 ml, 12,8 mmolů). Po míchání za teploty okolí přes noc se rozpouštědlo částečně odstraní ve vakuu. Zbývající reakční směs se zředí vodou (50 ml) a lyofilizuje se pro získání surové sloučeniny cli (2,82 g, > 100%) ve formě její sodné soli.



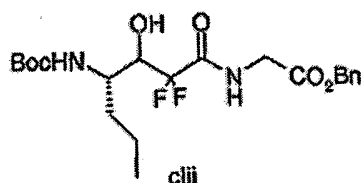
Tato příprava je v zásadě stejná jako postup, který popsal Thaisrivongs a kol., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986).

Příklad meziproduktu 149

Sloučenina clii

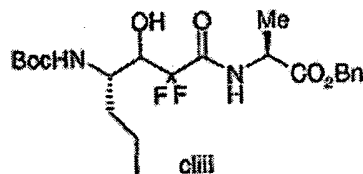
DCM roztok (10 ml) surové sloučeniny cli (516 mg, 1,61 mmolů) se zpracovává pomocí HOBt (436 mg, 3,23 mmolů) a DIC (0,328 ml, 2,09 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 30 minut se reakční směs zpracovává roztokem DCM (5 ml) obsahujícím sůl glycin benzylester-TsOH (815 mg, 2,42 mmolů) a DIPEA (0,422 ml, 2,42 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 12 hodin se reakce zastaví vodou a reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická fáze se suší a koncentruje ve vakuu a čistí se chromatografií na silikagelu (40% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clii (495 mg, 69%).

^1H NMR sloučeniny clii (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29-7,21 (m, 5H), 5,16 (bs, 2H), 4,89 (bs, 1H), 4,20-3,90 (m, 4H), 3,80 (bs, 1H), 1,75-1,42 (m, 4H), 1,38 (s, 9H), 0,87 (m, 3H).



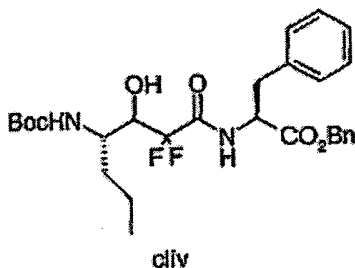
Vycházejíce ze surové sloučenina cli se připraví sloučeniny cliii (83%) a cliv (50%) způsobem, který je identický se způsobem uvedeným pro sloučeninu clii.

^1H NMR sloučeniny cliii (400 MHz, CDCl_3): δ 7,49 (bs, 1H), 7,34-7,24 (m, 5H), 5,13 (AB q, $J = 12,2$ Hz, $J' = 23,9$ Hz, 2H), 4,88 (bd, $J = 8,8$ Hz, 1H), 4,53 (m, 1H), 3,98-3,91 (m, 2H), 3,82 (m, 1H), 1,65-1,20 [m, 16H, včetně singletu na 1,37 (9H)], 0,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).



^1H NMR sloučeniny cliv (400MHz, CDCl_3): δ 7,60-7,0 (m, 10H), 5,30-5,00 (m, 2H), 5,004,75 (m, 2H), 4,15-3,70 (m, 3H), 3,30-3,00 (m, 2H), 1,75-1,20 [m, 13H, včetně singletu na 1,36 (9H)], 0,86 (bs, 3H).

07.04.03

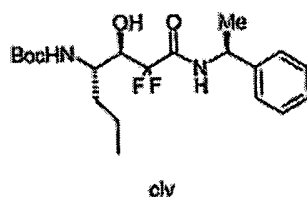


Příklad meziproduktu 150

Sloučenina clv

Do DCM (10 ml) a THF (5 ml) roztoku surové sloučeniny cli (1 g, 3,13 mmolů) se přidá HOBT (634 mg, 4,69 mmolů) a EDCI (781 mg, 4,07 mmolů) a potom (s)- α -methylbenzylamin (0,604 ml, 4,69 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí a potom se reakce zastaví vodou. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická fáze se promývá solným roztokem a suší nad Na_2SO_4 . Organická fáze se koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (20% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clv (459 mg, 37%).

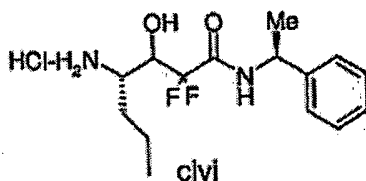
^1H NMR sloučeniny clv (400 MHz, CDCl_3): δ 7,32-7,21 (m, 6H), 5,00 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,94 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 1,65-1,15 [m, 16H, včetně doubletu na 1,51 ($J=6,8$ Hz, 3H), singlet na 1,39 (9H)], 0,82 (m, 3H).



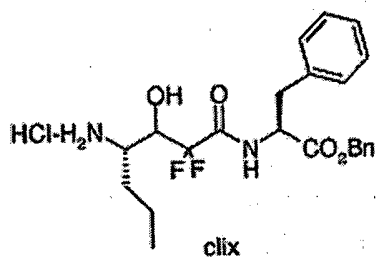
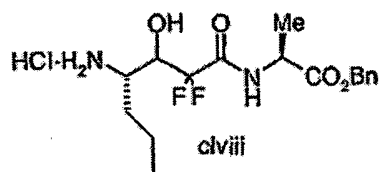
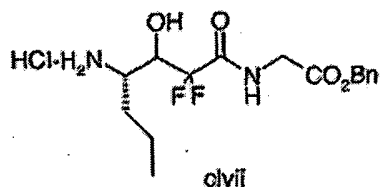
Příklad meziproduktu 151

Sloučenina clvi

Sloučenina clv (220 mg, 0,55 mmolů) se rozpustí v 4 N HCl v dioxanu (10 ml). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 2 hodin a potom se koncentruje ve vakuu pro získání surové sloučeniny clvi (~100%) ve formě její HCl sole.



Postupem podle způsobu, popsaného pro přípravu sloučeniny clvi se připrav sloučeniny clvii, clviii a clix s takřka kvantitativním výtěžkem, vycházejíce ze surové sloučeniny cli.

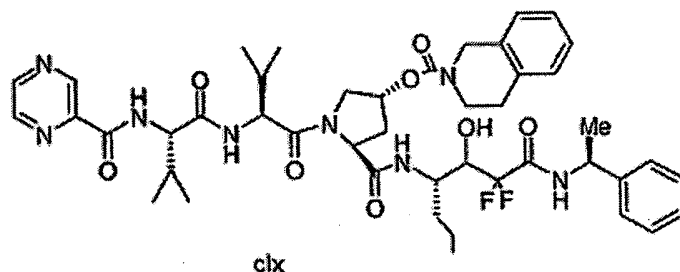


Příklad meziprojektu 152

Sloučenina clx

DCM roztok (4 ml) HCl soli sloučeniny vii (96 mg, 0,144 mmolů) se zpracovává pomocí PyBOP (120 mg, 0,23 mmolů) a DIPEA (0,1 ml, 0,576 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 30 minut se roztok se zpracovává THF roztokem (4 ml) obsahujícím sloučeninu clv (0,288 mmolů) a DIPEA (0,2 ml, 1,152 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. Reakční směs se potom zředí pomocí EtOAc (50 ml), a organická fáze se potom promývá NaHCO_3 a solným roztokem. Organická fáze se koncentruje ve vakuu a reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (80% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clx (113 mg, 89%).

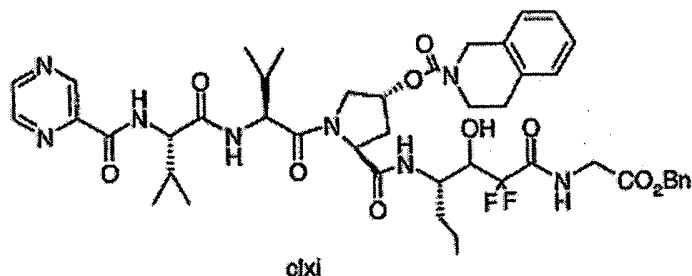
07.04.03



Příklad meziprojektu 153

Sloučenina clxi

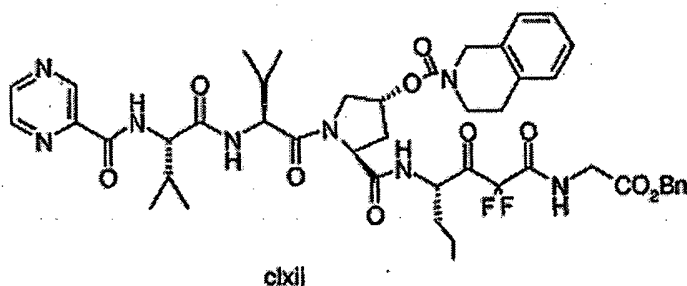
DCM roztok (6 ml) sloučeniny vii (140 mg, 0,235 mmolů) se zpracovává pomocí PyBOP (196 mg, 0,376 mmolů) po dobu 30 minut. Potom se přidá do výše uvedeného roztoku THF roztok (6 ml) sloučeniny clvii (~0,47 mmolů) a DIPEA (0,327 ml, 1,88 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc a reakce se zastaví vodou (30 minut). Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc (50 ml). Organická fáze se promývá NaHCO_3 a solným roztokem. Zkombinované vodné vrstvy se zpětně extrahují pomocí EtOAc (50 ml). Zkombinované organické fáze se suší a koncentrují ve vakuu. Vzniklé reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (80-100 EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clxi (104 mg, 48%).



Příklad meziprojektu 154

Sloučenina clxii

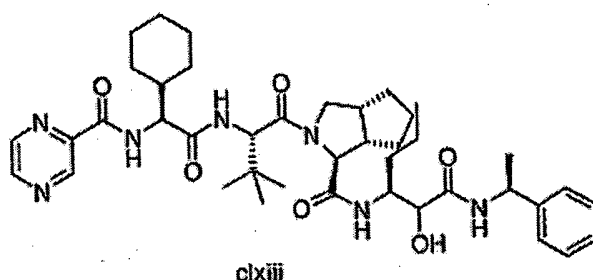
Do DCM roztoku (10 ml) sloučeniny clxi (280 mg, 0,304 mmolů) se přidá činidlo DMP (193 mg, 0,456 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 3 hodin a reakce se zastaví přidáním 10% Na₂SO₃. Organická fáze se promývá NaHCO₃ a solným roztokem. Výsledná organická fáze se suší a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (80-100% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clxii (271 mg, 97%).



Příklad meziprojektu 155

Sloučenina clxiii

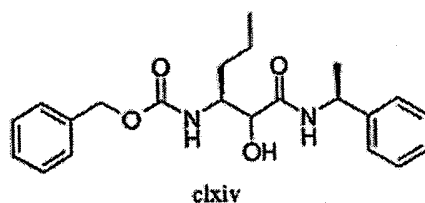
Sloučenina lxxxiii (220 mg, 0,43 mmolů) se vyjme v DCM (5 ml). Do DCM roztoku se přidá PyBOP (270 mg, 0,51 mmolů) a míchá 5 minut. Do tohoto roztoku se přidá po kapkách sloučenina xxxvi' (0,51 mmolů) v THF (5,1 ml). DIPEA (0,09 ml, 0,51 mmolů) se přidá do reakční směsi a míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Následující den se reakční směs zředí EtOAc, promývá nasyceným NaHCO₃, promývá solným roztokem. Čištění gradientem směsi 70% až 90% EtOAc/hexan dává sloučeninu clxiii (180 mg, 56%).



Příklad meziprojektu 156
Sloučenina clxiv

Sloučenina cxxv (2,09 g, 7,4 mmolů) se vyjme v DCM (20 ml). Do tohoto roztoku se přidají PyBOP (4,64 g, 8,9 mmolů) a HOBt (1,2 g, 8,9 mmolů) a míchají po pět minut. Výsledná směs se ochladí na teplotu 0 °C a potom se přidají S (-)α-methylbenzylamin (1,15 ml, 8,9 mmolů) a DIPEA (1,55 ml, 8,9 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc se zahřátím na teplotu okolí. Reakční směs se promývá 0,1 N HCl, nasyceným

NaHCO₃ a solným roztokem. Čištění směsí 30% EtOAc/hexan dává sloučeninu clxiv (1,6 g, 56,3%).



Příklad meziprojektu 157

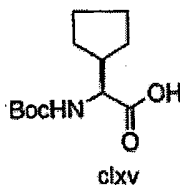
Sloučenina xxxvi'

Sloučenina clxiv (1,48 g, 3,8 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (300 mg) v MeOH (50 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou. Reakční směs se filtruje přes Celit a koncentruje pro získání sloučeniny xxxvi' (895 mg, 94,2%).

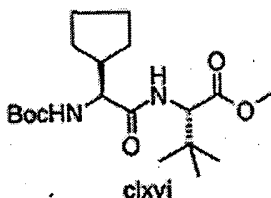
Příklad meziprojektu 158

Sloučenina clxvi:

Do DCM roztoku (15 ml) sloučeniny clxv (2 g, 8,2 mmolů) se



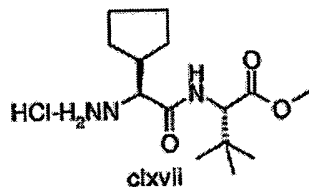
přidá HOAt (1,34 g, 9,84 mmolů) a DCC (9,84 ml, 1 M, 9,84 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 20 minut se přidá do výše uvedeného roztoku THF roztok (9,84 ml) obsahující hydrochlorid methylesteru terc.-L-leucinu (9,84 mmolů) a DIPEA (1,72 ml, 9,84 mmolů). Potom se přidá za teploty okolí DMAP (1 g, 8,2 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. Po standardním vodném zpracování a chromatografii na silikagelu (20% EtOAc/hexan) se získá sloučenina clxvi (1,75 g, 58%).



Příklad meziproduktu 159

Sloučenina clxvii:

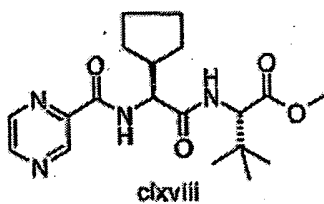
Do THF roztoku (35 ml) sloučeniny clxvi (1,75 g, 4,73 mmolů) se přidá 4 N HCl roztok v dioxanu (11,8 ml, 47,3 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. V tomto okamžiku se rozpouštědlo odstraní za sníženého tlaku pro získání surové sloučeniny clxvii (~100%), která se znovu rozpustí v DMF a použije přímo v následující reakci.



Příklad meziproduktu 160

Sloučenina clxviii:

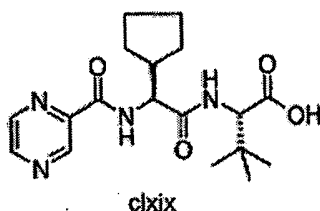
Do DCM roztoku (15 ml) obsahujícího kyselinu 2-pyrazinkarboxylovou (447 mg, 3,6 mmolů) se přidá PyBOP (1,87 g, 3,6 mmolů) a DMF roztok (15 ml) sloučeniny clxvii (811 mg, 3 mmolů). Do výsledné směsi se potom přidá DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmolů). Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí a potom se reakce zastaví vodou. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Organická vrstva se promývá solným roztokem a koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu (40% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clxviii (0.93 g, 82%).



Příklad meziproduktu 161

Sloučenina clxix:

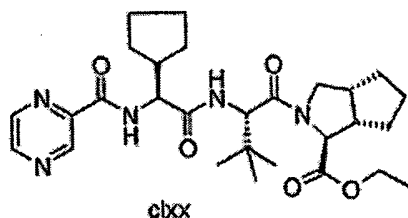
Do MeOH roztoku (10 ml) sloučeniny clxviii (0,93 g, 2,47 mmolů) se přidá 2 N NaOH (3,71 ml, 7,41 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. Potom se reakční směs okyselí na pH 3 použitím 1 N HCl. Reakční směs se zředí EtOAc (75 ml) a promývá vodou a solným roztokem. Takto získaná organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu pro získání sloučeniny clxix (~100%).



Příklad meziprojektu 162

Sloučenina clxx:

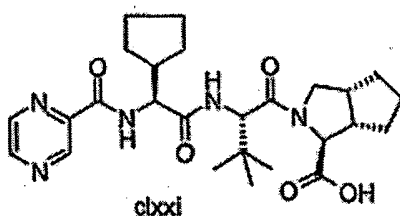
DCM roztok (10 ml) sloučeniny clxix (2,47 mmolů) se zpracovává HOAt (436 mg, 3,21 mmolů) a DCC (3,2 ml, 1 M, 3,2 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (13,6 ml) sloučeniny v (499 mg, 2,72 mmolů). Po míchání za teploty okolí přes noc se bílá pevná látka (močovina) odfiltruje. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí chromatografií na silikagelu pro získání sloučeniny clxx (0,99 g, 76%).



Příklad meziproduktu 163

Sloučenina clxxi:

EtOH roztok (20 ml) sloučeniny clxx (0,99 g, 1,88 mmolů) se zpracovává pomocí 2 N NaOH (2,81 ml, 5,63 mmolů). Po míchání za teploty okolí přes noc se reakční směs okyselí na pH 3 přidáním 1 N HCl. Reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc (75 ml). Organická vrstva se suší a koncentruje ve vakuu pro získání sloučeniny clxxi (772 mg, 82%).

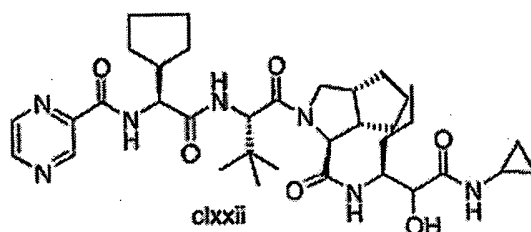


Příklad meziproduktu 164

Sloučenina clxxi:

DCM roztok (10 ml) sloučeniny clxxi (290 mg, 0,58 mmolů) se zpracovává pomocí PyBOP (484 mg, 0,93 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 20 minut se reakční směs zpracovává THF roztokem (7,5 ml) sloučeniny xiii' (140 mg, 0,75

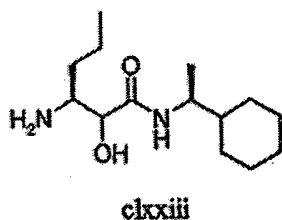
mmolů), následovaným DIPEA (0,13 ml, 0,75 mmolů). Po míchání přes noc za teploty okolí se reakce zastaví vodou a reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a suší a koncentruje ve vakuu. Výsledné reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (5% EtOH/EtOAc) pro získání sloučeniny clxxii 290 mg (75%).



Příklad meziproduktu 165

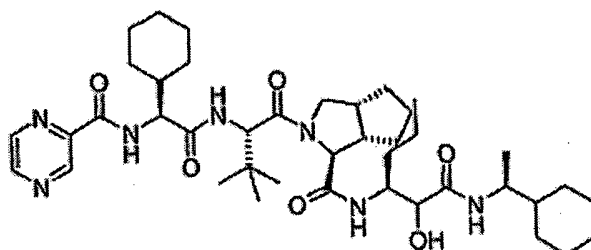
Sloučenina clxxiv:

Sloučenina lxxxiii (600 mg, 1,17 mmolů) se vyjme v DCM (4 ml). Přidá se PyBOP (670 mg, 1,3 mmolů) míchá se pět minut



a ochladí na teplotu 0 °C. Do tohoto roztoku se přidá po kapkách sloučenina clxxiii (333 mg, 1,3 mmolů) v THF (13 ml). DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmolů) se přidá do reakční směs a

směs se ponechá zahřát se na teplotu okolí za míchání po dvě noci. Následující den se reakční směs koncentruje a čistí se směsí 2% EtOH/EtOAc pro získání surové sloučeniny clxxiv (900 mg, přes 100%).

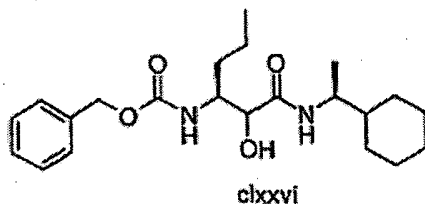


clxxiv

Příklad meziprojektu 166

Sloučenina clxxxv:

Sloučenina cxxv (3,01 g, 10,7 mmolů) se vyjme v DCM (30 ml) a teplota se sníží na -78°C . Do tohoto roztoku se přidají PyBOP (6,1g, 11,7 mmolů) a HOBT (1,58 g, 11,7 mmolů) následované (S)-(+)-1-cyklohexylethylaminem, sloučeninou clxxv (1,74 ml, 11,7 mmolů) a DIPEA (2,1 ml, 11,7 mmolů). Výsledná směs se míchá přes noc za teploty okolí. Následující den se reakční směs zředí pomocí EtOAc, promývá se 0,1 N HCl, nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Produkt se čistí v 40% EtOAc/Hex pro získání 2 g (47,8%) sloučeniny clxxvi.



Příklad meziprojektu 167

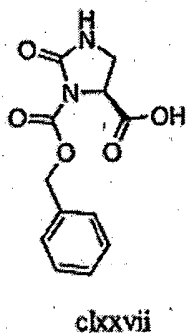
Sloučenina clxxiii:

Sloučenina clxxvi (2 g, 5,13 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (500 mg) v MeOH (40 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou. Reakční směs se filtruje přes Celit a koncentruje pro získání sloučeniny clxxiii (1,31 g, 99,8%).

Příklad meziprojektu 168

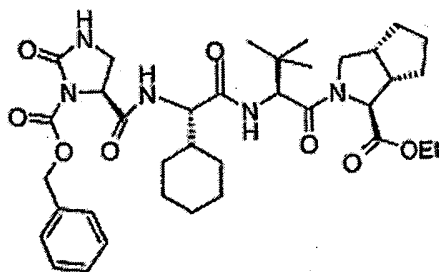
Sloučenina clxxix:

V kulaté baňce se pod inertní atmosférou sloučenina clxxvii



[1-benzylester kyseliny (S)-(-)-2-oxo-1,5-imidazolindikarboxylové] (290 mg, 1.1 mmolů) rozpustí v bezvodém DMF (6 ml). Přidá se HOAt (151 mg, 1,2 mmolů) a

reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 25 minut. Reakční směs se potom ochladí v ledové lázni. Potom se přidá DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmolů) s následnou adicí sloučeniny clxxviii (1 mmolů, 435 mg.) v bezvodém DMF (4 ml). Reakční teplota se ponechá pomalu vzrůst na teplotu okolí a směs se míchá po dva dny. Reakční směs se potom vleje do separační nálevky obsahující 120 ml EtOAc a promývá se dvakrát 1 N HCl (50 ml) a jednou solným roztokem. Organická vrstva se separuje a suší se nad MgSO₄. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (náplň v DCM a vymývání 30% potom 50% EtOAc/DCM potom 2% MeOH/EtOAc) pro získání produktu clxxix (434 mg, 64%).



clxxix

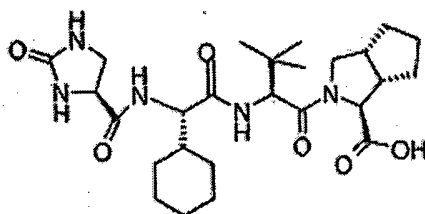
Příklad meziprojektu 169

Sloučenina clxxx:

Výchozí materiál clxxix (434 mg, 0,64 mmolů) se rozpustí v dioxanu (6 ml) a 0,5 M vodném roztoku NaOH (4 ml, 3 ekv.). Reakce se nechá probíhat přes noc. TLC v 100% EtOAc (použitím PMA skvrny) ukazujekromě očekávaného kyselého produktu na počátku rychlejší produkt. Reakční směs se

07.04.03

okyselí na pH 2 přidáním 1 N HCl a potom se extrahuje dvakrát pomocí EtOAc. Do vodného roztoku se přidá pevný NaCl pro usnadnění extrakce. Organické extrakty se potom zkombinují, suší se nad MgSO_4 a odpaří za sníženého tlaku. MS indikuje, že CBZ skupina se odstraní hydrolýzou. Výsledná sloučenina clxxx (kvantitativní výtěžek) se použije je v dalším kroku.



clxxx

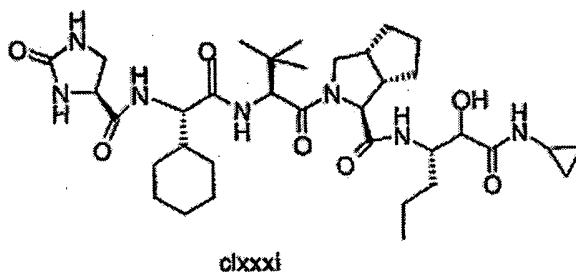
Příklad meziproduktu 170

Sloučenina clxxxi:

V kulaté baňce se pod inertní atmosférou sloučenina clxxx (279 mg, 0,54 mmolů) rozpustí v bezvodém DMF (6 ml). Přidá se HOAt (82 mg, 0,65 mmolů) a reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 25 minut. Reakční směs se potom ochladí v ledové lázni. Potom se přidá DIC (0,11 ml, 0,65 mmolů) s následnou adicí sloučeniny xiii' (0,7 mmolů) v bezvodém DMF (4 ml). Reakční teplota se nechá pomalu vzrůst na teplotu okolí a směs se míchá po dobu 21 hodin. Reakční směs se potom vleje do separační nálevky obsahující 120 ml EtOAc a promývá se dvakrát 1 N HCl (50 ml) a jednou solným roztokem. Organická vrstva se separuje, suší se nad MgSO_4 .

07.04.03

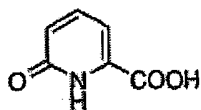
Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a produkt se čistí chromatografií na silikagelu (náplň v DCM a vymývání směsí 50% EtOAc/hexan, potom 3% MeOH/EtOAc, potom 20% EtOH/EtOAc). Po odstranění rozpouštědla se reziduum znovu rozpustí v Dri Solv THF a filtruje pro odstranění veškerého silikagelu. Odstranění rozpouštědla potom dává sloučeninu clxxxi (434 mg, 64% výtěžek).



Příklad meziprojektu 171

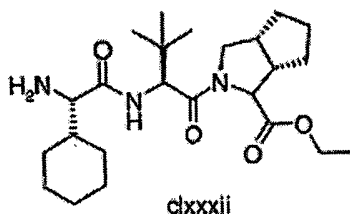
Sloučenina clxxxiii:

V kulaté baňce se pod inertní atmosférou rozpustí kyselina 6-hydroxypikolinová

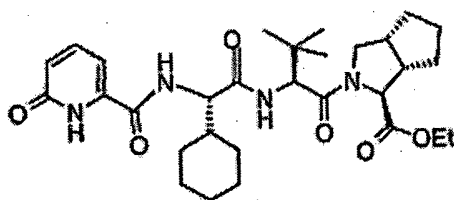


(153 mg, 1,1 mmolů) v bezvodém DMF (6 ml). Přidá se HOAt (151 mg, 1,2 mmolů) a potom se reakční směs míchá za teploty okolí po dobu 25 minut. Reakční směs se potom

ochladí v ledové lázni. Potom se přidá DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmolů) s následnou adicí sloučeniny clxxxii (1,0 mmolů, 435 mg.) v bezvodém DMF (4 ml).



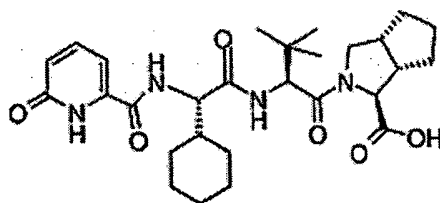
Reakční teplota se nechá pomalu vzrůst na teplotu okolí a směs se míchá po dva dny. Reakční směs se potom vleje do separační nálevky obsahující 120 ml EtOAc a promývá se dvakrát 1 N HCl (50 ml) a jednou solným roztokem. Organická vrstva se separuje a suší se nad MgSO_4 . Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a produkt se čistí chromatografií na silikagelu (náplň v DCM, vymývání 30%, potom 50% EtOAc/DCM, a potom 2% MeOH/EtOAc) pro získání sloučeniny clxxxiii (314 mg, 56%).



Příklad meziproduktu 172

Sloučenina clxxxiv:

Výchozí materiál clxxxiii (314 mg, 0,56 mmolů) se rozpustí v dioxanu (5 ml) a 0,5 M NaOH (3,4 ml, 3 ekv.). Reakce se nechá probíhat přes noc. TLC s 100% EtOAc (použitím UV) ukazuje úplnou přeměnu na pomalý kyselý produkt na počátku. Reakční směs se okyselí na pH 2 přidáním 1 N HCl a potom se extrahuje dvakrát EtOAc. Přidá se pevný NaCl pro usnadnění extrakce. Organické extrakty se potom zkombinují, suší se nad MgSO_4 a potom odpaří za sníženého tlaku pro získání sloučeniny clxxxiv (0,5 mmolů, 89%), která se používá bez úpravy v dalším kroku.



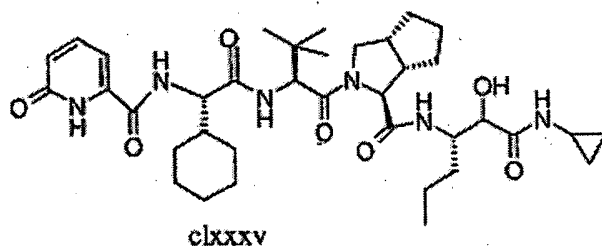
clxxxiv

Příklad meziprojektu 173

Sloučenina clxxxv:

V kulaté baňce se pod inertní atmosférou rozpustí kyselá sloučenina clxxxiv (265mg, 0,5 mmolů) v bezvodém DMF (6 ml). Přidá se HOAt (75,6 mg, 0,6 mmolů) a reakční směs se míchá za teploty okolí po dobu 25 minut. Reakční směs se potom ochladí v ledové lázni. Potom se přidá DIC (0,1 ml, 0,6 mmolů) s následnou adicí sloučeniny xiii' (0,65 mmolů) v bezvodém DMF (4 ml). Reakční teplota se nechá pomalu vzrůst na teplotu okolí a směs se míchá po dobu 21 hodin.

Reakční směs se potom vleje do separační nálevky obsahující EtOAc (120 ml) a promývá se dvakrát 1 N HCl (50 ml) a jednou solným roztokem. Organická vrstva se separuje, suší se nad MgSO_4 . Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a produkt se čistí chromatografií na silikagelu (náplň v DCM, vymývání 50% EtOAc/hexan, potom čistý EtOAc a potom 4% MeOH/EtOAc) pro získání produktu, sloučeniny clxxxv (185 mg, 52%).

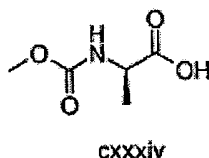


Příklad meziprojektu 174

Sloučenina cxxxxiv':

Do roztoku D-alaninu (5 g, 56,1 mmolů) v 1 N NaOH (152 ml, 152 mmolů) se za teploty 0 °C přidá roztok MeOC(O)Cl (6,5 ml, 84,2 mmolů) v diethyletheru (30 ml). Směs se míchá v ledové lázni po dobu 3 hodin a potom se pH upraví na 9 přidáním 1 N NaOH. Po míchání za teploty okolí po 1 hodinu se směs promývá etherem (3x50 ml), okyselí se na pH přibližně 2 přidáním 5 N HCl, extrahuje se EtOAc (5x50 ml). Organické extrakty se promývají vodou, solným roztokem a potom suší (MgSO_4). Rozpouštědlo se odstraní pro získání

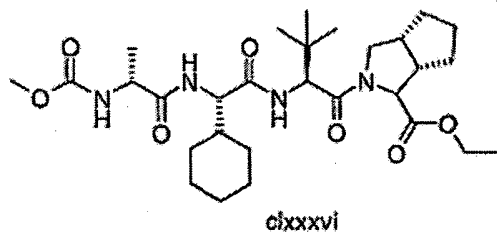
sloučeniny cxxxiv, N-methoxykarbonyl-D-alaninu, ve formě bezbarvého oleje (6,48 g, 79%).



Příklad meziproduktu 175

Sloučenina clxxxvi:

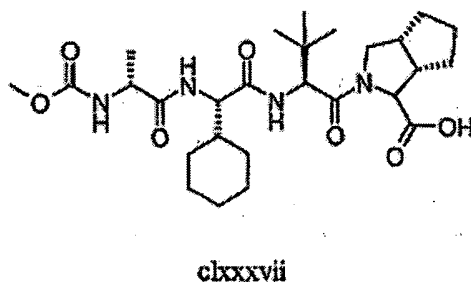
Roztoku N-methoxykarbonyl-D-alaninu (0,193 g, 1,31 mmolů) a HOAt (0,177 g, 1,31 mmolů) v DCM (10 ml), ochlazený v ledové lázni, se zpracovává DCC (1,31 ml, 1,31 mmolů). Po míchání v ledové lázni po dobu 0,5 hodiny se přidá roztok připravené sloučeniny clxxxii (0,88 mmolů) v THF (8,8 ml). Směs se zahřívá na teplotu okolí a míchá přes noc, potom se ochladí v ledové lázni a reakce se zastaví nasyceným roztokem NaHCO_3 . Precipitáty se filtrují a filtrát se vyjme v EtOAc (100 ml). Organická vrstva se promývá nasyceným roztokem NaHCO_3 , solným roztokem a potom suší (MgSO_4). Po odstranění rozpouštědla se reziduum čistí kolonovou chromatografií na oxidu křemičitém (60% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny clxxxvi ve formě gumovité pěny (0,321 g, 68%).



Příklad meziproduktu 176

Sloučenina clxxxvii:

Do roztoku sloučeniny clxxxvi (0,321 g, 0,597 mmolů) v EtOH (5 ml) se za teploty 5 °C přidá 2 N NaOH (1,05 ml, 2,1 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí po dobu 4 hodin. Roztok se okyselí na pH ~2 přidáním 1 N HCl a EtOH se odstraní rotačním odpařením. Směs se extrahuje pomocí EtOAc (3x30 ml) a zkombinovaný extrakt se promývá solným roztokem a potom suší (MgSO₄). Rozpouštědlo se odstraní a reziduum se suší za vakua pro získání sloučeniny clxxxvii ve formě gumovité pěny (0,235 g, 77%).



Příklad meziproduktu 177

07.04.03

Sloučenina clxxxviii:

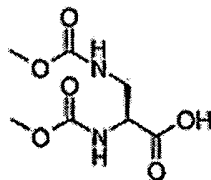
Roztok sloučeniny clxxxvii (0,363 g, 0,712 mmolů) v DCM (10 ml) se ochladí v ledové lázni a zpracovává se PyBOP (0,594 g, 1,14 mmolů). Po míchání za teploty okolí po dobu 0,5 hodiny se směs ochladí v ledové lázni a zpracovává roztokem sloučeniny xiii' (1,1 mmolů) v THF (11 ml) a DIPEA (0,249 ml, 1,42 mmolů). Směs se míchá za teploty okolí přes noc a reakce se zastaví přidáním roztoku NH_4Cl . Rozpouštědlo se koncentruje a směs se vyjme v EtOAc (100 ml). Organická vrstva se promývá nasyceným roztokem NaHCO_3 , solným roztokem a potom suší (MgSO_4). Po odstranění rozpouštědla se reziduum čistí kolonovou chromatografií (5% EtOH/EtOAc) pro získání clxxxviii (0,341 g, 71%).

Příklad meziprojektu 178

Sloučenina clxxxix:

Diaminopropionová kyselina (3 g, 28,7 mmolů) se vyjme v 1 M NaOH (86,2 ml, 86,2 mmolů) a ochladí na teplotu 0 °C a potom se přidá MeOC(O)Cl (5,54 ml, 71,75 mmolů) v Et_2O (25 ml). Výsledná směs se míchá přes noc za zahřátí na teplotu okolí. pH reakční směsi se sníží na 2 a vodná vrstva se extrahuje 3x pomocí EtOAc. Extrakty se zkombinují a suší se nad Na_2SO_4 , filtrují a koncentrují pro získání sloučeniny clxxxix (3,09 g, 48,9%).

07.04.03



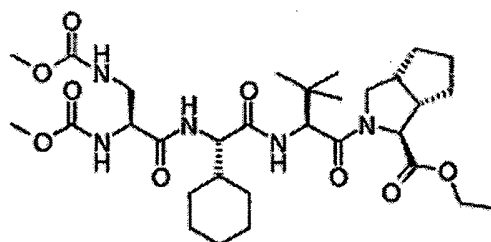
clxxxix

Příklad meziproduktu 179

Sloučenina cc:

Sloučenina clxxxix (340 mg, 1,55 mmolů) se vyjme v DCM (4 ml). Přidají se DCC (1,7 mmolů) a HOAt (235 mg, 1,7 mmolů), následované sloučeninou clxxxii (1,7 mmolů) v DCM (3,4 ml). Reakční směs se míchá přes noc. Následující den se reakční směs filtruje přes vrstvu oxidu křemičitého a koncentruje. Čištění se provádí v 75% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny clxxxx (715 mg, 72,4%).

07.04.03

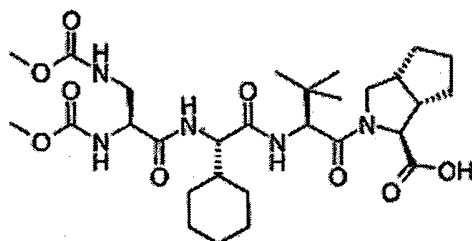


clxxxx

Příklad meziproduktu 180

Sloučenina clxxxxi:

Sloučenina clxxxx (715 mg, 1,12 mmolů) se hydrolyzuje za standardních podmínek použitím EtOH (4 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.) pro získání sloučeniny clxxxxi (600 mg, 88,0%).



clxxxxi

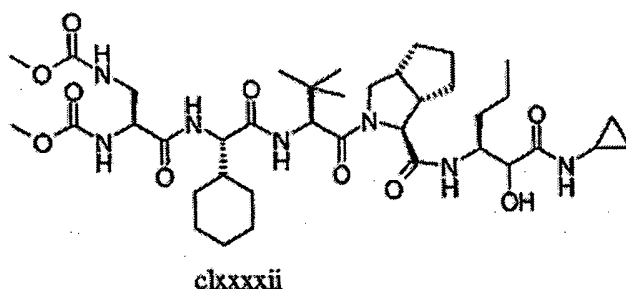
Příklad meziproduktu 181

Sloučenina clxxxxii:

Sloučenina clxxxxi (550 mg, 0,9 mmolů) se vyjme v DCM (8 ml). Přidá se PyBOP (675 mg, 1,3 mmolů) následovaný sloučeninou xiii' (1,3 mmolů) v THF (1,3 ml). Přidá se DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmolů) a výsledný roztok se míchá přes noc. Následující den se reakční směs zředí EtOAc, promývá

07.04.03

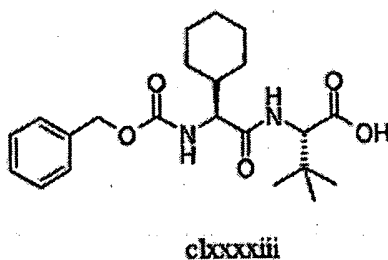
nasyceným NaHCO_3 a potom solným roztokem před koncentrací pro získání rezidua. Výsledné reziduum se čistí pomocí 5% EtOH/EtOAc pro získání sloučeniny clxxxxii (290 mg, 41,5%).



Příklad meziprojektu 182

Sloučenina clxxxxiii:

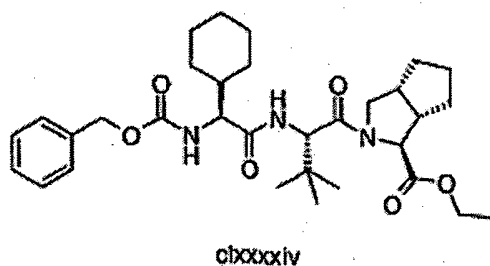
Methylester Cbz-cyklohexyglycin-terc.-leucinu (7,36 g, 17,6 mmolů) se hydrolyzuje za standardních podmínek použitím MeOH (60 ml) a 1 N NaOH (52,8 ml, 3 ekv.) pro získání meziprojektu clxxxxiii (92%).



Příklad meziprojektu 183

Sloučenina clxxxxiv:

Sloučenina clxxxxiii (3,82 g, 9,46 mmolů) se vyjme v DCM (30 ml). Přidá se DCC (11,35 mmolů) v DCM (11,35 ml) s následnou adicí HOAt (1,54 g, 11,35 mmolů). Výsledná směs se míchá pět minut a přidá se sloučenina v (9,46 mmolů) v THF (40 ml). Výsledná směs se míchá přes noc. Následující den se reakční směs zředí pomocí EtOAc, promýván 1 N HCl, nasyceným NaHCO₃ a potom solným roztokem před koncentrací pro získání rezidua. Vzniklé residuum se čistí pomocí gradientu 20% na 30% na silikagelu pro získání sloučeniny clxxxxiv (3,03 g, 56,3%).



Příklad meziprojektu 183

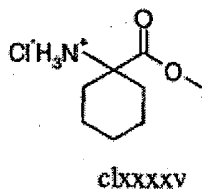
Sloučenina clxxxii:

Sloučenina clxxxxiv (3,03 g, 5,33 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (500 mg) v MeOH (30 ml) pod vodíkovou atmosférou po dobu 4 hodin pro získání sloučeniny clxxxii (2,3 g, 99%).

Příklad meziprojektu 184

Sloučenina clxxxxv:

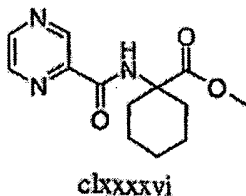
Do roztoku kyseliny 1-amino-1-cyklohexankarboxylové (2,86 g, 20 mmolů) v MeOH (40 ml) se přidá za teploty 0 °C po kapkách SOCl_2 (3 ml). Směs se pomalu zahřívá na teplotu okolí a potom se zahřívá na teplotu zpětného toku po dobu 5 hodin. Potom se do čirého roztoku přidá Et_2O a precipitát se izoluje. Pevná látka se dále suší ve vakuu pro získání sloučeniny clxxxxv (95%) ve formě bílého prášku.



Příklad meziprojektu 185

Sloučenina clxxxxvi:

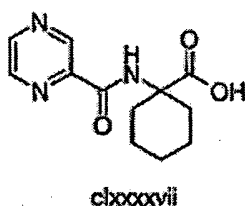
Kyselina 2-pyrazinkarboxylová (1 g, 8 mmolů, 1 ekv.) se rozpustí v DCM (15 ml) s přidáním HOAt (1,1 g, 8 mmolů) a DCC (8 ml, 1 M) v DCM. Po míchání za teploty okolí po dobu 20 minut se přidá do aktivované směsi sloučenina clxxxxv (1,3 g, 8 mmolů). Následně se přidá DIPEA (2 ml, 12 mmolů), následuje DMAP (1,5 g, 12 mmolů). Po míchání po tři dny za teploty okolí se reakční směs filtruje přes Celit, koncentruje a požadovaný produkt clxxxxvi se čistí kolonovou chromatografií (50% EtOAc/hexan) na žlutý olej (2,1 g, 100%).



Příklad meziproduktu 186

Sloučenina clxxxxvii:

Sloučenina clxxxxvi (1,06 g, 2,6 mmolů) se rozpustí v MeOH (30 ml) s přidáním 2 N NaOH (vodný) (12 ml, 24 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí přes noc před tím, než TLC (50% EtOAc/hexan) ukazuje ukončení hydrolýzy. Roztok se potom okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl a zředí se EtOAc a následuje extrakce organické vrstvy. Organická vrstva se následně promývá solným roztokem a suší nad MgSO₄ pro získání sloučeniny clxxxxvii (84%) po koncentraci.



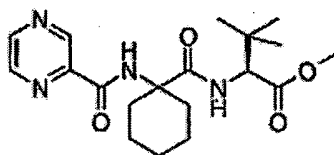
Příklad meziproduktu 187

Sloučenina clxxxxviii:

Sloučenina clxxxvii (1,6 g, 6,4 mmolů) se rozpustí v DCM (18 ml) a potom se za teploty okolí přidají HOAt (0,96 g, 7 mmolů) a DCC (7 ml, 1 M v DCM). Po míchání za teploty okolí

07.04.03

po dobu 20 minut se přidá do aktivované směsi hydrochlorid methylesteru L-terc.-leucinu (7 ml, 1 M v THF). Následně se přidá DIPEA (1,2 ml, 7 mmolů), následuje DMAP (1,2 g, 9,8 mmolů). Po míchání po tři dny za teploty okolí se reakční směs filtruje přes Celit, čistí kolonovou chromatografií a koncentruje pro získání sloučeniny clxxxxviii (60% EtOAc/hexan) ve formě bílé pevné látky (1,74 g, 72%).

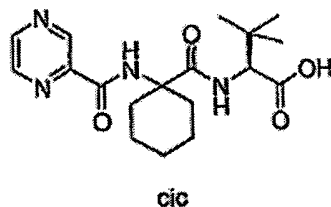


clxxxxix

Příklad meziprojektu 188

Sloučenina cic:

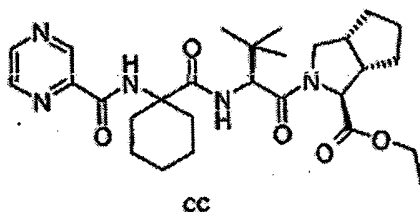
Sloučenina clxxxxviii (1,74 g, 4,6 mmolů) se rozpustí v MeOH (22 ml) s přidáním 2 N NaOH (vodný) (7 ml, 14 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí přes noc před tím, než TLC (50% EtOAc/hexan) ukazuje ukončení hydrolýzy. Roztok se okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl a zředí pomocí EtOAc a potom se organická vrstva extrahuje. Organická vrstva se promývá solným roztokem a suší se nad MgSO₄ a potom koncentruje pro získání sloučeniny cic (100%).



Příklad meziproduktu 189

Sloučenina cc:

Do DCM roztoku (15 ml) sloučeniny cic (1,5 g, 4,1 mmolů) se za teploty okolí přidá HOAt (610 mg, 4,5 mmolů), následovaný 1 M DCC roztokem v DCM (4,5 ml, 4,5 mmolů). Po míchání po dobu 30 minut za teploty okolí se potom přidá THF roztok (20 ml, 0,2 M) sloučeniny v (4 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc. Potom se reakční směs filtruje přes Celit. Filtrát se koncentruje na žlutý olej, který se čistí chromatografií na silikagelu (50% EtOAc/hexan) pro získání sloučeniny cci (660 mg, 32%).

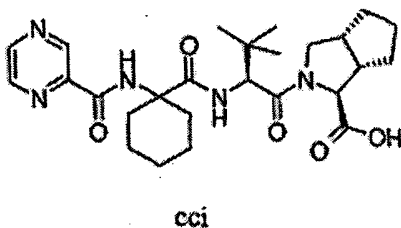


Příklad meziproduktu 190

Sloučenina cci:

Do EtOH roztoku (6 ml) sloučeniny cc (600 mg, 1,13 mmolů) se přidá 2 N NaOH (1,7 ml, 3,4 mmolů). Reakční směs se

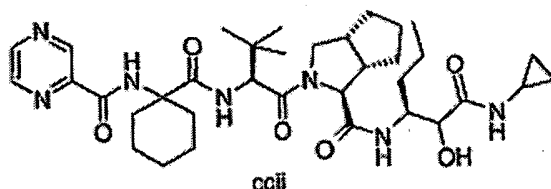
míchá po dobu 2 hodin za teploty okolí, potom se okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl. Směs se potom zředí pomocí EtOAc, následuje extrakce organické vrstvy. Následně se organická vrstva promývá solným roztokem a potom suší nad MgSO₄ pro získání sloučeniny cci (92%) po koncentraci.



Příklad meziprojektu 191

Sloučenina ccii:

Do DCM roztoku (8 ml) ccii (310 mg, 0,62 mmolů) se přidá PyBOP (420 mg, 0,8 mmolů). Roztok se míchá za teploty okolí po dobu 30 minut. Do tohoto roztoku se potom přidá sloučenina xiii' (8 ml, 0,1 M) v THF, s následnou adicí DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmolů). Reakční směs se míchá za teploty okolí přes noc a potom se reakce zastavuje vodou (25 ml) po dobu 30 minut. Směs se potom extrahuje pomocí EtOAc. Výsledná organická vrstva se promývá solným roztokem a potom se suší nad MgSO₄ před koncentrací pro získání žlutého oleje. Čištění chromatografií na silikagelu (3% EtOH/EtOAc) dává sloučeninu ccii (140 mg, 33%).



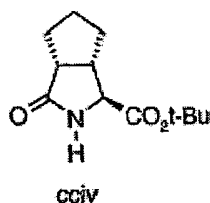
Příklad meziproduktu 192

Sloučenina ccxiv

Do roztoku sloučeniny cciii, terc.-butyl esteru (N-difenylmethylen)-glycinu, (6 g, 0,0206 mmolů) a chirálního PTC (1,08 g, 0,00206 mmolů) v bezvodém DCM (48 ml) se pod dusíkovou atmosférou za teploty -60°C přidá CsOHC.H₂O (6,9 g, 0,0412 mmolů). Do reakční směsi se přidá po kapkách methylester 1-karboxy-1-cyklopentenu (5,2 ml, 0,0412 mmolů) v 10 ml DCM. Směs se míchá po dobu 4 dní za teploty -60°C , potom se zředí přidáním 200 ml Et₂O a se přidá 15 ml nasyceného vodného roztoku NH₄Cl. Fáze se separují a organická fáze se promývá 15 ml vody a 15 ml solného roztoku. Vodné fáze se extrahují 100 ml Et₂O. Organické fáze se spojí a suší se nad Na₂SO₄. Surový produkt se získá odstraněním rozpouštědla, rozpuštěním v 100 ml EtOH a potom se přidají NH₂OH.HCl (1,43 g, 0,0206 mmolů) a NaOAc (1,68 g, 0,0206 mmolů). Směs se zahřívá na teplotu zpětného toku po dobu 48 hodin. Potom se rozpouštědlo odstraní a získané surové reziduum se přímo čistí mžikovou chromatografií s vymýváním směsí 30 %-50 % EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cciv (65 %) ve formě bílé pevné látky. C₁₂H₁₉NO₃ (molekulová hmotnost = 225,29);

MS: m/z ($M^+ + 1$) = 226,5.

Enantiomerní přebytek: 18 % ee, určeno chirální HPLC.

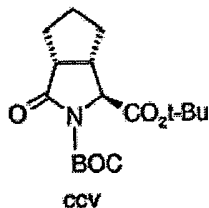


Příklad meziprojektu 193

Sloučenina ccv

Do roztoku sloučeniny cciv (2 g, 0,0088 mmolů) v 60 ml of ACN se přidá katalytické množství DMAP (0,216 g, 0,0017 mmolů) a roztok di-terc.-butyl-dikarbonátu (2,49 g, 0,011 mmolů) v 30 ml ACN. Směs se míchá po dobu 14 hodin za teploty okolí, potom se zředí přidáním 100 ml DCM a promývá nasyceným NaHCO_3 (10 ml) a solným roztokem (10 ml). Organická fáze se suší nad Na_2SO_4 . Odpaření rozpouštědla poskytne surový produkt, který se čistí v silikagelové koloně s vymýváním směsí 15 % EtOAc/hexan pro získání sloučeniny ccv (86%) ve formě bílé pevné látky. $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_5$
molekulová hmotnost = 325,40

MS: m/z ($M^+ + 1$) = 326,2



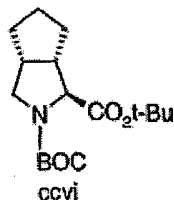
Příklad meziprojektu 194

Sloučenina ccvi

Do roztoku sloučeniny ccv (1,7 g, 0,0052 mmolů) v 50 ml THF (0,14 M) se za teploty -78°C přidá DIBAL-H (7,8 ml, 0,0078 mmolů). Směs se míchá po 1 hodině, potom se přidá 10 ml of MeOH. Směs se zředí přidáním 25 ml EtOAc a 25 ml nasyceného vodného roztoku vlnanu sodného a potom se míchá za teploty okolí jednu hodinu. Fáze se separují a vodná fáze se extrahuje jednou pomocí 50 ml EtOAc. Organické fáze se zkombinují a suší se nad Na_2SO_4 . Odpaření rozpouštědla dalo surové reziduum, která se používá bez jakéhokoli čištění. Surová látka se rozpustí v 25 ml DCM, přidá se Et_3Si (0,84 ml, 0,0052 mmolů) a potom se směs ochladí na teplotu -78°C před přidáním po kapkách BF_3OEt_2 (0,71 ml, 0,0061 mmolů). Po 30 minutách se přidají Et_3Si (0,84 ml) a BF_3OEt_2 (0,71 ml) a směs se míchá po dobu 2 hodin za teploty -78°C . Reakce se potom zastaví nasyceným vodným NaHCO_3 (10 ml) a extrahuje se DCM (dvakrát 20 ml). Organické fáze se zkombinují a suší se nad Na_2SO_4 . Odpaření rozpouštědla dává surové reziduum, které se čistí mžikovou chromatografií s vymýváním směsí 13 % EtOAc/hexan pro získání sloučeniny ccvi %).

$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ molekulová hmotnost = 311,42

MS: m/z ($M^+ + 1$) = 312,6

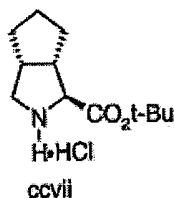


Příklad meziproduktu 195

Sloučenina ccvii

Sloučenina ccvi (0,5 g, 0,0016 mmolů) se rozpustí v 8 ml 1 N HCl v EtOAc (připraven probubláváním bezvodého HCl do bezvodého EtOAc a potom zředěním na 1 N dodatečným EtOAc). Směs se míchá po dobu 6 hodin za teploty okolí. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a výsledný precipitát se rozpustí v Et₂O. Po míchání směsi po dobu 15 minut se rozpouštědlo odstraní za sníženého tlaku. Výsledná bílá pevná látka se promývá Et₂O a sloučenina ccvii (0,27 g, 80% výtěžek) se izoluje filtrací. C₁₂H₂₁NO₂ molekulová hmotnost = 211,15

MS: m/z (M⁺ + 1) = 212,6



Příklad meziproduktu 196

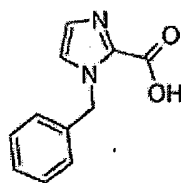
Sloučenina v

Do roztoku sloučeniny ccxvi (0,230 g, 0,74 mmolů) v DCM (3,7 ml) se přidá TFA (2,85 ml). Směs se míchá přes noc, potom se rozpouštědlo odstraní ve vakuu do sucha a reziduum se rozpustí v EtOH (7,5 ml). Směs se ochladí na teplotu 0 °C a přidá se po kapkách SOCl_2 (0,22 ml, 2,96 mmolů) a potom se směs zahřívá na teplotu zpětného toku po dobu 2 hodin. EtOH se odstraní za sníženého tlaku a reziduum se rozpustí v DCM (10 ml). Výsledný roztok se promývá dvakrát nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (5 ml). Fáze se separují a organická fáze se suší nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu pro získání sloučeniny v (80 %) ve formě oleje. $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ molekulová hmotnost 183,25
MS: m/z ($M^+ + 1$) = 184,2

Příklad meziproduktu 197

Sloučenina cd

1-Benzylimidazol (6 g, 37,9 mmolů) se vyjme v Et_2O (180 ml). Výsledný roztok se ochladí na -60 °C a zpracovává se $n\text{-BuLi}$ (1,6 M, 24 ml). Reakční směs se míchá po dobu 30 minut a potom se CO_2 probublává směsí po dobu 15 minut. Precipitát se filtruje, propláchnuje Et_2O a potom se vyjme v H_2O . Tento vodný roztok se okyselí na pH 3 přidáním 5 N HCl . Požadovaný produkt, cd, se izoluje po lyofilizaci ve formě bílé pevné látky.

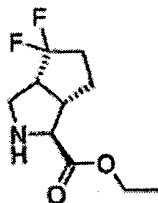


cd

Příklad meziproduktu 198

Sloučenina cdi

DCM roztok (100 ml) sloučeniny i (9,25 g, 27,9 mmolů) se zpracovává za teploty 0 °C pomocí DAST (9,2 ml, 69,8 mmolů). Po míchání za teploty okolí přes noc se reakce zastaví pomocí ledu a směs se extrahuje DCM (200 ml). Organická vrstva se promývá solným roztokem a koncentruje ve vakuu. Reziduum se čistí chromatografií na silikagelu (30% EtOAc/hexan) pro získání 8,5 g (86%) požadovaného fluorovaného meziproduktu. Část tohoto meziproduktu (4,5 g, 14,2 mmolů) se rozpustí v EtOH (75 ml). Tento roztok se vystaví standardním hydrogenačním podmínkám použitím $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (2,98 g, 20% obsah Pd, 4,26 mmolů). Po míchání přes noc za teploty okolí se reakční směs filtruje přes Celit. Filtráty se koncentrují ve vakuu pro získání sloučeniny cdi (2,5 g, 96%).

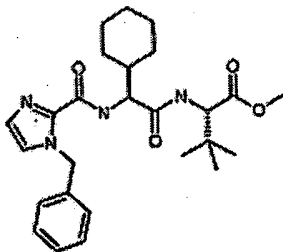


cdi

Příklad meziproduktu 199

Sloučenina cdii

Do roztoku sloučeniny cd (890 mg, 4,4 mmolů) vyjmuté v DCM (15 ml) se přidají HOBt (595 mg, 4,4 mmolů) a DCC (4,4 mmolů, 1 M v DCM) a směs se míchá po 20 minut. Do této směsi se přidá DCM roztok (15 ml) sloučeniny lxxix' (990 mg, 3,5 mmolů). Výsledná směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se zředí pomocí EtOAc, promývá se nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Organická vrstva se koncentruje ve vakuu pro získání rezidua, které se čistí ve směsi 30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cdii (666 mg, 41%).

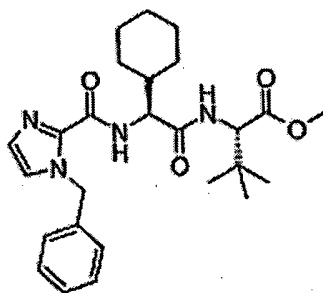


cdii

Příklad meziproduktu 200

Sloučenina cdiii

Sloučenina cdiii se připraví ze sloučenina cdi za standardních podmínek hydrolýzy použitím methylalkoholu (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.). Získá se 565 mg sloučeniny cdiii (88%).

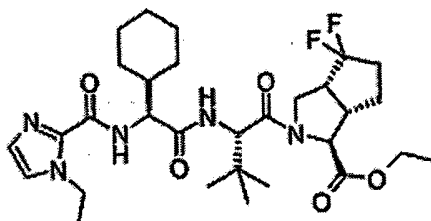


cdiii

Příklad meziprodktu 201

Sloučenina cdiv

Sloučenina cdiii (1,24 mmolů) se vyjme v DCM (5 ml). Přidá se DCC (1,6 mmolů, 1 M DCM) následovaný HOAT (1,6 mmolů).



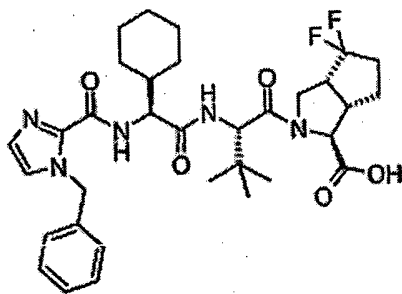
Výsledná směs se míchá 20 minut a sloučenina cdi (1,6 mmolů) se přidá po kapkách v THF (8 ml). Reakční směs se

míchá přes noc. Reakční směs se filtruje a proplachuje EtOAc. Zkombinované organické vrstvy se promývají nasyceným NaHCO_3 , solným roztokem, suší se nad MgSO_4 a koncentrují. Čištění se provádí ve směsi 30% EtOAc/hexan pro získání sloučeniny cdv (565 mg, 70%).

cdv

Příklad meziprojektu 202-cdv

Sloučenina cdv (565 mg, 0,86 mmolů) se připraví ze sloučeniny cdv za standardních podmínek hydrolýzy použitím ethylalkoholu (10 ml) a 1 N NaOH (3 ekv.). Získá se 490 mg (91%) sloučeniny cdv.

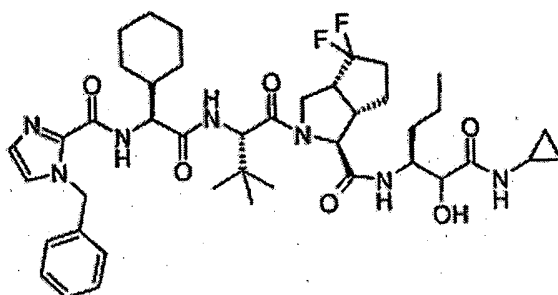


cdv

Příklad meziprojektu 203-cdvi

Sloučenina cdv (490 mg, 0,78 mmolů) se vyjme v DCM (10 ml). Do DCM roztoku se přidá PyBOP (520 mg, 1 mmolů), následuje THF roztok (10 ml) xiii (186 mg, 1 mmolů). Do reakční směsi

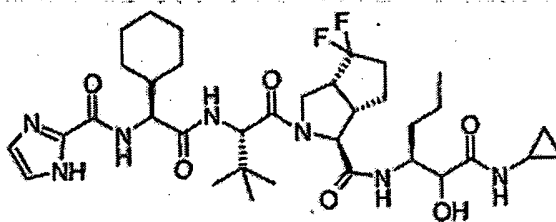
se přidá DIEA (0,18 ml, 1 mmolů) a směs se míchá přes noc pod dusíkovou atmosférou. Následující den se reakční směs zředí EtOAc, promývá nasyceným NaHCO_3 a solným roztokem. Čištění se provádí v 100% EtOAc pro získání sloučeniny cdvi (478 mg, 77%).



cdvi

Příklad meziproduktu 204-cdvii

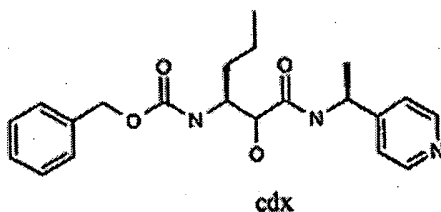
Sloučenina cdvi (478 mg, 0,6 mmolů) se hydrogenuje použitím $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20% bezvodá báze, 100 mg) v MeOH (40 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou. V tomto okamžiku se reakční směs filtruje přes Celit a koncentruje pro získání sloučeniny cdvii (417 mg, 98%).



cdvii

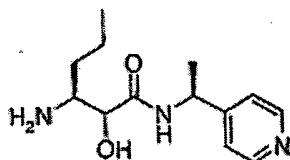
Příklad meziprojektu 205-cdx

Sloučenina cxxv (zakoupená od společnosti Albany Molecular Research Inc., 1,5 g, 5,2 mmolů) se vyjme v DCM (15 ml). Do tohoto roztoku se přidají PyBOP (2,7 g, 5,2 mmolů) a HOBT (700 mg, 5,2 mmolů). THF roztok (15 ml) (-)- α -(4-pyridyl)ethyl aminu (640 mg, 5,2 mmolů) se přidá do výše uvedeného roztoku, následovaný DIEA (0,93 ml, 5,2 mmolů). [(-)- α -(4-pyridyl)ethylamin se získá z vínánové soli (-)- α -(4-pyridyl)ethylaminu (Aldrich) mícháním s 1 N NaOH (2 ekv.) po 1 hodinu následovaným extrakcí pomocí EtOAc (3x) 70% zisk]. Reakční směs se míchá přes noc za teploty okolí. Reakční směs se promývá nasyceným NaHCO₃ a solným roztokem. Produkt se čistí ve směsi 5% EtOH/EtOAc pro získání 2 g (99%) meziprojektové sloučeniny cdx.



Příklad meziprojektu 206-cdviii

Sloučenina cdx (2 g, 5,2 mmolů) se hydrogenuje použitím 10% Pd/C (500 mg) v MeOH (50 ml). Reakční směs se míchá přes noc pod vodíkovou atmosférou. Produkt se filtruje přes Celit a koncentruje pro získání sloučeniny cdviii (1,3, g 98%).



cdviii

Farmakologie

Sloučeniny podle předloženého vynálezu byly popsány výše jako použitelné pro inhibici HCV proteázy a tady jsou také použitelné pro inhibici HCV replikace.

V souladu s tím se předložený vynález týká způsobu inhibice HCV proteázy, zahrnující kontakt sloučeniny obecného vzorce 1 v množství umožňujícím inhibici HCV proteázy s kompozicí obsahující HCV proteázu.

Předložený vynález se dále týká způsobu inhibice replikace HCV zahrnující kontakt HCV s účinným množstvím sloučeniny obecného vzorce 1.

Předložený vynález se kromě toho dále týká způsobu léčby pacienta trpícího nebo vystaveného HCV infekci, který zahrnuje podávání pacientovi farmaceuticky účinného množství sloučeniny obecného vzorce 1. Reference uvedené zde a týkající se léčby HCV infekce by měly být chápány tak, že zahrnují profylaktickou terapii pro prevenci nebo inhibici infekce stejně tak jako léčbu vzniklé akutní nebo chronické HCV infekce nebo fyziologických stavů,

souvisejících s HCV infekcí, pro vyléčení pacienta od infekce, inhibici jistého stupně (množství) infekce nebo zlepšení fyziologických stavů s ní souvisejících. "Účinné množství" se chápe jako množství sloučeniny podle předloženého vynálezu, účinné v rámci rozumné biologické úvahy, vhodné pro použití v kontaktu s buňkami člověka a dalších savců bez nepatřičné toxicity, podráždění, alergické odezvy a podobně a přináší rozumný poměr příznivého působení a rizika při léčbě HCV infekce a tím vytváří požadovaný terapeutický účinek.

Fyziologické stavy uvedené výše zahrnují některé, ale ne všechny, možné klinické situace, ve kterých je žádoucí léčba proti HCV. Odborníci v tomto oboru jsou si dobře vědomi okolností vyžadujících léčbu proti HCV.

Konkrétní aspekt předloženého vynálezu se týká sloučenin podle předloženého vynálezu pro podávání ve formě farmaceutické kompozice, i když sloučenina může být podávána samotná. "Farmaceutická kompozice" znamená kompozici obsahující sloučeninu obecného vzorce 1 a alespoň jednu složku, zvolenou ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky přijatelné nosiče, ředidla, povlaky, adjuvans, excipienty, nebo vehikula, jako jsou konzervační činidla, plnidla, desintegrační činidla, smáčecí činidla, emulsifikační činidla, činidla pro stabilizaci emulze, suspenzní činidla, isotonická činidla, sladidla, chuťová činidla, parfumační činidla, barviva, antibakteriální činidla, antifungální činidla, další terapeutická činidla, lubrikační činidla, činidla zpomalující nebo podporující

adsorpci a dispenzní činidla, v závislosti na způsobu podávání a dávkových formách. Kompozice mohou být používány ve formě tablet, pilulek, granulí, prášků, vodných roztoků nebo suspenzí, injektovatelných roztoků, elixírů nebo sirupů. Příklady suspenzních činidel zahrnují ethoxylované isostearylalkoholy, polyoxyethylensorbitol a sorbitanové estery, mikrokrystalickou celulózu, metahydroxid hlinitý, bentonit, agaragar a tragakanth nebo směsi těchto látek. Příklady antibakteriálních a antifungálních činidel pro prevenci působení mikroorganismů zahrnují parabeny, chlorbutanol, fenol, kyselinu sorbovou a podobně. Příklady isotonických činidel zahrnují cukry, chlorid sodný a podobně. Příklady činidel zpozžujících adsorpci pro prodloužení adsorpce zahrnují monostearan hlinitý a želatinu. Příklady činidel podporujících adsorpci pro zesílení absorpce zahrnují dimethylsulfoxid a příbuzné analogy. Příklady nosičů, ředidel, rozpouštědel, vehikul, solubilizačních činidel, emulzifikátorů a emulzních stabilizátorů zahrnují vodu, chloroform, sacharózu, ethanol, isopropylalkohol, ethylkarbonát, ethylacetát, benzylalkohol, tetrahydrofurfurylalkohol, benzylbenzoát, polyoly, propylenglykol, 1,3-butylen glykol, glycerol, polyethylenglykoly, dimethylformamid, Tween® 60, Span® 80, ketostearylalkohol, myristylalkohol, glyceryl mono-stearát a laurylsulfát sodný, estery mastných kyselin, sorbitan, rostlinné oleje (jako je olej z bavlníkových semen, podzemnicový olej, kukuřičný olej, olivový olej, ricínový olej a sezamový olej) a injektovatelné organické estery jako je ethyloleát a podobně nebo vhodné směsi těchto látek.

Příklady excipientů zahrnují laktózu, mléčný cukr, citrát sodný, uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý. Příklady desintegračních činidel zahrnují škrob, alginové kyseliny a jisté komplexní silikáty. Příklady lubrikantů zahrnují stearan hořečnatý, laurylsulát sodný, mastek stejně tak jako polyethylenglykoly o vysoké molekulové hmotnosti.

Další terapeutická činidla, která mohou být použita v kombinaci se sloučeninami podle předloženého vynálezu, zahrnují další činidla s účinkem proti HCV. Některé příklady známých činidel s účinkem proti HCV zahrnují imunomodulační činidla, jako jsou α -, β - nebo γ -interferony; pegylované derivatizované inteferony- α , další protivirová činidla jako je ribavirin a amantadin; další inhibitory proteázy hepatitidy C; inhibitory dalších cílů životního cyklu HCV včetně helikázy, polymerázy, metaloproteázy, vnitřní ribosomové vstupy nebo širokospektré protivirové sloučeniny jako je VX497, inhibitor buněčné inosin monofosfát dehydrogenázy, IMPDH, kterého se týká U.S. patent č. 5,807,876; nebo jejich kombinace. Terapeutická činidla používaná v kombinaci se sloučeninami podle předloženého vynálezu mohou být podávána odděleně, současně nebo postupně.

Volba materiálů ve farmaceutické kompozici, jiných než je sloučenina obecného vzorce 1, je obecně určena v souladu s chemickými vlastnostmi účinné sloučeniny jako je rozpustnost, konkrétní způsob podávání a opatření, která

mají být dodržována ve farmaceutické praxi. Například excipienty jako je laktóza, citrát sodný, uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý a desintegrační činidla jako je škrob, alginové kyseliny a jisté komplexní silikáty zkombinované s lubrikanty jako je stearan hořečnatý, laurylsulfát sodný a mastek mohou být použity pro přípravu tablet.

Farmaceutické kompozice mohou být používány ve vybraných formách jako jsou tablety, pilulky, granule, prášky, vodné roztoky nebo suspenze, injektovatelné roztoky, elixíry nebo sirupy.

"Kapalná dávková forma" znamená dávku účinné sloučeniny pro podávání pacientovi, která je v kapalně formě, například farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a elixíry. Kromě účinných sloučenin může kapalná dávková forma obsahovat inertní ředidla běžně používaná v oboru, jako rozpouštědla, solubilizační činidla a emulzifikátory.

Pevné kompozice mohou také být použity jako náplně v měkkých a tvrdých želatinových kapslích s použitím takových excipientů jako je laktóza nebo mléčný cukr stejně tak jako polyethylenglykoly o vysoké molekulové hmotnosti a podobně.

Pokud jsou použity vodné suspenze, mohou obsahovat emulzifikační činidla nebo činidla, která usnadňují vytváření suspenze.

Olejovitá fáze emulze farmaceutické kompozice může sestávat ze známých složek známým způsobem. I když fáze může obsahovat pouze emulzifikátor (jinak známý jako emulgátor), je žádoucí, aby obsahovala směs alespoň jednoho emulzifikátoru s tukem nebo olejem nebo současně s tukem a olejem. Výhodně emulze obsahuje hydrofilní emulzifikátor spolu s lipofilním emulzifikátorem, který působí jako stabilizátor. Je také výhodné zahrnout současně olej a tuk. Emulzifikátor nebo emulzifikátory s nebo bez stabilizátoru nebo stabilizátorů vytvářejí emulzifikační vosk a ty společně s olejem a tukem vytvářejí emulzifikační mastový základ, který tvoří olejovitou dispergovanou fázi krémových přípravků.

Je-li to požadováno, vodná fáze krémového základu může obsahovat například alespoň 30% hmotn. polyhydričkého alkoholu, to znamená alkoholu, který má dvě nebo více hydroxylových skupin, jako je propylenglykol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glycerol a polyethylenglykol (včetně PEG 400) a jejich směsi. Je žádoucí, aby topické přípravky obsahovaly sloučeninu, která zlepšuje absorpci nebo penetraci účinné složky pokožkou nebo dalšími dotčenými oblastmi.

Volba vhodných olejů nebo tuků pro přípravek je založena na dosažení požadovaných kosmetických vlastností. Krém by proto výhodně neměl být mastný, neměl by vytvářet skvrny a měl by být smývatelný s vhodnou konzistencí pro zabránění úniku z tub a dalších obalů.

Mohou být použity mono- nebo dibázické alkylestery s přímým nebo rozvětveným řetězcem jako je diisopropyl-myristát, decyl-oleát, isopropyl-palmitát, butyl-stearát, 2-ethylhexyl-palmiát nebo směs esterů s rozvětveným řetězcem známá jako Crodamol CAP. Tyto látky mohou být popužity samotné nebo v kombinaci v závislosti na požadovaných vlastnostech. Alternativně mohou být použity lipidy s vysokou teplotou tání, jako je bílý měkký parafín a/nebo kapalný parafín nebo další minerální oleje.

V praxi mohou být sloučeniny/farmaceutické kompozice podle předloženého vynálezu podávány ve vhodném přípravku lidem a zvířatům topickým nebo systémovým podáváním, které zahrnuje podávání orální, inhalační, rektální, nasální, bukální, sublingvální, vaginální, rektální, parenterální (v to počítaje podávání subkutánní, intramuskulární, intravenózní, intradermální, intrathekální a epidurální), intracisternální a intraperitoneální. Je zřejmé, že výhodný způsob podávání se může měnit například v závislosti na stavu příjemce.

"Farmaceuticky přijatelné dávkové formy" označují dávkové formy sloučenin podle předloženého vynálezu a zahrnují například tablety, dražé, prášky, elixíry, sirupy, kapalně přípravky včetně suspenzí, sprejů, inhalačních tablet, pastilek, emulzí, roztoků, granulí, kapslí a čípků, stejně tak jako kapalně přípravky pro injekce, včetně liposomových přípravků. Způsoby a přípravky obecně mohou být nalezeny v Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, poslední vydání.

"Přípravky vhodné pro orální podávání" mohou být podávány jako diskrétní jednotky jako jsou kapsle, tobolky nebo tablety, každá obsahující předem určené množství účinné složky; ve formě prášku nebo granulí; jako roztok nebo suspenze ve vodné kapalině nebo bezvodé kapalině; nebo jako kapalná emulze typu olej ve vodě nebo kapalná emulze typu voda v oleji. Účinná složka může také být podána jako bolus nebo pasta.

Tableta může být vyrobena lisováním nebo odléváním, popřípadě s jednou nebo více dodatečnými složkami. Lisované tablety mohou být připraveny ve vhodném stroji lisováním účinné složky v sypké formě, jako je prášek nebo granule, popřípadě smíchané s vazebným činidlem, lubrikantem, inertním ředidlem, konzervačním činidlem, povrchově aktivním nebo disperzním činidlem. Odlévané tablety mohou být vyrobeny ve vhodném stroji odléváním směsi práškové sloučeniny zvlhčené inertním kapalným ředidlem. Tablety mohou být popřípadě povlékány nebo rýhovány a mohou být upraveny pro získání pomalého nebo řízeného uvolňování účinné složky.

Pevné kompozice pro rektální podávání zahrnují čípky vyrobené známými způsoby a obsahující alespoň jednu sloučeninu podle předloženého vynálezu.

Je-li to požadováno a pro účinnější distribuci mohou sloučeniny být mikroenkapsulovány do nebo na systémy pro pomalé uvolňování nebo cílené podávání, jako jsou

biologicky slučitelné a biologicky degradovatelné polymerní matrice (například poly(d,l-laktid ko-glykolid)), liposomy a mikrosféry a subkutánně nebo intramuskulárně injektovány způsobem nazývaným subkutánní nebo intramuskulární depot pro získání kontinuálního pomalého uvolňování sloučeniny nebo sloučenin po dobu dvou týdnů nebo déle. Sloučeniny mohou být sterilizovány, například filtrací přes filtr zadržující bakterie nebo zabudováním sterilizačních činidel ve formě sterilních pevných kompozic, které mohou být rozpuštěny ve sterilní vodě nebo v některém jiném sterilním injektovatelném médiu bezprostředně před použitím.

"Přípravky vhodné pro nasální nebo inhalační podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání nasálně nebo inhalací pacienta. Přípravek může obsahovat nosič v práškové formě, který má velikost částic například v rozmezí od 1 do 500 mikronů (v to počítaje velikost částic v rozmezí mezi 20 a 500 mikrony s přírůstky po 5 mikronech, jako je 30 mikronů, 35 mikronů a pod.) Vhodné přípravky, ve kterých nosič je kapalný, pro podávání jako například nasální sprej nebo nasální kapky, zahrnuje vodné nebo olejovité roztoky účinné složky. Přípravky vhodné pro aerosolové podávání mohou být připraveny obvyklými způsoby a mohou být podávány s dalšími terapeutickými činidly. Inhalační terapie je snadno podávána inhalačními přístroji s odměřenou dávkou.

"Přípravky vhodné pro orální podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání pacientovi orální cestou. Přípravky mohou být vytvořeny jako diskrétní

jednotky jako jsou kapsle, tobolky nebo tablety, každá obsahující předem určené množství účinné složky; ve formě prášku nebo granulí; jako roztok nebo suspenze ve vodné kapalině nebo bezvodé kapalině; nebo jako kapalná emulze typu olej ve vodě nebo kapalná emulze typu voda v oleji. Účinná složka může také být podána jako bolus nebo pasta.

"Přípravky vhodné pro parenterální podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání pacientovi parenterálně. Přípravky jsou sterilní a zahrnují emulze, suspenze, vodné a bezvodé injekční roztoky, které mohou obsahovat suspenzní činidla a zahušťující činidla a antioxidanty, pufrы, bakteriostatika a látky, které dělají přípravek isotonickým a mají vhodně upravené pH vzhledem ke krvi příjemce.

"Přípravky vhodné pro rektální nebo vaginální podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání pacientovi rektálně nebo vaginálně. Přípravek je výhodně ve formě čípků, které mohou být připraveny smícháním sloučeniny podle předloženého vynálezu se vhodnými nedráždivými excipienty nebo nosiči jako je kakaové máslo, polyethylenglykol nebo čípkový vosk, které jsou tuhé za běžných teplot, ale kapalné za teploty těla a proto tají v rektální nebo vaginální dutině a uvolňují účinnou složku.

"Přípravky vhodné pro systémové podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání pacientovi systémově. Přípravek je výhodně podáván injekcí,

v to počítaje injekci transmuskulární, intravenózní, intraperitoneální a subkutánní. Pro použití v injekci jsou sloučeniny podle předloženého vynálezu v kapalném roztoku, výhodně ve fyziologicky slučitelných pufrch jako je Hankův roztok nebo Ringerův roztok. Kromě toho sloučeniny mohou být připraveny v pevné formě a rozpuštěny nebo suspendovány těsně před injekcí. Zahrnuty jsou také lyofilizované formy. Systémové podávání také může být prováděno transmukosálním nebo transdermálním způsobem nebo sloučeniny mohou být podávány orálně. Pro transmukosální nebo transdermální podávání se používají penetranty odpovídající bariéře, která má být prostoupena. Takové penetranty jsou obecně v oboru známy a zahrnují například žlučové sole a deriváty kyseliny fusidové pro transmukosální podávání. Kromě toho mohou být použity detergenty pro usnadnění prostupu. Transmukosální podávání může být dosaženo například použitím nasálních sprejů nebo čípků. Pro orální podávání se sloučeniny upravují do obvyklých forem pro orální podávání jako jsou kapsle, tablety a tonika.

"Přípravky vhodné pro topické podávání" znamenají přípravky, které jsou ve formě vhodné pro podávání pacientovi topicky. Přípravek může být připraven jako topická mast, balzámy, prášky, spreje a inhalanty, gely (na bázi vody nebo alkoholu), krémy, jak je v oboru obecně známo, nebo zabudovány do matricové báze pro aplikaci v náplasti, která umožní řízené uvolňování sloučeniny přes transdermální bariéru. Pokud jsou připraveny ve formě masti, účinné složky mohou být použity buď s parafínovým nebo s vodou mísitelným základem masti. V souladu s tím

mohou být účinné složky připraveny ve formě krému se základem masti typu olej ve vodě. Přípravky vhodné pro topické podávání do oka zahrnují oční kapky, ve kterých je účinná složka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném nosiči, obzvláště ve vodném rozpouštědle účinné složky. Přípravky vhodné pro topické podávání do úst zahrnují pastilky obsahující účinnou složku v ochuceném základu, obvykle se používá sacharóza a akáciová guma nebo tragakanth; pastilky obsahující účinnou složku v inertním základu jako je želatina a glycerin nebo sacharóza a akáciová guma; a ústní vody s účinnou složkou ve vhodném kapalném nosiči.

"Pevná dávková forma" znamená dávkovou formu sloučeniny podle předloženého vynálezu, které je v pevném stavu, například kapsle, tablety, pilulky, prášky, dražé nebo granule. V takových pevných dávkových formách je sloučenina podle předloženého vynálezu smíchána s alespoň jedním inertním obvyklým excipientem (nebo nosičem) jako je citrát sodný nebo fosforečnan vápenatý nebo (a) plnidly nebo extendéry jako je například škrob, laktóza, sacharóza, glukóza, manitol a kyselina křemičitá, (b) vazebná činidla jako například karboxymethylcelulóza, alignáty, želatina, polyvinylpyrrolidon, sacharóza a akáciová guma, (c) zvlhčovačla jako například glycerol, (d) desintegrační činidla jako například agar-agar, uhličitan vápenatý, bramborový nebo maniokový škrob, kyselina alginová, jisté komplexní křemičitany a uhličitan sodný, (e) zpoždovače rozpouštění jako je například parafín, (f) urychlovače absorpce jako jsou například kvarterní amoniové sloučeniny,

(g) smáčecí činidla jako je například ketylalkohol a glycerolmonostearát, (h) adsorbenty jako je například kaolin a bentonit, (i) lubrikanty jako je například mastek, stearan vápenatý, stearan hořečnatý, pevné polyethylenglykoly, lauryl sodný (j) činidla způsobující neprůhlednost, (k) pufry a činidla, která způsobují uvolňování sloučeniny nebo sloučenin podle předloženého vynálezu v jisté části intestinálního traktu zpožděným způsobem.

Skutečné dávky účinné složky nebo složek v kompozicích podle předloženého vynálezu mohou být měněny, tak aby se dosáhlo množství účinné složky nebo složek, které je účinné pro získání požadované terapeutické odezvy pro konkrétní kompozici a způsob podávání pacientovi. Zvolená dávková hladina pro konkrétního pacienta proto závisí na řadě faktorů včetně požadovaného terapeutického účinku, způsobu podávání, požadované době trvání léčby, etiologii a závažnosti onemocnění, pacientově stavu, hmotnosti, pohlaví, dietě a věku, typu a síle každé účinné složky, rychlosti absorbce, metabolismu a/nebo vyměšování a dalších faktorech.

Celková denní dávka sloučenin podle předloženého vynálezu, podávána pacientovi najednou nebo v rozdělených dávkách může být například množství od přibližně 0,001 do přibližně 100 mg na jeden kilogram tělesné hmotnosti denně a výhodně 0,01 do 10 mg/kg/den. Například u dospělého jsou dávky obecně od přibližně 0,01 do přibližně 100, výhodně od přibližně 0,01 do přibližně 10 mg na jeden kilogram tělesné

hmotnosti denně při inhalaci, od přibližně 0,01 do přibližně 100, výhodně 0,1 do 70, výhodněji od 0,5 do 10 mg na jeden kilogram tělesné hmotnosti denně při orálním podávání a od přibližně 0,01 do přibližně 50, výhodně od 0,01 do 10 mg na jeden kilogram tělesné hmotnosti denně při intravenózním podávání. Procento účinné složky v kompozici se může měnit, i když by mělo představovat takovou část, aby bylo dosaženo vhodného dávkování. Dávková jednotka kompozice může obsahovat taková množství, takových dílů, kolik může být použito v jedné denní dávce. Je zřejmé, že několik jednotkových dávkových forem může být podáváno v přibližně stejnou dobu. Dávka může být podávána tak často, jak je nutné pro dosažení požadovaného terapeutického účinku. Odezva některých pacientů může být rychlá na vyšší nebo nižší dávky a může se stát, že odpovídající jsou mnohem slabší udržovací dávky. Pro jiné pacienty může být nutné přistoupit k dlouhodobé léčbě s podáváním 1 až 4 dávek denně v souladu s fyziologickými požadavky každého individuálního pacienta. Není nutné uvádět, že pro jiné pacienty může být nutné nepředepisovat více než jednu nebo dvě dávky denně.

Přípravky mohou být připraveny v jednotkové dávkové formě libovolným ze způsobů dobře známých ve farmaceutickém oboru. Takové způsoby zahrnují krok spojení účinné složky s nosičem, který představuje jednu nebo více doplňkových složek. Obecně se přípravky připravují stejnoměrným a důkladným spojením účinné složky s kapalnými nosiči nebo jemně rozdělenými pevnými nosiči nebo oběma druhy nosičů a potom, je-li to nutné, tvarování produktu.

Přípravky mohou být podávány v balení nebo nádobkách s jednotkovou dávkou nebo více dávkami, například v uzavřených ampulkách nebo lahvičkách s elastomerními uzávěry a mohou být uchovávány sušené vymrazováním (lyofilizované) a vyžadující pouze přidání sterilního kapalného nosiče, například vody pro injekce, bezprostředně před použitím. Okamžité injekční roztoky a suspenze mohou být připraveny ze sterilních prášků, granulí a tablet výše popsaného typu.

Sloučeniny spadající do rozsahu předmětu předloženého vynálezu vykazují významné farmakologické účinky, jak je možno prokázat testy popsanými v literatuře a testy uvedenými dále, přičemž se předpokládá, že výsledky testů korelují s farmakologickými účinky u člověka a dalších savců.

In vitro enzymový test

Inhibice HCV NS3 serinové proteázy

Oblast HCV NS3 proteázy byla exprimována a čištěna způsobem již popsaným (Vertex, PCT publikovaná patentová přihláška W098/17679;, který je zde zahrnuta jako reference). Chromogenní peptidový substrát, EDVVAbuC-p-nitroanilid, a fragment kofactoru NS4A (-KKGSWIVGRIVLSGK-) pro NS3 proteázu byl na zakázku syntetizován společností American Peptide Com (Ca). Sloučeniny podle předloženého vynálezu byly testovány na jejich schopnost inhibice aktivity HCV

NS3 proteázy použitím spektrofotometrického testu s EDVVAbuC-p-nitroanilidem jako substrátem. Test byl prováděn v 96-jamkové mikrotitrační destičce použitím čtečky SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) s kinetickými možnostmi. Štěpení EDVVAbuC-p-nitroanilidového (500 μM) substrátu čistou HCV NS3 proteázou (0,5 μM) bylo prováděno za teploty 30 °C v pufru obsahujícím 30 μM NS4A fragment, 46 mM Hepes, pH 8,0, 92 mM NaCl, 18% glycerolu, 5 mM DTT a 7,5% DMSO v nepřítomnosti nebo přítomnosti testované sloučeniny. Reakce byla monitorována na uvolňování pNA (p-nitroanilin) na vlnové délce 405 nm.

Určování kinetických parameterů včetně V_{max} , K_m a V_{max}/K_m se provádí za podmínek popsaných výše. Hodnoty K_i se vypočítávají z grafů poměru v závislosti na inhibitoru pro pevné koncentrace enzymu a substrátu nelineární metodou nejmenších čtverců na datech použitím Morrisonovy rovnosti pro kompetitivní inhibice těsné vazby [J. F. Morrison, Biochim. Biophys. Acta., 185, 269-286 (1969)]. Pro tuto proceduru se používá program Prism (GraphPad Software, Inc.).

Inhibitory HCV serinových proteáz popsané v této přihlášce mohou být použity v kombinaci s dalšími molekulami, které přímo vykazují nebo nepřímo vyvolávají účinek proti HCV buď profylakticky u pacienta s rizikem vzniku HCV infekce nebo pro léčení pacientů, kteří jsou již infikováni. Výraz "účinek proti HCV" označuje schopnost molekuly, pokud je

přítomna, úplně inhibovat nebo snižovat akumulaci HCV virionů ve srovnání s akumulací HCV virionů v nepřítomnosti takové molekuly a/nebo schopnost molekuly snižovat nebo zlepšovat stavy nebo symptomy související s HCV infekcí nebo patogenezí u pacienta. Molekuly které mají účinek proti HCV zahrnují ty, které přerušují jeden nebo více kroků HCV infekce nebo replikace, stejně tak jako molekuly, které vyvolávají imunomodulační a antiproliferativní působení v hostitelských buňkách. Molekuly, které mají účinek proti HCV, mohou inhibovat HCV-specifické replikační události jako je neomezuujícím způsobem HCV-řízená syntéza nukleových kyselin nebo proteinů. Etapy replikace HCV, ve kterých molekula s účinkem proti HCV může působit, zahrnují vstup do buňky (například navázání nebo prostup); odhalování a uvolňování genomu HCV; replikaci genomu HCV (například replikace kteréhokoli vlákna RNA genomu viru; transkripce mediátorové RNA viru); translace HCV proteinů; posttranslační modifikace HCV proteinů (například proteolytické štěpení; glykosylace); nitrobuněčný přenos proteinů viru; sestavování složek virionu; a uvolňování virových částic (například pučení).

Třídy molekul, které mají protivirovou aktivitu zahrnují neomezuujícím způsobem rozpustné receptor návnady a protilátky proti receptorům; blokátory iontových kanálů, stabilizátory kapsidů a inhibitory fúzovaných proteinů; inhibitory virových polymeráz, reverzní transkriptázy, helikázy, primázy nebo integrázy; protisměrné oligonukleotidy a ribozymy; imunomodulační a imunostimulační činidla, včetně cytokinů jako jsou

interferony, stejně tak jako peptidové agonisty, steroidy a klasické látky jako je levamisol; inhibitory regulačních proteinů; inhibitory proteáz; inhibitory sestavování proteinů; a protilátky proti virům a cytotoxické lymfocyty. Výraz "množství účinné proti HCV" nebo "farmaceutický účinné množství" znamená množství sloučeniny nebo kombinace sloučenin, jak jsou zde popsány, účinné pro snížení nebo zlepšení stavů nebo symptomů související s HCV infekcí nebo související patogenezi u pacienta, nebo snížení hladin virů *in vitro* nebo *in vivo*. *In vitro* aplikace zahrnují testovací systém Replicon Assay popsaný dále, kde jsou taková množství účinná pro snížení akumulace replikonové RNA viru HCV a/nebo akumulace proteinů kódovaných tam obsaženými geny.

Sloučeniny, které mají účinek proti HCV, uvažované pro použití v kompozicích a způsobech zde popsané kombinační terapie zahrnují neomezujícím způsobem imunomodulační molekuly, včetně imunostimulačních cytokinů, a další sloučeniny, o kterých je známo, že mají HCV protivirový účinek, jako jsou různé protivirové nukleosidy a nukleotidy.

Imunomodulační molekuly uvažované pro použití v kombinaci s inhibitory HCV serinových proteáz popsány v předložené přihlášce vynálezu, zahrnují neomezujícím způsobem inteferon- α 2B (Intron A, Schering Plough); Rebatron (Schering Plough, Inteferon- α 2B + Ribavirin); pegylovaný inteferon α (Reddy, K. R. a kol. Efficacy and safety of

pegylated (40-kd) interferon alfa-2a compared with interferon alfa-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. Hepatology 33, 433-438 (2001)); konsenzuální interferon (Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. & Chen, D. S. Efficacy of consensual interferon in the treatment of chronic hepatitis C. J. Gastroenterol. Hepatol. 15,1418-1423 (2000)); inteferon- α 2A (Roferon A; Roche); lymfoblastoid nebo "přirozený" interferon; interferon tau (Clayette, P. a kol. IFN-tau, a new interferon type I with antiretroviral activity. Pathol. Biol. (Paris) 47, 553-559 (1999)); interleukin 2 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 103-112 (1999)); Interleukin 6 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19,103-112 (1999)); Interleukin 12 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19,103-112 (1999)); Ribavirin; a sloučeniny, které posilují vznik odezvy „helper“ T buněk typu 1 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19,103-112 (1999)). Interferony mohou zlepšovat stav virových infekcí přímým protivirovým působením a/nebo modifikací imunitní odezvy na infekci. Protivirové účinky interferonů jsou často dosahovány inhibicí prostupu nebo odhalování virů, syntézy RNA viru, translace proteinů viru a/nebo sestavování a uvolňování viru.

Sloučeniny které stimulují syntézu interferonu v buňkách (Tazulakhova, E. B., Parshina, O. V., Gusev, T. S. & Ershov, F. I. Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Induces. J. Interferon Cytokine Res. 21,65-73)) zahrnují neomezujícím způsobem dvouvláknovou RNA samotnou nebo v kombinaci s tobramycinem a Imiquimod (3M Pharmaceuticals) (Sauder, D. N. Immunomodulační a pharmacologic vlastnosti of imiquimod. J. Am. Acad. Dermatol. 43, S6-11 (2000)).

Další sloučeniny, o nichž je známo, že mají nebo mohou mít HCV protivirový účinek působením neimunomodulačního mechanismu, zahrnují neomezujícím způsobem Ribavirin (ICN Pharmaceuticals); inhibitory inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy (VX-497, ve vývoji společností Vertex Pharmaceuticals); amantadin a rimantadin (Younossi, A. M. a Perillo, R. P. The roles of amantadin, rimantadin, ursodeoxycholic acid, NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 95-102 (1999)); LY217896 (U. S. patent 4,835,168) (Colacino, J. M. a kol. Evaluation of the anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamid (LY217896) and its sodium salt. Antimicrobial Agents & Chemotherapy 34, 2156-2163 (1990)); a methylester kyseliny 9-hydroxyimino-6-methoxy-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahydro-fenanthren-1-karboxylové; hydrochlorid methylesteru kyseliny 6-methoxy-1,4a-dimethyl-9-(4-methyl-piperazin-1-ylimino)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahydro-fenanthren-1-karboxylové; 1-(2-chlor-fenyl)-3-(2,2-difenyl-ethyl)-močovinu (U. S. patent 6,127,422).

Přípravky, dávkování a způsoby podávání výše uvedených molekul jsou buď popisovány v dále uvedených referencích nebo jsou dobře známy v oboru, viz například F. G. Hayden, v Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. vydání, Hardman a kol., editoři., McGraw-Hill, New York (1996), kapitola 50, str. 1191-1223 a tam citované reference. Alternativně, pokud je identifikována sloučenina, který vykazuje HCV protivirový účinek, farmaceuticky účinné množství této sloučeniny může být určeno použitím způsobů, které jsou dobře známy odborníkům. Viz například Benet a kol., v Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. vydání, Hardman a kol., editoři., McGraw-Hill, New York (1996), kapitola 1, str. 3-27, a tam citované reference.

Vhodná forma přípravku, rozmezí dávky nebo dávek a režimy dávkování takových sloučenin mohou být snadno určeny běžnými způsoby.

Kombinace léčiv podle předloženého vynálezu mohou být dopraveny do buňky nebo buněk nebo lidskému pacientovi buď v oddělených farmaceuticky přijatelných přípravcích, podávaných současně nebo postupně, nebo v přípravcích obsahujících více než jedno terapeutické činidlo, nebo v souborech jednotlivých činidel a přípravků s vícenásobnými činidly. Pokud jsou však podávány, tyto kombinace látek dohromady představují množství složek účinné proti HCV.

V současné době je dostupné velké množství dalších imunomodulátorů a imunostimulátorů, které mohou být použity ve způsobech podle předloženého vynálezu, tento soubor zahrnuje: AA-2G; adamantylamid dipeptid; adenosin deaminázu, Enzon; adjuvans, Alliance; adjuvans, Ribic; adjuvans, Vaxcel; Adjuvax; agelasfin-11; terapii proti AIDS, Chiron; algalglukan, SRI; algammulin, Anutech; Anginlyc; protibuněčné faktory, Yeda; Anticort; imunogen antigastrin-17, Ap; antigenové systémy, Vac; antigový přípravek, IDBC; antiGnRH imunogen, Aphton; Antiherpin; Arbidol; azarol; Bay-q-8939; Bay-r-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001; BL-009; Broncostat; Cantastim; CDRI-84-246; cefodizim; inhibitory chemokinů, ICOS; CMV peptidy, City of Hope; CN-5888; cytokin uvolňující činidlo, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; ditiokarb sodný; ECA-10-142; ELS-1; endotoxin, Novartis; FCE-20696; CE-24089; FCE-24578; ligand FLT-3, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; G-proteiny, Cadus; gludapcin; glutaurin; glykofosfopeptické látky; GM-2; GM-53; GMDP; vakcína růstového faktoru, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; vakcíny proti Helicobacter pylori; herpes-specifický imunitní faktor; terapie HIV, United Biomed; HyperGAM+CF; h-nmumax; Immun BCG; imunitní terapie, Connective; imunomodulátor, Evans; imunomodulátory, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; inosin pranobex; interferon, Dong-A (alfa2); interferon, Genentech (gama); interferon, Novartis (alfa); interleukin-12, Genetics Ins; interleukin-15, Immunex; interleukin-16, Research Cor; ISCAR-1; J005X; L-644257; kyselina likomarasminová; LipoTher; LK-409; LK-410; LP-2307; LT (R1926); LW-50020;

MAF, Shionogi; deriváty MDP, Merck; met-enkefalin, TNI; methyلفurylbutyrolaktony; MIMP; mirimostim; smíšené bakteriální vakciny, Tem; MM-1; moniliastat; MPLA, Ribí; MS-705; murabutid; murabutid, Vacsyn; muramyl dipeptidový derivát; muramyl peptidové deriváty myelopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; peptidy, Scios; peptidoglykan, Pliva; Perthon, Advanced Plant; derivát PGM, Pliva; Pharmaprojects č. 1099; č. 1426; č. 1549; č. 1585; č. 1607; č. 1710; č. 1779; č. 2002; č. 2060; č. 2795; č. 3088; č. 3111; č. 3345; č. 3467; č. 3668; č. 3998; č. 3999; č. 4089; č. 4188; č. 4451; č. 4500; č. 4689; č. 4833; č. 494; č. 5217; č. 530; pidotimod; pimelautid; pinafid; PMD-589; podofyllotoxin, Conpharm; POL-509; poly-ICLC; poly-ICLC, Yamasa Shoyu; PolyA-PolyU; Polysaccharide A; protein A, Berlox Bioscience; PS34WO; Pseudomonády MAbS, Teijin; Psomaglobin; PTL-78419; Pyrexol; pyriferon; Retrogen; Retropep; RG-003; Rhinostat; rifamaxil; RM-06; Rollin; romurtid; RU-40555; RU-41821; protilátkas proti Rubella, ResCo; S-27609; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL-953; SK & F-107647; SL04; SL05; SM-4333; Solutein; SRI-62-834; SRL-172; ST-570; ST-789; stafágový lyzát; Stimulon; suppressin; T-150R1; T-LCEF; tabilautid; temurtid; Theradigm-HBV; Theradigm-HPV; Theradigm-HSV; THF, Pharm & Upjohn; THF, Yeda; thymalfasin; frakce hormonu brzlíku; thymocartin; thymolymfotropin; thymopentin; analogy thymopentinu; thymopentin, Peptech; thymosinová frakce 5, Alpha; thymostimulin; thymotrinan; TMD-232; TO-115; transferové faktory, Viragen; tuftsin, Selavo; ubenimex; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IF-A-2+; IF-B+;

IF-G+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-12+; IL-15+; IM+; LHRH-;
LIPCOR+L LYM-B+; LYM-NK+; LYM-T+; OPI+; PEP+; PHG-MA+; RNA-
SYN-; SY-CW-; TH-A-1+; TH-5+; TNF+; UN.

Representativní nukleosidové a nukleotidové sloučeniny
použitelné podle předloženého vynálezu zahrnují
neomezujícím způsobem: (+)-cis-5-fluor-1-[2-(hydroxy-
methyl)-[1,3-oxathiolan-5-yl]cytosin; (-)-2'-deoxy-3'-
thiacytidin-5'-trifosfát (3TC); (-)-cis-5-fluor-
1-[2-(hydroxy-methyl)-[1,3-oxathiolan-5-yl]cytosin (FTC);
(-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin [(-)-SddC]; 1-(2'-deoxy-
2'-fluor-beta-D-arabinofuranosyl)-5-jodcytosin (FIAC);
1-(2'-deoxy-2'-fluor-beta-D-arabinofuranosyl)-5-jodcytosin
trifosfát; 1-(2'-deoxy-2'-fluor-beta-D-arabinofuranosyl)-
5-methyluracil (FMAU); 1-beta-D-ribofuranosyl-
1,2,4-triazol-3-karboxamid; 2',3'-dideoxy-3'-fluor-
5-methyl-dexocytidin; 2',3'-dideoxy-3'-chlor-5-methyl-
dexocytidin (ClddMeCyt); 2',3'-dideoxy-3'-amino-5-methyl-
dexocytidin; 2',3'-dideoxy-3'-fluor-5-methyl-cytidin
(FddMeCyt); 2',3'-dideoxy-3'-chlor-5-methyl-cytidin
(ClddMeCyt); 2',3'-dideoxy-3'-amino-5-methyl-cytidin
(AddMeCyt); 2',3'-dideoxy-3'-fluorthymidin (FddThd); 2',3'-
dideoxy-beta-L-5-fluorcytidin (beta-L-FddC); 2',3'-dideoxy-
beta-L-5-thiacytidin; 2',3'-dideoxy-beta-L-5-cytidin (beta-
L-ddC); 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin; 2'-deoxy-
3'-thia-5-fluorcytosin; 3'-amino-5-methyl-dexocytidin
(AddMeCyt); 2-amino-1,9-[(2-hydroxymethyl-1-(hydroxymethyl)-
ethoxy)methyl]-6H-purin-6-on (gancyklovir); 2-[2-(2-amino-
9H-purin-9-yl)ethyl]-1,3-propandil diacetát; 2-amino-
1,9-dihydro-9-[(2-hydroxy-ethoxy)methyl]-6H-purin-6-on

(acyklovir); 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethyl-but-1-yl)guanin
 (penciclovir); 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethyl-but-1-yl)-
 6-deoxy-guanin diacetát (famciclovir); 3'-azido-3'-
 deoxythymidin (AZT); 3'-chlor-5-methyl-dexocytidin
 (ClddMeCyt); 9-(2-fosfonyl-methoxyethyl)-2',6'-
 diaminopurin-2',3'-dideoxyribosid;
 9-(2-fosfonylmethoxyethyl)adenin (PMEA); acyklovir
 trifosfát; D-karbocyklický-2'-deoxyguanosin (CdG);
 dideoxycytidin; dideoxycytosin; dideoxyguanin (ddG);
 didoxyinosin (ddI); E-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin
 trifosfát; fluor-arabinofuranosyl-joduracil; 1-(2'-deoxy-
 2'-fluor-1-beta-D-arabinofuranosyl)-5-jod-uracil (FlAU);
 stavudin; 9-beta-D-arabinofuranosyl-9H-purin-6-amin
 monohydrát; 9-beta-D-arabinofuranosyl-9H-purin-6-amin-5'-
 monofosfát monohydrát (Ara-AMP); 2-deoxy-3'-thia-
 5-fluorcytidin; 2',3'-dideoxy-guanin; a 2',3'-dideoxy-
 guanosin.

Způsoby syntézy pro přípravu nukleosidů a nukleotidů
 použitelných podle předloženého vynálezu jsou v oboru dobře
 známy a jsou posány například v Acta Biochim. Pol.,
 43,25-36 (1996); Swed. Nucleosides Nucleotides 15, 361-378
 (1996); Synthesis 12,1465-1479 (1995); Carbohyd. Chem.
 27,242-276 (1995); Chem. Nucleosides Nucleotides 3, 421-535
 (1994); Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press; a Exp.
 Opin. Invest. Drugs 4, 95-115 (1995).

Chemické reakce popsané v referencích uvedených výše jsou
 obecně popsány jako nejobecnější aplikace pro přípravu
 sloučenin podle předloženého vynálezu.

V některých případech reakce nemusí být aplikovatelné způsobem, který byl popsán, na každou sloučeninu spadající do rozmezí sloučenin podle předloženého vynálezu. Sloučeniny, pro které to nastává, můhou být odborníkem v oboru snadno rozpoznány. Ve všech takových případech reakce mohou být úspěšně prováděny obvyklými modifikacemi známými odborníkům v oboru, například vhodnou ochranou interferujících skupin, volbou jiných obvyklých reakčních činidel, rutinní modifikací reakčních podmínek a podobně nebo mohou být použity další reakce zde popsané nebo jiné běžné postupy pro přípravu odpovídajících sloučenin podle předloženého vynálezu. Ve všech preparativních způsobech jsou výchozí materiály známé nebo snadno dostupné ze známých výchozích materiálů.

Zatímco nukleosidové analogy jsou obecně používány jako protivirová činidla bez modifikací, nukleotidy (fosfáty nukleosidů) musí někdy být přeměněny na nukleosidy pro usnadnění jejich přenosu buněčnou membránou. Příkladem chemicky modifikovaného nukleotidu schopného vstupu do buňky je S-1-3-hydroxy-2-fosfonylmethoxypropyl cytosin (HPMPC, Gilead Sciences). Nukleosidové a nukleotidové sloučeniny podle předloženého vynálezu, které jsou kyselinami, mohou vytvářet sole. Příklady zahrnují sole s alkalickými kovy nebo kovy alkalických zemin jako jsou sole sodné, draselné, vápenaté nebo hořečnaté nebo s organickými bázemi nebo báze kvarterní amonné sole.

Imunomodulátory a imunostimulátory použitelné v kombinační terapii podle předloženého vynálezu mohou být podávány v množstvích nižších než je v oboru běžné. Například interferon alfa je typicky podáván lidskému pacientovi pro léčbu HCV infekcí v množství od přibližně 1×10^6 jednotek/osobu třikrát týdně do přibližně 10×10^6 jednotek/osobu třikrát týdně (Simon a kol., Hepatology 25: 445-448 (1997)). Ve způsobech a kompozicích podle předloženého vynálezu tato dávka může být v rozmezí od přibližně $0,1 \times 10^6$ jednotek/osobu třikrát týdně do přibližně $7,5 \times 10^6$ jednotek/osobu třikrát týdně; výhodněji od přibližně $0,5 \times 10^6$ jednotek/osobu třikrát týdně do přibližně 5×10^6 jednotek/osobu třikrát týdně; nejvýhodněji od přibližně 1×10^6 jednotek/osobu třikrát týdně do přibližně 3×10^6 jednotek/osobu třikrát týdně. V důsledku zlepšené účinnosti proti viru hepatitidy C u imunomodulátorů a imunostimulátorů v přítomnosti inhibitorů HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu mohou být ve způsobech a kompozicích podle vynálezu používána snížená množství těchto imunomodulátorů/imunostimulátorů. Podobně v důsledku zlepšené účinnosti proti viru hepatitidy C u imunomodulátorů a imunostimulátorů v přítomnosti inhibitorů HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu mohou být ve způsobech a kompozicích podle vynálezu používána snížená množství inhibitorů HCV serinových proteáz. Taková snížená množství mohou být určena rutinním monitorováním titru viru hepatitidy C u infikovaných pacientů podstupujících terapii. To může být prováděno například monitorováním HCV RNA v séru pacientů způsoby slot-blot, dot-blot nebo RT-PCR nebo měřením

povrchu HCV nebo dalších antigenů. Pacienti mohou být také monitorováni během kombinační terapie používané zde popsaných inhibitorů HCV serinových proteáz a dalších sloučenin, které mají účinek proti HCV, například nukleosidových a/nebo nukleotidových protivirových činidel pro určení nejnižších účinných dávek látek použitých v kombinaci.

Ve způsobech kombinační terapie podle předloženého vynálezu mohou být nukleosidové nebo nukleotidové protivirové sloučeniny nebo jejich směsi podávány člověkům v množství v rozmezí od přibližně 0,1 mg/osobu/den do přibližně 500 mg/osobu/den; výhodně od přibližně 10 mg/osobu/den do přibližně 300 mg/osobu/den; výhodněji od přibližně 25 mg/osobu/den do přibližně 200 mg/osobu/den; ještě výhodněji od přibližně 50 mg/osobu/den do přibližně 150 mg/osobu/den; a nejvýhodněji v rozmezí od přibližně 1 mg/osobu/den do přibližně 50 mg/osobu/den.

Dávky sloučenin mohou být podávány pacientovi v jediné dávce nebo v proporcionálních vícenásobných částečných dávkách. V takovém případě dávková jednotka kompozic může obsahovat takové množství částečných dávek, které dohromady dávají denní dávku. Vícenásobné denní dávky mohou také zvyšovat celkovou denní dávku, pokud je to požadováno osobou předepisující látku.

Režim léčby pacienta trpícího infekcí HCV sloučeninami a/nebo kompozicemi podle předloženého vynálezu se volí v souladu s řadou faktorů zahrnujících věk, hmotnost,

pohlaví, dietu a lékařský stav pacienta, závažnost infekce, způsob podávání, farmakologická hlediska jako je působení, účinnost, farmakokinetický a toxikologický profil konkrétní použité sloučeniny a otázka zda je použit systém pro podávání léku. Podávání kombinace léčiv podle vynálezu by mělo obecně probíhat po dobu několika týdnů až několika měsíců nebo roku, dokud titrace viru nedosáhne přijatelné hladiny, což indikuje, že infekce byla zvládnuta nebo vymýcena. Pacienti podstupující léčení kombinacemi léků podle vynálezu mohou být rutinně monitorováni měřením RNA viru hepatitidy v pacientově séru technikami slot-blot, dot-blot nebo RT-PCR nebo měřením antigenů virů hepatitidy C, jako jsou povrchové antigeny, v séru pro určení účinnosti terapie. Kontinuální analýza dat získaných těmito způsoby dovoluje modifikaci režimu léčby během terapie tak, aby mohlo být určeno optimální množství každé složky v podávané kombinaci a může tím být také určena doba trvání terapie.

Rozvrh režimu a dávkování při terapii tímto způsobem může být racionálně modifikován v průběhu terapie tak, aby bylo podáváno nejmenší vhodné množství každé jednotlivé protivirové sloučeniny, používané v kombinaci, která vykazuje uspokojivou účinností proti viru hepatitidy C a aby podávání takových protivirových sloučenin v kombinaci pokračovalo pouze tak dlouho, jak je nutné pro úspěšné zvládnutí infekce.

Předložený vynález také zahrnuje použití inhibitorů HCV serinových proteáz v různých kombinacích se sloučeninami

uvedenými výše a podobnými typy sloučenin, které jsou účinné proti HCV, pro léčbu nebo prevenci infekcí HCV u pacienta. Například jeden nebo více inhibitorů HCV serinových proteáz může být použit v kombinaci s: jedním nebo více interferony nebo interferonovými deriváty, účinnými proti HCV; jednou nebo více neinterferonovými sloučeninami, účinnými proti HCV; nebo jedním nebo více interferony nebo interferonovými deriváty, účinnými proti HCV a jednou nebo více neinterferonovými sloučeninami, účinnými proti HCV. Pokud jsou použity v kombinaci pro léčení nebo prevenci infekce HCV u lidského pacienta, libovolný z popsaných inhibitorů HCV serinových proteáz a výše popsaných sloučenin, účinných proti HCV mohou být přítomny ve farmaceuticky nebo anti-HCV účinném množství. V důsledu jejich aditivních nebo synergických účinků, pokud jsou použity ve výše popsaných kombinacích, může každá látka být přítomna v množství nižším než klinické farmaceuticky účinné množství nebo množství účinné proti HCV, to znamená v množství, které pokud by bylo použito samotné, by přineslo pokles farmaceutické účinnosti pro úplnou inhibici nebo snížení akumulace HCV virionů a/nebo snížení nebo zlepšení stavů nebo symptomů souvisejících s infekcí HCV nebo patogenezí u pacienta ve srovnání s inhibitory HCV serinových proteáz a sloučeninami, účinnými proti HCV, pokud jsou použity ve farmaceuticky účinných množstvích. Kromě toho předložený vynález zahrnuje použití kombinací inhibitorů HCV serinových proteáz a sloučenin, účinných proti HCV a popsaných výše, pro léčbu nebo prevenci infekcí HCV, kde jeden nebo více těchto inhibitorů nebo sloučenin je přítomno ve farmaceuticky účinném

množství a další je nebo jsou přítomny v množství nižším než je klinické farmaceuticky účinné množství nebo množství účinné proti HCV v důsledku jejich aditivního nebo synergického účinku. Jak je zde používán, výraz "aditivní účinek" popisuje kombinovaný účinek dvou (nebo více) farmaceuticky účinných činidel, který je roven součtu účinků jednotlivých činidel použitých samostatně. Synergický účinek je účinek kombinace dvou (nebo více) farmaceuticky účinných činidel, který je větší než součet účinků jednotlivých činidel použitých samostatně.

Příklad 42

Současná standardní terapie infekce virem hepatitidy C (HCV) je léčení imunomodulátorem označovaným jako alfa-interferon (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Tato terapie je neúčinná u většiny HCV pacientů, kteří buď nevykazují žádnou odezvu nebo dokonce vykazují relaps po dlouhodobé terapii interferonem. Kromě toho dochází k závažným vedlejším účinkům souvisejícím s interferonovou terapií.

V důsledku naléhavé potřeby nových a účinnějších protivirových léčiv pro léčbu pacientů s infekcí HCV přihlašovatelé vyvinuli řadu sloučenin, které inhibují serinové proteázy HCV (komplex proteinů NS3 a NS4A viru HCV). Tyto sloučeniny mohou být používány samy o sobě, spolu s jednou další třídou sloučenin nebo v kombinaci s dalšími třídami sloučenin pro léčbu nebo prevenci infekce HCV. Tento příklad popisuje testování tří reprezentativních

inhibitorů HCV serinových proteáz, to znamená sloučeniny CU, sloučeniny EP a sloučeniny EC, samotné a v kombinaci s jednotlivými členy souboru interferonů (interferon alfa-2B (Schering Plough), interferon alfa-2A (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ, USA), interferon beta (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA) a ovčí interferon tau (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA)) v HCV subgenomovém RNA replikonovém testu (Replicon Assay) pro určení, zda dvě sloučeniny spolupůsobí pro omezení akumulace HCV RNA. Test Replicon Assay měří množství HCV subgenomové RNA (replikonová RNA) zůstávající v replikonových buňkách (Lohmann a kol. Science 285: 110-113 (1999)) po dvou dnech léčby látkou ve srovnání s množstvím replikonové RNA v neošetřených buňkách. V tomto testu je schopnost sloučenin působit jako léčivo proti viru HCV přímo úměrná úrovni inhibice akumulace replikonové RNA.

Dva léky jsou testovány v kombinacích v *in vitro* systému testu Replicon Assay pro určení zda, pokud jsou použity společně, vykazují aditivní nebo synergický účinek proti viru HCV.

Test Replicon Assay se používá jako náhradní model *in vitro* HCV infekce pro zhodnocení kombinovaných účinků imunomodulátoru, například inteferonu- α 2B ((Intron A); Schering Plough) a inhibitoru HCV serinových proteáz, například sloučeniny CU. Jak je ukázáno dále, výsledky prokazují, že u těchto dvou typů látek dochází ke zjevnému synergickému účinku proti viru HCV, jak je změřeno použitím

formálního matematického určování synergie jejich schopností snižovat hladinu HCV RNA v testu Replicon Assay.

Test Replicon Assay

Replikonový test označovaný dále jako Replicon Assay, používající buněčnou linii obsahující samoreplikující subgenomickou RNA viru HCV (replikon), je popsán v Lohmann a kol. Science 285: 110-113 (1999). Přístupové číslo v Genbank pro sekvenci replikonu použitého ve zde popsáných experimentech je uvedeno v této referenci jako AJ242654. Tento článek popisuje způsoby pro *in vitro* transkripci RNA z replikonové cDNA, transfekci replikonové RNA do buněk Huh7 elektroporací a volbu buněk obsahujících replikonovou RNA použitím antibiotika G418.

Huh7 jsou buněčná linie hepatomu získaná od Dr. Williama Masona, Fox Chase Cancer Research Center (Philadelphia, USA). Tyto buňky jsou veřejně dostupné z laboratoře Fox Chase a byly podrobně popsány ve všdecké literatuře (Nakabayashi a kol. Cancer Res. 42: 3858-3863 (1982)). V experimentech, které jsou zde popsány, se veškerá templátová DNA odstraní z *in vitro* transkribované replikonové RNA před provedením elektroporace této RNA do buněk Huh7 opakovaným zpracováním DNázou (tři po sobě následující zpracování).

Test Replicon Assay se provádí jak je detailně popsáno dále. Ve stručnosti lze uvést, že replikonové buňky se vloží do jamek 96-jamkové destičky s hustotou 10000 buněk na jamku a inkubují se při teplotě 37 °C. Buňky se inkubují

v DMEM (Dulbeccovo Minimální Esenciální Médium) doplněném 10% fetálním hovězím sérem, glutaminem, neesenciálními aminokyselinami a antibiotikem G418 (0,25 mg/ml). Po inkubaci přes noc se médium nahradí médiem DMEM obsahujícím 2% fetální hovězí sérum a různé koncentrace inhibitorů serinových proteáz, jako je sloučenina CU a/nebo interferony jako je inteferon- α 2B (Intron A, Schering Plough). Každá sloučenina se testuje v šesti až osmi různých koncentracích. Pro jedno extrémní rozmezí koncentrací se zvolí vysoké koncentrace sloučenin, které vedou k takřka úplné inhibici akumulace replikonové RNA po dvou dnech ošetření. Z těchto výchozích koncentrací se vytvářejí postupná ředění tak, aby rozmezí koncentrací testovaných v testu Replicon Assay zahrnovaly koncentrace, při kterých jsou sloučeniny vysoce účinné stejně tak jako koncentrace, u kterých nedochází k významnějšímu účinku. Každá koncentrace inhibitoru HCV serinových proteáz se testuje bez jakéhokoli přidaného interferon, stejně tak jako s přidáním šesti až osmi různých dávek interferonu.

Podobně se interferon testuje bez jakéhokoli přidaného inhibitoru HCV serinových proteáz. Po 48 hodinách inkubace se sloučeninami se médium odstraní z destiček a veškerá buněčná RNA se extrahuje z buněk použitím soupravy RNeasy-96, kterou vyrábí společnost Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA). Tato RNA se potom analyzuje kvantitativní RT-PCR nebo pomocí TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cílem TaqMan[®] RT-PCR je na neomycin rezistentní gen v replikonu RNA.

Destičky jsou uspořádány tak, že každý vzorek testované látky se použije pětkrát a dále se použije 16 opakování neošetřených vzorků. To umožňuje dosažení větší statistické spolehlivosti dat kvantitativní RT-PCR.

Analýza dat získaných v testu Replicon Assay dává dvě hodnoty, které jsou užitečné pro hodnocení síly potenciálních činidel proti viru HCV. Pro každou testovanou koncentraci sloučeniny se určí inhibice akumulace replikonové RNA, způsobená sloučeninou za dva dny ošetřování vzhledem k množství replikonové RNA v neošetřených buňkách. Tento poměr je uváděn jako procento inhibice. Pokud se získá řada datových bodů, vytvořených ošetřením buněk v rozmezí různých koncentrací, vytvoří se hodnoty IC_{50} , které znamenají koncentraci sloučeniny, při které se akumulace replikonové RNA viru HCV sníží o 50% působením sloučeniny. Opakováním testů inhibitorů HCV serinových proteáz v testu Replicon Assay se určí, že IC_{50} má procentní odchylku (% odchylky nebo $100\% \times$ standardní odchylka IC_{50} /střední IC_{50}) přibližně 20%. IC_{50} je hodnota používaná pro určení pořadí jednotlivých sloučenin testovaných v tomto testu na základě jejich schopnosti působit jako činidla proti viru HCV. Jednoduché určování IC_{50} není adekvátní pro hodnocení užitečnosti sloučenin použitých v kombinaci. Nejúčinnější analýza pole dat získaných použitím všech kombinací různých interferonů a inhibitorů serinových proteáz vyžaduje určení procenta inhibice, jak je ukázáno v Tabulce 7, použitím matematických způsobů popsanych dále, které jsou navrženy

pro zjištění, zda kombinační léčení je agonistické, aditivní nebo synergické.

Detaily testu Replicon Assay jsou následující:

Procedura pro kvantitativní analýzu replikonové RNA viru HCV v testu HCV Replicon Assay používající TaqMan® RT-PCR

Test Replicon Assay se používá pro změření schopnosti potenciálních HCV protivirových sloučenin inhibovat akumulaci HCV subgenomových RNA replikonových molekul v buněčné linii Huh7 (Lohmann a kol. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285,110-113 (1999)). Tento test zahrnuje tři operační složky:

- (1) Pěstování replikonových buněk, příprava testovací destičky a aplikace sloučeniny;
- (2) Extrakce veškeré buněčné RNA z replikonových buněk; a
- (3) RT-PCR v reálném čase (TaqMan®) pro změření množství replikonové RNA v každém vzorku.

Test Replicon Assay vyžaduje ke svému provedení alespoň 4 dny; proces ale může být přerušen a vzorky zmrazeny mezi jednotlivými kroky. Každá část testu je popsána dále.

1. Pěstování replikonových buněk, příprava testovací destičky a aplikace sloučeniny
 - 1.1. Pěstování replikonových buněk
Buněčná linie použitá v testu Replicon Assay byla vytvořena jak je popsáno v Lohmann a kol.

(Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285,110 113 (1999)). Po inkubaci replikonových buněk v baňkách na buněčné kultury o objemu 150 cm² (Costar) za teploty 37 °C a s 5% CO₂ a když se vrstva buněk stala souvislou, se buňky zředí 1:10 objemově do čerstvých baněk na buněčné kultury o objemu 150 cm². Médium je DMEM obsahující 10% fetální hovězí sérum (FBS), 1X neesenciální aminokyseliny (NEAA), 1X Glutamin (Glu) a 0,25 mg/ml G418. Provedou se tři postupné etapy, pokaždé se buňky nechají rozrůst do souvislé vrstvy, následuje zředění buněk do čerstvých baněk na buněčné kultury o objemu 150 cm². Tyto buňky, označované jako "původní buňky", se potom alikvotují a uchovávají pro budoucí použití v testu Replicon Assay. Analýza za pomoci TaqMan® se provádí pro určení počtu HCV replikonových genomů na jednu buňku, což odhalí přítomnost přibližně 150 kopií replikonů v jedné buňce. Tento počet je založen na počtu kopií replikonové RNA ke dvojnásobku kopií lidského genu apoB (počet haploidních genomů).

- 1.1.1 Původní buňky se uchovávají v kapalném N₂. Buňky použité v testu Replicon Assay dvacetkrát po sobě se vyhodí a ožíví se čerstvá dávka ze zásoby v kapalném N₂.
- 1.2 Vkládání buněk do 96-jamkových destiček pro test Replicon Assay

- 1.2.1. Pro přípravu 96-jamkových destiček se na 75% souvislá kultura v baňce o objemu 75 cm² obsahující replikonové buňky trypsinizuje a resuspenduje v 10 ml Médiu A. Trypsinizace se provádí odebráním média, přidáváním 1 ml směsi trypsin-EDTA 0,25%, hmotn./obj. a potom odebráním směsi trypsin-EDTA. Po 5-10 minutách se buňky vyjmou z baňky a resuspendují se v médiu.
- 1.2.2. Buňky se počítají použitím hemacytometru a buněčná koncentrace se upraví na 10⁵ buněk/ml.
- 1.2.3. Každá jamka se naočkuje 100 µl buněčné suspenze použitím vícekanálové pipety Impact2 (Matrix), přičemž se nikdy neosazují více než čtyři 96-jamkové destičky z jediné buněčné suspenze.
- 1.2.4 96-jamkové destičky se inkubují za teploty 37 °C přes noc.
- 1.3. Ředění sloučeniny a aplikace na desktyčky s replikonovými buňkami
- 1.3.1. Sloučeniny inhibující HCV serinové proteázy se rozpustí v dimethylsulfoxidu (DMSO) na konečnou koncentraci 20 mM. Interferony se suspendují ve fosfátem pufrovaném solném roztoku, obsahujícím 0,1 % hmot./obj. Albuminu z hovězího séra.

07.04.03

1.3.2.20 mM roztok sloučeniny se zředí na 1 mM pomocí DMSO.

1.3.3.50 μ l sloučeniny rozpuštěné v DMSO se přidá do 10 ml Média B (koncentrace sloučeniny je 5 mM a koncentrace DMSO je nyní 0,5%) nebo 20 μ l 1 mM sloučeniny a 30 μ l DMSO se přidá do 10 ml Média B (koncentrace sloučeniny je 2 μ M.)

1.3.4.Ředění sloučeniny na konečnou koncentraci je ukončeno smícháním roztoku sloučenina/Médium B s Médium C (obsahuje 0,5% DMSO). Postupná ředění sloučeniny v poměru jedna ku pěti se provádějí Médium C v 2 ml polypropylenovém 96-jamkovém bloku pro dosažení požadovaných konečných koncentrací sloučeniny.

1.3.5.Destička s buňkami se vyjme z inkubátoru zahříváného na teplotu 37 °C a označí v horním pravém rohu víčka a na pravé straně základny. Médium se vyleje z 96-jamkových destiček.

1.3.6 100 μ l roztoků sloučenina/médium z každé jamky 96-jamkového ředícího bloku se přidá do 96-jamkových destiček s buňkami použitím pipety Impact2.

1.3.7 100 μ l Média C se přidá do všech neošetřených jamek podle Tabulky 3 pro testování sloučenin v 1, 3 nebo 6 různých koncentracích. "Neoš" označuje předstíraně

07.04.03

ošetřené buňky (DMSO přidáno ve stejné koncentraci jako u ošetřených buněk); "Kon." znamená koncentraci sloučeniny.

Tabulka 3

2 sloučeniny, 6 koncentrací, 5 opakování

Sloučenina 1						Sloučenina 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	
B		kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	
C		kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	
D		kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	
E		kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	kon.4	
F		kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	kon.5	
G		kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	kon.6	
H		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	

4 sloučeniny, 3 koncentrace, 5 opakování

	Sloučenina 1					Sloučenina 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	
B		kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	
C		kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	
D		kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	
E		kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	kon.1	
F		kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	kon.2	
G		kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	kon.3	
H		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	

Sloučenina 3

Sloučenina 4

16 sloučenin, 1 koncentrace, 4 opakování.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		neoš	sl 1	sl 2	sl 3	sl 4	sl 5	sl 6	sl 7	sl 8	neoš	
B		neoš	sl 1	sl 2	sl 3	sl 4	sl 5	sl 6	sl 7	sl 8	neoš	
C		neoš	sl 1	sl 2	sl 3	sl 4	sl 5	sl 6	sl 7	sl 8	neoš	
D		neoš	sl 1	sl 2	sl 3	sl 4	sl 5	sl 6	sl 7	sl 8	neoš	
E		neoš	sl 9	sl10	sl11	sl12	sl13	sl14	sl15	sl16	neoš	
F		neoš	sl 9	sl10	sl11	sl12	sl13	sl14	sl15	sl16	neoš	
G		neoš	sl 9	sl10	sl11	sl12	sl13	sl14	sl15	sl16	neoš	
H		neoš	sl 9	sl10	sl11	sl12	sl13	sl14	sl15	sl16	neoš	

12 sloučeninas, 1 koncentrace, 5 opakování.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	
B		sl 1	sl 1	sl 1	sl 1	sl 1	sl 7	sl 7	sl 7	sl 7	sl 7	
C		sl 2	sl 2	sl 2	sl 2	sl 2	sl 8	sl 8	sl 8	sl 8	sl 8	
D		sl 3	sl 3	sl 3	sl 3	sl 3	sl 9	sl 9	sl 9	sl 9	sl 9	
E		sl 4	sl	sl 4	sl 4	sl 4	sl10	sl10	sl10	sl10	sl10	
F		sl 5	sl 5	sl 5	sl 5	sl 5	sl11	sl11	sl11	sl11	sl11	
G		sl 6	sl 6	sl 6	sl 6	sl 6	sl12	sl12	sl12	sl12	sl12	
H		neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	neoš	

1,4. Destičky jsou inkubovány po dobu 48 hodin za teploty 37 °C a potom vystaveny extrakci RNA.

Tabulka 4

Přehled vybavení a materiálů použitých pro pěstování kultur a aplikaci sloučeniny

8-kanálová pipeta Impact2, 1250 µl	kat.č. 2004	Matix
2 ml polypropylenový hlubokojamkový blok,	kat.č. 4222	Matrix

07.04.03

96-jamkový, sterilní		
25 ml zásobník činidel, sterilní	kat.č. 8096	Matrix
1250 µl extra dlouhé pipetové špičky	kat.č. 8255	Matrix
96-jamková destička	kat.č. 3595	Costar
Hemacytometr	Bright line zlepšený Neubauer 0,1 mm hluboký	Reichert

DMEM	kat.č. 51444-79P	JRH
L-glutamin (Glu)	kat.č. 12403-010	GIBCO-BRL
Neesenciální aminokyseliny (NEAA)	kat.č. 11140-050	GIBCO-BRL
Fetální hovězí sérum (FBS)	kat.č. 16250-078	GIBCO-BRL
G418	kat.č. 55-0273	Invitrogen
DMSO	kat.č. D-2650	Sigma

Médium A	DMEM, 10% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0,25 mg/ml G418
Médium B	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu
Médium C	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0,5% DMSO
Trypsin-EDTA 0,25%	GIBCO-BRL

2. Extrakce veškeré buněčné RNA z replikonových buněk

2.1 Úvod

Cílem procedury je extrakce RNA z vzorků *in vitro* tkáňových kultur tak, aby virová nebo buněčná RNA byla kvantitativně izolována a aby byla dostatečně čistá pro analýzu kvantitativním HCV RT-PCR testem.

Pro umožnění detekce odchylek účinnosti extrakce RNA se do každého buněčného vzorku přidá před extrakcí RNA standardní množství viru virového hovězího průjmu (bovine viral diarrhea virus - BVDV), což je RNA virus s jistou podobností s HCV. Potom by úroveň BVDV RNA detekovaná v závěrečné multiplexní reakci RT-PCR měla být konzistentní pro všechny jamky s mezemi variability, odpovídajícími testu Replicon Assay. Tato vnitřní kontrola účinnosti extrakce RNA je diskutována dále v kapitole TaqMan® uvedené dále.

Použitý přístup k extrakci RNA je způsob RNeasy-96 společnosti Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA). Tento způsob používá 96 mini-kolon s oxidem křemičitým, které jsou rozmístěny v poli odpovídajícímu 96-jamkovým destičkám pro operace s tkáňovými kulturami. Technologie extrakce RNA je modifikace Boomova způsobu, ve kterém se všechny buněčné proteiny a nukleové kyseliny, včetně nukleáz, nejprve denaturují silnou chaotropní solí (guanidinium thiokyanát). V tomto prostředí mají nukleové kyseliny silnou afinitu k oxidu křemičitému, což je materiál v mini-kolonách; ale

proteiny a další kontaminující látky se nevážou na oxid křemičitý a prochází kolonami.

Po promývání kolon roztoky chaotropní sůl/ethanol se vzorky částečně suší a nukleové kyseliny se potom uvolňují z kolon malým objemem vody.

Pro snížení odchylek při izolaci HCV RNA je věnována pozornost podmínkám promývání kolony a částečného sušení. Přítomnost malého množství ethanolu v koloně by kontaminovala výslednou RNA a interferovala s RT-PCR detekčním systémem. Pozornost je nutná ve všech fázích této procedury protože výchozí vzorky mohou být biologicky nebezpečné, chaotropní sůl je silně alkalická a navíc jako thiokyanát může vytvářet jedovatý plynný kyanid pokud přijde do kontaktu s kyselým prostředím.

Tabulka 5

Přehled vybavení a materiálů potřebných pro proceduru extrakce HCV RNA

Souprava RNeasy 96 (24)	kat.č. 74183	Qiagen
Pole QIAvac 96	kat.č. 19504	Qiagen
Centrifuga 4-15C pro 2x96 destiček, 6000 x g	kat.č. 81010	Qiagen
destičkový rotor pro 2x96 destiček	kat.č. 81031	Qiagen

07.04.03

200 Proof Ethylalkohol		
8-kanálová pipeta Impact2 Pipette, 250 µl	kat.č. 2002	Matrix
8-kanálová pipeta Impact2 Pipette, 1250 µl	kat.č. 2004	Matrix
2 ml polypropylenový hlubokojamkový blok, 96-jamkový, sterilní	kat.č. 4222	Matrix
25 ml zásobník činidel, sterilní	kat.č. 8096	Matrix
1250 µl extra dlouhé pipetové špičky	kat.č. 8255	Matrix
200 µl pipetové špičky	kat.č. 7275	Matrix
MEM médium prosté séra	kat.č. 11095-80	GIBCOBRL

2.2 Procedura:

2.2.1 Lýze buněk

2.2.1.1. Příprava lýzového pufru: Do jedné 96-jamkové destičky se přidá 150 µl β-merkapt ethanolu (β-ME) a 1 µl BVDV zásobního roztoku (vířivé míchání roztoku před přidáním) na 15 ml RLT pufru (složka soupravy RNeasy, Qiagen). Tento zásobní roztok je připraven infekcí MDBK buněk (hovězí ledvinové buňky #CCL-22, dodává American Type Culture Collection, Manassas VA, USA) virem BVDV a odebráním kultury v okamžiku špičkového cytopatologického účinku (peak cytopathic

07.04.03

effect - CPE). Tento zásobní roztok má infekční titr přibližně 1×10^7 pfu/ml. Z toho vyplývá prahový cyklus (Ct) pro BVDV přibližně 22 v testu TaqMan®. Zásobní roztok BVDV se uchovává v mrazničce při teplotě -80 °C.

2.2.1.2. Buňky se promývají 150 µl MEM média prostého séra (program 4 8-kanálové elektronické pipety P1250: Fill 1250, Disp 150 x 8). Do každé jamky se přidá 150 µl lýzového pufru (týž program).

2.2.1,3. RNA se extrahuje okamžitě nebo se buňky zmrazí za teploty -80 °C.

2.2.2. Příprava činidel a materiálů pro extrakci RNA.

2.2.2.1. Zápis čísla dávky RPE a RNeasy 96 Kit.

2.2.2.2. RPE: 720 ml 100% ethanolu se přidá do jedné láhve RPE (Qiagen) a dobře promíchá; RPE láhve se vždy dobře protřepávají před použitím.

2.2.2.3. 70% Ethanol: 150 ml diethylpyrokarbonát (DEPC) s vodou se přidá do 350 ml 100% ethanolu a dobře promíchá.

2.2.3. Příprava RNA pomocí soupravy RNeasy 96

- 2.2.3.1. Zmrazené vzorky se rozmrazí za teploty okolí během 40 minut. Současně se rozmrazí jedna kolona extrakční kontroly pro každou destičku (Extrakční kontroly soupravy RNeasy je soubor 8 navzájem spojených trubic. Uvnitř každé trubice je 170 μ l buněčného lyzátu s jistým poměrem HCV pozitivních a negativních buněk. Shora dolů je po dvou s nízkým, středním, vysokým a nulovým počtem kontrol. (Viz kapitola 2.3 protokolu uvedená dále).
- 2.2.3.2. Vzorky se smíchají pipetováním 100 μ l pětkrát tam a zpátky. Celý vzorek se přenesse do kolon 1-10 v 2 ml Matrix bloku s čtvercovými jamkami (program 1 na P250: Mix 100 x 5, Fill 170, Purge).
- 2.2.3.3. 150 μ l replikonového standardu se přenesse do kolony 11 (žádné vzorky v koloně 12).
- 2.2.3.4. 150 μ l 70% ethanolu (EtOH) se přidá ke každému vzorku (program 4 na P1250: Fill 1250, Disp 150).
- 2.2.3.5. Destičky RNeasy 96 označené odpovídajícím číslem destičky se vloží do vakuového pole. Směs lyzátu/EtOH se zamíchá a přenesse na RNeasy 96 destičky (program 1 na P1250: Mix 200, Times 5, Fill 330 and Purge). Nepoužité jamky se přelepí průhlednou páskou (dodává společnost Qiagen), obvykle kolona 12.

07.04.03

- 2.2.3.6. Vzorky se nanesou na mini-kolony použitím vakua (přibližně 800 mbarů).
- 2.2.3.7. Destičky RNeasy-96 se promývají 1000 μ l pufru RW1 (Qiagen) na jamku (program 2 na P1250: Fill 1000, Disp 1000).
- 2.2.3.8. Pufr RW1 se vakuově profiltruje a průchod se uvolní.
- 2.2.3.9. RNeasy-96 destička se promývá 1000 μ l RPE pufru/jamku (program 2 na P1250).
- 2.2.3.10. Pufr RPE se vakuově profiltruje.
- 2.2.3.11. Krok 2.2.3.9 se opakuje
- 2.2.3.12. Pufr RPE se vakuově profiltruje, vakuum se udržuje po dobu 3 minut.
- 2.2.3.13. Destičky RNeasy 96 se suší: Destičky RNeasy-96 se vloží do mikrozkuřavkového zásobníku (dodávaný společností Qiagen), zakryjí se dodanou páskou AirPore a jednotka se centrifuguje po dobu 10 minut při 6000g (centrifuga Qiagen Sigma; 4-15 °C).
- 2.2.3.15. Vymývání RNA z RNeasy 96-jamkových destiček: Destičky RNeasy-96 se vloží na nový mikrozkuřavkový zásobník. Do středu každé jamky se přidá 70 μ l vody

07.04.03

prosté RNázy (program 3 na P1250: Fill 850, Disp 70).

2.2.3.16. Inkubace 1 minutu za teploty okolí a potom zakrytí destičky novou páskou AirPore.

2.2.3.17. Jednotka se potom centrifuguje po dobu 4 minut při 6000 g v centrifuze Sigma 4-15C. Velikost vymytého objemu je mezi 28 μ l a 50 μ l.

2.2.3.18. Destičky RNeasy-96 se odstraní a zkumavkový zásobník se uzavře kloboučky dodávanými společností Qiagen (8 na jednu řadu).

2.2.3.19. Vymytá RNA se uchovává za teploty -80 °C nebo se okamžitě analyzuje testem TaqMan®.

2.3 Příprava extrakční kontroly

Den 1

2.3.1.1. Vložit $2,5 \times 10^7$ replikon produkcí buněk do baňky na tkáňové kultury o objemu 150 cm^3 (T-150).

2.3.1.2. Vložit $2,0 \times 10^6$ Huh7 buněk do baňky na tkáňové kultury o objemu 75 cm^3 (T-75).

2.3.1.3 Inkubovat přes noc za teploty 37 °C.

Den 2

2.3.1.4. Lýzovat buňky lýzovacím pufrem.

2.3.1.5. Odebrání supernatantu buněk Huh7 a replikon produkujících buněk a promývání jednoduché vrstvy 10 ml média prostého séra (MEM).

2.3.1.6. Přidat 30 ml lýzovacího pufru (s 1 μ l zásobního roztoku s BVDV na 15 ml lýzovacího pufru) k buňkám Huh7, míchat opakovaným pipetováním a vložit buněčný lyzát do 50 ml centrifugační zkumavky na tkáňové kultury s kónickým dnem.

2.3.1.7. Přidat 10,5 ml lýzovacího pufr k replikon produkujícím buňkám, míchat opakovaným pipetováním a vložit buněčný lyzát do 15 ml centrifugační zkumavky na tkáňové kultury s kónickým dnem.

2.3.2. Pro vysoký (HIGH) extrakční standard: Alikvotovat 170 μ l lyzátu replikon produkujících buněk do řad 5 a 6 dvou Matrix 0,75 ml zkumavkových zásobníků.

2.3.3. Pro střední (MEDIUM) extrakční standard: Přidat 1,0 ml lyzátu replikon produkujících buněk do 9 ml lyzátu buněk Huh7 a dobře promíchat. Alikvotovat 170 μ l této směsi do řad 3 a 4 dvou Matrix 0,75 ml zkumavkových zásobníků.

2.3.4. Pro nízký (LOW) extrakční standard: Přidat 50 μ l lyzátu replikon produkujících buněk do 10 ml lyzátu buněk Huh7 a dobře promíchat. Alikvotovat 170 μ l této směsi do řad 1 a 2 dvou Matrix 0,75 ml zkumavkových zásobníků.

2.3.5. Nulová (ZERO) extrakční kontrola: Alikvotovat 170 μ l lyzátu buněk Huh7 do řad 7 a 8 dvou Matrix 0,75 ml zkumavkových zásobníků.

2.3.6. Uchovávat kontroly za teploty -80°C

3. TaqMan® RT-PCR a analýza dat

3.1 Úvod

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase se používá pro měření množství HCV replikonové RNA v každém vzorku. Tato technologie je často označována jako na PCR založený 5'-nukleázový test a TaqMan®. Analytické zařízení je detekční systém Applied Biosystems 7700 Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Toto zařízení je v zásadě časově multiplexovaný spektrograf laserově indukované fluorescence spojený s teplotním cyklovačem. Přístroj monitoruje akumulaci PCR ampliconu v každé jamce 96-jamková desky se vzorky v průběhu PCR procesu.

3.2. Použití vnitřní kontroly BVDV

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, do každého vzorku je vložena vnitřní pozitivní kontrola. Ta slouží jako měřítko účinnosti extrakce RNA a ukazuje zda vzorek obsahuje kontaminanty, které inhibují TaqMan PCR. BVDV se smíchá s chaotropním buněčným lýzovacím pufrem před aplikací lýzového pufru na buňky. Ačkoli pozitivní kontrola je v každém vzorku, test BVDV vnitřní pozitivní kontroly je prováděn pouze tehdy, když testová data v HCV testu replikonové RNA padnou mimo očekávané rozmezí, což naznačuje, že by mohl být problém se vzorky. Přístroj 7700 je schopen současně monitorovat akumulaci dvou různých PCR amplikonů ve zkumavce použitím detekčních sond označených dvěma různými fluorescenčními reportujícími barvivy ("multiplex"). Specifická kritéria, která vyvolávají TaqMan® analýzu BVDV vnitřní pozitivní kontroly vzorku destička jsou popsán v kapitole o analýze dat (3.6).

3.3 Sondy a primery pro test TaqMan® HCV replikonové RNA

V důsledku očekávané genetické stability a obecné nepřítomnosti sekundární struktury RNA genu rezistence na neomycin (neo) zakódovaného v replikonu byly použity primery a sonda, které se vážou na tuto oblast. Tento segment replikonové RNA se nachází mezi bázemi 342-1193 replikonu o 8001 párech bází (SEQ ID NO: 1):

```
301 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac
361 ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc
421 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga
481 caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg cgggttcttt
541 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggttat
601 cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg
```

661 gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg
 721 ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc
 781 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga
 841 tggaagccgg tcttgctgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgcag
 901 ccgaactgtt cgccaggtc aaggcgcgca tgcccgcgag cgaggatctc gtcgtgaccc
 961 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg CCGCTTTTCT GGATTCATCG

dopředný primer

1021 aCTGTGGCCG GCTGGGTGTG Gcggaccgct atcaggacat agcgttggt acccgtgata
 TaqMan® sonda

1081 ttgctgaaga gcTTGGCGGC GAATGGGctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg
 zpětný primer

1141 ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa

3.4. Procedury

3.4.1. Způsob přípravy 1x hlavních směsí pro NEO a BVDV RT-PCR

Tabulka 6

Přehled vybavení a materiálů pro přípravu RT-PCR
 10-destičkovou hlavní směs

Vybavení a materiály	Objednací číslo	Dodavatel
0,5-10 µl pipeta	22 47 005-1 2000 Series	Eppendorf
2-20 µl pipeta	2 47 015-9 2000 Series	Eppendorf
10-100 µl pipeta	22 47 020-5 2000 Series	Eppendorf
50-200 µl pipeta	22 47 025-6 2000 Series	Eppendorf
100-1000 µl pipeta	22 47 030-2 2000	Eppendorf

07.04.03

	Series	
1250 µl Matrix špičky	kat.č. 8255	Matrix
200 µl Matrix špičky	kat.č. 7275	Matrix
10 µl ART špičky	kat.č. 2140	Molecular Bioproducts
20 µl ART špičky	kat.č. 2149P	Molecular Bioproducts
100 µl ART špičky	kat.č. 2065E	
200 µl ART špičky	kat.č. 2069	Molecular Bioproducts
1000 µl ART špičky	kat.č. 2079E	Molecular Bioproducts
Elektronická pipeta, Impact2	kat.č. 2001	Matrix
1,5 ml mikrofugační zkumavky bez RNázy	kat.č. 12450	Ambion
14 ml Polypropylenové zkumavky	kat.č. 352059	Falcon
25 ml zásobník činidel	kat.č. 8096	Matrix
96-jamková reakční destička	kat.č. N801-0560	Applied Biosystems
pásky optických uzávěrů	kat.č. N801-0935	Applied Biosystems
Sterilní rukavice na jedno použití	kat.č. 9515-E	Baxter
Reagenty	Objednávka č.	Dodavatel
Kyselina	0. 1N HClFisher	
RNase Zap	kat.č. 9780	Ambion

07.04.03

RNAse away	kat.č. 7005	Molecular Bioproducts
10-násob. EZ RT-PCR souprava základních činidel, 5x reakční pufr, 25 mM octan hořečnatý, deoxy NTP	kat.č. 403028	Applied Biosystems
VIC NEO sonda, 2 μ M (=10x), 550 μ l na alíkvot	kat.č. 450003, zákaznický, 5'-VIC-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 2)	Applied Biosystems
VIC BVDV sonda, 2 μ M (=10x), 550 μ na alíkvot (Vertex)	kat.č. 450003, zákaznický, 5'-VIC-CCC TCG TCC ACG TGG CAT CTC GA-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 3)	Applied Biosystems
NEO dopředný primer, 3 μ M (=10x) směs dopředný/zpětný primer, 550 μ na alíkvot	kat.č. 4304972, zákaznický, 5'-CCG CTT TTC TGG ATT AT CG-3' (SEQ ID NO: 4)	Applied Biosystems
NEO zpětný primer, 3 μ M (=10x) směs dopředný/zpětný primer, 550 μ l na alíkvot	kat.č. 4304972, zákaznický, 5'- CCC ATT CGC CGC CAA 3' (SEQ m NO: 5)	Applied Biosystems
BVDV dopředný primer, 3 μ M (=10x) směs	zákaznický, 5'-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-	Oligos etc

07.04.03

dopředný/zpětný primer, 550 μ na alikvot	3' SEQ ID NO: 6), 1,0 μ M bez gelového čištění	
BVDV zpětný primer, 3 μ M (=10x) směs dopředný/zpětný primer, 550 μ l na alikvot	zákaznický, 5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEQ ID NO: 7), 1,0 μ M bez gelového čištění	Oligos etc
NEO RNA standardy	<i>In vitro</i> transkribovaná RNA z plasmidu obsahujícího neo genovou část HCV replikonové RNA použitím T7 RNA polymerázy. <i>In vitro</i> transkribovaná RNA je kvantitativně vztažena ke známé molekulové hmotnosti i transkriptů a UV-absorbce čištěného transkribovaného roztoku. Tato RNA se zředí, alikvotuje a uchovává za teploty -80 °C. Jednotlivé alikvoty se rozmrazí pro každý TaqMan®3 test.	

RNA vzorky pro testování se izolují z HCV replikonových buněk (kapitola 2 tohoto Protokolu), 10 μ l/96-jamkových destiček		
Voda prostá nukleázy (nezpracovaná pomocí DEPC)	kat.č. 9930	Ambion

3.4.2. Příprava činidel hlavní směsi

3.4.2.1. Umýt stůl v následujících dvou krocích a
propláchnout pipetu pomocí RNase Away.

RNase Zap (Ambion, Austin, TX, USA)

RNase Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA,
USA)

3.4.2.2. Otevřít hlavní EZ RT-PCR činidla (Applied
Biosystems) a vložit 5x pufr na led, rozmrazovat
zmrazená činidla za teploty okolí po přibližně 15
minut a potom je poožít na led. Jedna souprava EZ
RT-PCR činidel může být použita pro dvě 96-jamkové
RNA extrakce.

3.4.2.3. Vztít jednu tubu 2 μ M VIC sondy (NEO nebo BVDV,
550 μ l v tubě) z -20 °C a položit na led.

07.04.03

- 3.4.2.4. Vzáit jednu tubu 3 μM směsi dopředný/zpětný primer (NEO nebo BVDV, 550 μl v tubě) z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a položit na led.
- 3.4.2.5. Vzáit jednu tubu (30 μl) standardních RNA transkriptů (10^8 kopií/10 μl) z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a položit na led.
- 3.4.2.6. Vzáit jednu tubu Ambion vody o teplotě okolí.
- 3.4.3. Sestavení hlavní směsi pro jednu 96-jamkovou reakční destičku.
- 3.4.3.1. Použít 1 ml pipetu pro přenesení 5x pufru (Applied Biosystems) do 14 ml tuby; celkový přidaný objem je 1100 μl .
- 3.4.3.2. Použít 1 ml pipetu pro přidání 25 mM Mn (OAc)₂ (Applied Biosystems) do 14 ml tuby; celkový přidaný objem je 660 μl .
- 3.4.3.3. Použít 200 μl pipetu pro přidání 165 μl 10 mM dATP do 14 ml tuby. Provést totéž pro 10 mM dCTP, 20 mM dUTP a 10 mM dGTP.
- 3.4.3.4. Použít 1 ml pipetu pro přidání 550 μl 10x 3 M směsi dopředný/zpětný primer.

07.04.03

- 3.4.3.5. Použít 1 ml pipetu pro přidání 550 μ l 10x 2 μ M sondy.
- 3.4.3.6. Použít 1 ml pipetu pro přidání 220 μ l rTth DNA polymerázy (Applied Biosystems).
- 3.4.3.7. Použít 100 μ l pipetu pro přidání 55 μ l AmpErase UNG (Applied Biosystems).
- 3.4.3.8. Použít 1 ml pipetu pro přidání 605 μ l Ambion H₂O do 14 ml tuby; konečný objem je celkově 4400 μ l.
- 3.4.3.9. Přenést 4400 μ l hlavní směsi do 25 ml zásobníku činidel.
- 3.4.3.10. Rozdělit 40 μ l na jamku do všech 96 jamek použitím 8-kanálové pipety.
- 3.4.3.11. Přenést 10 μ l extrahovaných neznámých vzorků do jamek reakční destičky použitím 8-kanálové pipety, sloupec po sloupci, sloupec 1 až sloupec 11. Uzavřít sloupce po přenosu.
- 3.4.3.12. Přidat 270 μ l Ambion H₂O do 30 μ l 10⁸ kopií/10 μ l RNA transkriptu pro použití ve standardní křivce a promíchat. Nyní je 10⁷ kopií HCV replikonové kvantizačně standardní RNA/10 μ l.

3.4.4. Nastavení ABI 7700 pro každý běh

3.4.4.1 Před každým během restartovat počítač pro ABI 7700 a přestavět desktop.

3.4.4.2 Uzavřít a odstranit každý nadbytečný program z pevného disku; zpracovaná data do koše.

3.4.4.3 Otevřít program Sequence Detector vl. 7 (SDS software).

3.4.4.5 Otevřít složku "Replicon Assay Runs".

3.4.4.6 Otevřít "Replicon Assay" dialog šablony. Podmínky tepelného cyklovače se naprogramují do šablony následujícím způsobem:

Etapa 1: 50 °C po dobu 2 minut.

Etapa 2: 60 °C po dobu 30 minut.

Etapa 3: 95 °C po dobu 5 minut.

Etapa 4: 95 °C po dobu 15 sek.

Etapa 5: 60 °C po dobu 60 sek.

Počet opakování cyklu etap 4-5: 40.

Další nastavení:

Template instrument: diagnosis: advanced options:

Select views: display mse.

Select views: display best fit.

Select miscellaneous: reference dye ROX.

3.4.4.7 Uložit ("Save", nikoli "save as") soubor do složky "Replicon Assay Runs".

07.04.03

- 3.4.4.8 Nastavení zobrazení: stisknout RUN
- 3.5 Příprava ABI7700 dat po běhu použitím SDS software.
- 3.5.1. Testovací destičky se vyjmou z ABI7700 a vyhodí, aniž by byly otevřeny. To velmi snižuje laboratorní problémy s PCR křížovou kontaminací.
- 3.5.2. Data se analyzují použitím software Sequence Detector System v1.7.
- 3.5.3. Prahové hodnoty se na začátku nastaví použitím základního nastavení.
- 3.5.4. Kritérium odmítnutí dat: Datové body nebo řady pro celou destičkas mohou být odmítnuty. Jestliže dojde k významné odchylce od protokolu, selhání činidla nebo nehodě nebo chybě při běhu ABI 7700, data mohou být vymazána. Pro odmítnutí libovolného datového bodu pocházejícího ze zjevně normálního běhu musí být splněno jedno nebo více následujících kritérií.
- 3.5.4.1. Prahové výpočty cyklu. Normálně se používají základní hodnoty SDS software. Jestliže Ct vzorků většiny koncentrací je menší než 15, potom se změní prahová hodnota stop limitu jak je třeba k nižší hodnotě, aby Ct vzorku nejvyšší koncentrace bylo větší než stop hodnota. Aktualizovat výpočty po provedení této změny.

- 3.5.3.2. Uvažovat vyřazení zcela abnormálního běhu TaqMan® indikovaného odchylkou od středních hodnot sklonu a průsečíku s y-ovou osou u přímky generované analýzou neo RNA standardy. Přijatelná rozmezí pro tyto hodnoty jsou:
- sklon mezi 3,0 a 3,6
průsečík s osou y mezi 36 a 41 cykly.
- 3.5.4.3. Nenormální jednotlivé TaqMan® jamky jak je indikováno extrémním $R_n/\Delta R_n$ mohou být vypuštěny před prováděním analýzy dat tak, aby neovlivnily výpočty SDS software.
- 3.5.4.4. Přezkoumat a zaznamenat netemplátové kontrolní Ct hodnoty a potvrdit že jsou větší než 7,0 Ct ($> 100X$) vyšší než Ct pro libovolný vzorek ošetřený sloučeninou.
- 3.5.5. HCV RNA standardní Ct hodnoty se porovnají s předchozími výsledky.
- 3.5.6. HCV RNA standardní křivky se porovnají s předchozími výsledky.
- 3.5.7. Jestliže je pro jednotlivé jamky zjevná nenormální amplifikace, tyto jamky se identifikují a poznamenají.

07.04.03

- 3.5.8. Soubor "výsledky" se exportuje a přenese z počítače 7700 do jiného počítače pro analýzu použitím Microsoft Excel.
- 3.5.9. Libovolné následující změny přípravy použitých činidel nebo ředění se oznámí.
 - Nová syntéza sondy nebo primeru od dodavatele.
 - Nová ředění a alikvoty sondy nebo primeru.
 - Nové standardy přípravy RNA transkriptu.
 - Nové standardy ředění a alikvotů RNA transkriptu.
 - Nová příprava BVDV viru.
 - Nová příprava standardů kolony 11.
- 3.6. TaqMan® analýza dat.
 - 3.6.1. Zkopírovat a vložit TaqMan® HCV Ct hodnotu a zkopírovat hodnotu z výsledkového souboru TaqMan® do odpovídajícího pole makra Microsoft Excel pro analýzu dat testu Replicon Assay provedení tohoto makra.
 - 3.6.2. Zkopírovat tabulku výsledků TaqMan® z listu makra na jiný list, vložit pořadové číslo a číslo šarže sloučeniny.
 - 3.6.3. Z uvedeného listu Microsoft Excel se určí střední hodnota, standardní odchylka a procento CV inhibiční aktivity sloučeniny, stejně tak jako HCV hodnota, HCV Ct hodnota a BVDV Ct hodnota (je-li známa) všech

bodů ředění pro 5 opakování a kontrolu bez sloučeniny.

3.6.4. Kritéria pro odmítnutí dat a implementaci BVDV kontorly v testu TaqMan®. Zkontrolovat všechny výpočty. Datové body nebo údaje pro celé destičky mohou být odmítnuty. Dojde-li k významné odchylce od protokolu, selhání činidla nebo nehodě nebo selhání ABI 7700, data mohou být vyloučena. Pro odmítnutí libovolného datového bodu ze zjevně normálního běhu musí být splněno jedno nebo více následujících kritérií. Standardní odchylka procenta inhibice by měla být menší než 30% u aktivních sloučenin. Procento CV pro HCV hodnotu by mělo být menší než 30%. Standardní odchylka HCV Ct všech vzorků by měla být menší než 0,5; obvykle je přibližně 0,1 až 0,3 u většiny vzorků. Jestliže HCV Ct standardní odchylka je větší než 0,5, potom jít zpět do tabulky nezpracovaných dat a překontrolovat hodnoty Ct pro 5 opakování. Jestliže hodnota Ct pro libovolnou jamku je o 2 Ct odlišná od střední hodnoty Ct pro 5 opakování, potom tato jamka by měla být vyloučena z analýzy. Jestliže více než 3 jamky (ne ve stejném sloupci) mají neobvyklé hodnoty Ct, potom by měla být proveden BVDV TaqMan® vnitřní kontrolní test. Jestliže BVDV data vykazují irregularitu, potom sloučenina by měla být testována znova.

3.6.5. Výpočet IC_{50} : Zkopírovat a vložit data střední inhibice a standardní odchylky do kalkulačtoru

sigmoidální dávkové odezvy s proměnným sklonem, který používá metodu nelineární regrese. Použitím tohoto nástroje se vypočtou hodnoty IC_{50} použitím následujících dvou metod: pouze zafixování stropu na 100% inhibice nebo zafixování stropu na 100% inhibice a dna na 0% inhibice. Způsob, který dává jasnější hodnotu, se potom uvádí pro každou sloučeninu. Nejspolehlivější IC_{50} vychází z výpočtů, které mají nejnížší standardní chybu. Jestliže hodnoty IC_{50} vypočtené z těchto dvou křivek vykazuje více než jednonásobnou odchylku nebo jestliže standardní odchylka IC_{50} je větší než IC_{50} , sloučenina by měla být testována znova pro upravené koncentrace.

Výpočet účinku inhibitorů HCV serinových proteáz v kombinaci s interferony

Účinek inhibitorů HCV serinových proteáz (HSPI) a interferonů v kombinaci může být zhodnocen v testu Replicon Assay vytvořením křivky dávkové odezvy pro HSPI v přítomnosti různých hladin interferonu nebo určováním křivky dávkové odezvy pro interferon v přítomnosti různých hladin HSPI. Cílem je určit, zda dochází k větší nebo menší inhibici akumulace virové RNA, než by bylo možno očekávat, pokud by uvedené dvě látky přinášely aditivní účinek na RNA. Přesněji, byla použita definice aditivity podle Lowe ((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic, Ergebn. Physio., 27, 47-187). Ta je definována následujícím způsobem. Necht $D_{E,INF}$ je koncentrace interferonu, která

vede k účinku E a nechť $D_{E,HSPI}$ je koncentrace inhibitoru proteáz, která vede k účinku E.

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSPI}} \quad (1)$$

Potom nulová interakce nebo Lowe-ova aditivita je definována následujícím vztahem, kde kombinace koncentrací D_1 pro INF a D_2 pro HSPI přináší účinek E.

Stupeň synergie nebo antagonismu je vyjádřen jako křivky stejného účinku neboli Isoboly. Kombinace (D_1 , D_2) je bod grafu, kde osy jsou koncentrace interferonu a HSPI (Obr. 2). Všechny takové kombinace, které vyvolávají hladinu účinku E vytváří isobol účinku E. Body ($D_{E,INF}$, 0) a (0, $D_{E,HSPI}$) jsou body na isobole. Isoboly jsou přímky spojující body ($D_{E,INF}$, 0) a (0, $D_{E,HSPI}$), pokud je splněn vztah (1).

Konkávě vzhůru obrácené Isoboly označují synergie a konkávě dolů obrácené Isoboly označují antagonismus. Na základě pokynů z prací Berenbaum, M. C. ((1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. J. Theor. Biol., 114,413-431) a Greco, Park a Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327), (1) popisuje synergii nebo antagonismus. Rovnice definuje

povrch odpovídající odezvám, který může být proložen hodnotami kontroly pro všechny kombinace ošetření. Grafy obrysů z tohoto povrchu odpovídajícího odezvám představuje Isoboly.

Model povrchů odezvy předpokládá sigmoidální dávkovou odezvu pro každou sloučeninu, definovanou vztahem (2).

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + \left(\frac{[Drug]}{IC50} \right)^n} + B \quad (2)$$

Koncentrace, které dávají specifikovanou hodnotu samotné aktivity E jsou dány vztahem (3)

$$D_{E,INF} = IC50_{INF} \left(\frac{E-B}{E_{\max}-E+B} \right)^{1/n_{INF}} \quad D_{E,HSP} = IC50_{HSP} \left(\frac{E-B}{E_{\max}-E+B} \right)^{1/n_{HSP}} \quad (3)$$

Pro splnění modelu podle Greco a kol. (1990) potom musí zkombinované působení látek splňovat rovnici (4) pro každou kombinaci látek, která dává úroveň odezvy E.

$$1 = \frac{[INF]}{IC50_{INF} \left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/m_{INF}}} + \frac{[HSPI]}{IC50_{HSPI} \left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/m_{HSPI}}} + \frac{\alpha [INF][HSPI]}{IC50_{INF} IC50_{HSPI} \left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/2m_{INF}} \left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/2m_{HSPI}}} \quad (4)$$

Parameter α měří velikost interakce. Hodnota nula pro α znamená nulovou interakci nebo aditivitu, protože rovnice se redukuje na (1) pokud $\alpha = 0$. Jsou-li dány IC_{50} , Hillův sklon (m), maximální hodnota (E_{max}) a minimální hodnota (B), tato rovnice může být vyřešena pro získání účinku, který vznikne pro libovolnou kombinaci ošetření $[INF]$ a $[HSPI]$. Proto tato rovnice definuje povrch určující odezvy. Je-li dán experiment, ve kterém se hodnoty $[INF]$ a $[HSPI]$ mění, parametry mohou být zvoleny použitím nelineární vážené regrese s nejmenšími čtverci. Parameter α může být vztažen k míře synergie S (Hewlett, P. S. (1969) Measurement of potencies of drug mixtures. Biometrics, 25, 477-487), která je vzata přímo z Isoboly pro 50% účinek. S je poměr vzdálenosti od počátku k Isobole definující aditivitu k vzdálenosti od počátku k Isobole prokládající data podél přímky s úhlem 45° s osami. ($S=ON/OM$, viz Obr. 3). Vztah je $\alpha = 4 (S^2 - S)$.

Způsob diskutovaný v práci Greco a kol. (1990) uvedené výše pro nalezení plochy odezev a určení parametru synergie α s jeho mírou významnosti je následován určením stupně

synergie v řadě experimentů testujících HSPI v kombinaci s několika různými interferony.

Je však nutné dávat pozorováním s nižšími počty menší váhu než pozorováním s vyššími počty. Počty se vztahují přímo k procentu kontroly, kterou je účinek E. Použitím způsobu, který je popsán v monografii Carroll, R. J. a Rupert, D. ((1988) (Transformation and Weighting in Regression, Chapman and Hall, New York), může být variabilita mezi jamkami nahlížena jako vzrůst čtverců střední hodnoty procenta kontroly. Proto jsou pozorování vážena proti čtverci hodnoty procenta kontroly (E). Odchytky a vážení používané při analýze těchto experimentů jsou v souladu s vztahy variability, pozorovanými výzkumníky zkoumajícími způsoby analýzy radioligandových testů (Finney, D. J., (1976), Radioligand Test, Biometrics, 32, 721-740, a Dudley, R. A. Edwards, P., Ekins, R. P., McKinzie, I. G. M., Raab, G. M., Rodbard, D. a Rodgers, R. P. C. (1985), Guidelines for Immunoassay Data Processing, Clinical Chemistry, 31/8, 1264-1271).

Výsledky

V počátečních experimentech se inhibitor HCV serinových proteáz, kterým je sloučenina CU, testuje pro koncentrace v rozmezí od 3 μM to 0,0123 μM , to znamená v 244-násobném rozmezí. Koncentrace inteferonu- α 2B se mění v rozmezí od 30 jednotek na vzorek do 0,0096 jednotek na vzorek, to znamená v 3125-násobném rozmezí. Jak je ukázáno v Tabulce

7, pokud je použita jako jediná látka pro ošetření, sloučenina CU vykazuje IC_{50} 0,48 μM a hodnota IC_{50} pro interferon je 2,19 U. V rámci přesnosti testu Replicon Assay, která je přibližně 20%, přidání inteferonu- α 2B vede k vzrůstu inhibice akumulace replikonové RNA dávkově závislým způsobem. Například ošetření buněk 0,333 μM sloučeniny CU vede k 28% inhibice of akumulace replikonové RNA. Ošetření kombinací 0,333 μM sloučeniny CU, která je 71% IC_{50} dávky (0,469 μM) a 0,24 U inteferonu- α 2B, která je 11% IC_{50} pro inteferon- α 2B (2,05 μM) vede k 49% inhibici akumulace replikonové RNA. To znamená, že 71% jedné IC_{50} dávky v kombinaci s 11% jiné IC_{50} dávky vede k 49% inhibice akumulace replikonové RNA. Použitím intuitivního přístupu k určování, zda je kombinační léčba synergická nebo aditivní nebo antagonistická, by bylo možno předpovědět, že pokud by účinek kombinační léčby byl pouze aditivní, pak zkombinované frakce dvou IC_{50} dávek, nutných pro dosažení 49% inhibice akumulace replikonové RNA by představovaly 98%. Dosažené experimentální výsledky ukazují, že hodnota inhibice akumulace replikonové RNA je dosažena použitím 71 % plus 11 %, to znamená 82% dávky IC_{50} namísto 98%, jak by bylo možno očekávat pro aditivní účinky kombinační léčby. Proto pro tyto koncentrace sloučenin dochází k synergickému účinku, protože menší částečné dávky IC_{50} dávky každé sloučeniny se použijí pro dosažení 49% inhibice HCV replikonové RNA, než by bylo požadováno pro kteroukoli sloučeninu samotnou, kdy by bylo třeba 98% dávky IC_{50} . Výsledky tohoto kombinačního ošetření jsou uvedeny v Tabulce 8 a graficky na Obr. 1.

Tabulka 7

Inhibice akumulace replikonové RNA po 48 hodinách od ošetření sloučeninou CU a inteferonem- α 2B, individuálně nebo v kombinaci

Sloučenina CU (konc.)	Inteferon- α 2B (jednotky)						
	30U	6U	1,2U	0,24U	0,048U	0,0096U	0 U
3 μ M	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 μ M	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0,333 μ M	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0,1111 μ M	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,0370 μ M	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,0123 μ M	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 μ M	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

Tyto počáteční výsledky, odvozené jak bylo uvedeno výše z použití *in vitro* testu Replicon Assay a jednoduché analýzy aditivity data vytvořených tímto testem, prokazují, že kombinační ošetření replikonových buněk inhibitorem HCV serinových proteáz a interferonem dává alespoň aditivní protivirový účinek a pravděpodobně synergický protivirový účinek.

Předchozí data byla znovu analyzována použitím formálních matematických nástrojů popsaných výše pro určení, zda vztah mezi inhibitorem HCV serinových proteáz CU a interferonem alfa-2B je synergický, aditivní nebo antagonistický. Znovu

analyzovaná data jsou znázorněna numericky v Tabulce 8 a graficky na Obr. 4.

Tabulka 8 přehledně uvádí další výsledky získané v testu Replicon Assay po ošetření replikon obsahujících buněk po dobu 48 hodin s různými inhibitory HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu a několika různými interferony, individuálně nebo v kombinaci. Podotýkáme, že standardní odchylka hodnot změřených pro inhibici HCV replikonové RNA v testu Replicon Assay je okolo 20%. Sloučeniny jsou testovány pro široké rozmezí koncentrací a s nižšími koncentracemi sloučenin takovými, že nezpůsobují významnou inhibici koncentrace HCV replikonové RNA. V důsledku 20% standardní odchylky testu některé datové body generují záporná čísla. Záporná hodnota inhibice indikuje u konkrétního experimentu, že v průměru je ve vzorcích zpracovaných sloučeninou více molekul HCV replikonové RNA než ve vzorcích zpracovaných bez sloučeniny.

Tabulka 8

Inhibice akumulace replikonové RNA po 48 hodinách působení inhibitoru HCV serinových proteáz a s různými interferony, individuálně nebo v kombinaci

Experiment 1

Sloučenina CU (μM)	IFN alfa-2B (jednotky)						
	30,00	6,00	1,20	0,24	0,048	0,0096	0,000
0,000	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

07.04.03

0,012	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0,037	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,111	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,333	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
1,000	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
3,000	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%

Experiment 2

Sloučenina CU (μM)	IFN alfa-2A (jednotky)						
	30	6	1,2	0,24	0,048	0,0096	0
0	86%	61%	27%	4%	-7%	5%	0%
0,0123	87%	6%	17%	-23%	8%	8%	10%
0,37	85%	62%	13%	-2%	0%	-1%	1%
0,1111	87%	68%	37%	20%	-6%	12%	10%
0,333	92%	77%	58%	41%	26%	25%	44%
1	98%	96%	90%	86%	84%	83%	85%
3	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%

Experiment 3

Interferon alfa-2B (jednotky)	Sloučenina CU (μM)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	-2%	0
0,049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%	3%
0,123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%	2%
0,307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	19%	-3%
0,768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%	28%
1,920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%	45%

07.04.03

4,8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%	59%
12,0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	85%	80%
30,0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	92%	93%	89%

Experiment 4

Interferon alfa-2A (jednotky)	Sloučenina CU (μM)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%	0%
0,049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%	6%
0,123	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%	-8%
0,307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%	10%
0,768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%	15%
1,920	98%	96%	73%	48%	43%	44%	27%	33%	29%
4,8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%	43%
12,0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%	73%
30,0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	84%	83%

Experiment 5

Ovčí interferon tau (jednotky)	Sloučenina CU (μM)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0,0	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0
0,9375	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%
1,875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
3,75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
7,5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
15	98%	97%	84%	64%	59%	61%	56%	51%	53%

07.04.03

30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%
60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%
120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%

Experiment 6

Interferon alfa 2B (jednotky)	Sloučenina EC (μM)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0
0,0492	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%
0,1229	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
0,3072	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%
0,768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
1,92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	54%	58%	47%
4,8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
12,0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
30,0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%

Experiment 7

Interferon alfa-2A (jednotky)	Sloučenina EC (μM)								
	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
0	96%	92%	81%	47%	28%	17%	-1%	-8%	0
0,0492	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	10%	- 17%
0,1229	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	22%
0,3072	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
0,768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
1,92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%

07.04.03

4,8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
12,0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
30,0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%

Experiment 8

Interferon beta (jednotky)	Sloučenina CU (μM)								
	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
0	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
0,2344	98%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	-7%	1%
0,4688	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
0,9375	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%	30%
1,875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
3,75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
7,5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
15,0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
30,0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%

Experiment 9

Interferon alfa-2B (jednotky)	Sloučenina EP (μM)								
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0
0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
0,0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	8%	3%
0,1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
0,3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
0,7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
1,92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
4,8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%

07.04.03

12	97%	98%	98%	97%	94%	89%	89%	87%	83%
30	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%

Experiment 10

Interferon alfa-2B (jednotky)	Ribavirin (μM)								
	200	80	32	12,8	5,12	2,048	0,8192	0,3277	0
0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
0,0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
0,1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
0,3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
0,7680	90%	80%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
1,92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	46%
4,8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

Jak je znázorněno na Obr. 4-13, které graficky znázorňují data v Tabulce 8 vypočtené použitím výše popsaného matematického způsobu měření synergie, křivky Isobol pro všechny kombinace testovaných inhibitorů HCV serinových proteáz a interferonů jsou konkávně obrácené vzhůru, což indikuje, že protivirový účinek ošetření v testu Replicon Assay je synergický. Tyto výsledky jsou tabulovány v Tabulce 9, která ukazuje relativní úrovně synergie pro kombinační ošetření a hodnoty IC_{50} protivirové sloučeniny použité individuálně. Klíčový prvek v Tabulce 9 jsou hodnoty α a hodnoty p . Hodnota α je míra maximální inflexe Isobol pro každé kombinační ošetření. Hodnota nula označuje

aditivitu, negativní hodnota označuje antagonismus a, jak je tomu v případě kombinačních ošetření s inhibitory HCV serinových proteáz a interferony, znázorněném výše, hodnota větší než jedna označuje synergii. Čím větší je parametr α , tím větší je synergie. Jak je znázorněno v Tabulce 9 pro kombinace inhibitorů HCV serinových proteáz a interferony, dokonce při ignorování úrovně významnosti v každém experimentu t test založený na 9 experimentech pro střední hodnotu α rovnou 0 (bez interakce) má hodnotu p rovnou 0,00014, což indikuje, že výsledky jsou vysoce významné.

Výpočet synergie, založený na metodě Greco Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diaminedichlorplatinum a 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327, použitý v této analýze, je ideální nástroj pro ohodnocení druhu experimentálních dat, které mohou být generovány použitím testu HCV Replicon Assay. Existují jiné metody, které jsou aplikovány na studium protivirových sloučenin, jako je Pritchard a Shipman (Prichard, M. N., a Shipman, C. Jr., (1990) "A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions (review)", Antiviral Res. 14: 181-206). Aplikace jejich způsobu výpočtu synergie na data uvedená v Tabulce 8 také naznačují, že kombinační ošetření replikonových buněk inhibitorem HCV serinových proteáz a interferonem vede k synergické inhibici akumulace HCV replikonové RNA (data nejsou uvedena).

Tabulka 9

Relativní hodnoty synergie pro kombinační ošetření a hodnoty IC_{50} pro protivirové sloučeniny použité individuálně

	Inhibitor HCV serinové proteázy	Interferon	IC_{50} INF (jednotky)	IC_{50} HSPI (μM)	α (SE) ¹	hodnota P $\alpha > 0$
Experiment 1	Sloučenina CU	IFN alfa- 2B	2,05	0,469	0,477 (0,09)	< 0,0001
Experiment 2	Sloučenina CU	IFN alfa- 2A	3,72	0,446	0,770 (0,12)	< 0,0001
Experiment 3	Sloučenina CU	IFN alfa- 2B	2,36	0,587	0,730 (0,08)	< 0,0001
Experiment 4	Sloučenina CU	IFN alfa- 2A	5,67	0,633	0,438 (0,08)	< 0,0001
Experiment 5	Sloučenina CU	IFN tau	13,22	0,605	0,328 (0,07)	< 0,0001
Experiment 6	Sloučenina EC	IFN alfa- 2B	2,53	0,384	0,516 (0,10)	< 0,0001
Experiment 7	Sloučenina EC	IFN alfa- 2A	5,50	0,312	1,24 (0,20)	< 0,0001
Experiment 8	Sloučenina CU	IFN beta	1,82	0,466	0,551 (0,09)	< 0,0001
Experiment 9	Sloučenina EP	IFN alfa- 2B	3,06	0,426	0,490 (0,12)	< 0,0001
Experiment 10	Ribavirin	IFN alfa- 2B	1,22	145	-0,24 (0,067)	0,0004

¹(SE) Standardní odchylka

Další míra zhodnocení synergické povahy léčení látkami proti HCV použitím inhibitorů HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu a interferonů je použití stejné metody jaká byla popsána pro zhodnocení dosavadní

standardní kombinační terapie pro HCV, to znamená interferon alfa-2B v kombinaci s Ribavirinem, v testu Replicon Assay. Poslední řádka Tabulky 9 ukazuje, že parametr α pro směs interferonu alfa-2B a Ribavirin je záporné číslo, což ukazuje, že je malý antagonismus mezi těmito dvěma látkami. To dále zdůrazňuje význam kombinačních ošetření zde popsanych, používajících inhibitory HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu v kombinaci s interferony, spočívající v tom, že toto léčení jasně produkuje synergii, zatímco standardní kombinační terapie pro HCV (interferon alfa-2B v kombinaci s Ribavirinem) není synergický v testu Replicon Assay.

Výše uvedené srovnání kombinačních ošetření, používajících inhibitory HCV serinových proteáz plus interferony oproti ošetření Ribavirinem plus interferonem v testu Replicon Assay jasně ukazuje, že první z nich je synergické, zatímco druhé není. Experimentální výsledky, získané použitím testu Replicon Assay ukazují, že mnohem nižší dávka interferonu může být účinná, pokud interferon je použit v kombinaci s inhibitorem HCV serinových proteáz, než je nutné, pokud je interferon alfa-2B použit v kombinaci s Ribavirinem. Test Replicon Assay je užitečný modelový systém testování potenciálních sloučenin proti HCV a v současné době se na něj spoléhá jako na účinný prostředek predikce účinnosti sloučenin proti HCV. Viz například Blight a kol. (2000) Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture, Science 8; 290: 1972-1974, a Chung a kol. (2001) Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN-

α in a full-length binary expression system. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 98 (17): 9847-52. Ribavirin samotný je jen okrajově účinný pro snižování akumulace HCV replikonové RNA v testu Replicon Assay (Tabulka 8, Experiment 10 a poslední řádka Tabulky 9). Tento výsledek je ve zjevném konfliktu s *in vivo* studiemi, kde pokud je používán samotný, Ribavirin nemá významnou terapeutickou hodnotu pro léčení HCV. Na rozdíl od toho v testu Replicon Assay, po korekci cytotoxicity jak je uvedeno dále, má Ribavirin IC_{50} rovné 145 μM . Tento výsledek může být vysvětlen tím, že test Replicon Assay dovoluje hodnocení vysokých koncentrací Ribavirinu, které by nebylo možné použít u člověka v důsledku *in vivo* cytotoxicity (Chutaputti A. (2000) Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 15 Suppl: E156-63).

Toto hodnocení nutně vyžaduje zhodnocení cytotoxicity Ribavirinu. K takové toxicitě dochází u pacienta a v buněčných testech (Shiffman M. L., Verbeke S. B., Kimball P. M. (2000) Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes. Antiviral Research. 48 (2): 91-9). V experimentech zde popsanych byla cytotoxicita Ribavirinu v testu Replicon Assay pozorována a změřena ve dvou směrech. Jak v XTT metabolickém testu pro určení životaschopnosti replikonových buněk (Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991) An improved colorimetric

07.04.03

test for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Journal of Immunol. Methods. 142 (2): 257-65) a v TaqMan® kvantitativním RT-PCR testu, který měří glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázové (GAPDH) hodnoty mRNA u ošetřených versus ne ošetřených buněk v testu Replicon Assay (Brink N., Szamel M., Young A. R., Wittern K. P., Bergemann J. (2000) Comparative quantification of IL-1 beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. Inflammation Research. 49 (6): 290-6), byla pozorována významná Ribavirinem indukovaná cytotoxicita, ale byla korigována následujícím způsobem. Předpokládá se, že úroveň GAPDH mRNA, která je konstitučně exprimována hlavním genem, je stejná ve všech životaschopných buňkách. Je známo z měření hodnot GAPDH mRNA v buňkách ošetřených inhibitorem transkripce aktinomycinem D, že poločas života GAPDH mRNA je pouze několik hodin (data neznázorněna). Proto se postuluje, jak to bylo provedeno jinými výzkumníky používajícími technologii TaqMan® pro určení úrovně konkrétních mRNAs v lidských buňkách, že úroveň GAPDH mRNA jsou přímo úměrné počtům životaschopných buněk (životaschopný cell numbers - VCN) v libovolném daném vzorku, se vztahem $VCN = 2^{(40 - Ct_{GAPDH \text{ mRNA}})}$. VCN se vypočte pro každou jamku se vzorem v testu Replicon Assay a potom se vydělí počet kopií HCV replikonové RNA pro specifickou jamku hodnotou VCN pro tuto jamku. Jak je vypočten, použije se tento poměr namísto počtu kopií HCV pro výpočet inhibice ("Stř. Inh použitím poměru"; Obr 14.A). Bez korekce dat testu Replicon Assay na tuto cytotoxicitu se taková cytotoxicita projevuje jako falešná pozitivní inhibice akumulace HCV replikonové RNA.

V testu Replicon Assay se předpokládá, že změřená inhibice akumulace HCV replikonové RNA je součet skutečné inhibice akumulace HCV replikonové RNA a zjevné inhibice akumulace HCV replikonové RNA v důsledku cytotoxicity. Dále se předpokládá, v důsledku úzké korelace XTT a TaqMan® GAPDH mRNA měr cytotoxicity, že inhibice akumulace GAPDH mRNA způsobená sloučeninami testovanými v testu Replicon Assay je spolehlivou mírou zjevné inhibice akumulace HCV replikonové RNA v důsledku cytotoxicity. Skutečný účinek sloučeniny proti HCV v testu Replicon Assay, korigovaný na obecnou cytotoxicitu, může být odhadnut dělením počtu HCV replikonových RNA molekul, změřených v každém vzorku hodnotou VCN, což normalizuje počet životaschopných buněk v každém vzorku. Použitím tohoto způsobu Obr. 14.A ukazuje odhad skutečného účinku Ribavirinu proti HCV v testu Replikon Test ("Stř. Inh použitím poměru"). Odhad IC_{50} pro Ribavirin se nejlépe vypočte použitím tohoto způsobu. Na Obr. 14.A "Stř. Inh orig." ukazuje nekorigovanou IC_{50} pro Ribavirin, která je přibližně $80 \mu M$, zatímco korigovaná hodnota IC_{50} vypočtená z křivky "Stř. Inh použitím poměru" je přibližně $145 \mu M$. Je dobré si povšimnout, že rozdíl mezi korigovanou a změřenou inhibicí akumulace HCV replikonové RNA jako výsledku ošetření interferonem alfa-2B (Obr. 14.B) je nevýznamný vzhledem k $\sim 20\%$ CV v testu Replicon Assay. Stejně jako interferon alfa-2B, inhibitory HCV serinových proteáz testované v uváděném příkladu nevykazují významnou cytotoxicitu v použitých koncentracích. To se určí použitím XTT testů, ve kterých hodnoty TC_{50} pro různé sloučeniny jsou: CU= $64,7 \mu M$, EP > $10 \mu M$ a EC > $50 \mu M$. Tyto hodnoty

TC₅₀ jsou 20-140-krát větší než IC₅₀ hodnoty ukázané v Tabulce 9. Cytotoxicita těchto sloučenin tedy nemá žádný významný účinek na akumulaci HCV RNA v testu Replicon Assay v rámci přesnosti testu, protože taková cytotoxicita nastává pouze u koncentrací inhibitoru HCV serinových proteáz, které jsou významně vyšší než byly testovány v Replicon Assay.

Závěry týkající se účinnosti inhibitorů HCV serinových proteáz a interferonů, individuálně a v kombinaci

Účinek proti HCV u inhibitorů HCV serinových proteáz podle vynálezu a různých interferon, pokud jsou používány samotné v HCV Replicon Assay jsou ukázány v sloupcích a řádcích jednotlivých testů, uvedených v Tabulce 8, která používá pouze jediné protivirové činidlo. Tabulka 9 udává hodnoty IC₅₀ změřené pro každou protivirovou sloučeninu, pokud je testována samotná. Výše uvedené výsledky, získané z *in vitro* Replicon Assay, také ukazují, že kombinační ošetření replikonových buněk inhibitory HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu a různými interferony dává synergické protivirové účinky. Plně se očekává, že tyto účinky se přenesou i do účinnosti *in vivo*.

Kombinační terapie používající inhibitory HCV serinových proteáz podle předloženého vynálezu má několik velkých výhod proti terapii za použití jednoho léku. Předně tím, že umožňuje léčbu pomocí nižších dávek jednotlivých léků, než kdyby byly použity samostatně, lze očekávat snížení toxicity a vedlejších účinků souvisejících s léčením. To je

obzvláště důležité v případě interferonové terapie, kde vedlejší účinky jsou závažné a bylo ukázáno, že jsou úměrné dávkám podávaným pacientům. Výše uvedená data indikují, že dávka inhibitoru HCV serinových proteáz jako je sloučenina CU v množství odpovídajícím IC_{95} může být zkombinována s dávkou interferonu alfa, například v množství odpovídajícím IC_{50} a výsledkem bude daleko účinnější terapie, než kterou by bylo možné dosáhnout inhibitorem HCV serinových proteáz samotným bez nepříznivých vedlejších účinků, způsobovaných vysokými dávkami interferonu alfa. Druhý významný příznivý účinek kombinační terapie je, že jelikož oba léky působí nezávisle, je menší pravděpodobnost vývinu mutovaných kmenů HCV, které léčbě odolávají. Vývin rezistence je hlavní problém u RNA virů jako je HCV. Vzhledem k velkému množství mutací se mohou tyto viry rychle adaptovat na stres způsobovaný okolním prostředím. Třetí výhodou kombinační terapie může být snížená cena v důsledku potřeby menšího množství terapeutických činidel potřebných pro účinnou léčbu.

Ve způsobech zde popisovaných mohou být použity další imunomodulátory, například, alfa interferon 2A, konsenzuální interferon, interferon tau, interferon + Ribavirin (Rebatron), pegylovaný interferon a promotory exprese genu interferonu. Plně se předpokládá, že účinek těchto sloučenin proti HCV bude zlepšen, pokud budou použity v kombinaci s inhibitory HCV serinových proteáz jaké jsou zde popsány. Jelikož interferony jsou známy svým účinkem *in vivo* a v testu Replicon Assay, očekává se, že popsané inhibitory HCV serinových proteáz budou také účinné

07.04.03

in vivo a že budou schopny vyvolat synergický účinek, pokud budou použity v kombinaci s interferony, jejich stimulatory imunitního systému nebo dalšími sloučeninami, které mají protivirový účinek proti HCV a působí jiným mechanismem než je inhibice HCV serinových proteáz.

Nejlepší současná terapie HCV používá interferon alfa a nukleosidový analog Ribavirin. Toto léčení je pouze okrajově účinné a vede k významným vedlejším účinkům, které snižují pacientovu kompliance (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Kromě toho u pacientů s transplantacemi není jasné, zda kombinace Ribavirin-interferon účinkuje a může být ve skutečnosti horší než samotný interferon (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999).

Výše uvedené výsledky demonstrují synergický kombinační účinek, pokud jsou interferony použity s novou třídou sloučenin proti viru HCV, inhibitory serinových proteáz podle předloženého vynálezu. Plně se očekává, že *in vitro* výsledky zde uvedené povedou k účinnějšímu léčení HCV pacientů, než je v současné době možné použitím samotného interferonu. Subterapeutické dávky interferon mohou mobilizovat pacientův imunitní systém pro lepší boj s virem a inhibitor serinových proteáz může atakovat virus přímo, takže na virus se působí dvěma různými mechanismy působení. Tato léčba HCV infekce může být dosažena s nižší cenou pro pacient jak ve smyslu snížených vedlejších účinků, tak i

07.04.03

nižší platby za nutná farmaceutická činidla, neboť pro účinnou léčbu HCV bude třeba méně obou léků.

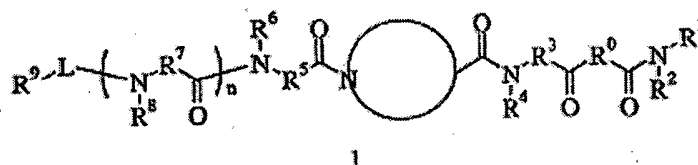
Předložený vynález může být prováděn jinými specifickými způsoby, aniž by došlo k odchýlení se od ducha vynálezu nebo jeho podstatných znaků.

Zastupuje:

Dr. O. Švorčík

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina obecného vzorce 1



ve kterém

R^0 je vazba nebo difluormethylen;

R^1 je atom vodíku, popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^2 a R^9 jsou každý nezávisle popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^3 , R^5 a R^7 jsou každý nezávisle;

popřípadě substituovaný (1,1- nebo 1,2-) cykloalkylen; nebo popřípadě substituovaný (1,1- nebo 1,2-)heterocyklylen; nebo

methylen nebo ethylen, substituovaný jedním substituentem zvoleným ze souboru, zahrnujícího popřípadě substituovanou alifatickou skupinu, popřípadě substituovanou cyklickou skupinu nebo popřípadě substituovanou aromatickou skupinu a kde methylen nebo ethylen je dále popřípadě substituován alifatickým substituentem; nebo

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou každý nezávisle je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;



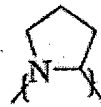
je substituovaný monocyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl, ve kterém nenasycenost je v kruhu vzdáleném od kruhu nesoucího skupinu $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ a ke kterému je skupina $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$ vázána;

L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$, nebo $-NR^1S(O)_2-$;

a

n je 0 nebo 1,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru,



s podmínkou, že pokud je substituovaný , potom L je $-OC(O)-$ a R^9 je popřípadě substituovaný alifatický substituent; nebo alespoň jeden z R^3 , R^5 a R^7 je ethylen, substituovaný jedním substituentem zvoleným ze souboru, zahrnujícího popřípadě substituovanou alifatickou skupinu, popřípadě substituovanou cyklickou skupinu nebo popřípadě substituovanou aromatickou skupinu a kde ethylen je dále popřípadě substituovaný alifatickým substituentem; nebo R^4 je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde R^0 je vazba.

3. Sloučenina podle nároku 1 nebo 2 kde:

popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkynyl, popřípadě substituované jedním nebo více substituenty alifatické skupiny;

popřípadě substituované cyklické skupiny jsou skupiny cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl, popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované aromatické skupiny jsou arylové nebo heteroarylové skupiny popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované (1,1- nebo 1,2-)cykloalkylenové skupiny jsou (1,1- nebo 1,2)cykloalkylenové skupiny popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované (1,1- nebo 1,2)heterocyklylenové skupiny jsou (1,1- nebo 1,2)heterocyklylenové skupiny popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;



jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je monocyklická azaheterocyklylová skupina, substituovaná přímo nebo přes vazebný člen alespoň jedním substituentem zvoleným ze souboru, zahrnujícího skupiny aryl, heteroaryl, aryloxy, heteroaryloxy, aroyl nebo jeho thio analog, heteroaryl nebo jeho thioxo analog, aroyloxy, heteroaroyloxy, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl,

arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, arylthio, heteroarylthio, aryldiazo, heteroaryldiazo, Y^1Y^2N $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde alespoň jeden ze substituentů Y^1 a Y^2 je aryl nebo heteroaryl, kde uvedená vazebná skupina je zvolena ze souboru, zahrnujícího $-C(O)-$, $-OC(O)-$, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkenyl, $-O-$, $-S-$, $-C(O)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NR^{80}-$, kde R^{80} je atom vodíku, skupiny alkyl, cykloalkyl, aryl, aralkyl, heterocyklyl nebo heteroaryl;

popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl je multicyklická azaheterocyklylová skupina popřípadě substituovaná jedním nebo více substituenty skupiny kruhů; popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl je multicyklická azaheterocyklenylová skupina popřípadě substituovaná jedním nebo více substituenty skupiny kruhů; kde

substituenty alifatických skupin jsou skupiny aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl,

aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$, nebo $Y^3SO_2NY^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku, ke kterému jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl; substituenty skupiny kruhů znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), kyselý bioster, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol,

Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl, nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, "substituenty skupiny kruhů" dále zahrnují skupiny methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$);

aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomy uhlíku;

cykloalkyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku;

cykloalkenyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku, který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík;

cyklyl znamená cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl;

heterocyklyl znamená nearomatický nasycený monocyklický nebo multicyklický systém kruhů od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatom jiný než uhlík;

heterocyklenyl znamená nearomatický monocyklický nebo multicyklický uhlovodíkový systém kruhů obsahující od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden

nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatomy jiné než uhlík a který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík nebo dvojnou vazbu uhlík-dusík; a

heteroaryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů obsahující od přibližně 5 do přibližně 14 atomů uhlíku, kde jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatomy jiné než uhlík.

4. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, kde R^0 je difluormethylen.

5. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, kde R^1 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

6. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, kde R^1 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

7. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, kde R^1 je atom vodíku.

8. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, kde R^2 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina nebo popřípadě substituovaná monocyklická skupina.

9. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, kde R^2 je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný nižší alkenyl nebo popřípadě substituovaný monocyklický cykloalkyl.

10. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, kde R^2 je karboxymethyl, 1-karboxy-2-fenylethyl, cyklopropyl, cyklobutyl, 1-cyklohexylethyl, 1-fenylethyl, but-2-yl, 1-pyrid-4-ylethyl, propen-3-yl nebo 3-methylbut-2-yl.

11. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, kde R^3 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen.

12. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 11, kde R^3 je popřípadě atomem halogenu substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl)methylen.

13. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, kde R^3 je propylmethylen, 2,2-difluorethylmethylen, 2,2,2-trifluormethylen nebo propen-3-ylmethylen.

14. Sloučenina podle nároku 13, kde R^3 je propylmethylen nebo 2,2-difluorethylmethylen.

15. Sloučenina podle nároku 14, kde R^3 je propylmethylen.

16. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 15, kde R^4 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

17. Sloučenina podle nároku 16, kde R^4 je atom vodíku.

07.04.03

18. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 17, kde R^5 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen.

19. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 18, kde R^5 je popřípadě (fenyl, karboxy, karboxamido nebo alkoxykarbonyl) substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl) methylen.

20. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 19, kde R^5 je methylmethylen, isopropylmethylen, terc.-butylmethylen, but-2-ylmethylen, butylmethylen, benzylmethylen, 3-methylbutylmethylen, 2-methylpropylmethylen, karboxymethylmethylen, karboxamidomethylmethylen, benzyloxykarbonylmethylmethylen, benzyloxykarbonylpropylmethylen nebo fenylpropen-3-ylmethylen.

21. Sloučenina podle nároku 20, kde R^5 je isopropylmethylen nebo terc.-butylmethylen.

22. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 21, kde R^6 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

23. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 22, kde R^6 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

24. Sloučenina podle nároku 23, kde R^6 je atom vodíku.

25. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 24, kde R^7 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methylen, popřípadě substituovaná nižší cyklická skupina methylen nebo popřípadě substituovaný monocyklický (aryl nebo heteroaryl) methylen.

26. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 25, kde R^7 je popřípadě substituovaný nižší alkylmethylen, popřípadě substituovaný nižší cykloalkylmethylen nebo popřípadě substituovaný fenylmethylen.

27. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 26, kde R^7 je methylmethylen, isopropylmethylen, n-propylmethylen, fenylmethylen, cyklohexylmethylen, cyklopentylmethylen, terc.-butylmethylen, s-butylmethylen, cyklohexylmethylmethylen nebo fenylmethylmethylen.

28. Sloučenina podle nároku 27, kde R^7 je isopropylmethylen, cyklohexylmethylen, cyklopentylmethylen, terc.-butylmethylen nebo s-butylmethylen.

29. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 28, kde každý z R^3 , R^5 , a R^7 je monosubstituovaný methylen.

30. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 29, kde R^3 je monosubstituovaný methylen a má (S) konfiguraci na atomu uhlíku, vázaném ke skupině $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$.

31. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 30, kde R^8 je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

32. Sloučenina podle nároku 31, kde R^8 je atom vodíku nebo nižší alkyl.

33. Sloučenina podle nároku 32, kde R^8 je atom vodíku.

34. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina nebo popřípadě substituovaná monocyklická aromatická skupina.

35. Sloučenina podle nároku 34, kde R^9 je popřípadě substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě substituovaný monocyklický heteroaryl.

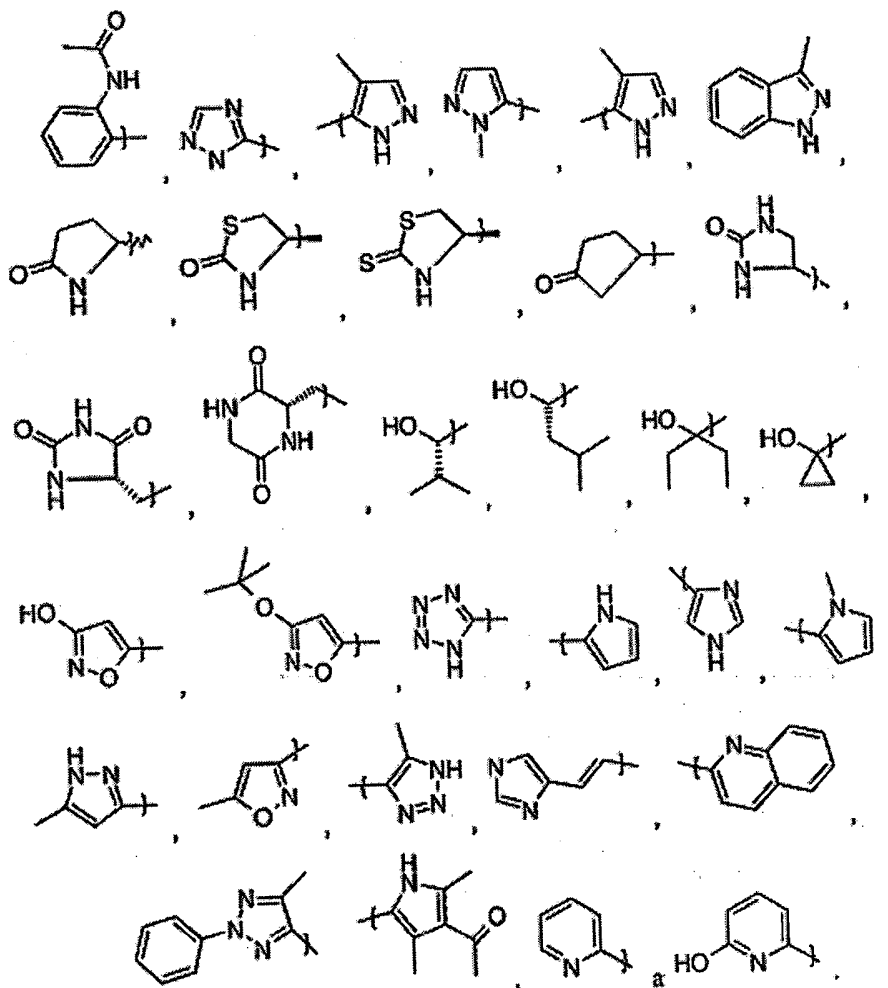
36. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 34, kde R^9 je popřípadě (karboxy, (nižší alkyl) SO_2NH- , (nižší alkyl) $HNCO-$, hydroxy, fenyl, heteroaryl nebo (nižší alkyl) $OC(O)_nH-$)-substituovaný nižší alkyl, nebo popřípadě substituovaný monocyklický heteroaryl.

37. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je nižší alkyl substituovaný skupinou (mono- nebo di-) $MeOC(O)NH-$.

38. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je (karboxy, (nižší alkyl) $HNCO-$ nebo tetrazolyl) substituovaný nižší alkyl.

07.04.03

39. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je 3-karboxypropyl, 2-tetrazol-5-ylpropyl, 3-(N-methylkarboxamido)propyl nebo 3-karboxy-2,2-dimethylpropyl.
40. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je 3-karboxypropyl, 2-tetrazol-5-ylpropyl nebo 3-(N-methylkarboxamido)propyl.
41. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je popřípadě substituovaný nižší alkyl.
42. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je 1-hydroxy-2-fenylethyl, isopropyl nebo terc.-butyl.
43. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je isopropyl nebo terc.-butyl.
44. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je zvolen ze souboru, zahrnujícího skupiny



45. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 33, kde R^9 je pyrazinyl.

46. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 45, kde R^{10} je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina.

47. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 46, kde R^{10} je atom vodíku nebo nižší alkyl.

48. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 47, kde R^{10} je atom vodíku.

49. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde

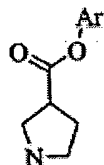


jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je substituovaný pyrrolidinyl.

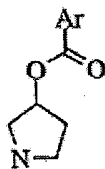
50. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je



popřípadě substituovaný nebo popřípadě substituovaný

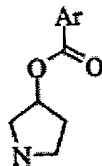


, kde Ar je R^2 , který obsahuje aromatickou skupinu.

51. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde

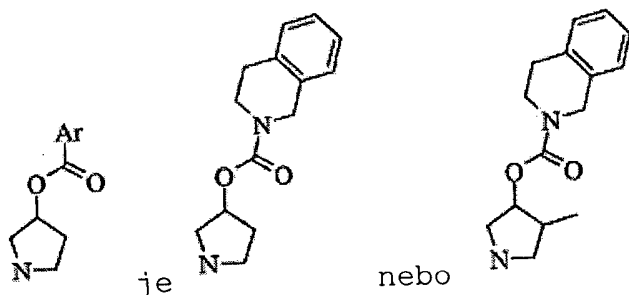


jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je



popřípadě substituovaný .

52. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



53. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný



54. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný



55. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako popřípadě substituovaný multicyklický

azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný



56. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako popřípadě substituovaný multicyklický

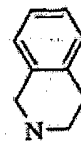


azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný .

57. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 48, kde



jako popřípadě substituovaný multicyklický



azaheterocyklyl je popřípadě substituovaný .

58. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 57, kde



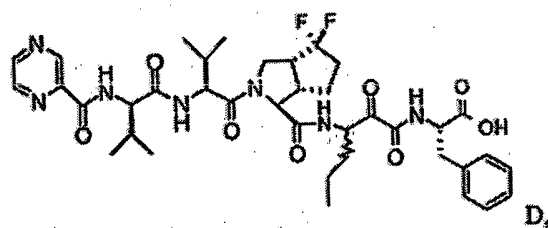
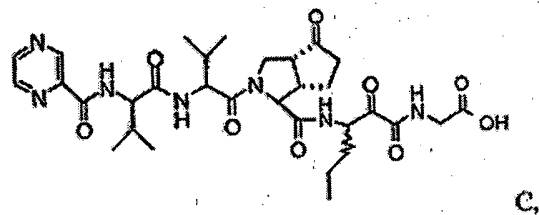
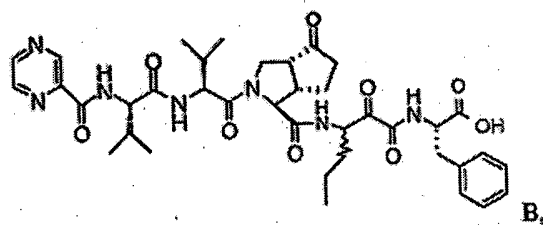
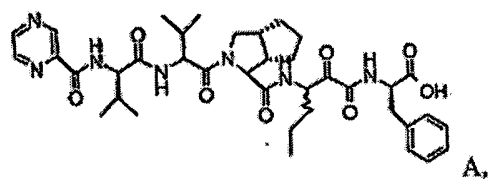
skupina $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)NR^2R^1$ vázaná k je
vázána uhlíkem α k atomu dusíku.

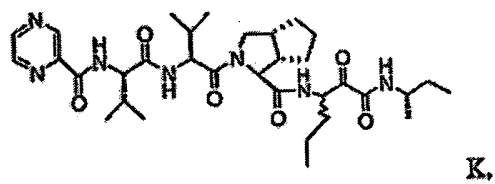
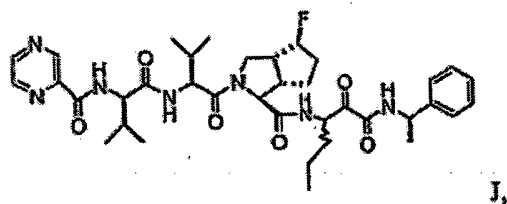
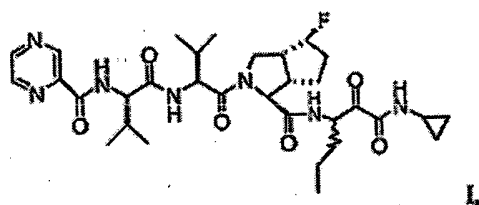
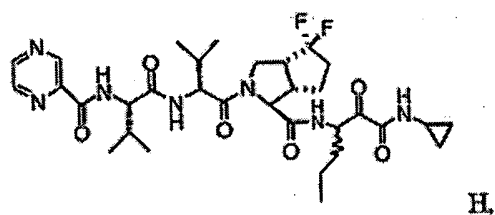
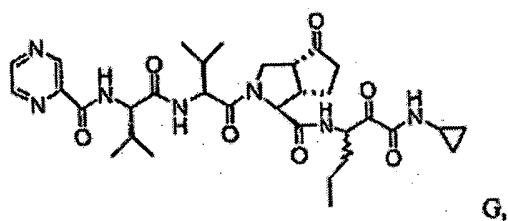
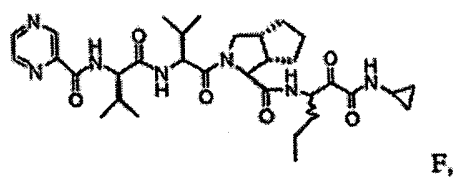
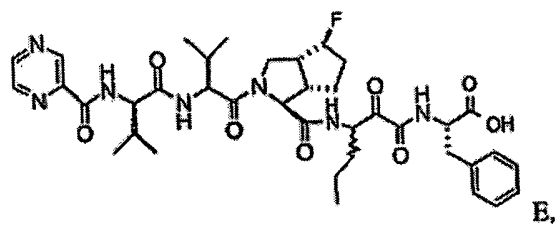
59. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 58, kde L je
 $-C(O)-$ nebo $-OC(O)-$.

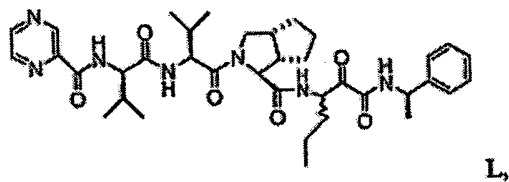
60. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 59, kde n je
0.

61. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 59, kde n je
1.

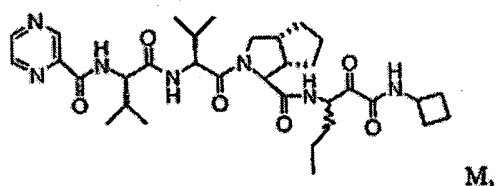
62. Sloučenina podle nároku 1 zvolená ze souboru, zahrnujícího:



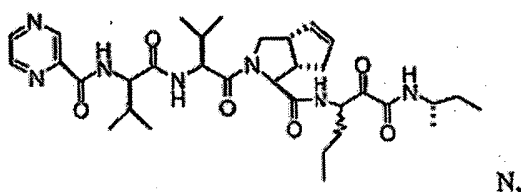




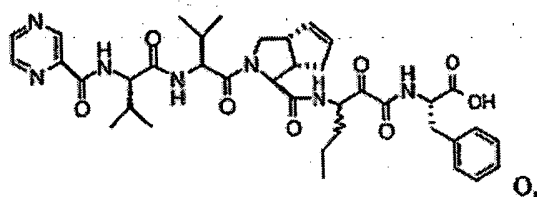
L,



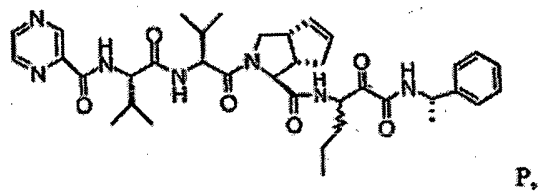
M,



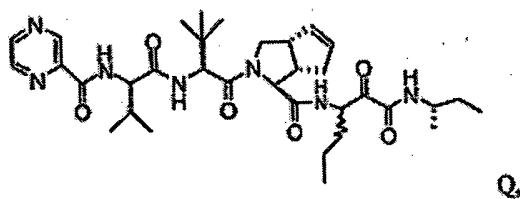
N,



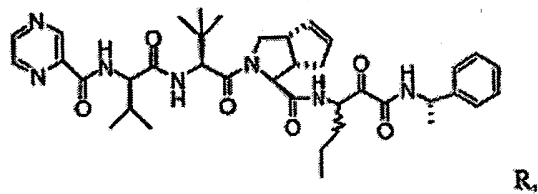
O,



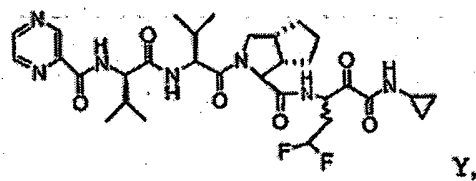
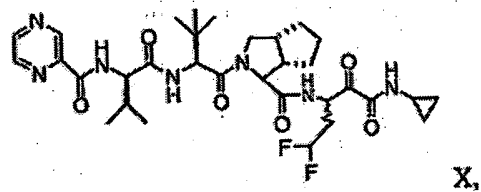
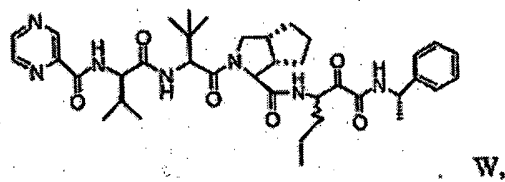
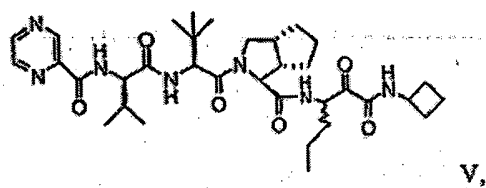
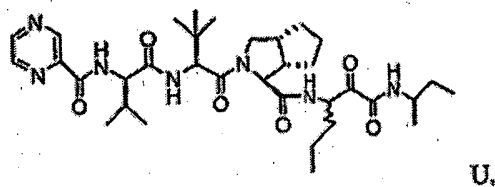
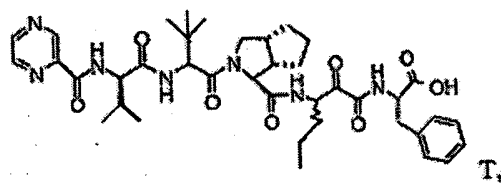
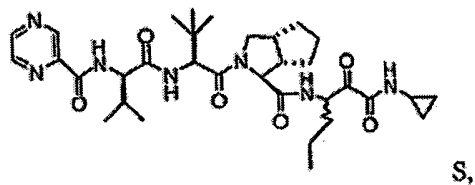
P,

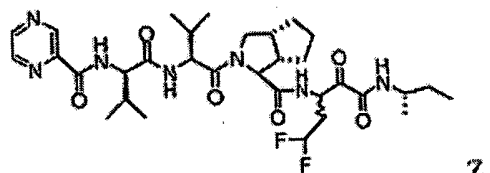


Q,

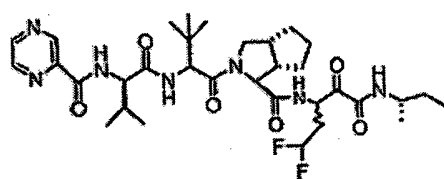


R,

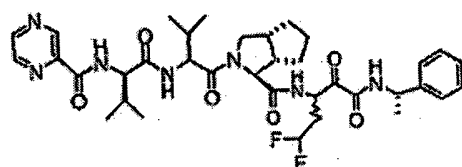




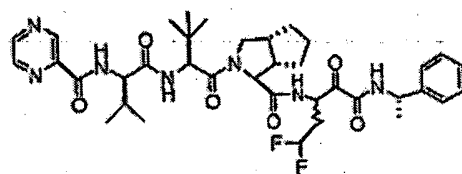
Z,



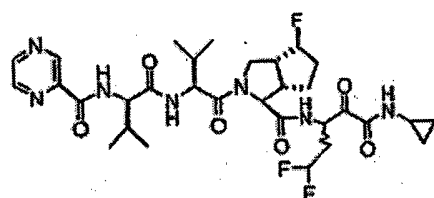
AA,



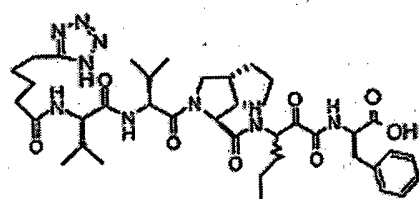
AB,



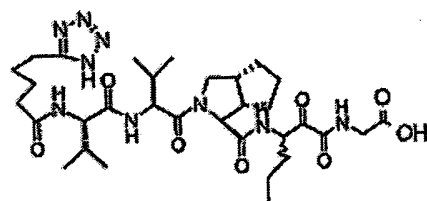
AC,



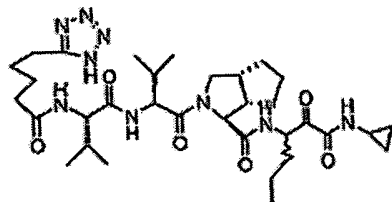
AD,



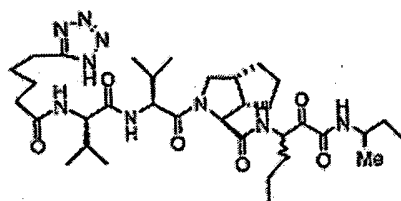
AE,



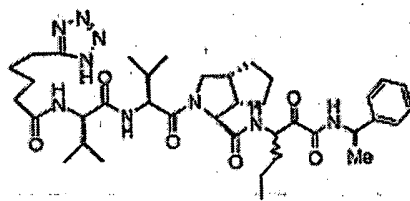
AF,



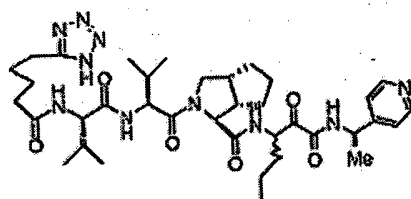
AG,



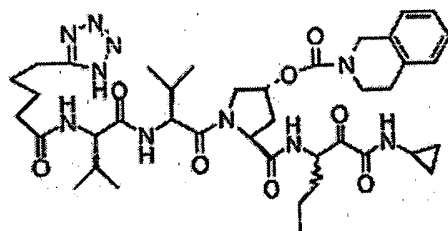
AH,



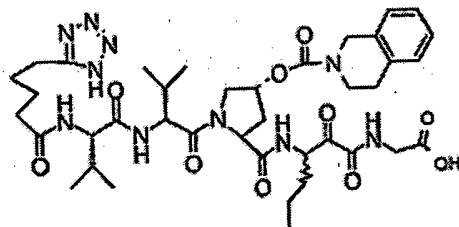
AI,



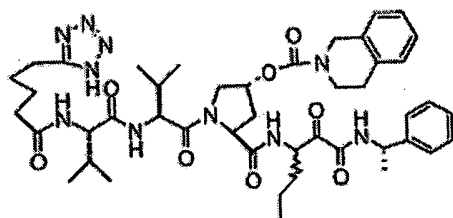
AJ,



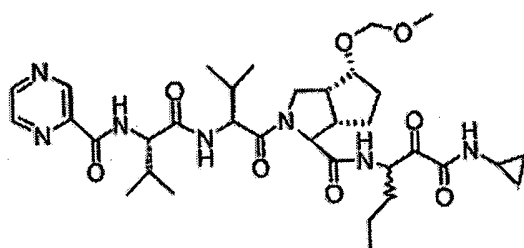
AK,



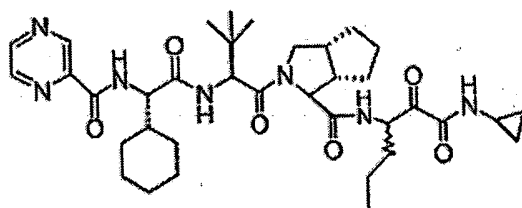
AL,



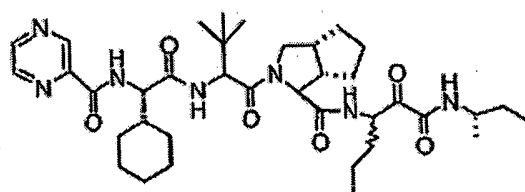
AM,



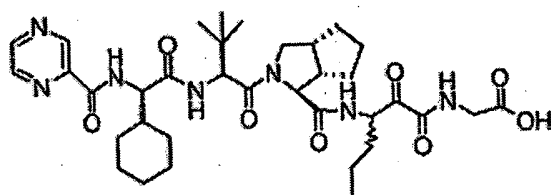
BV,



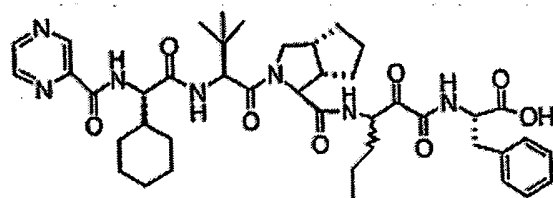
BW,



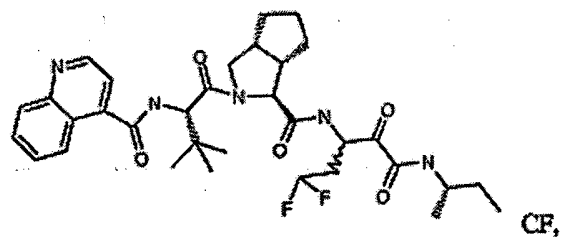
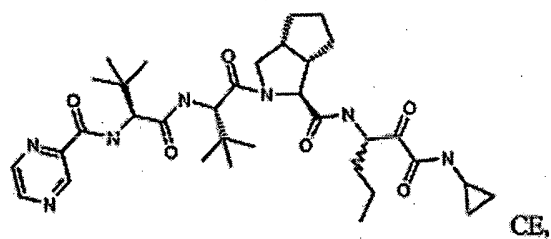
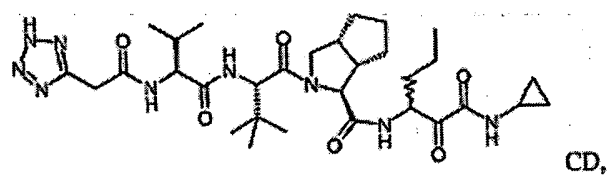
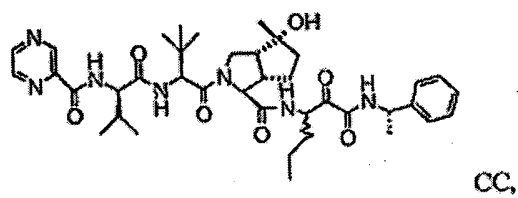
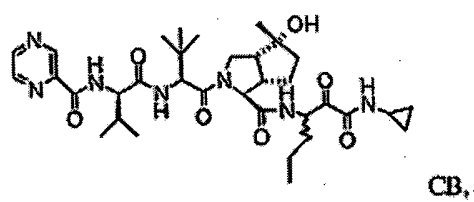
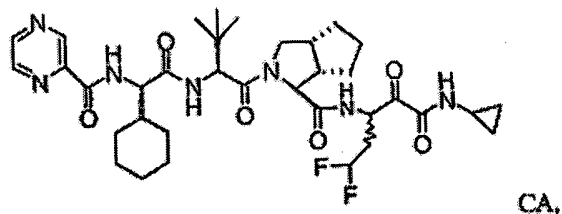
BX,



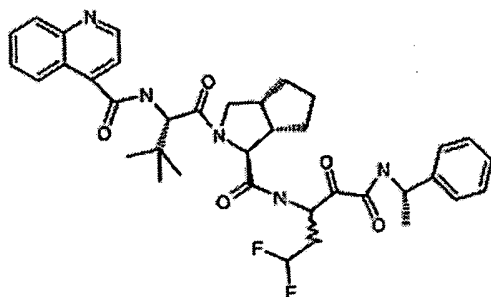
BY,



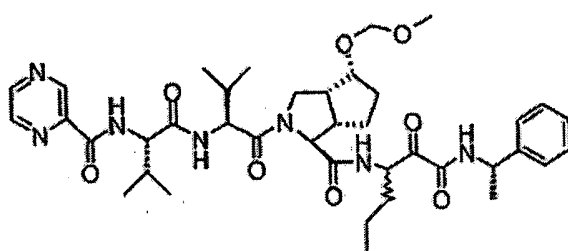
BZ,



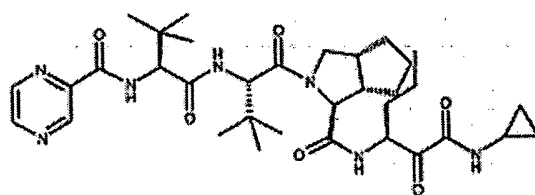
07.04.03



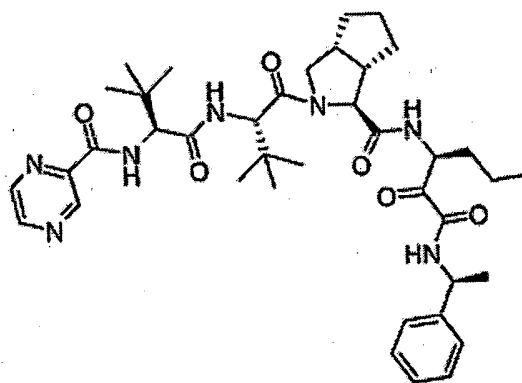
CG,



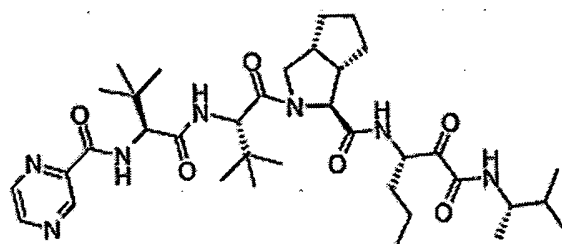
CH,



CI,

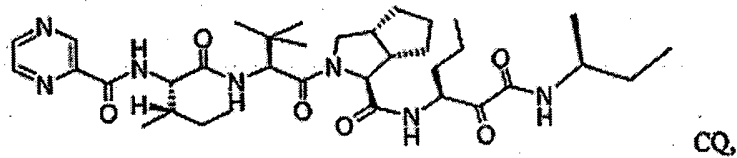
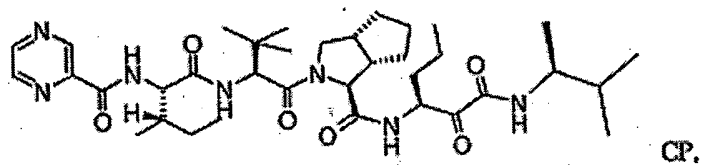
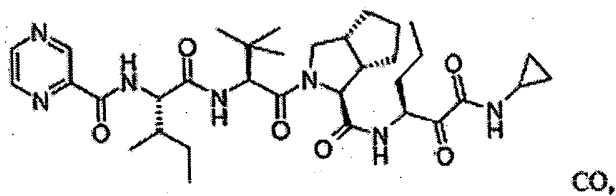
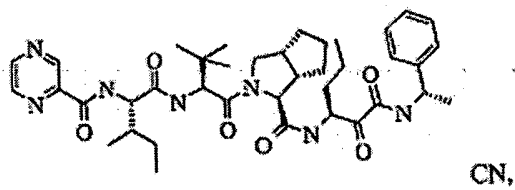
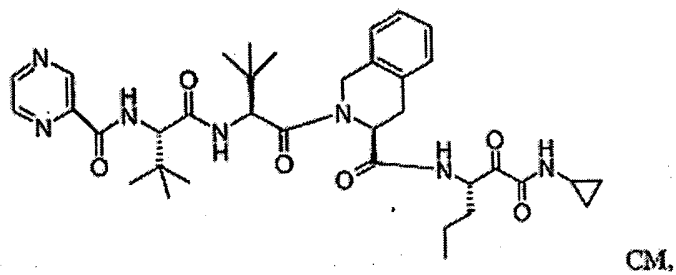
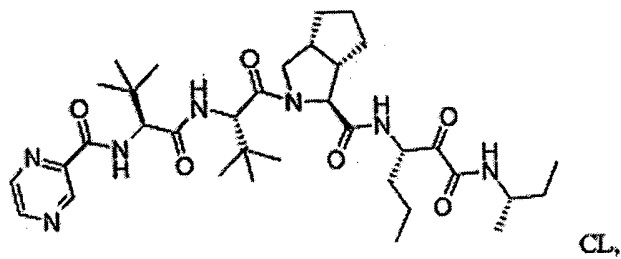


CJ,

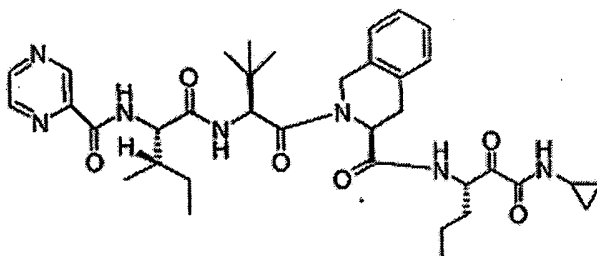


CK,

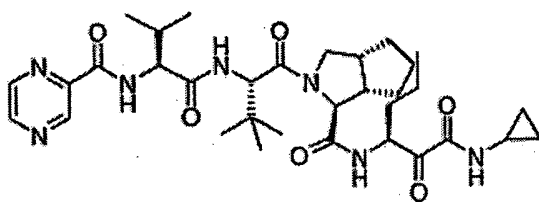
07.04.03



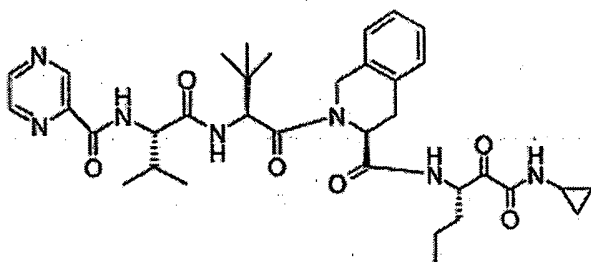
07.04.03



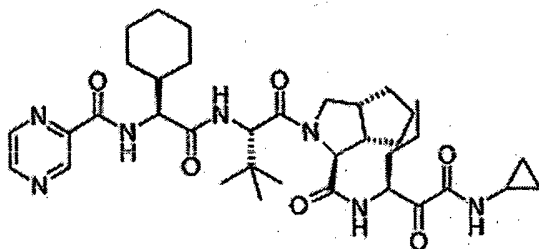
CR,



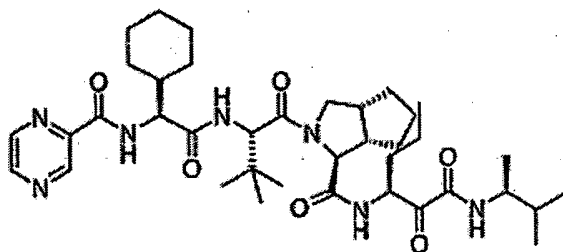
CS,



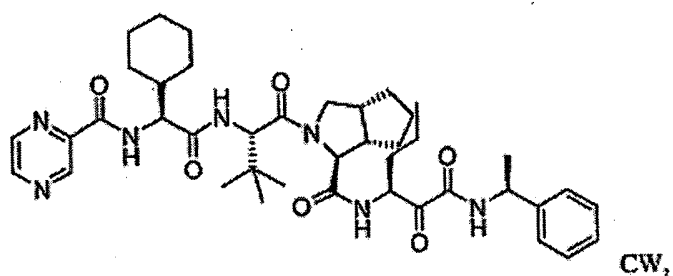
CT,



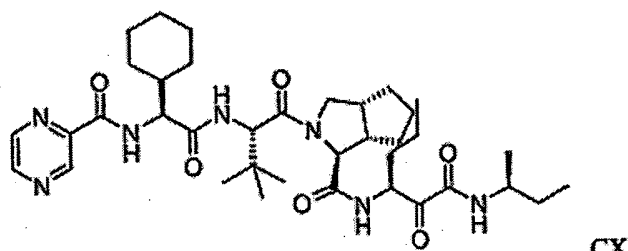
CU,



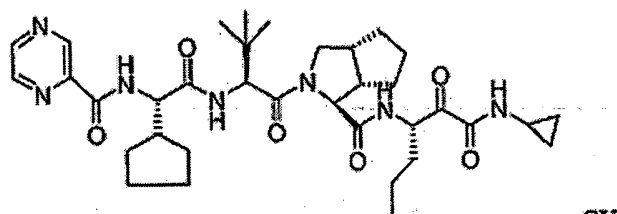
CV,



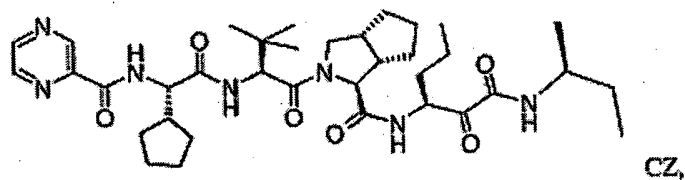
CW,



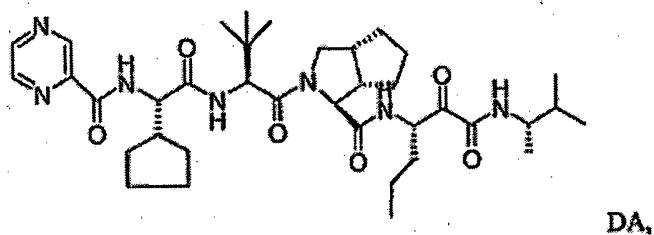
CX



CY

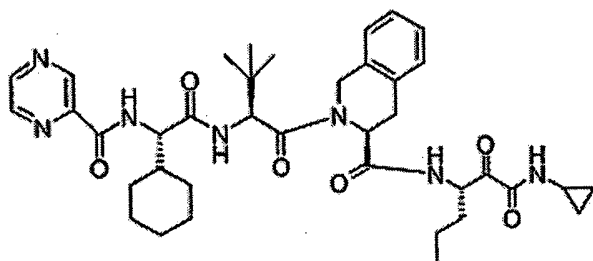


CZ,

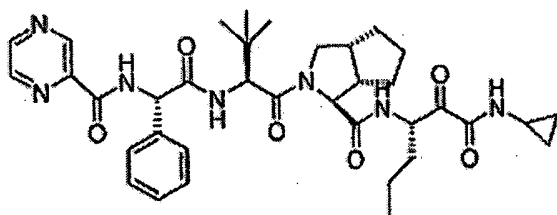


DA,

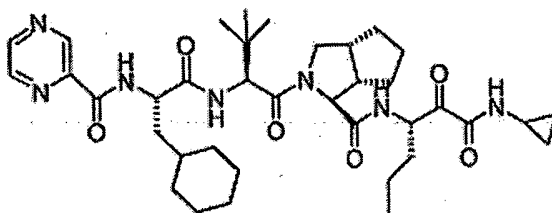
07.04.03



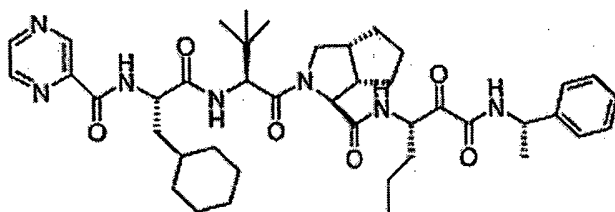
DB,



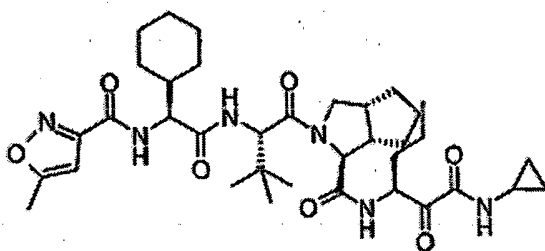
DC,



DD,

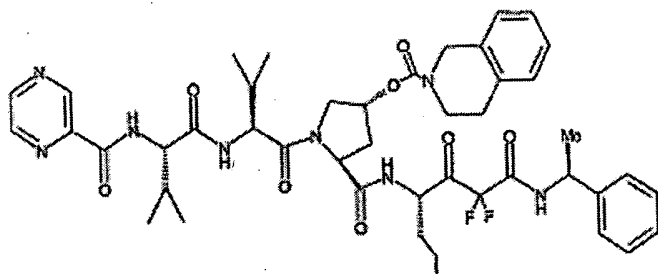


DE,

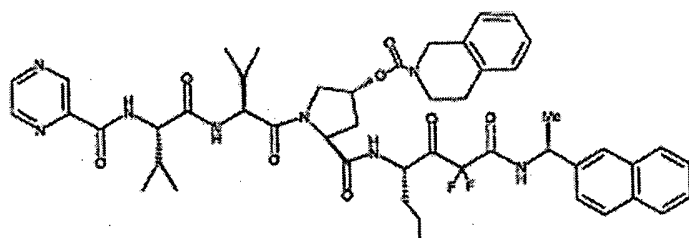


DF,

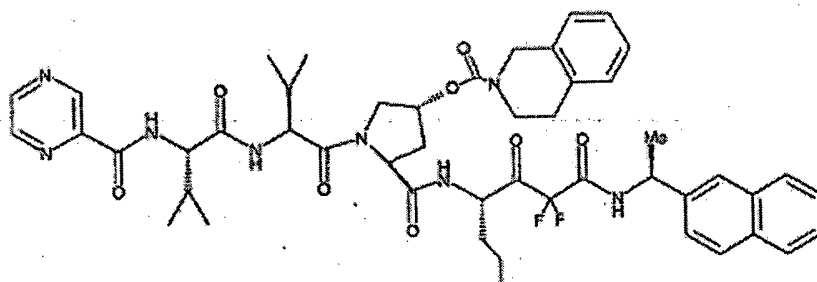
07.04.03



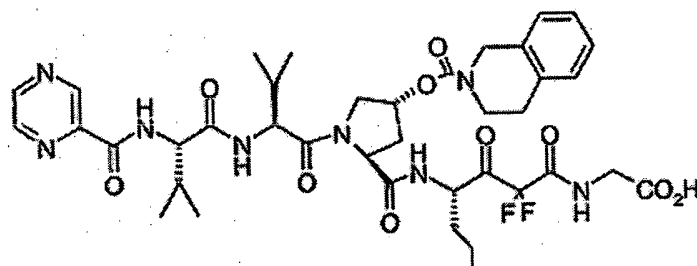
DK,



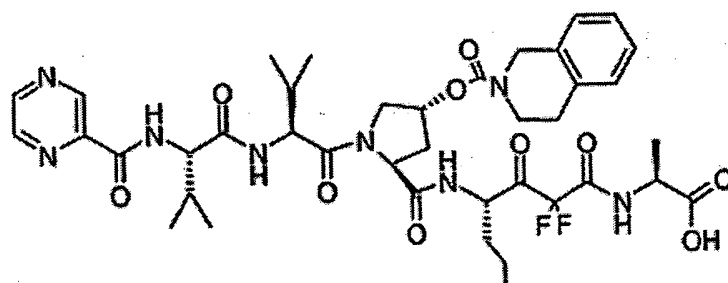
DL,



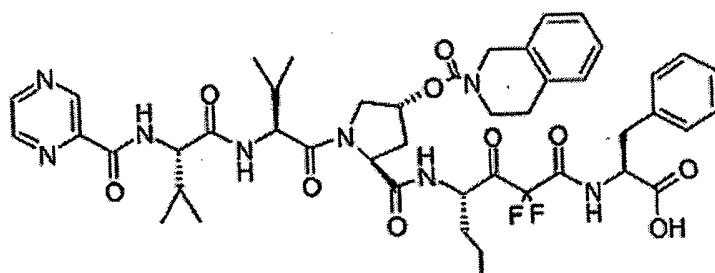
DM,



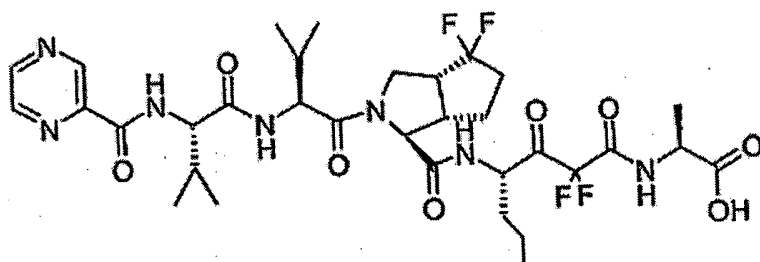
DO,



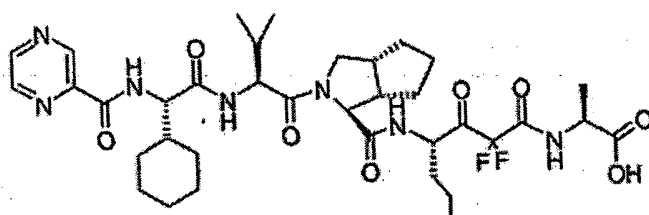
DP,



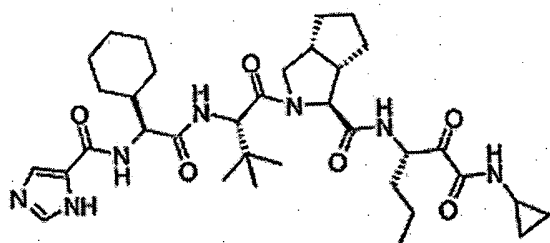
DQ,



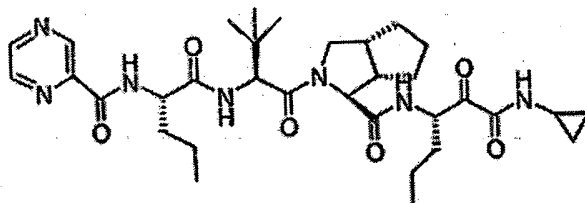
DR,



DS,

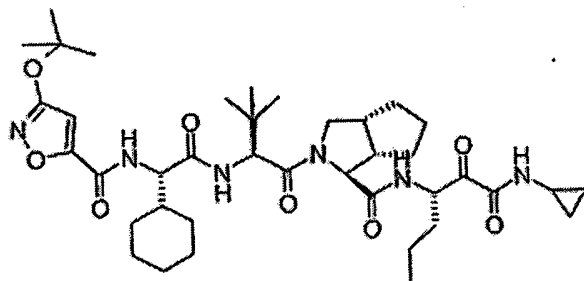


DT,

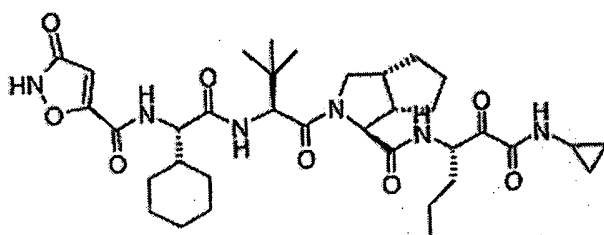


DU,

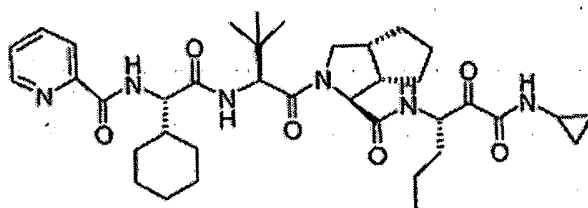
07.04.03



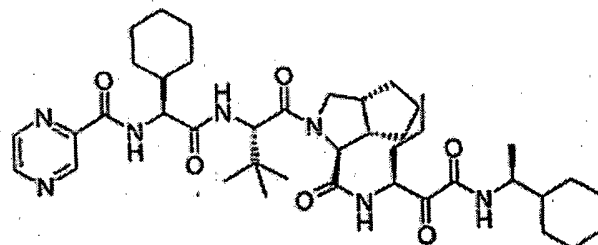
DV,



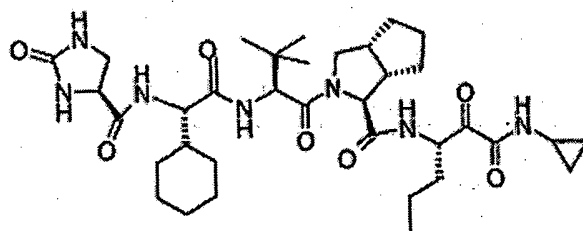
DW,



DX,

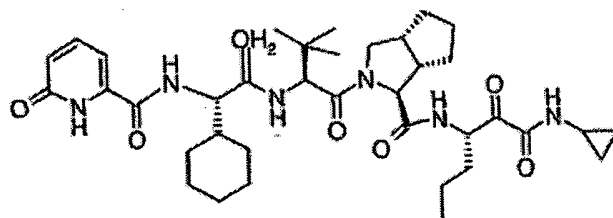


DY,

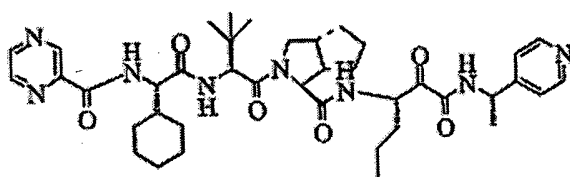


DZ,

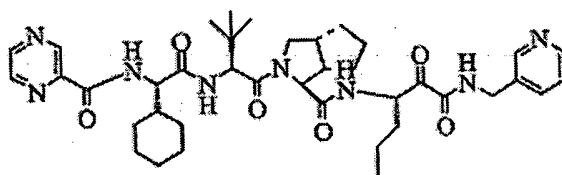
07.04.03



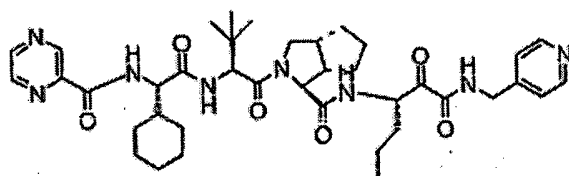
EA,



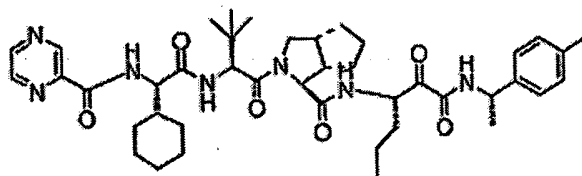
EJ,



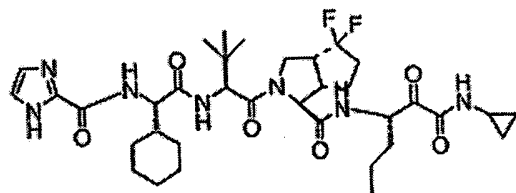
EK,



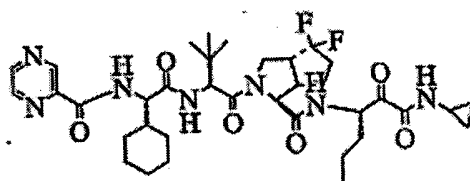
EL,



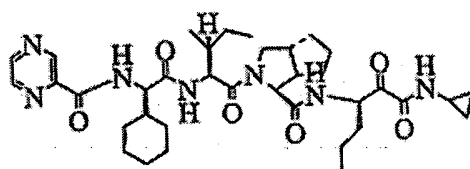
EM,



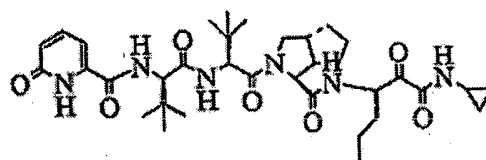
EN,



EO,

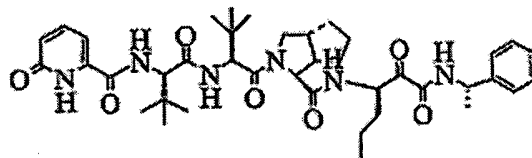


EP,

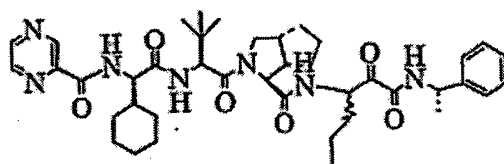


ES,

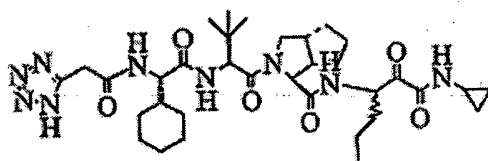
07.04.03



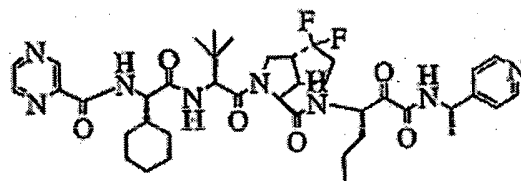
ET,



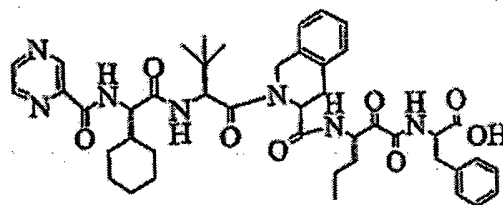
EU,



EV,

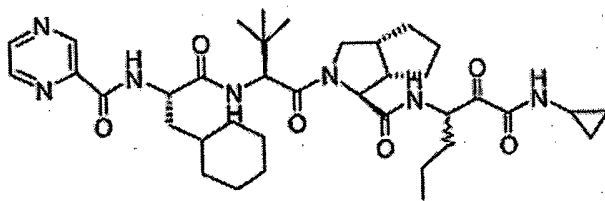


EZ,

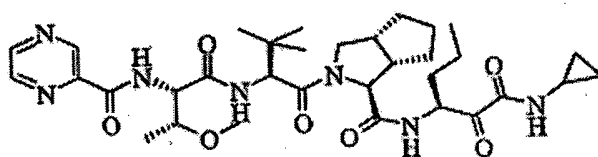


FA.

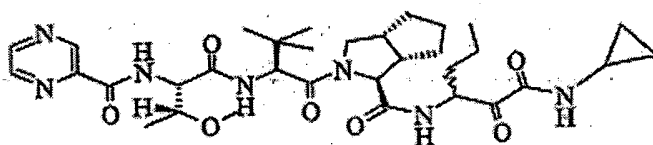
07.04.03



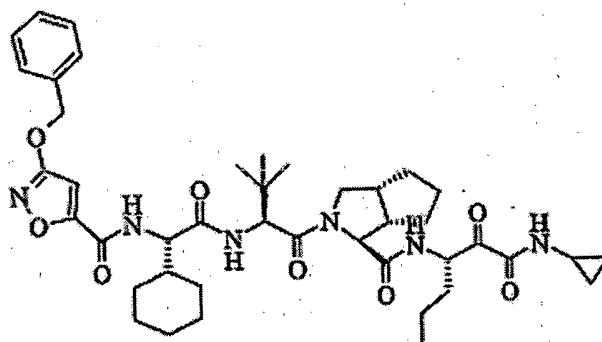
FB,



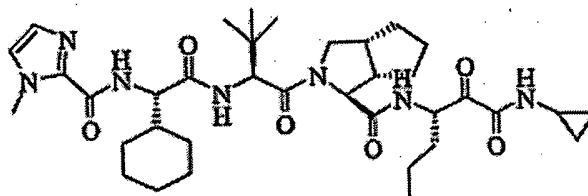
FC,



FD,

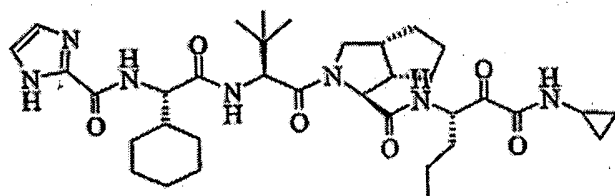


FE,

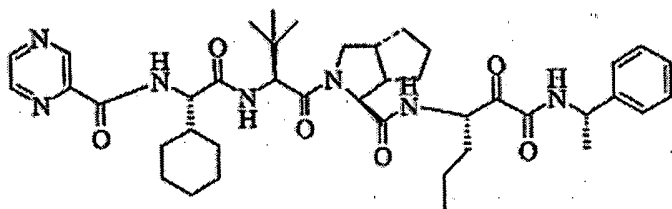


07.04.03

FF,



FG, and



FH,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru.

63. Farmaceutická kompozice vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelné množství sloučeniny podle kteréhokoli z předcházejících nároků a farmaceuticky přijatelný nosič.

64. Způsob inhibice HCV proteázy, vyznačující se tím, že zahrnuje uvedení proteázy do kontaktu se sloučeninou podle kteréhokoli z nároků 1 až 62.

65. Způsob léčení pacienta trpícího HCV infekcí nebo fyziologickými stavy vztahujícími se k infekci, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání pacientovi farmaceuticky účinného množství sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1 až 62.

66. Způsob léčení pacienta trpícího HCV infekcí nebo fyziologickými stavy vztahujícími se k infekci, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání pacientovi farmaceuticky účinného množství sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1 až 62 v kombinaci s farmaceuticky účinným množstvím další terapeutické látky s účinkem proti HCV.

67. Způsob podle nároku 66, vyznačující se tím, že terapeutická látka s účinkem proti HCV je interferon nebo derivatizovaný interferon.

68. Farmaceutická kompozice, vyznačující se tím, že obsahuje inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, interferon, který má účinek proti viru hepatitidy C a farmaceuticky přijatelný nosič.

69. Farmaceutická kompozice podle nároku 68, vyznačující se tím, že dále obsahuje sloučeninu, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

70. Farmaceutická kompozice, vyznačující se tím, že obsahuje inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, sloučeninu, který má účinek proti viru hepatitidy C a

07.04.03

farmaceuticky přijatelný nosič, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

71. Farmaceutická kompozice podle nároku 69, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, uvedený interferon a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C, jsou všechny přítomny v množství zvoleném ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky účinné množství, subklinicky farmaceuticky účinné množství a jejich kombinace.

72. Farmaceutická kompozice podle nároku 71, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C je sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 62; uvedený interferon je zvolen ze souboru, zahrnujícího interferon alfa 2B, pegylovaný interferon alfa, konsenzuální interferon, interferon alfa 2A, lymfoblastoidový interferon a interferon tau; a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C je zvolena ze souboru, zahrnujícího interleukin 2, interleukin 6, interleukin 12, sloučeninu, která zesiluje vývin odezvy helper T buněk typu 1, RNA s dvěma vlákny; RNA s dvěma vlákny komplexovaná s tobramycinem, Imiquimod, ribavirin, inhibitor inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy, amantadin a rimantadin.

73. Způsob léčení nebo prevence infekce virem hepatitidy C u pacienta, který má jeho potřebu, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání uvedenému pacientovi farmaceuticky účinného množství kombinace inhibitoru serinových proteáz

viru hepatitidy C a interferonu s účinkem proti viru hepatitidy C.

74. Způsob podle nároku 73, vyznačující se tím, že uvedené farmaceuticky účinné množství uvedené kombinace dále zahrnuje sloučeninu, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

75. Způsob léčení nebo prevence infekce virem hepatitidy C u pacienta, který má jeho potřebu, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání uvedenému pacientovi farmaceuticky účinného množství kombinace inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C a sloučeniny, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

76. Způsob podle kteréhokoli z nároků 74, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, uvedený interferon a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C, jsou všechny přítomny v množství zvoleném ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky účinné množství, subklinicky farmaceuticky účinné množství a jejich kombinace.

77. Způsob podle nároku 76, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C je sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 62; uvedený interferon je zvolen ze souboru, zahrnujícího interferon alfa 2B, pegylovaný interferon alfa, konsenzuální interferon, interferon alfa 2A, lymfoblastoidový

interferon, a interferon tau; a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C je zvolena ze souboru, zahrnujícího interleukin 2, interleukin 6, interleukin 12, sloučeninu, která zesiluje vývin odezvy helper T buněk typu 1, RNA s dvěma vlákny, RNA s dvěma vlákny komplexovaná s tobramycinem, Imiquimod, ribavirin, inhibitor inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy, amantadin a rimantadin.

78. Použití inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C v kombinaci s interferonem, který má účinek proti viru hepatitidy C, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci infekce virem hepatitidy C u pacienta, který má jeho potřebu.

79. Použití inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C v kombinaci se sloučeninou, která má účinek proti viru hepatitidy C, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci infekce virem hepatitidy C u pacienta, který má jeho potřebu, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

80. Použití inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C v kombinaci s interferonem, který má účinek proti viru hepatitidy C a sloučeninou, která má účinek proti viru hepatitidy C, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci infekce virem hepatitidy C u pacienta, který má jeho potřebu, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

81. Použití podle nároku 80, kde uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, uvedený interferon a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy

C, jsou všechny přítomny v uvedeném léčivu v množství zvoleném ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky účinné množství, subklinicky farmaceuticky účinné množství a jejich kombinace.

82. Použití podle nároku 81, kde uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C je sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 62; uvedený interferon je zvolen ze souboru, zahrnujícího interferon alfa 2B, pegylovaný interferon alfa, konsenzuální interferon, interferon alfa 2A, lymfoblastoidový interferon, a interferon tau; a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C je zvolena ze souboru, zahrnujícího interleukin 2, interleukin 6, interleukin 12, sloučeninu, která zesiluje vývin odezvy helper T buněk typu 1, RNA s dvěma vlákny, RNA s dvěma vlákny komplexovanou s tobramycinem, Imiquimod, ribavirin, inhibitor inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy, amantadin a rimantadin.

83. Souprava nebo farmaceutické balení, vyznačující se tím, že zahrnuje alespoň dvě oddělené nádoby, kde alespoň jedna z uvedených nádobek obsahuje inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C a alespoň jedna další uvedená nádoba obsahuje interferon, který má účinek proti viru hepatitidy C.

84. Souprava nebo farmaceutické balení, vyznačující se tím, že zahrnuje alespoň dvě oddělené nádoby, kde alespoň jedna z uvedených nádobek obsahuje inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C a alespoň jedna další uvedená nádoba

obsahuje sloučeninu, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

85. Souprava nebo farmaceutické balení, vyznačující se tím, že zahrnuje alespoň dvě oddělené nádoby, kde alespoň jedna z uvedených nádobek obsahuje inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, alespoň jedna další uvedená nádoba obsahuje interferon, který má účinek proti viru hepatitidy C a alespoň jedna další uvedená nádoba obsahuje sloučeninu, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

86. Souprava nebo farmaceutické balení podle nároku 85, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, uvedený interferon a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C, jsou všechny přítomny v množství zvoleném ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky účinné množství, subklinicky farmaceuticky účinné množství a jejich kombinace.

87. Souprava nebo farmaceutické balení podle nároku 86, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C je sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 62; uvedený interferon je zvolen ze souboru, zahrnujícího interferon alfa 2B, pegylovaný interferon alfa, konsenzuální interferon, interferon alfa 2A, lymfoblastoidový interferon, a interferon tau; a uvedená sloučenina, který má účinek proti viru hepatitidy C je zvolena ze souboru, zahrnujícího interleukin 2, interleukin 6, interleukin 12, sloučeninu, která zesiluje vývin odezvy

helper T buněk typu 1, RNA s dvěma vlákny, RNA s dvěma vlákny komplexovaná s tobramycinem, Imiquimod, ribavirin, inhibitor inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy, amantadin a rimantadin.

88. Způsob inhibice replikace viru hepatitidy C v buňce, vyznačující se tím, že zahrnuje dosažení kontaktu uvedené buňky, inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C a interferonu, který má účinek proti viru hepatitidy C.

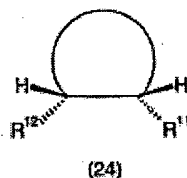
89. Způsob podle nároku 88, vyznačující se tím, že dále zahrnuje dosažení kontaktu uvedené buňky a sloučeniny, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

90. Způsob inhibice replikace viru hepatitidy C v buňce, vyznačující se tím, že zahrnuje dosažení kontaktu uvedené buňky, inhibitoru serinových proteáz viru hepatitidy C a sloučeniny, která má účinek proti viru hepatitidy C, kde uvedená sloučenina je jiná než interferon.

91. Způsob podle nároku 88, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C, uvedený interferon a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C, jsou všechny přítomny v množství zvoleném ze souboru, zahrnujícího farmaceuticky účinné množství, subklinicky farmaceuticky účinné množství a jejich kombinace.

92. Způsob podle nároku 91, vyznačující se tím, že uvedený inhibitor serinových proteáz viru hepatitidy C je sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 62; uvedený interferon je zvolen ze souboru, zahrnujícího interferon alfa 2B, pegylovaný interferon alfa, konsenzuální interferon, interferon alfa 2A, lymfoblastoidový interferon a interferon tau; a uvedená sloučenina, která má účinek proti viru hepatitidy C je zvolena ze souboru, zahrnujícího interleukin 2, interleukin 6, interleukin 12, sloučeninu, která zesiluje vývin odezvy helper T buněk typu 1, RNA s dvěma vlákny, RNA s dvěma vlákny komplexovanou s tobramycinem, Imiquimod, ribavirin, inhibitor inosin 5'-monofosfát dehydrogenázy, amantadin a rimantadin.

93. Sloučenina obecného vzorce 24



kde:



je popřípadě substituovaný cykloalkyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl;

R^{11} je $-\text{CO}_2R^{13}$;

R^{12} je adukt iminového glycinimidého derivátu; a

R^{13} je ochranná skupina kyseliny nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina.

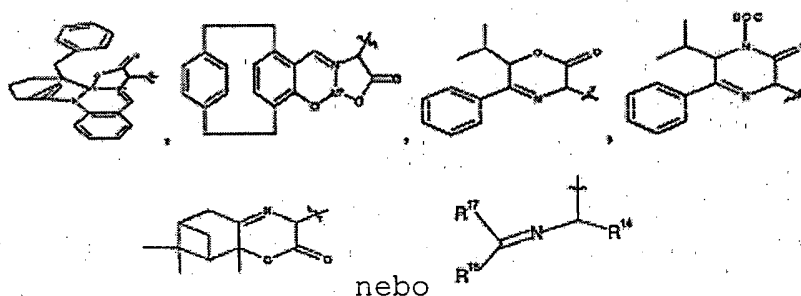
94. Sloučenina podle nároku 93, kde:

popřípadě substituovaný cykloalkyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl znamená kondenzovaný arylcykloalkyl popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituovaná alifatická skupina je alkyl, alkenyl nebo alkynyl popřípadě substituované substituentem alifatické skupiny;

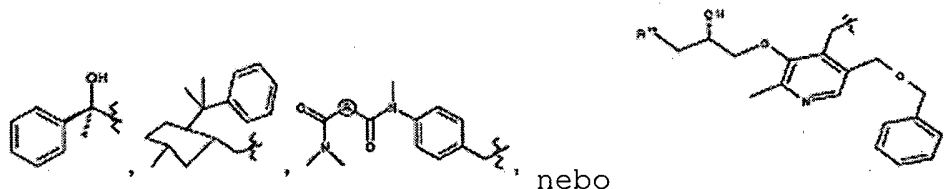
adukt iminového glycinimidého derivátu je sloučenina zvolená ze souboru, zahrnujícího



kde:

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{17} je popřípadě substituovaný aryl, popřípadě substituovaná alifatická skupina,



R^{18} je atom vodíku, skupiny alkyl, nebo alkylthio; nebo popřípadě substituovaný aryl;

kde

substituenty skupiny kruhů znamenají substituenty vázané k aromatickému nebo nearomatickému systému kruhů včetně skupin aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$,

kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, substituenty skupiny kruhů dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$); a substituenty alifatických skupin znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol,

methylen ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$), oxo ($\text{O}=\text{}$), thioxo ($\text{S}=\text{}$), $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, nebo $\text{Y}^3\text{SO}_2\text{NY}^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3$ nebo $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl; a aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů obsahující 6 až 14 atomů uhlíku.

95. Sloučenina podle nároků 93 nebo 94, kde R^{11} je $-\text{CO}_2\text{R}^{13}$.

96. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 93 nebo 95, kde R^{13} je an popřípadě substituovaná alifatická skupina.

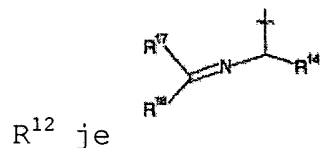
97. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 93 až 96, kde R^{13} je alkylová skupina.

98. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 93 až 97, kde R^{13} je nižší alkyl.

99. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 93 až 98, kde R^{13} je methyl.

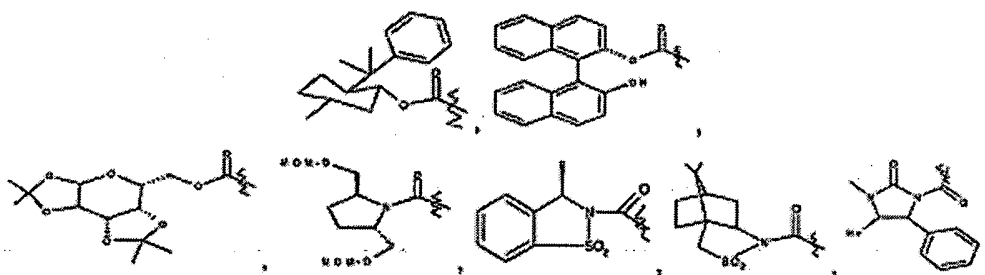
07.04.03

100. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 93 až 99, kde



kde

R^{14} je $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;

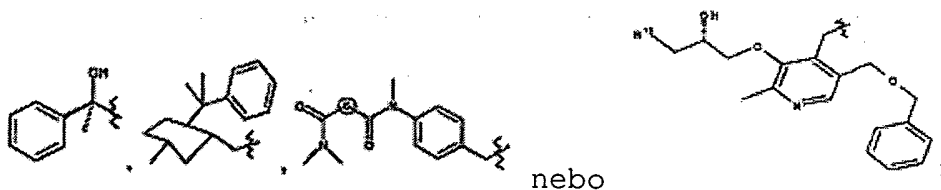


nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{17} je popřípadě substituovaný aryl, popřípadě substituovaná alifatická skupina,



R^{18} je atom vodíku, skupiny alkyl nebo alkylthio; nebo popřípadě substituovaný aryl;

R^{17} a R^{18} společně s atomem uhlíku, ke kterému R^{17} a R^{13} jsou vázány



Ⓢ je pevná fáze.

101. Sloučenina podle nároku 100, kde R^{14} je $-\text{CO}_2R^{16}$.

102. Sloučenina podle nároku 100 nebo 101, kde R^{16} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

103. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 102, kde R^{16} je alkyl.

104. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 103, kde R^{16} je nižší alkyl.

105. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 104, kde R^{16} je t-Bu.

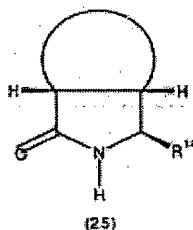
106. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 105, kde R^{17} je popřípadě substituovaný aryl.

107. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 106, kde R^{17} je fenyl.

108. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 107, kde R^{18} je popřípadě substituovaný aryl.

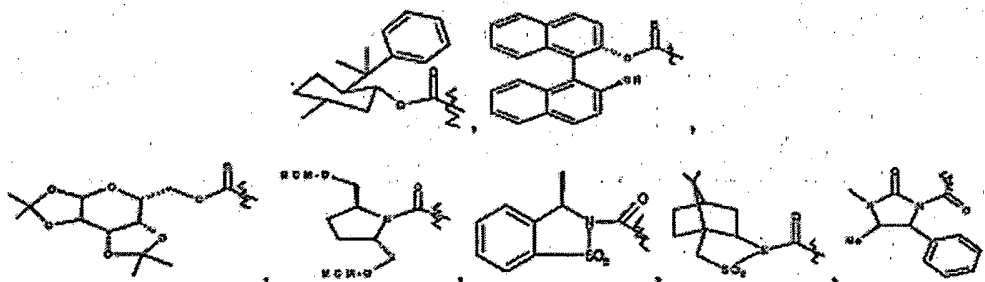
109. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 100 až 108, kde R^{18} je fenyl.

110. Sloučenina obecného vzorce 25



kde:

R^{14} je $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;



nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina; a

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina.

111. Sloučenina podle nároku 110, kde:

popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkinyl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty alifatických skupin;

popřípadě substituovaný aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomy uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

kde substituenty skupiny kruhů znamenají substituenty vázané k aromatickým nebo nearomatickým systémům kruhů včetně skupin aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl,

heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, "substituenty skupiny kruhů" dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$); a

substituenty alifatických skupin znamenají skupiny aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl,

cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl,
alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl,
heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio,
heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol,
methylen ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$), oxo ($\text{O}=\text{}$), thioxo ($\text{S}=\text{}$), $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$,
 $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, nebo $\text{Y}^3\text{SO}_2\text{NY}^1-$, kde R^2
je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom
vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, a Y^3 je alkyl,
cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je
 $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl,
aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl,
aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly
definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše,
nebo pokud substituent je $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$,
 $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$ nebo $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s
atomem dusíku kterým Y^1 a Y^2 jsou vázány, vytvářet 4 až 7
členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl.

112. Sloučenina podle nároků 110 nebo 111, kde R^{14} je -
 CO_2R^{16} .

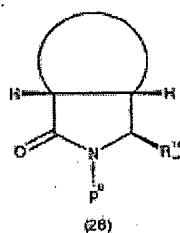
113. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 110 až 112, kde
 R^{16} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

114. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 110 až 113, kde
 R^{16} je alkyl.

115. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 110 až 114, kde
 R^{16} je nižší alkyl.

116. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 110 až 115, kde R^{16} je t-Bu.

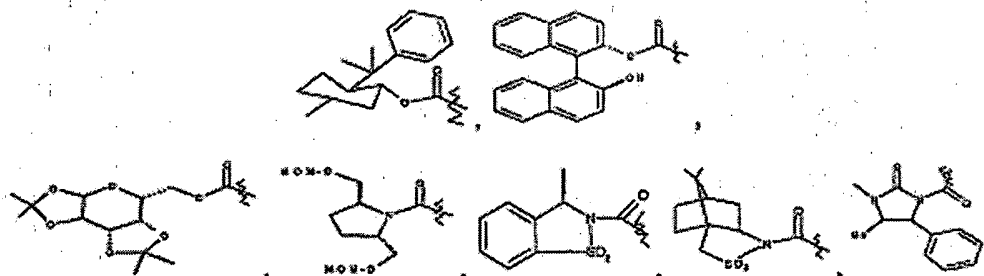
117. Sloučenina obecného vzorce 26



kde:

p^0 je ochranná skupina amidu;

R^{14} je $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;



nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina; a

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina.

118. Sloučenina podle nároku 117, kde:
 popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkinyl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty alifatických skupin;
 popřípadě substituovaný aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomů uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;
 kde substituenty skupiny kruhů znamenají substituenty vázané k aromatickému nebo nearomatickému systému kruhů včetně skupin aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfiny, cyklylsulfiny, arylsulfiny, heteroarylsulfiny, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- ,

potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, substituenty skupiny kruhů dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$); a substituenty alifatických skupin znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$,

$Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$, nebo $Y^3SO_2NY^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl.

119. Sloučenina podle nároku 117 nebo 118, kde R^{14} je $-CO_2R^{16}$.

120. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 117 až 119, kde R^{16} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

121. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 117 až 120, kde R^{16} je alkyl.

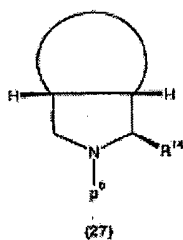
122. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 117 až 121, kde R^{16} je nižší alkyl.

123. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 117 až 122, kde R^{16} je t-Bu.

124. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 117 až 123, kde p^0 je zvolen ze souboru, zahrnujícího BOC, CBz a $-CO_2$ alkyl.

125. Sloučenina podle nároku 124, kde p^0 je BOC.

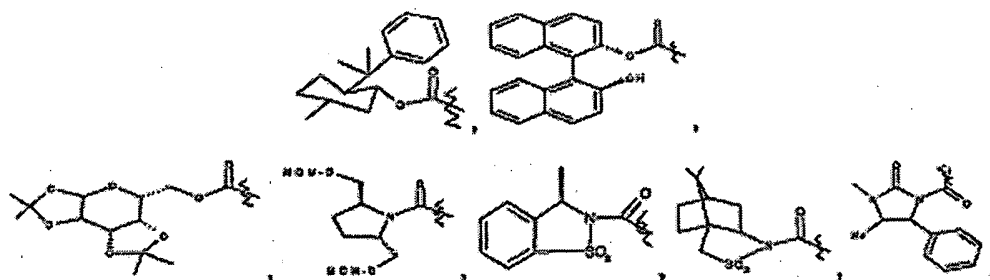
126. Sloučenina obecného vzorce 27



kde:

p^0 je ochranná skupina amidu;

R^{14} je $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;



nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina; a

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina.

127. Sloučenina podle nároku 126, kde:

popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkynyl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty alifatických skupin;

popřípadě substituovaný aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomy uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

kde substituenty skupiny kruhů znamenají substituenty vázané k aromatickému nebo nearomatickému systému kruhů včetně skupin aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl,

aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, substituenty skupiny kruhů dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$); a substituenty alifatických skupin znamenají aaryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol,

methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$ nebo $Y^3SO_2NY^1-$ kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku, přes který jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl.

128. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 nebo 127, kde R^{14} je $-CO_2R^{16}$.

129. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 až 128, kde R^{16} je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

130. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 až 129, kde R^{16} je alkyl.

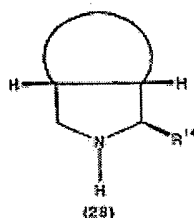
131. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 až 130, kde R^{16} je nižší alkyl.

132. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 až 131, kde R^{16} je t-Bu.

133. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 126 až 132, kde p^0 je zvolen ze souboru, zahrnujícího BOC, CBz a $-\text{CO}_2\text{alkyl}$.

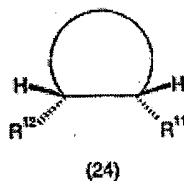
134. Sloučenina podle nároku 133, kde p^0 je BOC.

135. Způsob přípravy chirální bicykloprolinátové sloučeniny obecného vzorce 28,



vyznačující se tím, že zahrnuje následující kroky:

(a) štěpení a cyklizace sloučeniny obecného vzorce 24



kde:

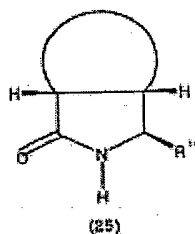
 je popřípadě substituovaný cykloalkyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl;

R^{11} je $-\text{CO}_2R^{13}$;

R^{12} je adukt iminového glycinimidového derivátu;

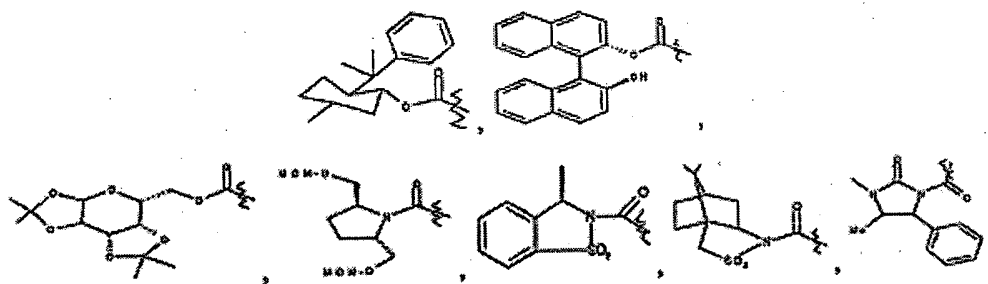
R^{13} je ochranná skupina kyseliny nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

za podmínek štěpení a cyklizace pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 25



kde:

R^{14} je $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;

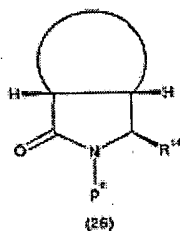


nebo $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

R^{15} je popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R^{16} je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina; a

(b) ochrana atomu dusíku laktamové části sloučeniny obecného vzorce 25 ochrannou skupinou amidu pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 26

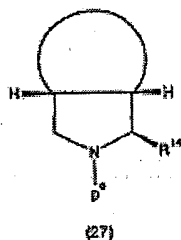


kde:

P^0 je ochranná skupina amidu;

R^{14} je jako bylo popsáno výše; a

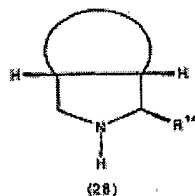
(c) redukce sloučeniny obecného vzorce 26 za redukčních podmínek pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 27



kde:

P^0 a R^{14} jsou jako bylo popsáno výše; a

(d) odstranění ochranné skupiny sloučeniny obecného vzorce 27 za podmínek odstranění ochranné skupiny pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce 28



kde R^{14} je jako bylo popsáno výše.

136. Sloučenina podle nároku 135, kde:

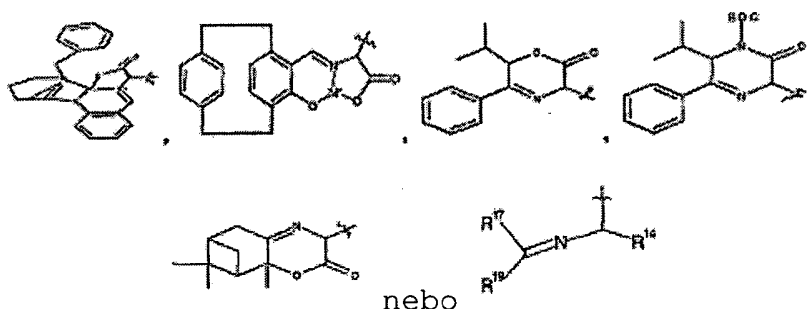
popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkinyl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty alifatických skupin;

popřípadě substituovaný aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomy uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituovaný cykloalkyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkyl znamená kondenzovaný arylcykloalkyl popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

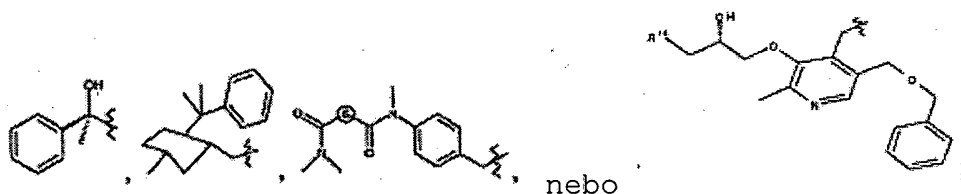
adukt iminového glycinimidového derivátu je sloučenina zvolená ze souboru, zahrnujícího



kde:

R¹⁶ je ochranná skupina kyseliny, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;

R¹⁷ je popřípadě substituovaný aryl, popřípadě substituovaná alifatická skupina,



R¹⁸ je atom vodíku, skupiny alkyl, nebo alkylthio; nebo popřípadě substituovaný aryl;

kde

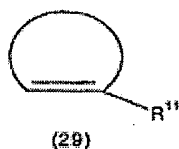
substituenty skupiny kruhů znamenají substituenty vázané k aromatickému nebo nearomatickému systému kruhů včetně skupin aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy,

halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, substituenty skupiny kruhů dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$); a substituenty alifatických skupin znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog,

heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$ nebo $Y^3SO_2NY^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl.

137. Způsob podle nároku 136, vyznačující se tím, že dále zahrnuje krok, kde sloučenina obecného vzorce 24 se

připraví provedením Michaelovy adice iminové glycinimidové sloučeniny na sloučeninu obecného vzorce 29



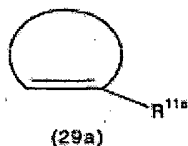
ve kterém:



je popřípadě substituovaný cykloalkenyl nebo popřípadě substituovaný kondenzovaný arylcykloalkenyl;

kde:

sloučenina obecného vzorce 29 může být připravena esterifikací sloučeniny obecného vzorce 29a



ve kterém:

R^{11a} je $-CHO$, $-COR^{15}$, $-C\equiv N$ nebo $-CONR^{15}R^{15}$.

138. Způsob podle nároku 137, vyznačující se tím, že způsob se provádí za teploty mezi $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

07.04.03

139. Způsob podle nároku 138, vyznačující se tím, že způsob se provádí za teploty -60°C .

140. Způsob podle nároku 139, vyznačující se tím, že způsob se katalyzuje chirálním katalyzátorem přenosu fáze.

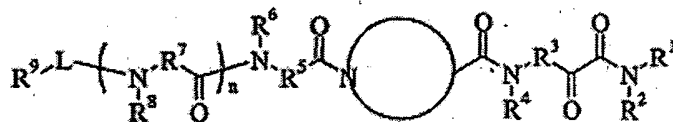
141. Způsob podle nároku 139, vyznačující se tím, že způsob se katalyzuje nechirálním katalyzátorem přenosu fáze.

142. Způsob podle kteréhokoli z nároků 135 až 141, vyznačující se tím, že ochranná skupina je BOC.

143. Způsob podle nároku 142, vyznačující se tím, že iminový glycinimid je terc.-butylester (N-difenylmethylen)glycinu.

143. Způsob podle nároku 142, vyznačující se tím, že sloučenina obecného vzorce 29 je methylester 1-karboxy-1-cyklopentenu.

144. Sloučenina podle nároku 1, která má strukturní obecný vzorec:



ve kterém:

R^1 je atom vodíku, popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^2 a R^9 jsou každý nezávisle popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina;

R^3 , R^5 a R^7 jsou každý nezávisle methandiyl nebo ethandiyl, substituovaný jedním substituentem zvoleným ze souboru, zahrnujícího popřípadě substituovanou alifatickou skupinu, popřípadě substituovanou cyklickou skupinu nebo popřípadě substituovanou aromatickou skupinu a kde methandiyl nebo ethandiyl je dále popřípadě substituovaný substituentem alifatické skupiny;

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou každý nezávisle je atom vodíku nebo popřípadě substituovaná alifatická skupina;



je substituovaný monocyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl nebo popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl, ve kterém nenasycenost je v kruhu vzdáleném od kruhu nesoucího skupinu $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ a ke kterému je vázána skupina $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$;

L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ nebo $-NR^{10}S(O)_2-$; a n je 0 nebo 1,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru, za předpokladu, že



pokud je substituovaný , potom L je $-OC(O)-$ a R^9 je popřípadě substituovaná alifatická skupina nebo alespoň jeden z R^3 , R^5 a R^7 je methandiyl nebo ethandiyl, substituovaný alespoň jedním substituentem zvoleným ze souboru, zahrnujícího popřípadě substituovanou alifatickou skupinu, popřípadě substituovanou cyklickou skupinu nebo popřípadě substituovanou aromatickou skupinu a kde methandiyl nebo ethandiyl je dále popřípadě substituován alifatickým substituentem, nebo R^4 je popřípadě substituovaná alifatická skupina.

145. Sloučenina podle nároku 144, kde:

popřípadě substituované alifatické skupiny jsou alkyl, alkenyl nebo alkynyl, popřípadě substituovaný jedním nebo více alifatickými substituenty;

popřípadě substituované cyklické skupiny jsou cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované aromatické skupiny jsou skupiny aryl nebo heteroaryl popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované (1,1- nebo 1,2)cykloalkylenové skupiny jsou (1,1- nebo 1,2)cykloalkylenové skupiny

popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituované (1,1- nebo 1,2) heterocyklylenové skupiny jsou (1,1- nebo 1,2) heterocyklylenové skupiny popřípadě substituované jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;



jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je monocyklická azaheterocyklylová skupina substituovaná přímo nebo přes vazebnou skupinu alespoň jedním substituentem, zvoleným ze souboru, zahrnujícího aryl, heteroaryl, aryloxy, heteroaryloxy, aroyl nebo jeho thio analog, heteroaryl nebo jeho thioxo analog, aroyloxy, heteroaroyloxy, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, arylthio, heteroarylthio, aryldiazo, heteroaryldiazo, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde alespoň jeden z Y^1 a Y^2 je aryl nebo heteroaryl, kde uvedená vazebná skupina je zvolena ze souboru, zahrnujícího $-C(O)-$, $-OC(O)-$, nižší alkyl, nižší alkoxy, nižší alkenyl, $-O-$, $-S-$, $-C(O)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NR^{80}-$, kde R^{80} je atom vodíku, skupiny alkyl, cykloalkyl, aryl, aralkyl, heterocyklyl nebo heteroaryl;

popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklyl je multicyklická azaheterocyklylová skupina popřípadě substituovaná jedním nebo více substituenty skupiny kruhů;

popřípadě substituovaný multicyklický azaheterocyklenyl je multicyklická azaheterocyklenylová skupina popřípadě substituovaná jedním nebo více substituenty skupiny kruhů; kde substituenty alifatických skupin znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$ nebo $Y^3SO_2NY^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše,

nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl;

substituenty skupiny kruhů znamenají skupiny aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), kyselý bioster, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl, nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, pak "substituenty skupiny kruhů" dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$);

aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s 6 až 14 atomy uhlíku;
cykloalkyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku;
cykloalkenyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku, který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík;
cyklyl znamená cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl;
heterocyklyl znamená nearomatický nasycený monocyklický nebo multicyklický systém kruhů obsahující od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, kde jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatom jiný než uhlík;
heterocyklenyl znamená nearomatický monocyklický nebo multicyklický uhlovodíkový systém kruhů, obsahující od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatom jiný než uhlík a který obsahuje alespoň jeden dvojnou vazbu uhlík-uhlík nebo dvojnou vazbu uhlík-dusík; a
heteroaryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s od přibližně 5 do přibližně 14 atomů uhlíku, kde jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatom jiný než uhlík.

146. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 145, kde R^2 je 1-karboxy-2-fenylethyl, cyklopropyl, karboxymethyl, cyklobutyl, 1-fenylethyl, but-2-yl, 1-pyrid-4-ylethyl nebo propen-3-yl.

147. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 146, kde R^3 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina methandiyl.

148. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 147, kde R^3 je popřípadě atomem halogenu substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl)methandiyl.

149. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 148, kde R^3 je propylmethandiyl, 2,2-difluorethylmethandiyl, 2,2,2-trifluormethandiyl nebo propen-3-ylmethandiyl; výhodnější R^3 je propylmethandiyl, 2,2-difluorethylmethandiyl.

150. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 149, kde R^5 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina-methandiyl.

151. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 150, kde R^5 je popřípadě (fenyl, karboxy, karboxamido nebo alkoxykarbonyl) substituovaný nižší (alkyl nebo alkenyl)methandiyl.

152. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 151, kde R^5 je methylmethandiyl, isopropylmethandiyl, terc.-butylmethandiyl, but-2-ylmethandiyl, butylmethandiyl, benzylmethandiyl, 3-methylbutylmethandiyl, 2-methylpropylmethandiyl, karboxymethylmethandiyl, karboxamidomethylmethandiyl, benzyloxykarbonylmethyl-

methandiyl, benzyloxykarbonylpropylmethandiyl, fenylpropen-3-ylmethandiyl.

153. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 152, kde R^7 je popřípadě substituovaná nižší alifatická skupina-methandiyl nebo popřípadě substituovaná nižší cyklická skupina-methandiyl.

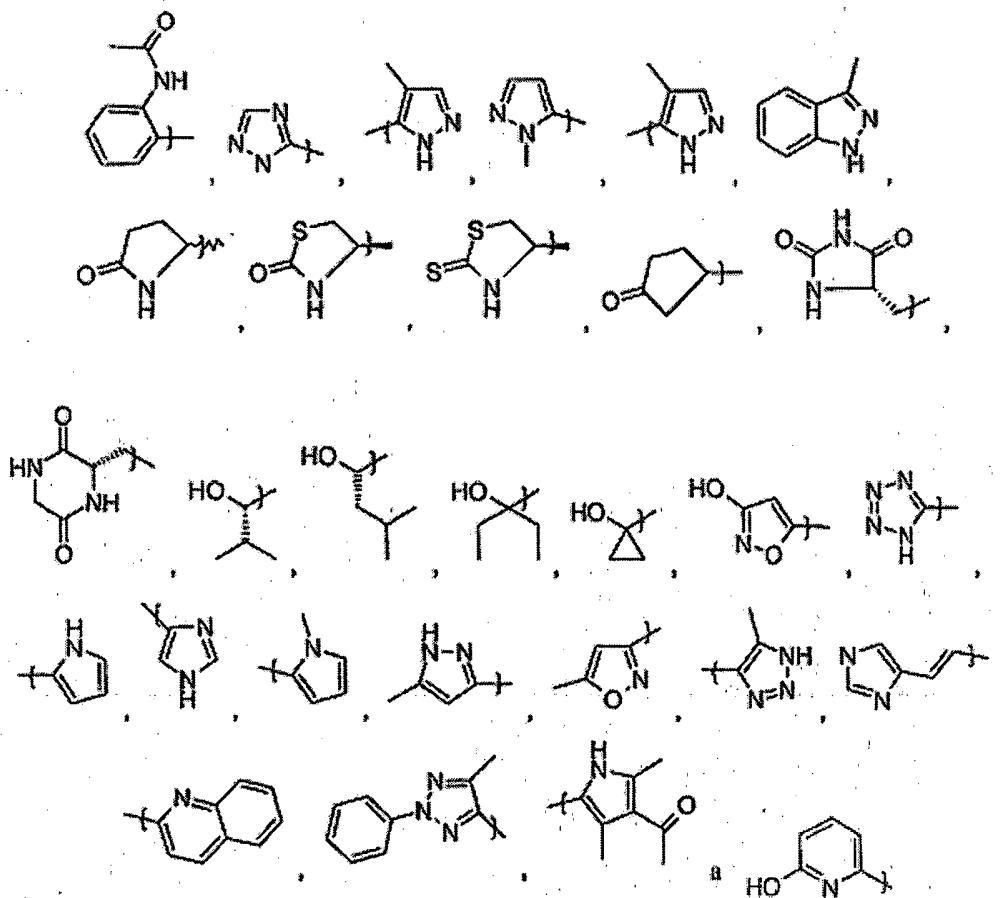
154. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 153, kde R^7 je popřípadě substituovaný nižší alkylmethandiyl nebo popřípadě substituovaný nižší cykloalkylmethandiyl.

155. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 154, kde R^7 je isopropylmethandiyl nebo cyklohexylmethandiyl.

156. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 155, kde R^9 je popřípadě (karboxy, (nižší alkyl)HNCO-, hydroxy, fenyl nebo heteroaryl) substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě substituovaný monocyklický heteroaryl.

157. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 156, kde R^9 je isopropyl nebo terc.-butyl.

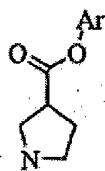
158. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 157, kde R^9 je zvolen ze souboru, zahrnujícího:



159. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 143 až 158, kde

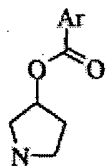


jako substituovaný monocyklický azaheterocyklyl je



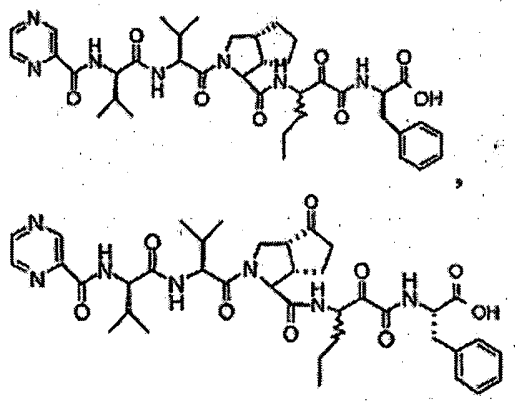
popřípadě substituovaný

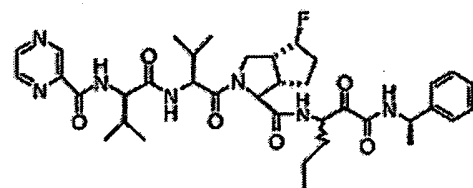
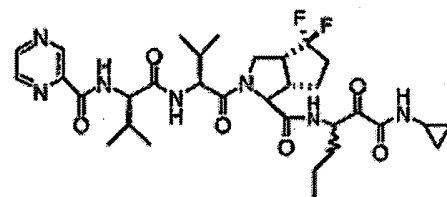
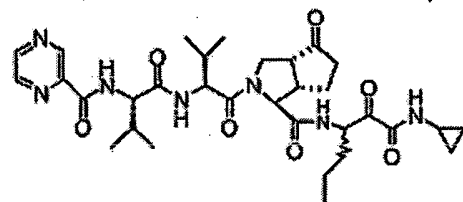
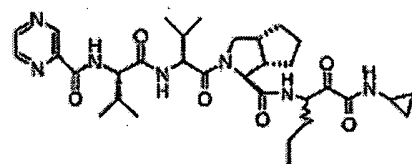
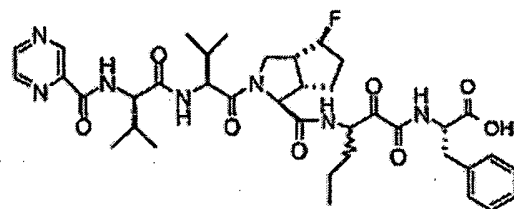
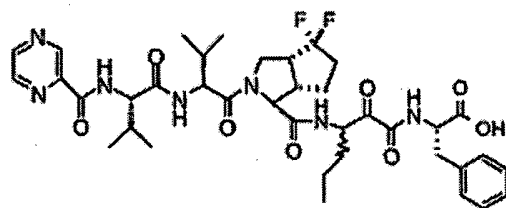
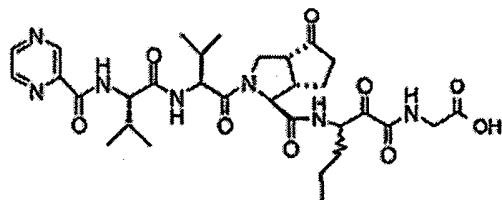
nebo popřípadě substituovaný

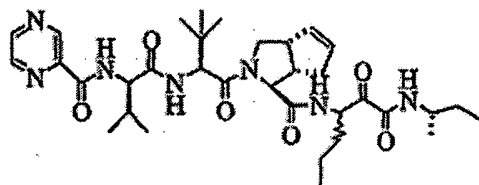
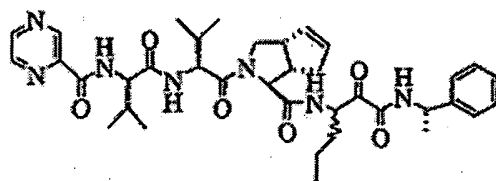
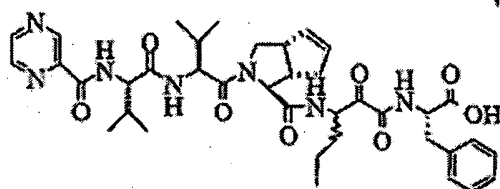
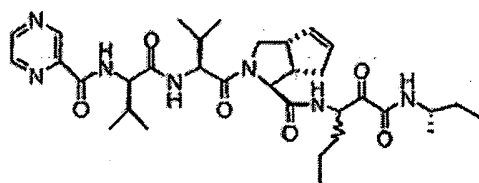
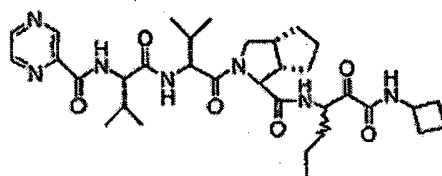
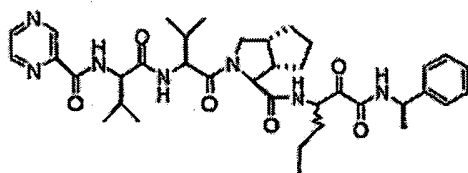
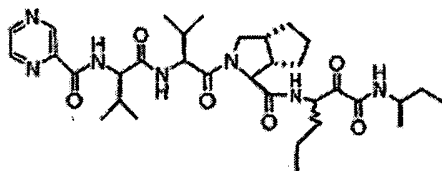


, kde Ar je R^2 , který obsahuje aromatickou skupinu/substituent.

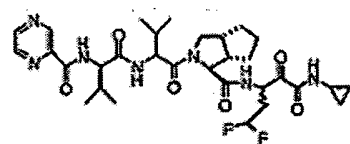
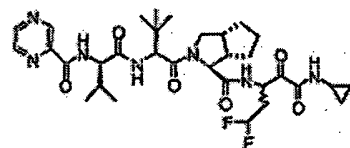
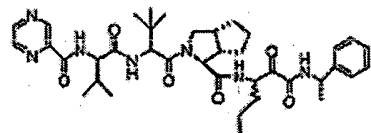
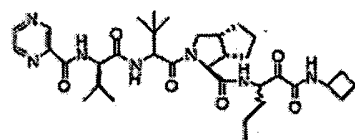
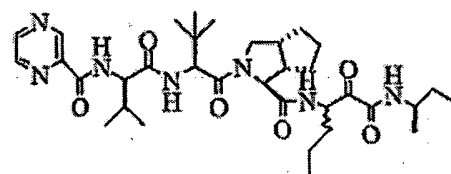
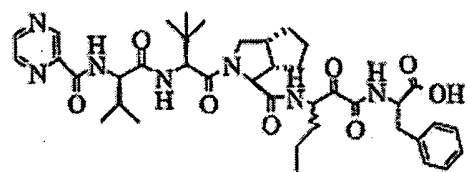
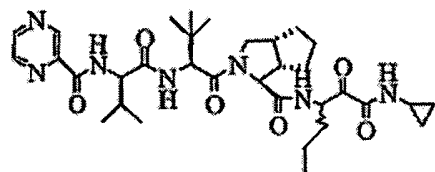
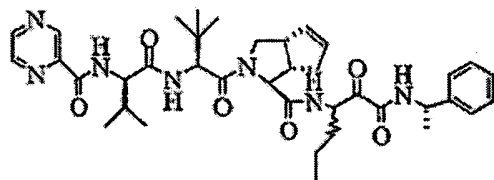
160. Sloučenina podle nároku 144 zvolená ze souboru, zahrnujícího následující sloučeniny:



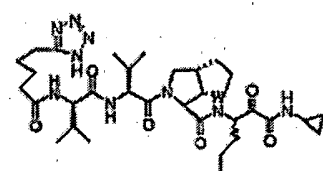
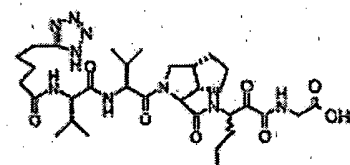
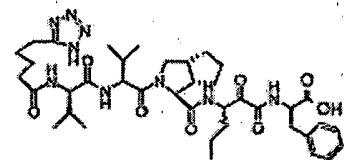
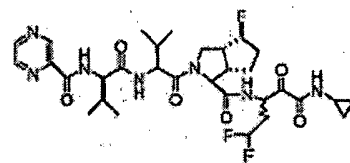
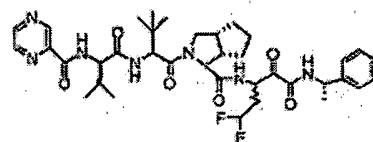
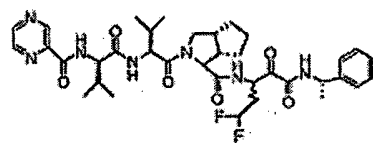
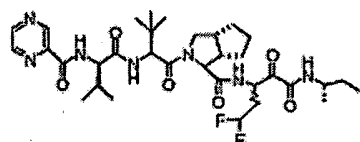
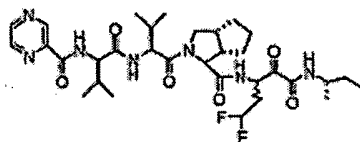




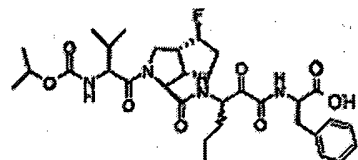
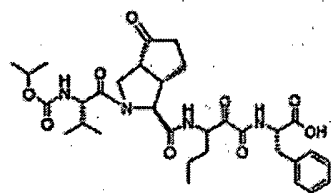
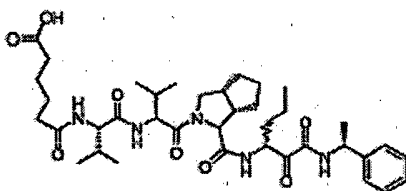
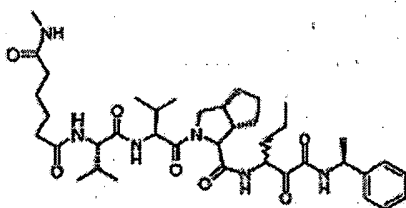
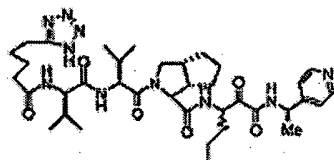
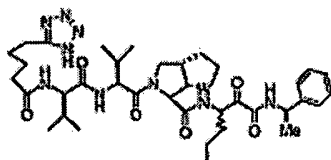
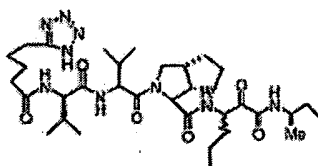
07.04.03

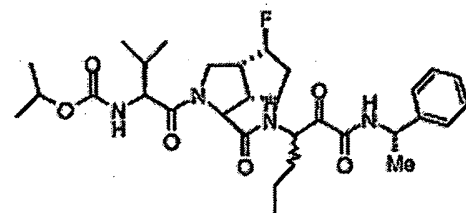
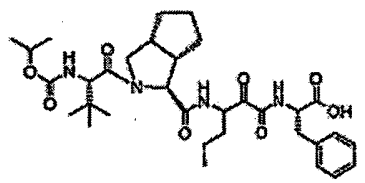
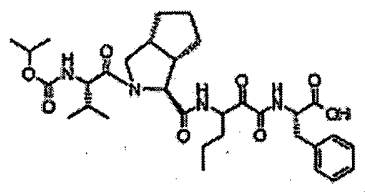
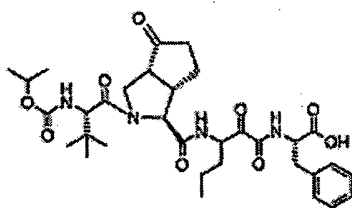
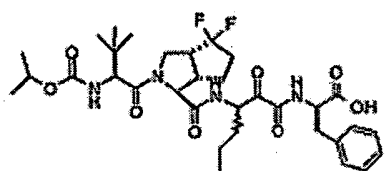
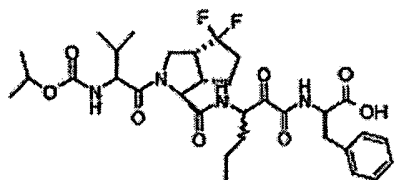
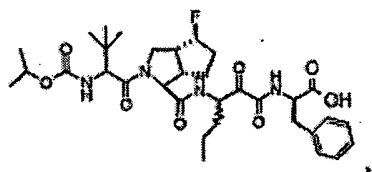


07.04.03

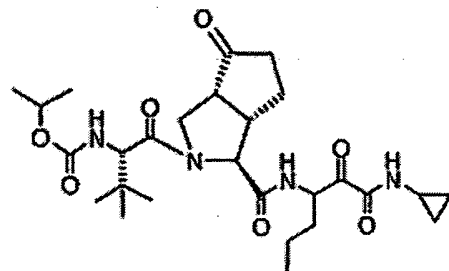
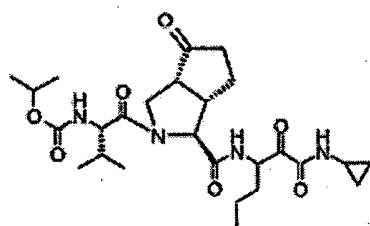
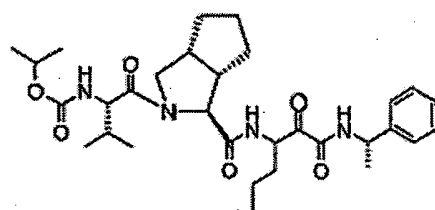
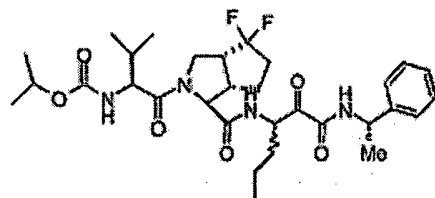
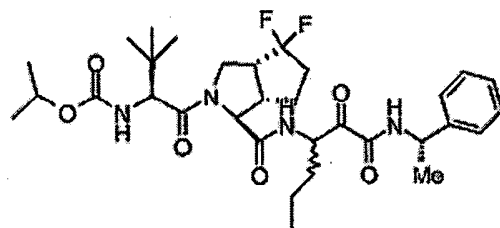
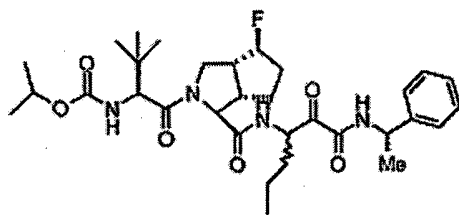


07.04.03

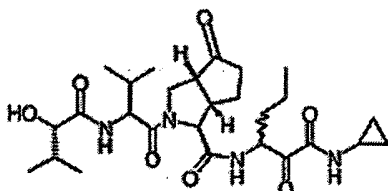
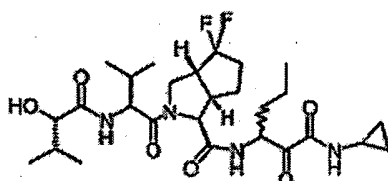
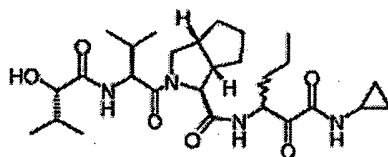
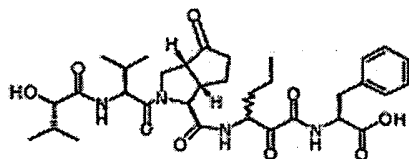
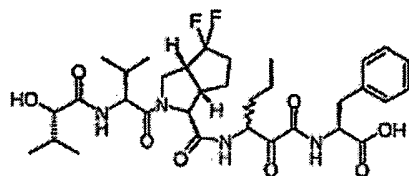
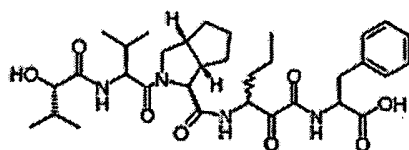
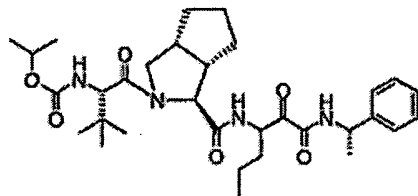




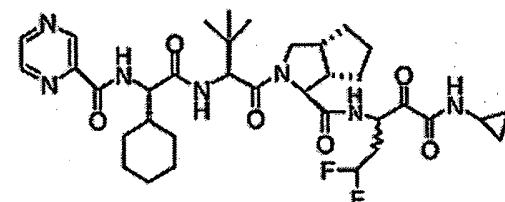
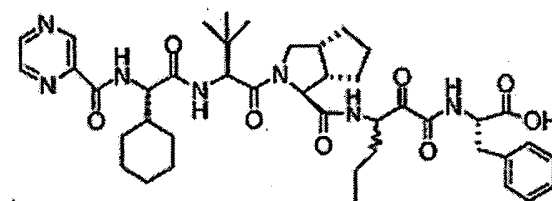
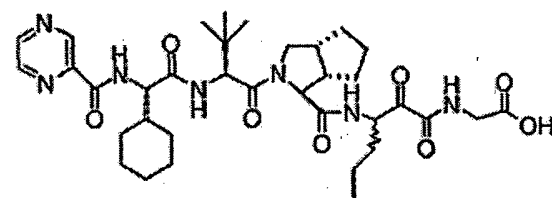
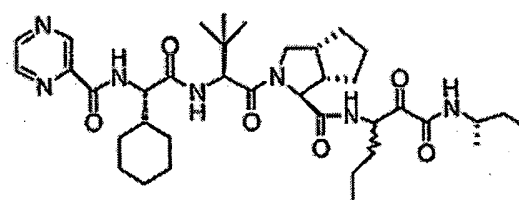
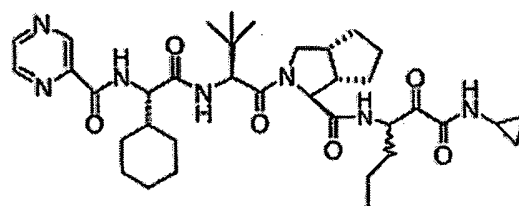
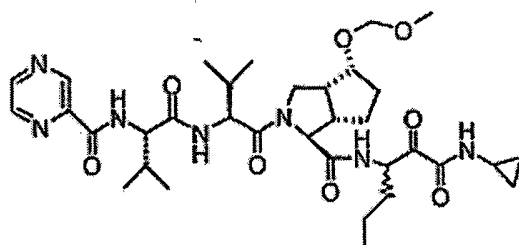
07.04.03



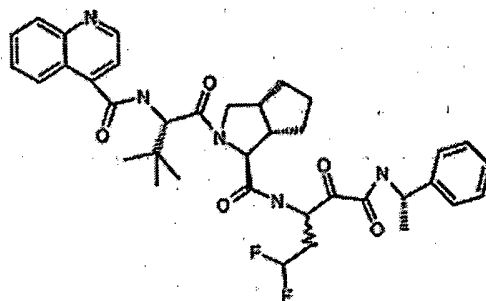
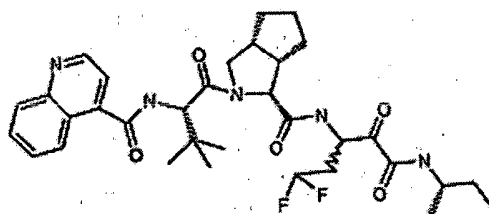
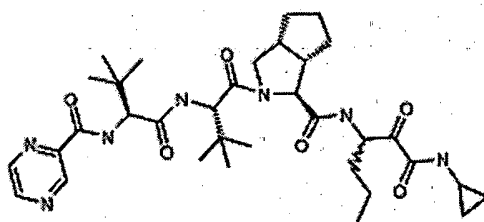
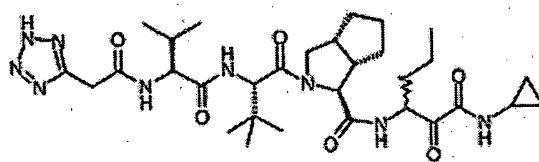
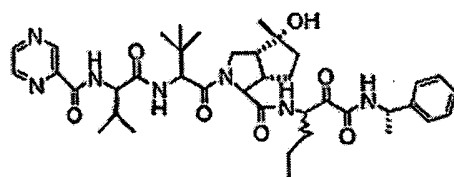
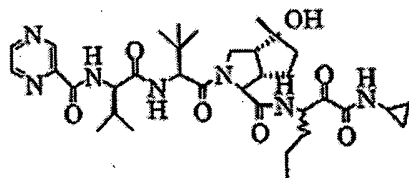
07.04.03



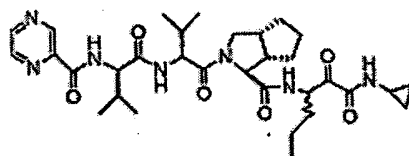
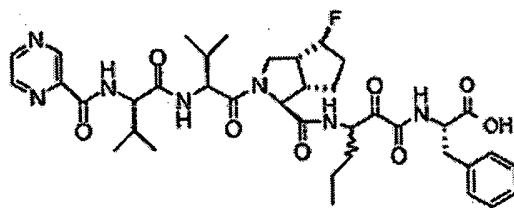
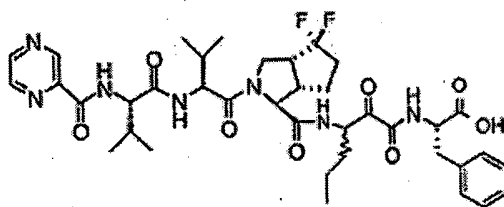
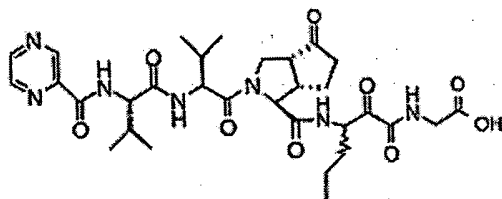
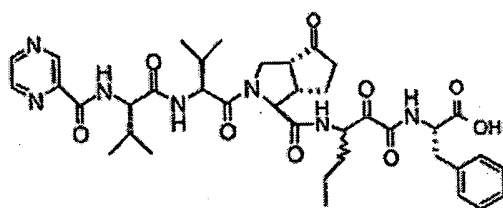
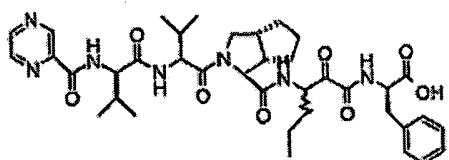
07.04.03

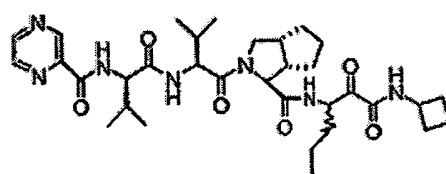
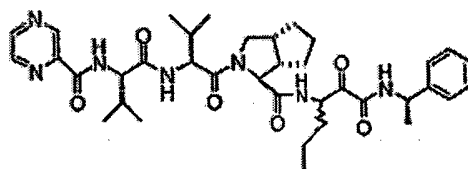
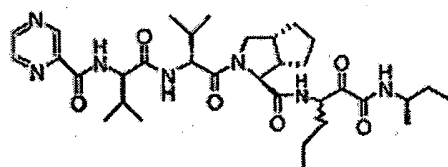
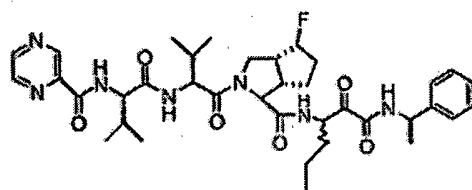
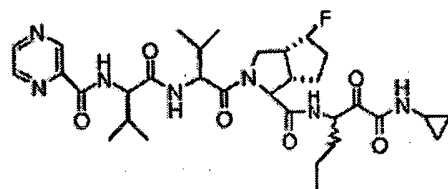
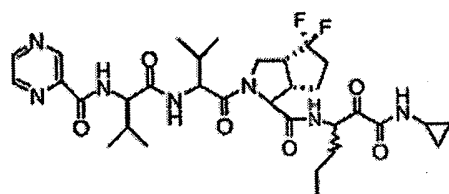
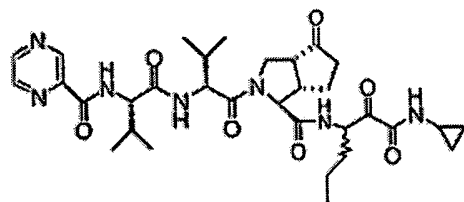


07.04.03

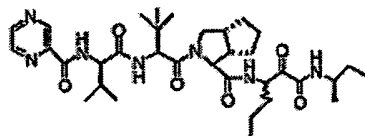
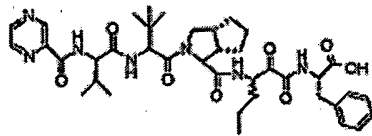
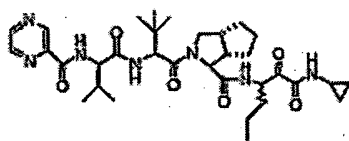
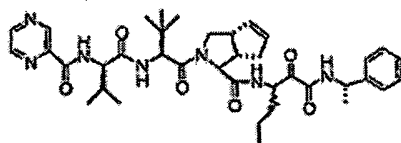
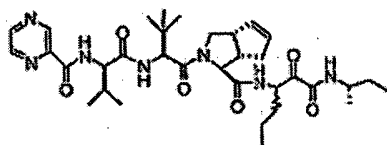
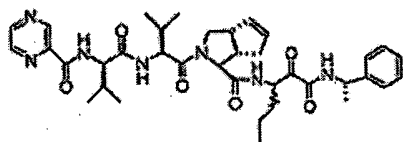
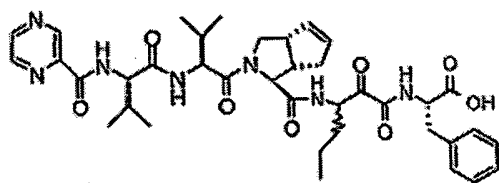
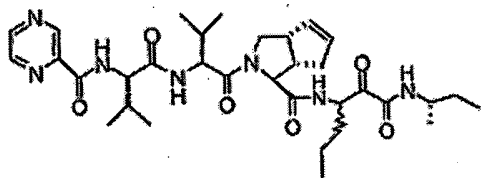


161. Sloučenina podle nároku 144 zvolená ze souboru, zahrnujícího:

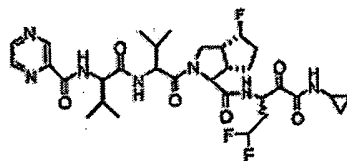
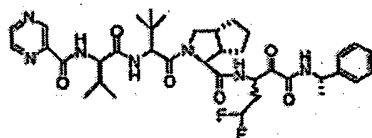
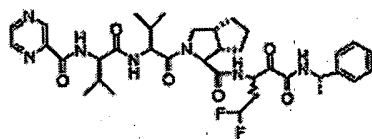
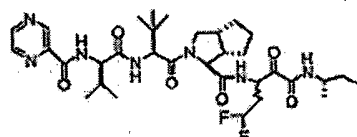
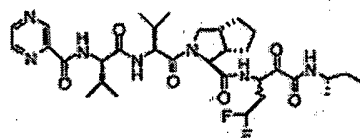
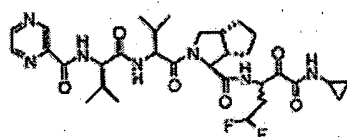
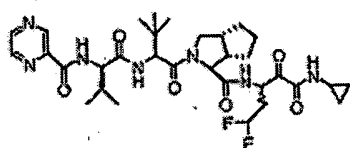
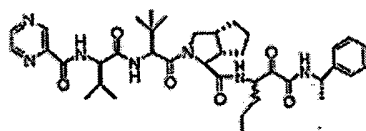
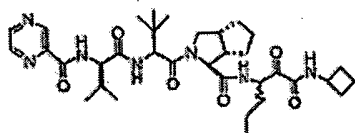


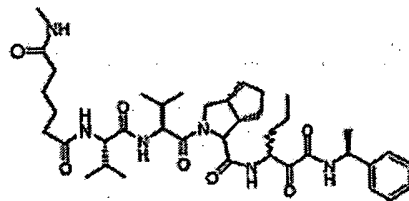
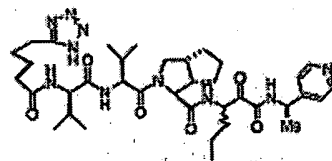
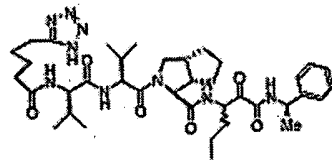
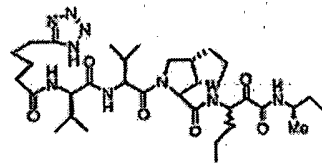
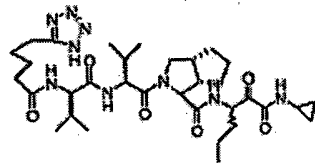
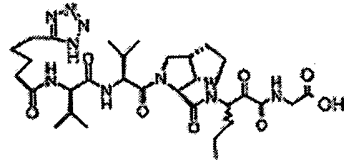
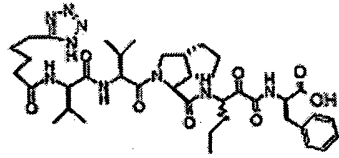


07.04.03



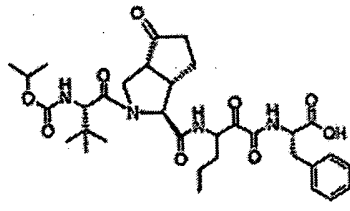
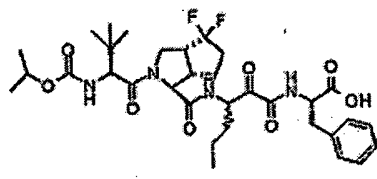
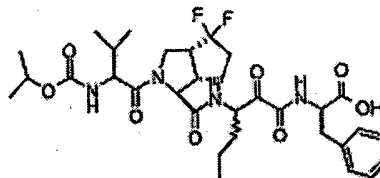
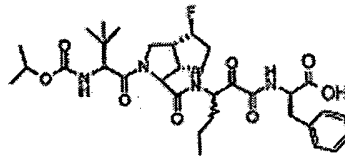
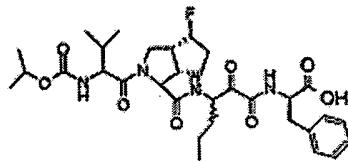
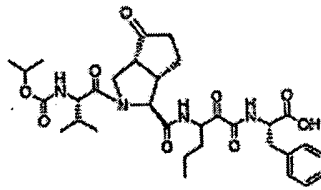
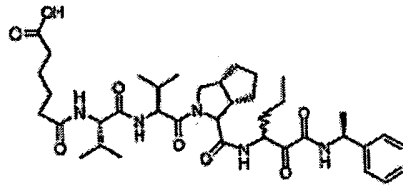
07.04.03



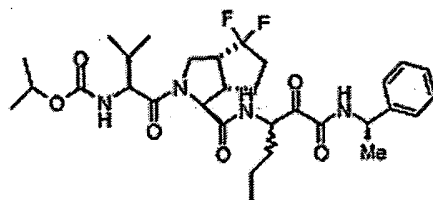
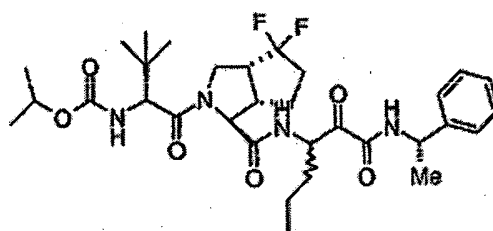
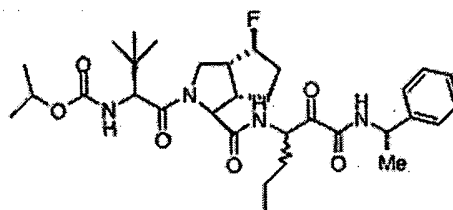
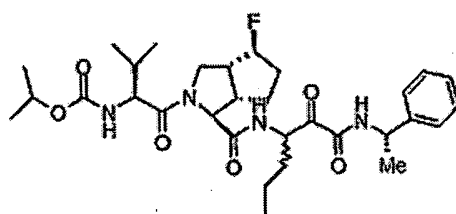
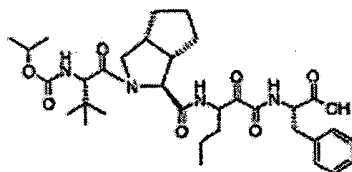
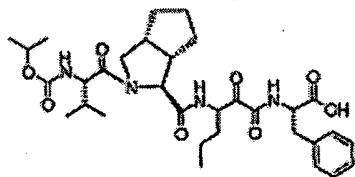


07.04.03

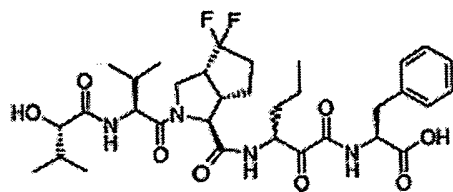
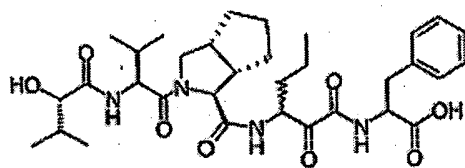
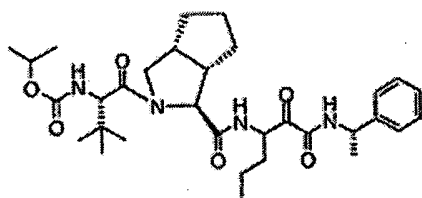
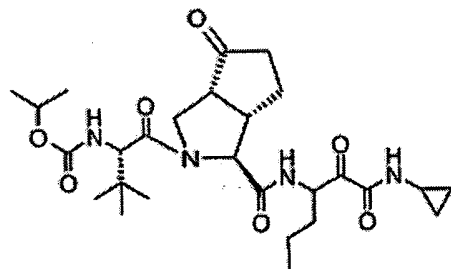
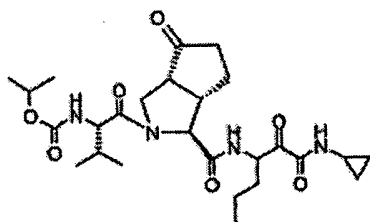
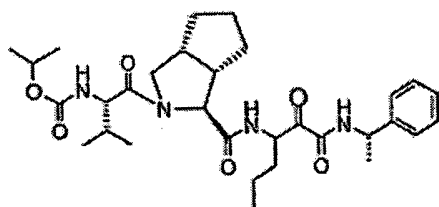
- 576 -

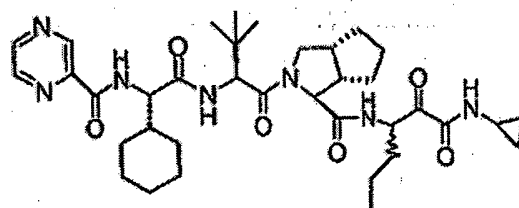
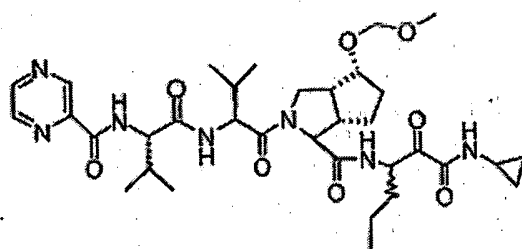
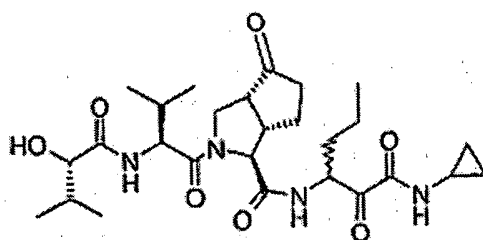
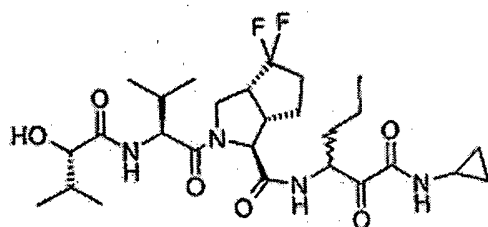
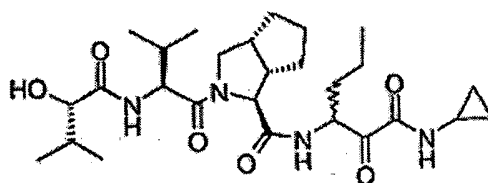
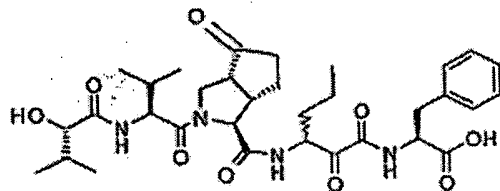


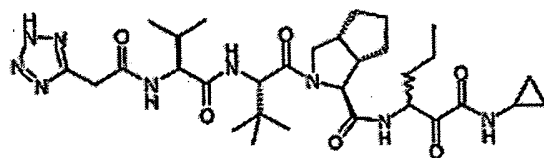
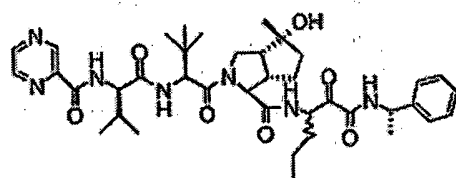
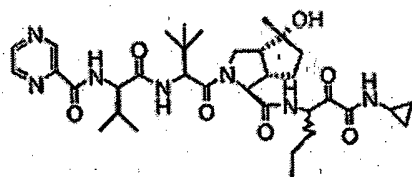
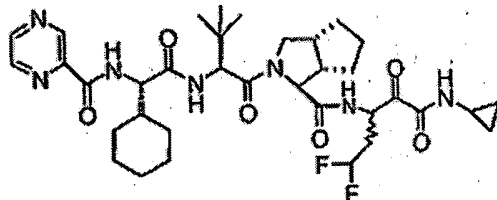
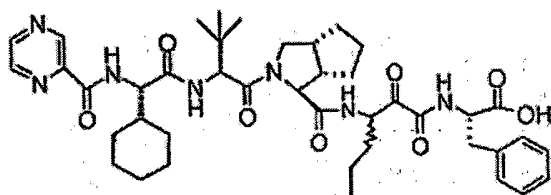
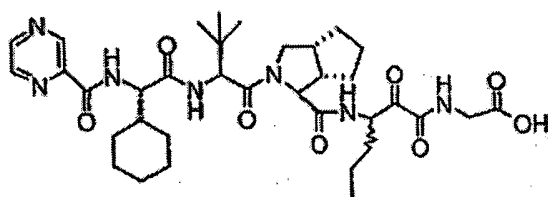
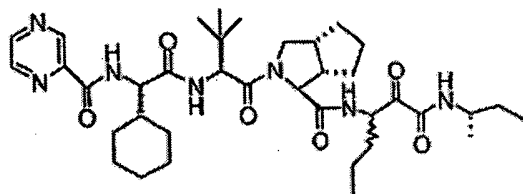
07.04.03



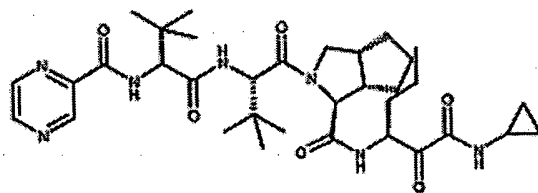
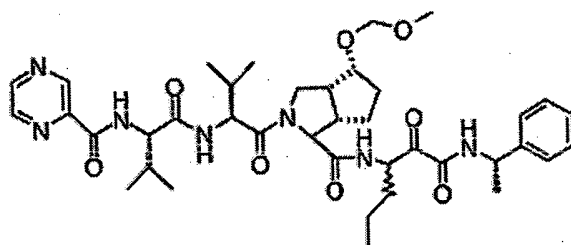
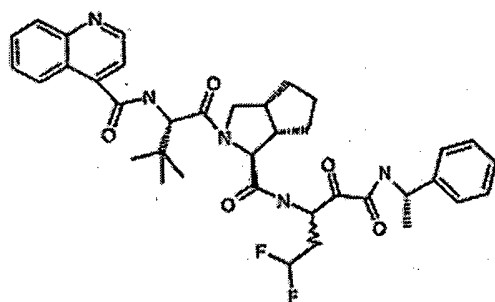
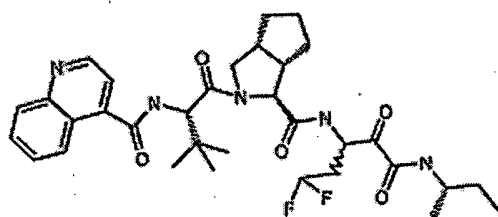
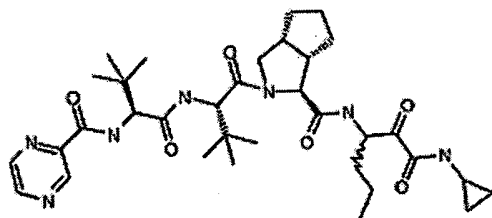
07.04.03

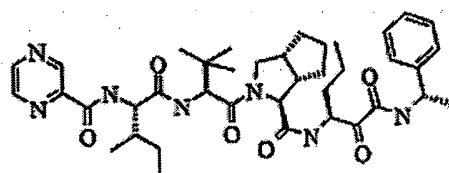
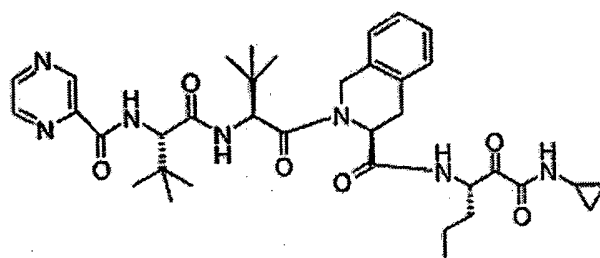
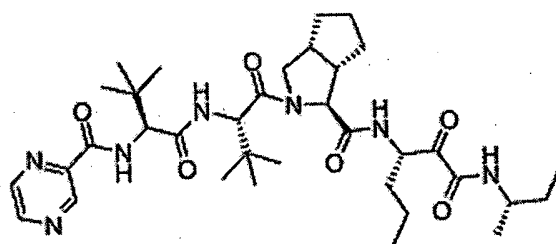
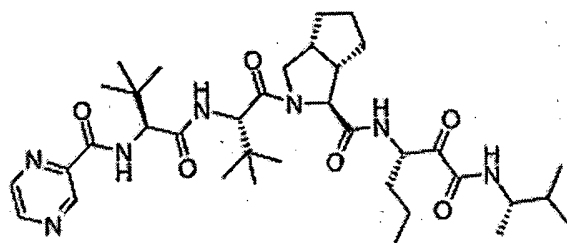
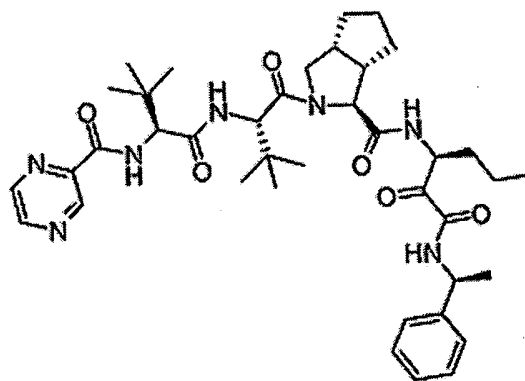




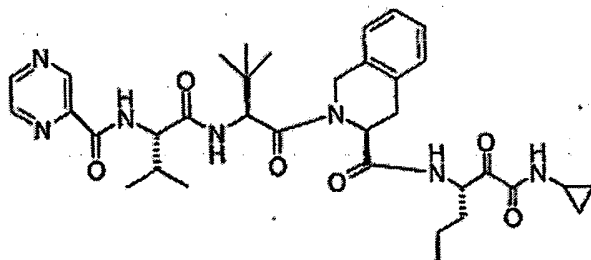
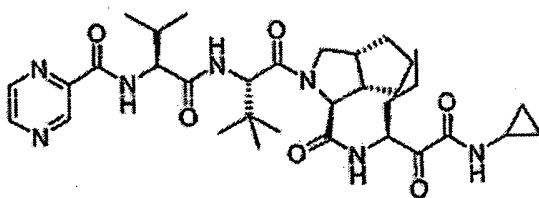
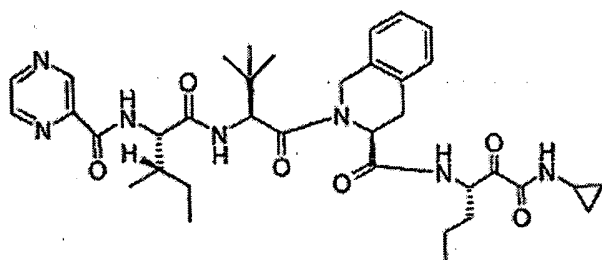
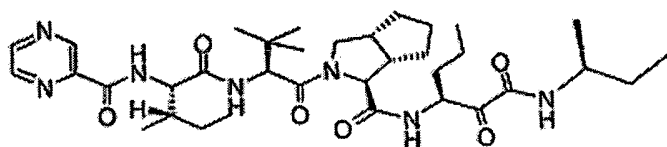
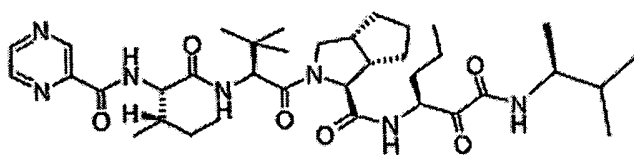
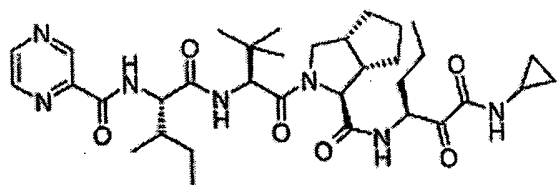


07.04.03

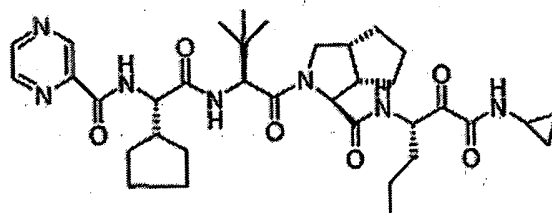
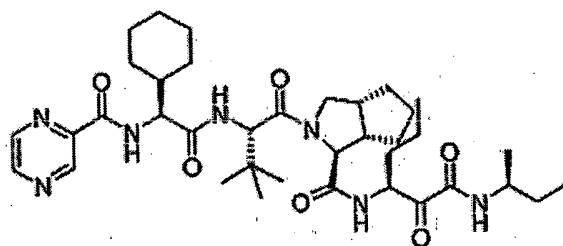
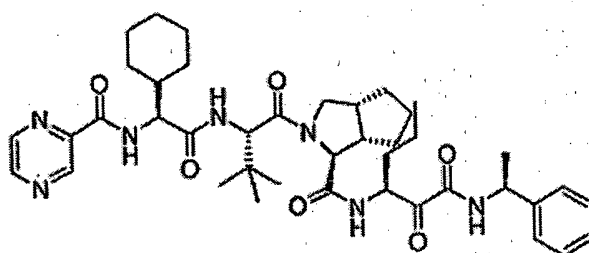
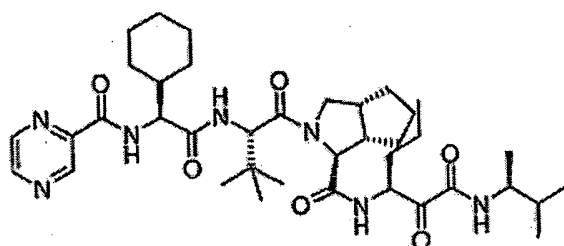
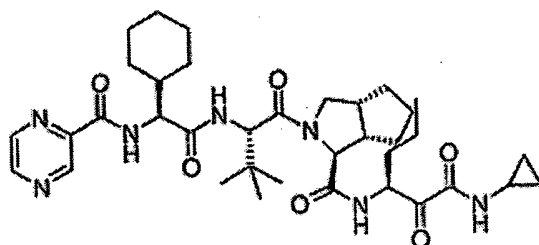




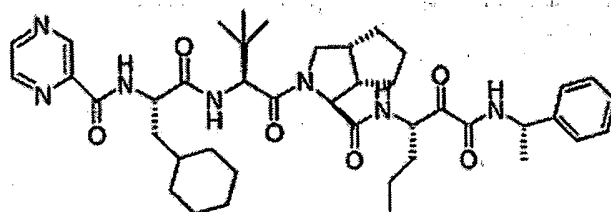
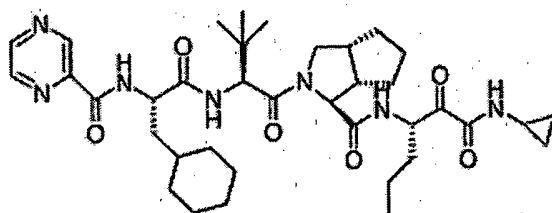
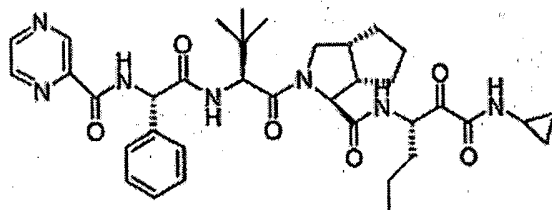
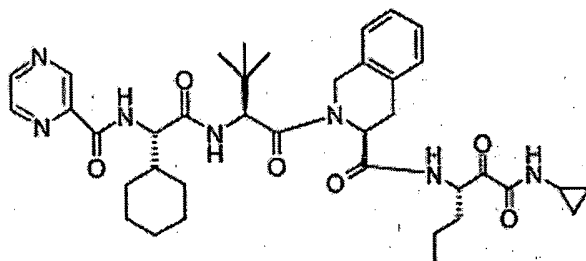
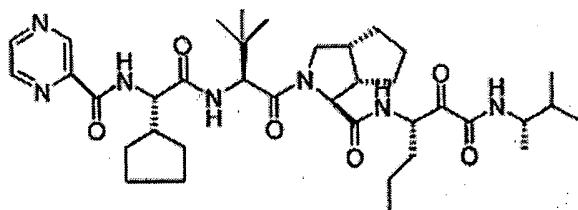
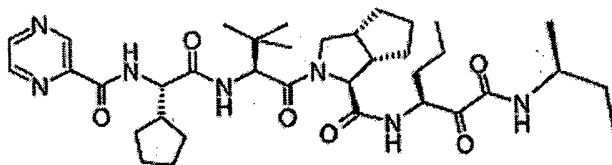
07.04.03



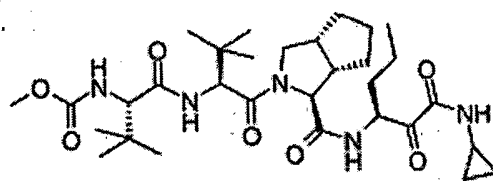
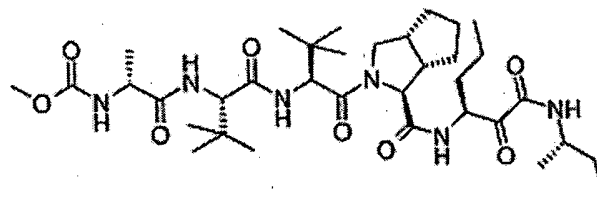
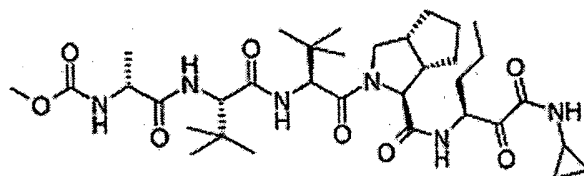
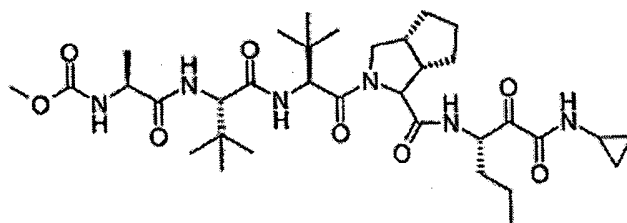
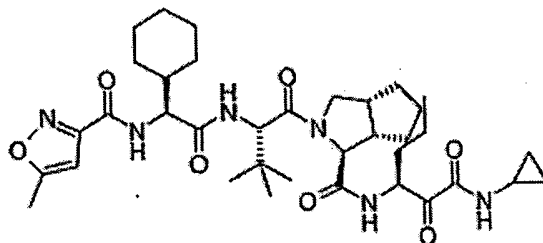
07.04.03



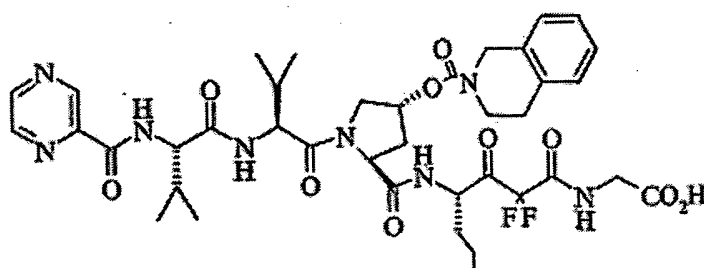
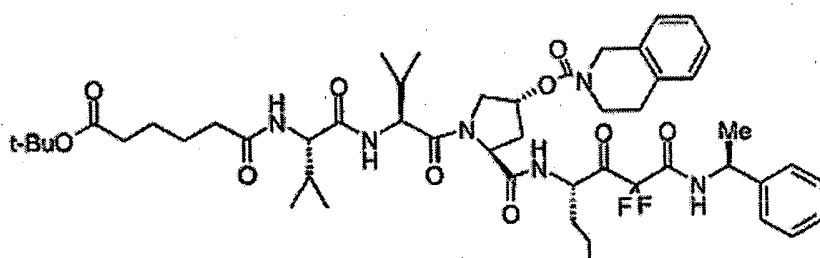
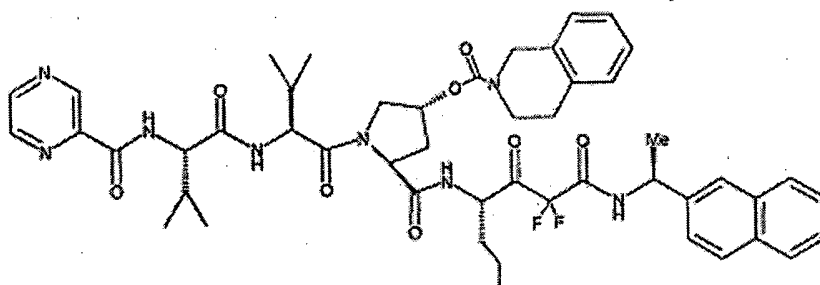
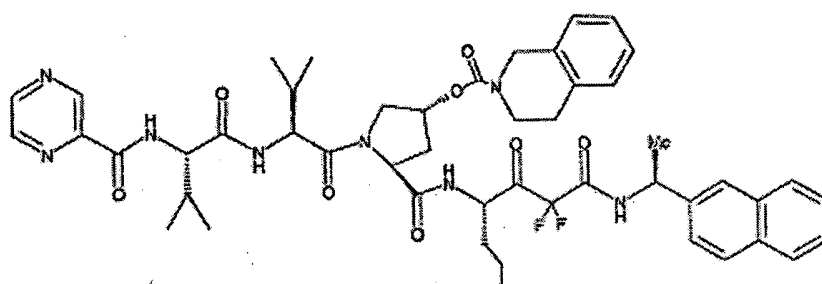
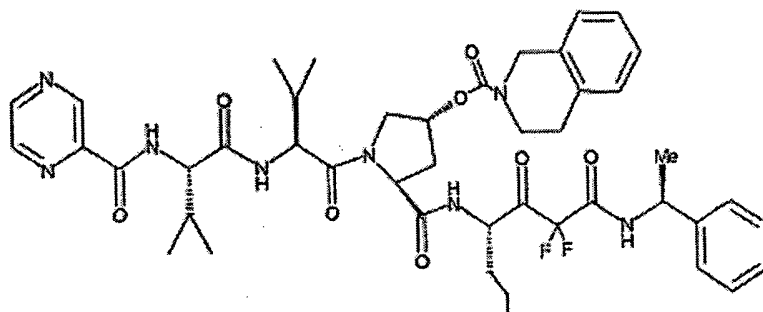
07.04.03



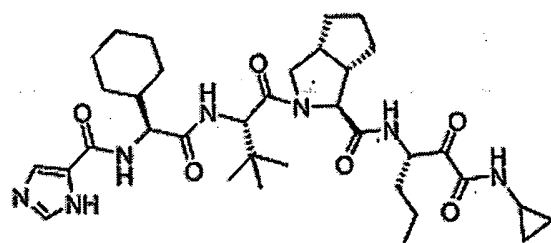
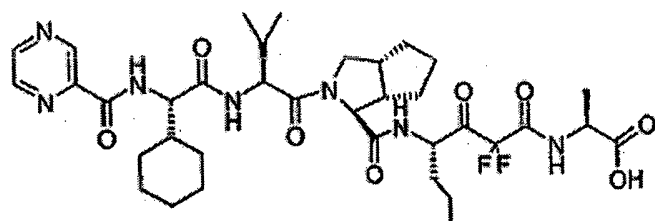
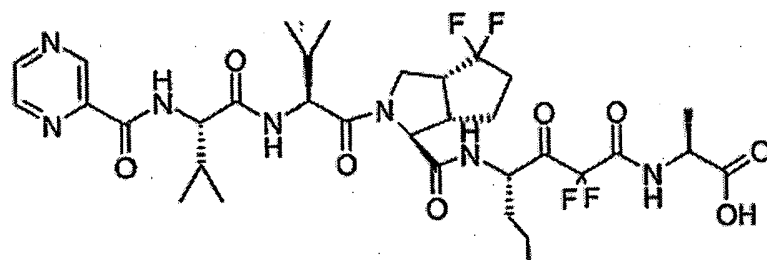
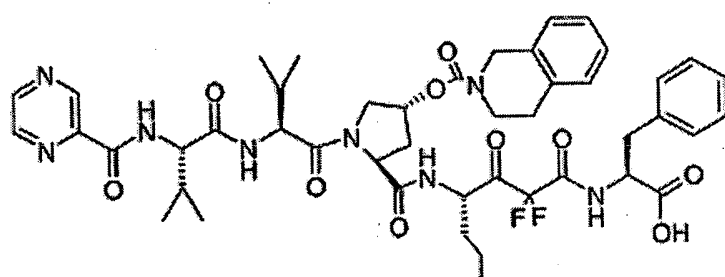
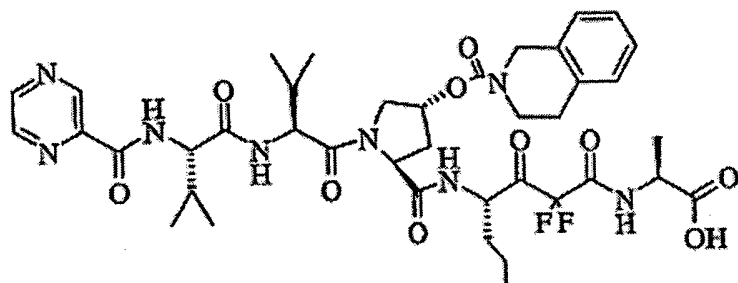
07.04.03



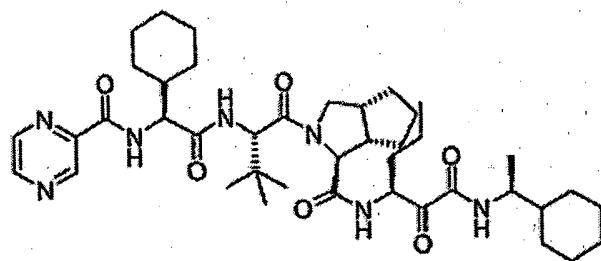
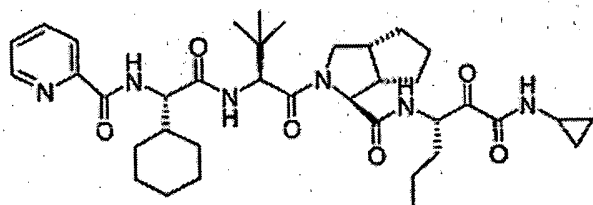
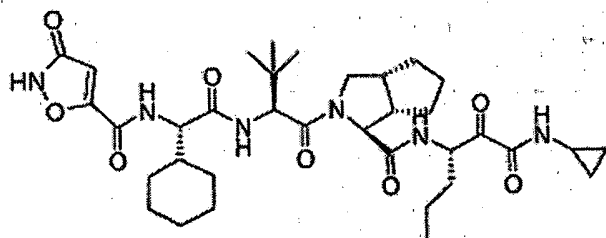
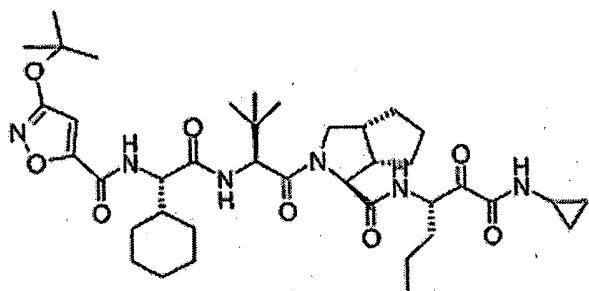
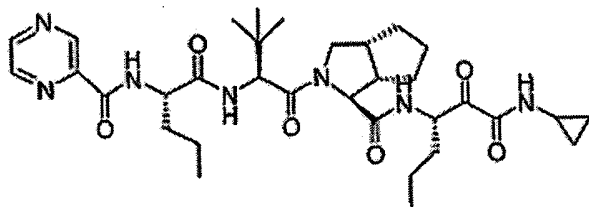
07.04.03



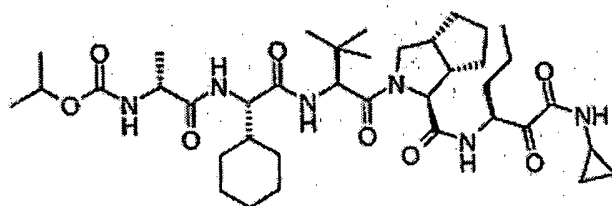
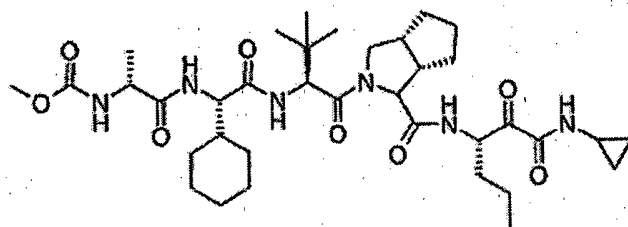
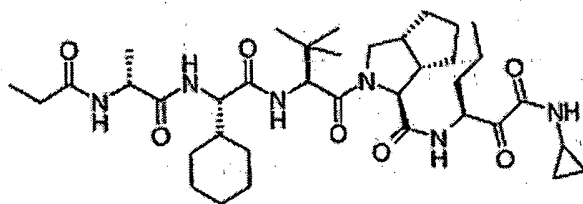
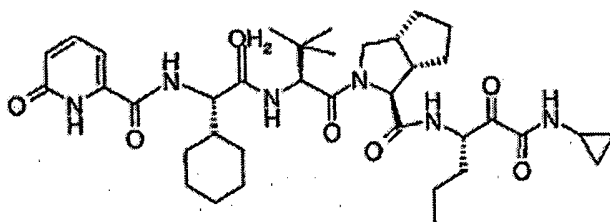
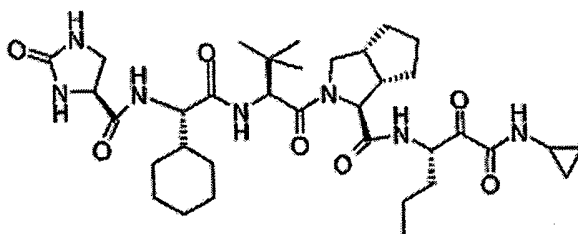
07.04.03

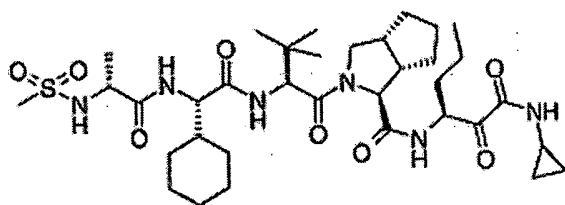
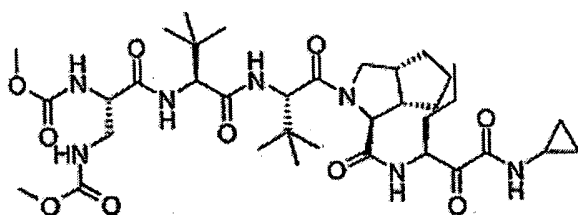
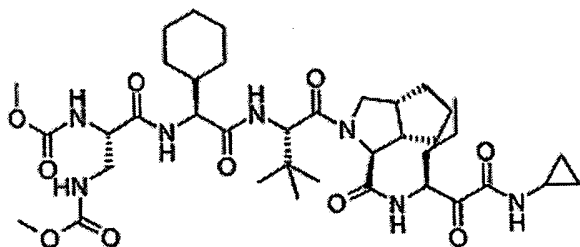


07.04.03

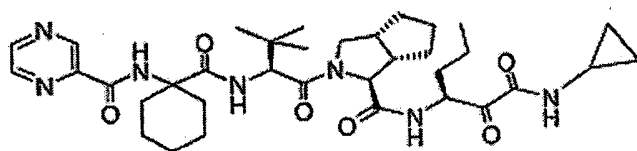


07.04.03

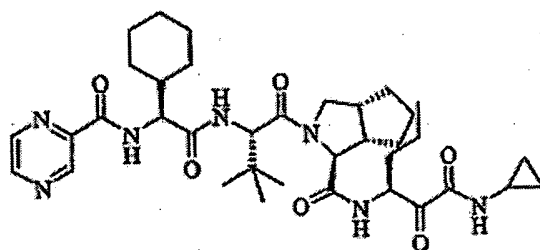




, and



161. Sloučenina obecného vzorce



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru.

162. Sloučenina podle nároku 1 nebo 2, kde:

R^0 je vazba;

R^1 je atom vodíku;

R^2 je nižší alkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 substituenty alifatických skupin; nebo

nižší cykloalkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 substituenty cyklických skupin;

R^3 a R^5 jsou každý nezávisle methylen popřípadě substituovaný 1 až 3 alifatickými substituenty;

R^4 , R^6 , R^8 a R^{10} jsou atom vodíku;

R^7 je methylen substituovaný skupinou cykloalkyl, nižší alkyl nebo aryl; nebo (1,1- nebo 1,2-)cykloalkenyl popřípadě substituovaný skupinou cykloalkyl, nižší alkyl nebo aryl;

R^9 je nižší alkyl popřípadě substituovaný 1 až 3 substituenty alifatických skupin; nebo heteroaryl popřípadě substituovaný 1 až 3 substituenty cyklických skupin; nebo heterocyklická skupina popřípadě substituovaná 1 až 3 substituenty cyklických skupin;



je monocyklický azaheterocyklyl, multicyklický azaheterocyklyl nebo multicyklický azaheterocyklenyl popřípadě substituovaný 1 až 3 substituenty cyklických skupin; a

L je $-C(O)-$, $-OC(O)-$.

163. Sloučenina podle nároku 163, kde:

substituenty alifatických skupin znamenají aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfono, alkylsulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-methoxykarbamoyl, heteroarylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinyl nebo hydroxyheteroaryl jako je 3-hydroxyisoxazolyl, 3-hydroxy-1-methylpyrazolyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfiny, cyklylsulfiny, arylsulfiny, heteroarylsulfiny, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$), thioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$, nebo $Y^3SO_2NY^1-$, kde R^2 je jak zde bylo definováno, Y^1 a Y^2 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, a Y^3 je alkyl, cykloalkyl aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3$ nebo $Y^1Y^2NSO_2$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem

dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl;

substituenty skupiny kruhů znamená aryl, heteroaryl, hydroxy, alkoxy, cyklyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, acyl nebo jeho thioxo analog, cyklylkarbonyl nebo jeho thioxo analog, aroyl nebo jeho thioxo analog, heteroaroyl nebo jeho thioxo analog, acyloxy, cyklylkarbonyloxy, aroyloxy, heteroaroyloxy, halogen, nitro, kyano, karboxy (kyselina), kyselý bioster, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl, heteroaryloxykarbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfiny, cyklylsulfiny, arylsulfiny, heteroarylsulfiny, alkylthio, cyklylthio, arylthio, heteroarylthio, cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, thiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, kde Y^1 , Y^2 a Y^3 jsou nezávisle atom vodíku, skupiny alkyl, aryl nebo heteroaryl, nebo pokud substituent je Y^1Y^2N- , potom jeden z Y^1 a Y^2 může být acyl, cyklylkarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoxykarbonyl, cyklyloxykarbonyl, aryloxykarbonyl nebo heteroaryloxykarbonyl, jak zde byly definovány a druhý z Y^1 a Y^2 je jako bylo definováno výše, nebo pokud substituent je $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ nebo $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 a Y^2 mohou také spolu s atomem dusíku kterým jsou Y^1 a Y^2 vázány, vytvářet 4 až 7 členný azaheterocyklyl nebo azaheterocyklenyl, nebo pokud systém kruhů je nasycený nebo částečně nasycený, "substituenty skupiny kruhů" dále zahrnují methylen ($H_2C=$), oxo ($O=$) a thioxo ($S=$);

aryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů obsahující 6 až 14 atomů uhlíku;

cykloalkyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomů uhlíku;

cykloalkenyl znamená nearomatický mono- nebo multicyklický systém kruhů s 3 až 10 atomy uhlíku, který obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu uhlík-uhlík;

cyklyl znamená cykloalkyl, cykloalkenyl, heterocyklyl nebo heterocyklenyl;

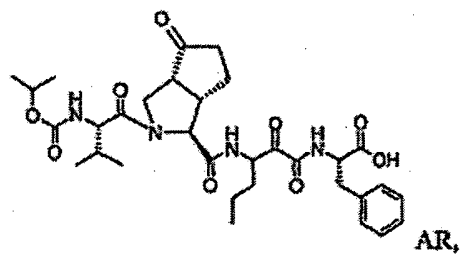
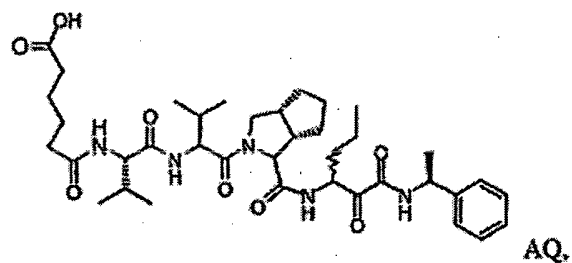
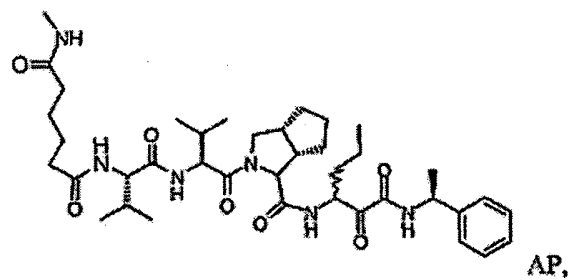
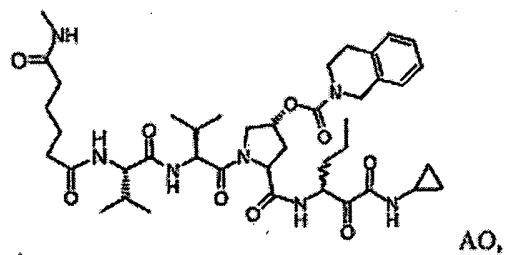
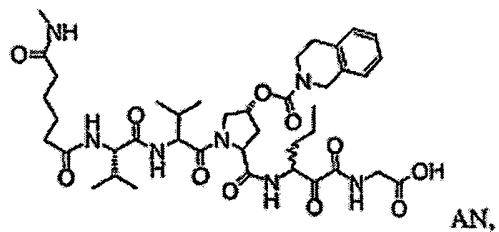
heterocyklyl znamená nearomatický nasycený monocyklický nebo multicyklický systém kruhů obsahující od přibližně 3 do přibližně 10 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatomy jiné než uhlík; a

heteroaryl znamená aromatický monocyklický nebo multicyklický systém kruhů s od přibližně 5 do přibližně 14 atomů uhlíku, ve kterém jeden nebo více atomů v kruhovém systému je/jsou heteroatomy jiné než uhlík.

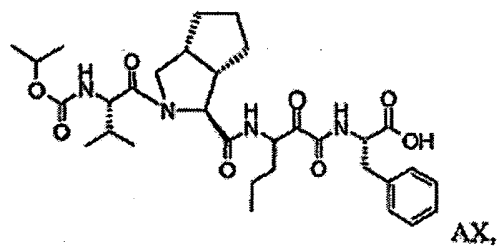
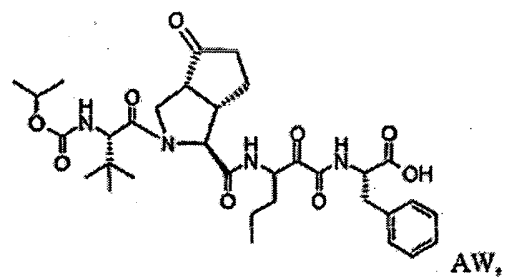
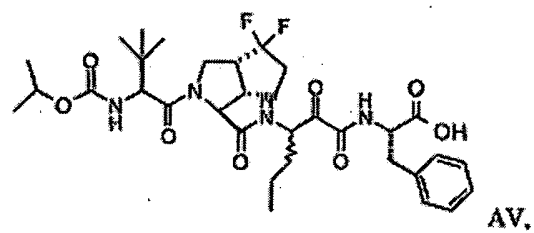
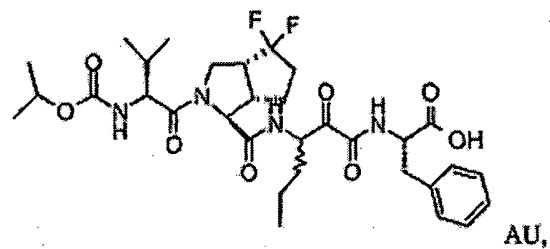
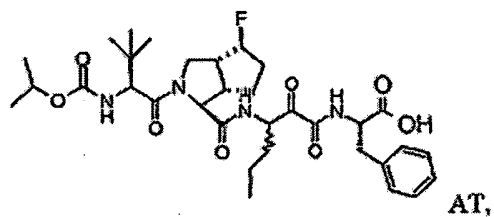
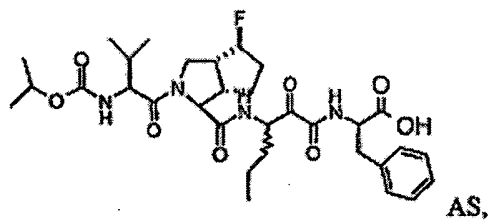
164. Libovolná sloučenina nebo syntetický meziprodukt popsané v této přihlášce.

165. Sloučenina zvolená ze souboru, zahrnujícího:

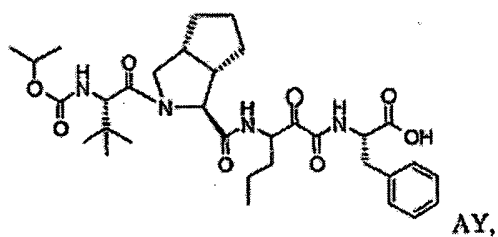
07.04.03



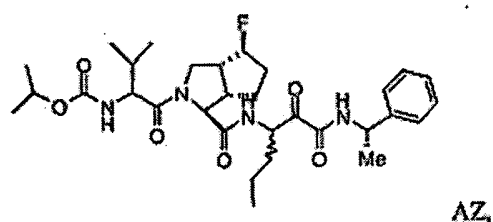
07.04.03



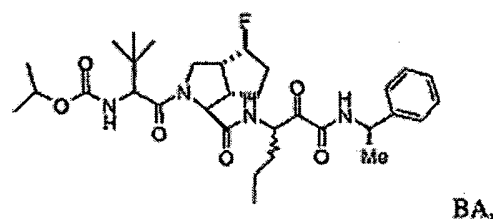
07.04.03



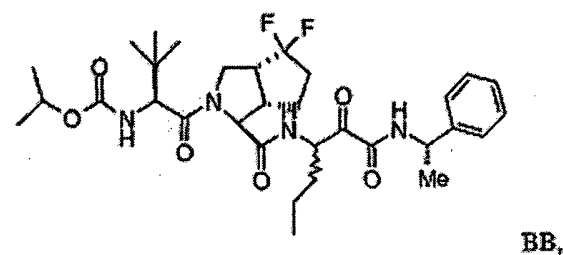
AY,



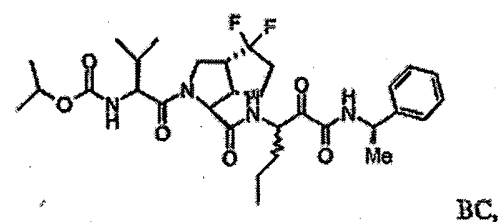
AZ,



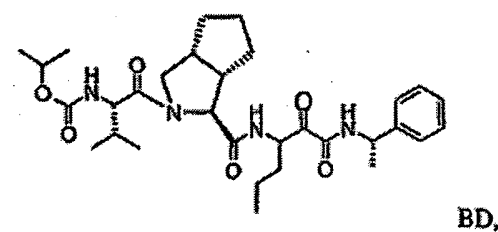
BA,



BB,

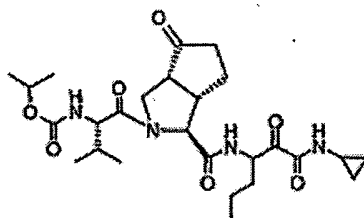


BC,

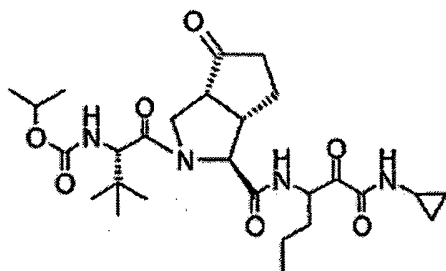


BD,

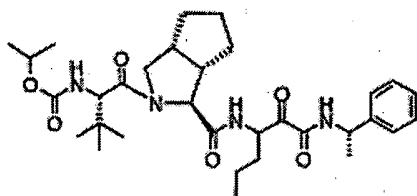
07.04.03



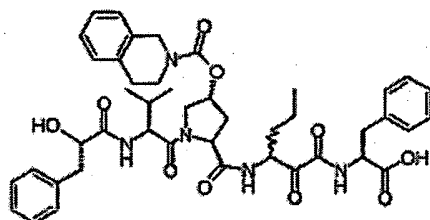
BE,



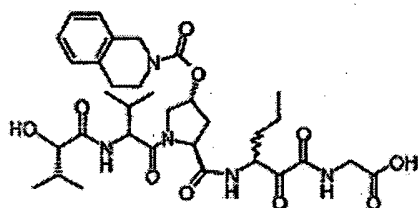
BF,



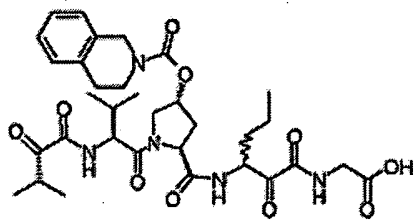
BG,



BH,

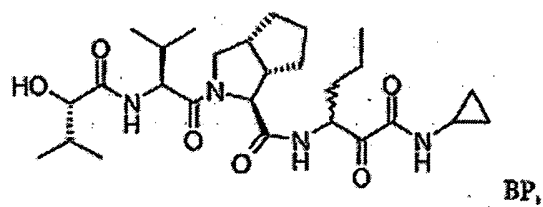
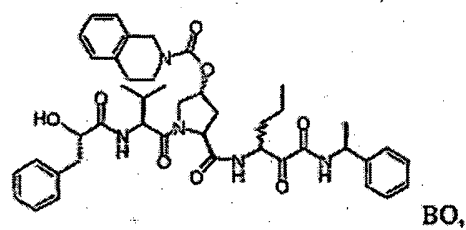
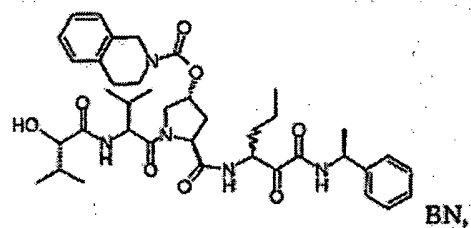
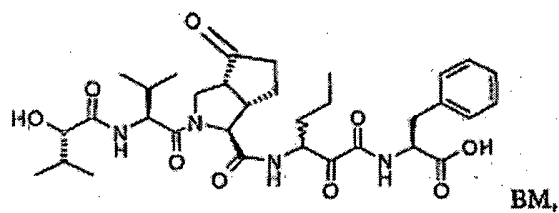
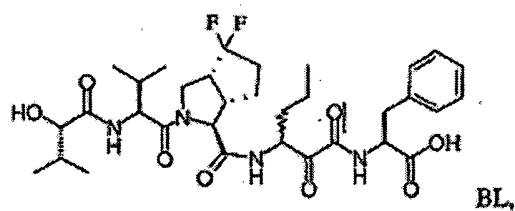
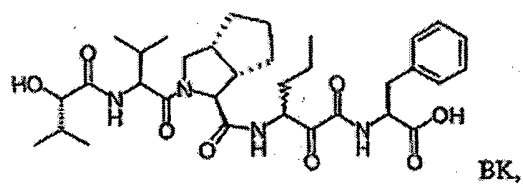


BI,

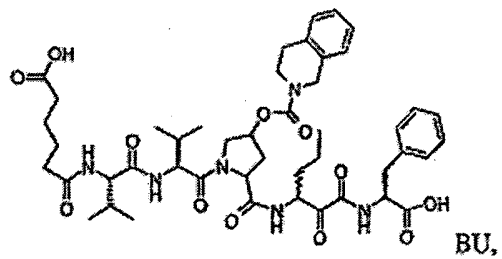
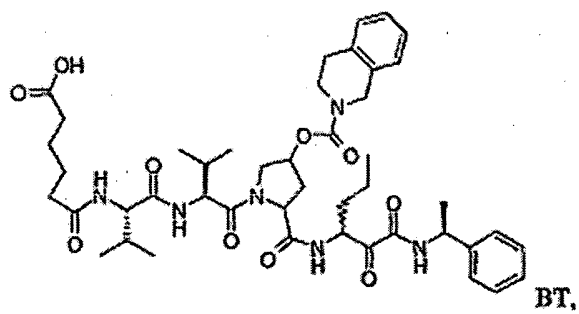
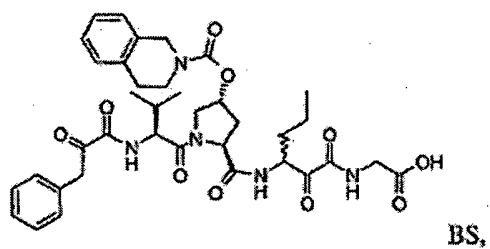
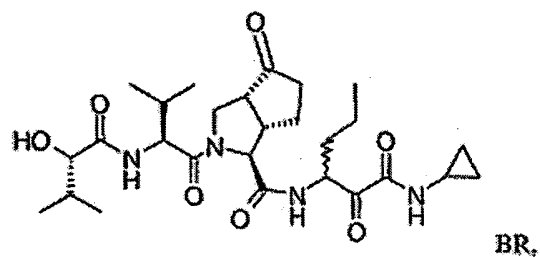
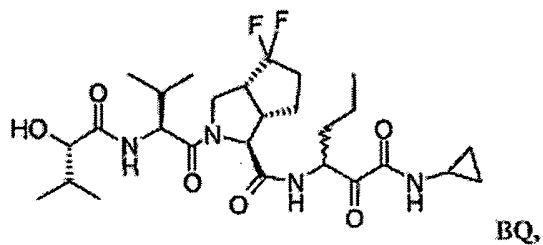


BJ,

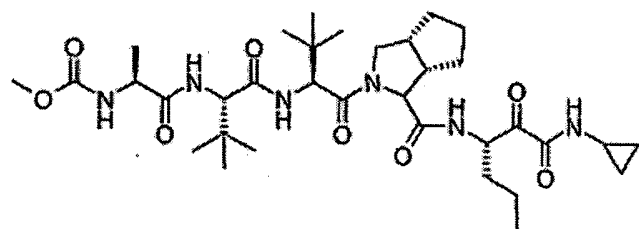
07.04.03



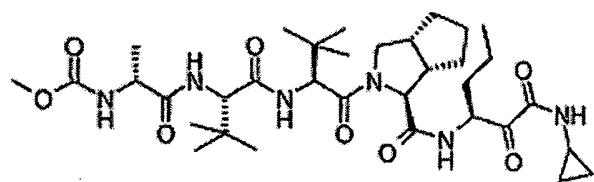
07.04.03



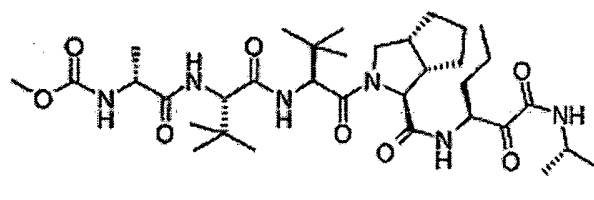
07.04.03



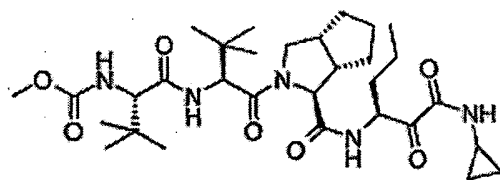
DG,



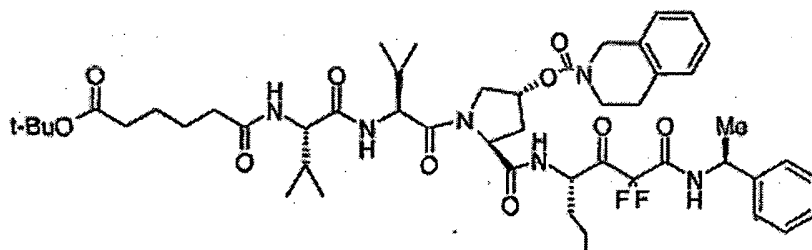
DH,



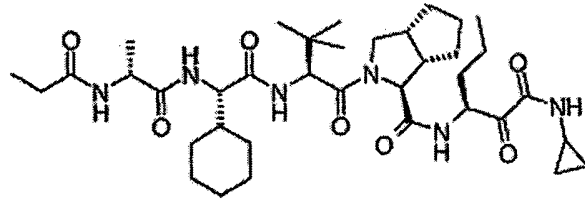
DI,



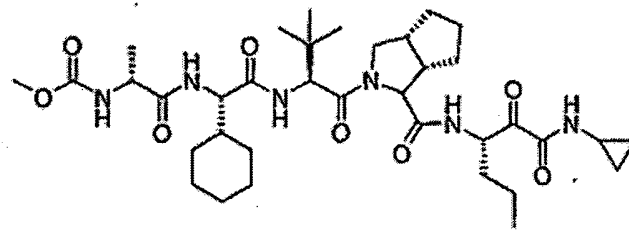
DJ,



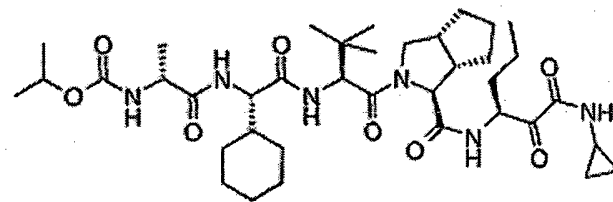
DN,



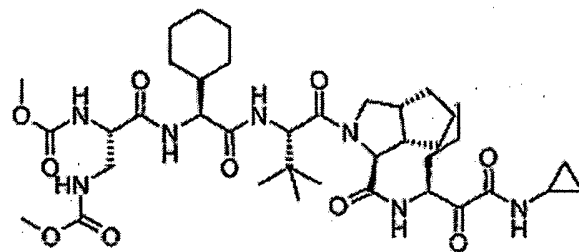
EB,



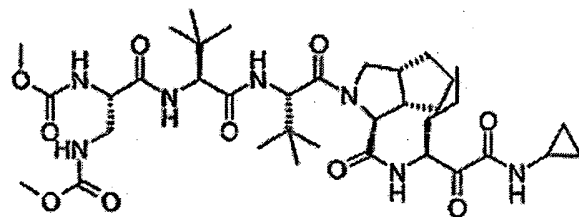
EC,



ED,

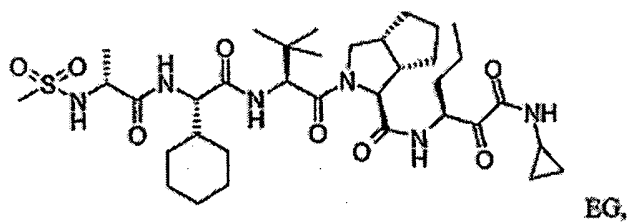


EE,

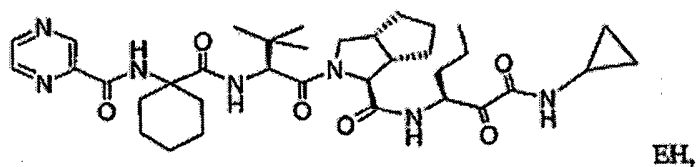


EF,

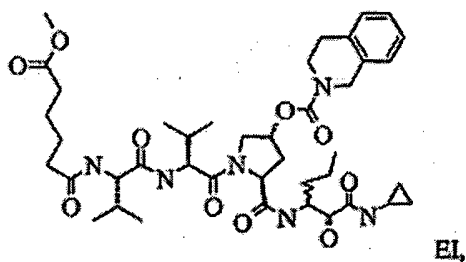
07.04.03



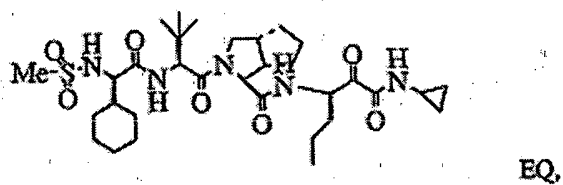
EG,



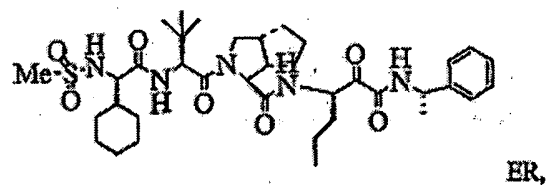
EH,



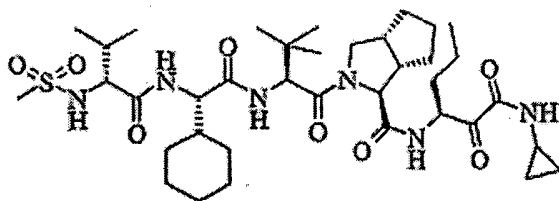
EI,



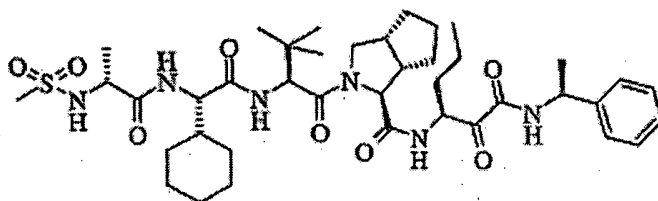
EQ,



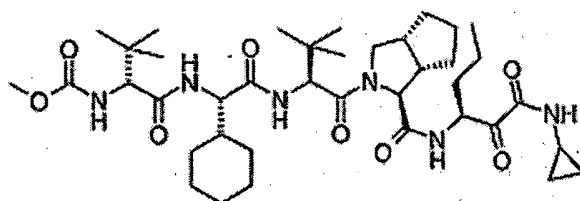
ER,



EW,



EX,



EY,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo prekurzor, nebo solvát takové sloučeniny, její soli nebo jejího prekurzoru.

166. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1, 2, 162 nebo 163, kde popřípadě substituovaná alifatická skupina, popřípadě substituovaná cyklická skupina nebo popřípadě substituovaná aromatická skupina R^9 je substituovaná alespoň jedním heteroarylovým substituentem.

167. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1, 2, 162 nebo 163, kde popřípadě substituovaná aromatická skupina R^9 je popřípadě substituovaný heteroaryl.

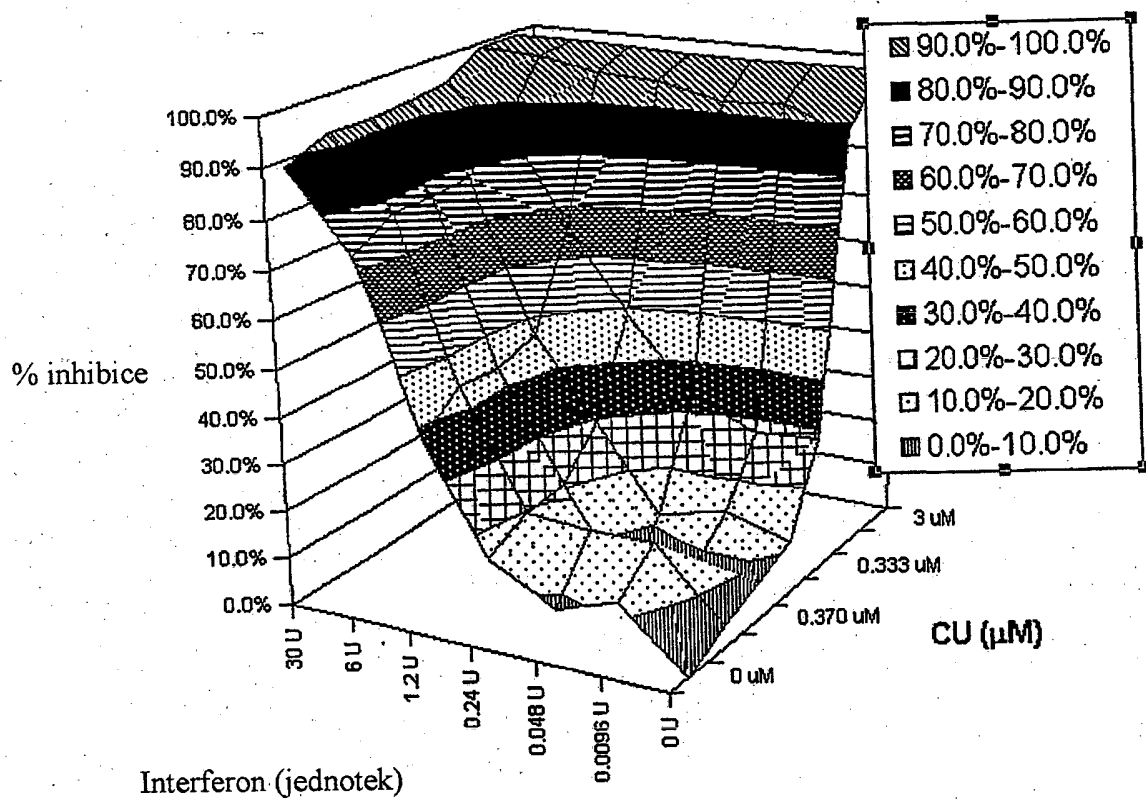
168. Sloučenina podle nároku 166, kde popřípadě substituovaná alifatická skupina R^9 je popřípadě substituovaný alkylheteroaryl.

Zastupuje:

Dr. O. Švorčík

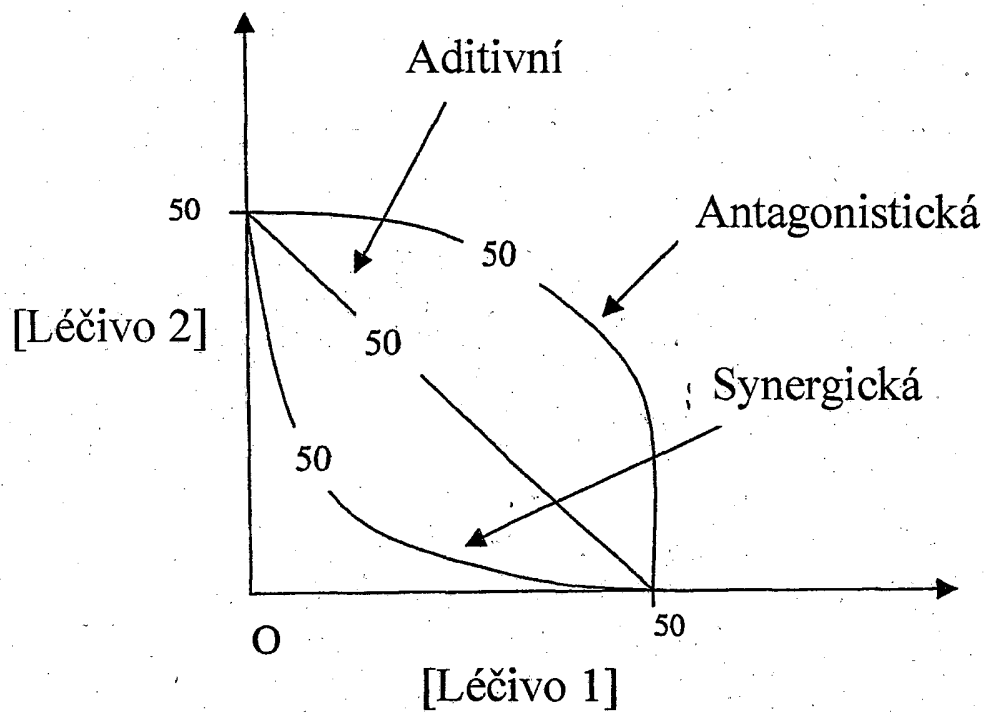
Obr. 1

Kombinační léčba interferonem alfa-2B a sloučeninou CU

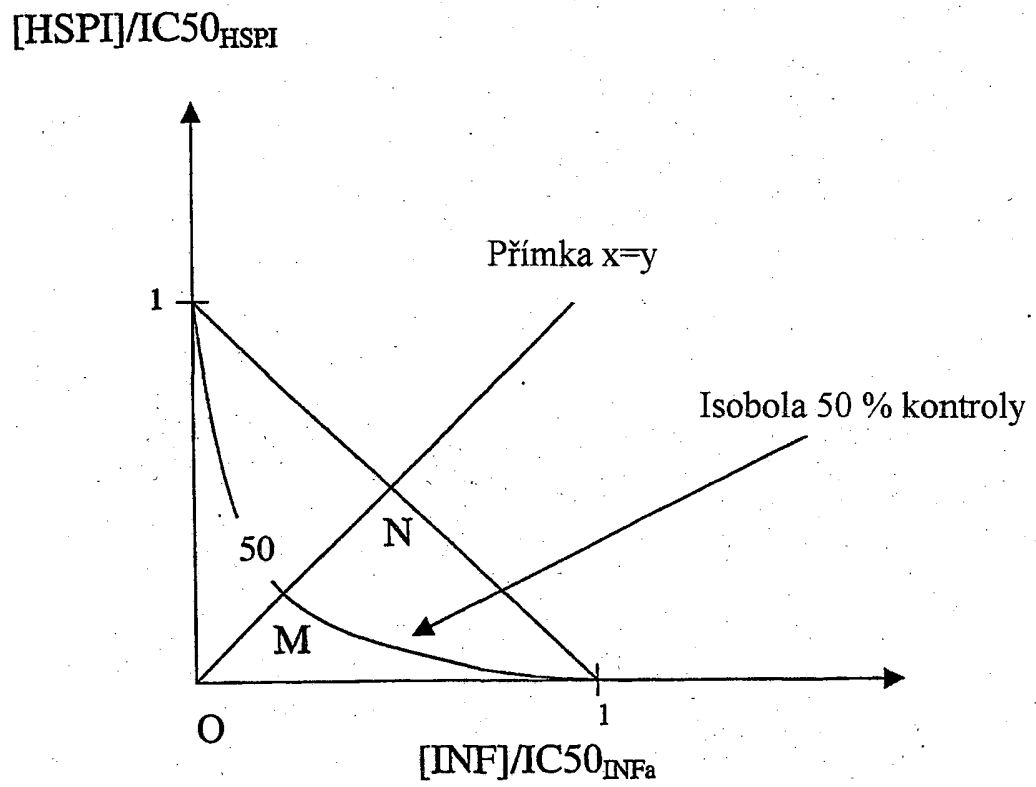


Obr. 2

Isoboly 50 % kontroly



Obr. 3

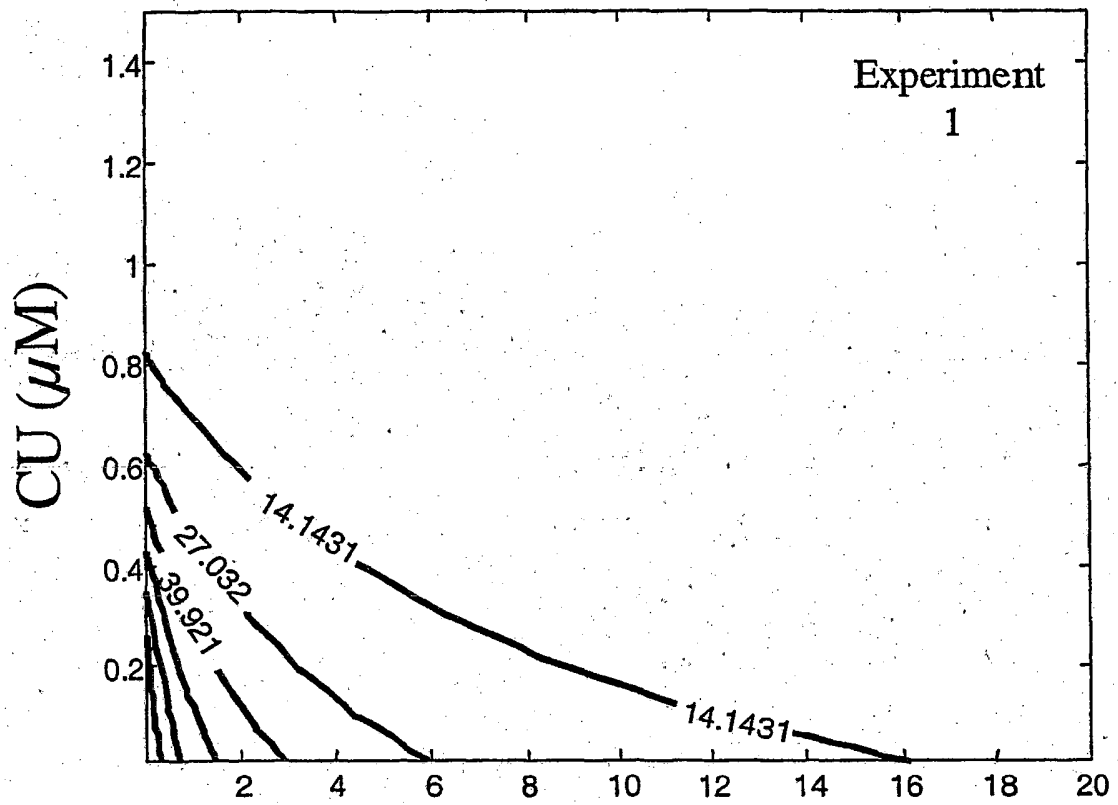


07.04.03

4/14

2003-595

Obr. 4



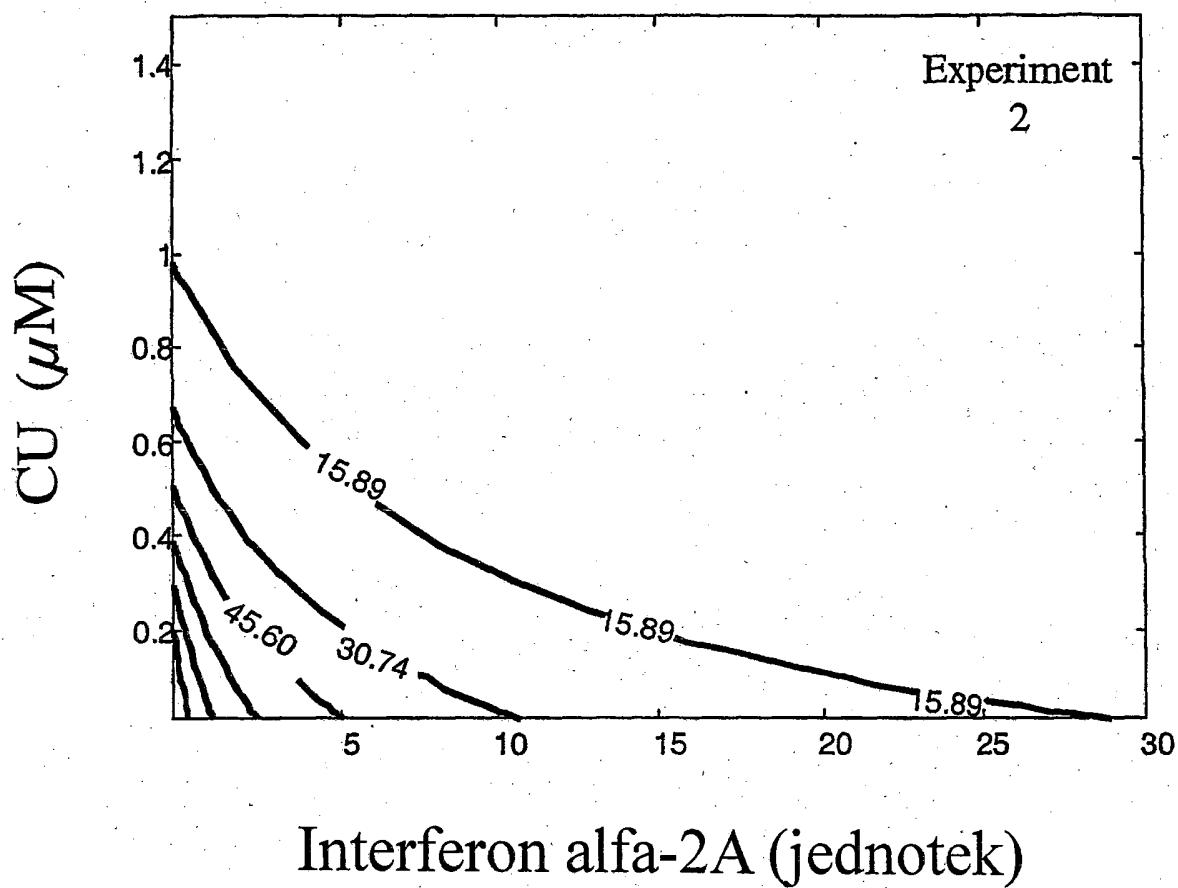
Interferon alfa-2B (jednotek)

07.04.03

5/14

2003-595

Obr. 5

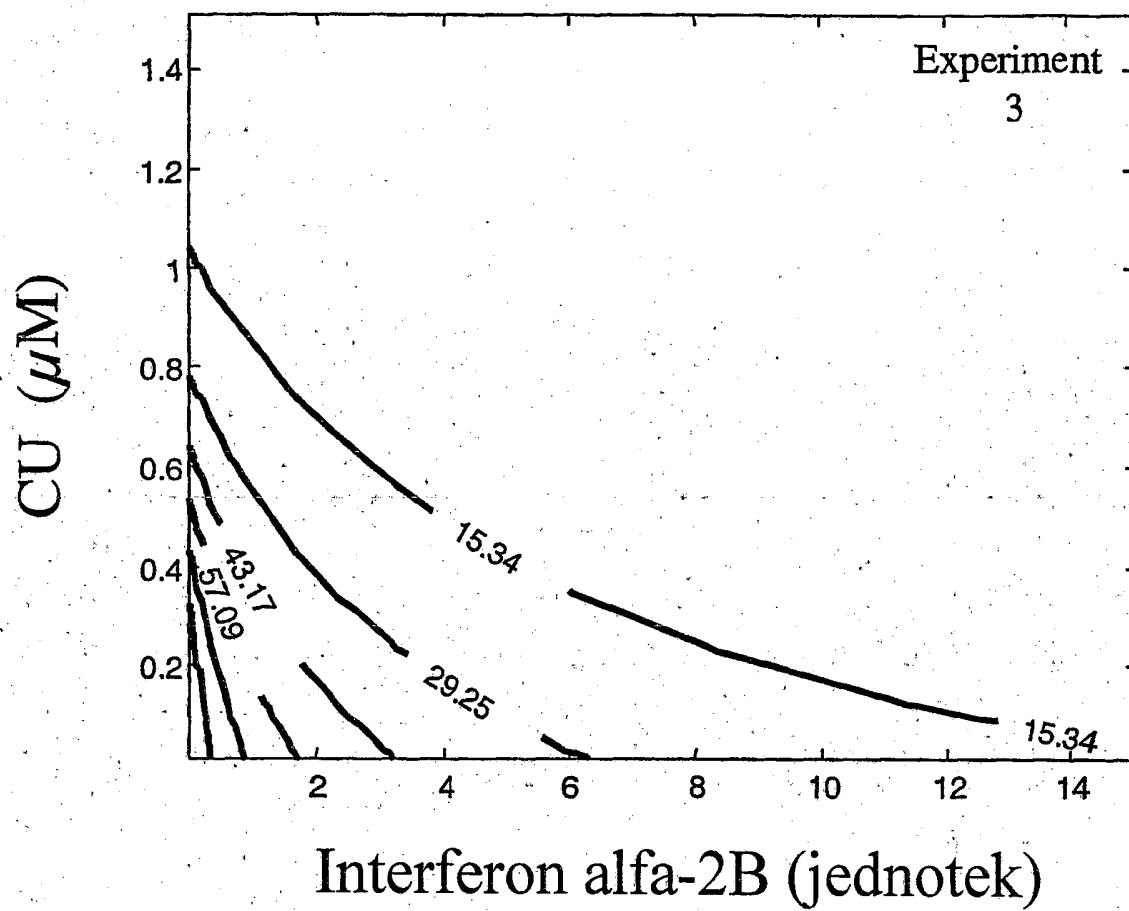


07.04.03

6/14

2003-595

Obr. 6

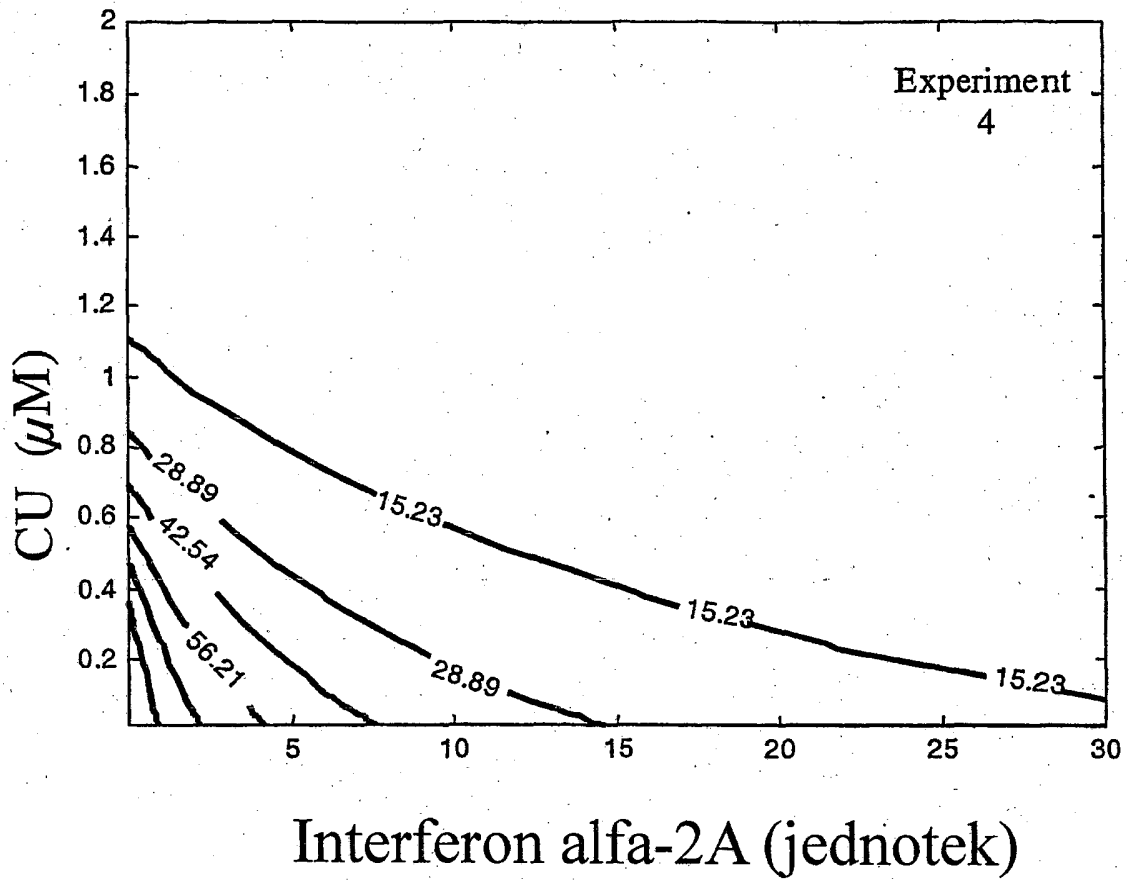


07.04.03

7/14

2003-595

Obr. 7

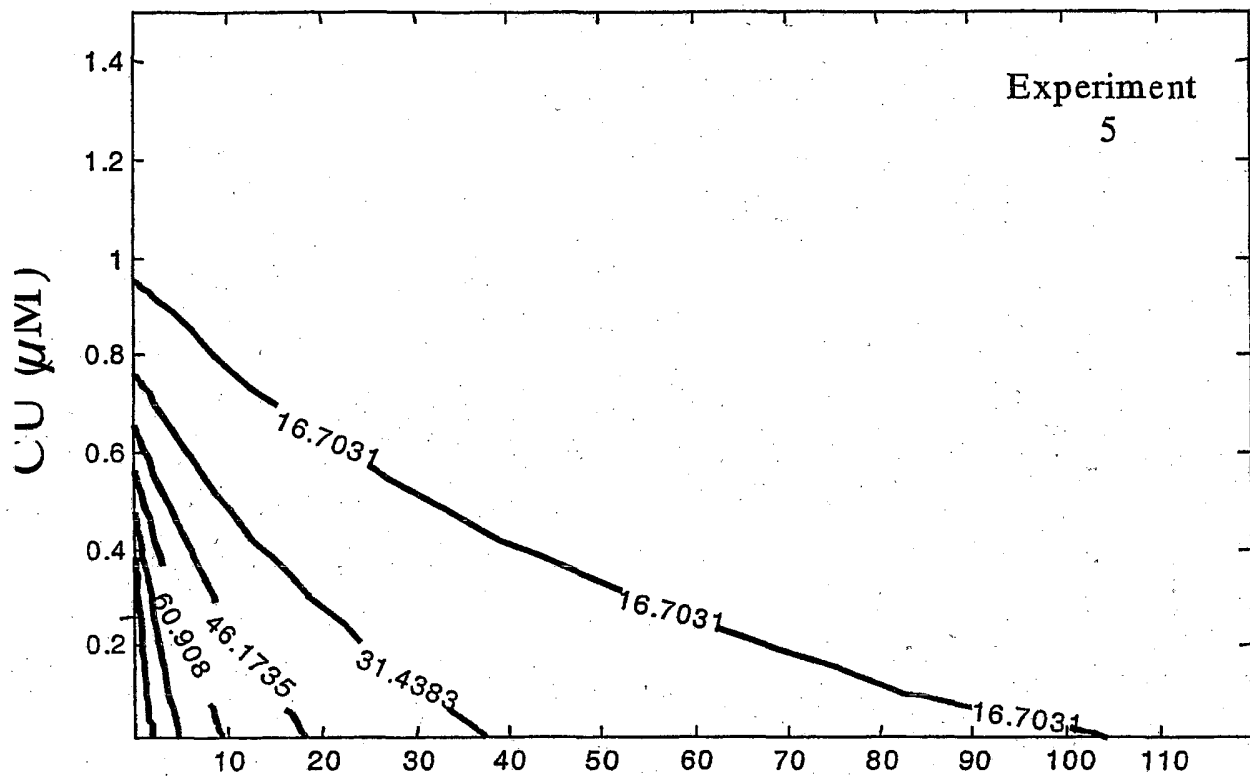


07.04.03

8/14

2003-595

Obr. 8



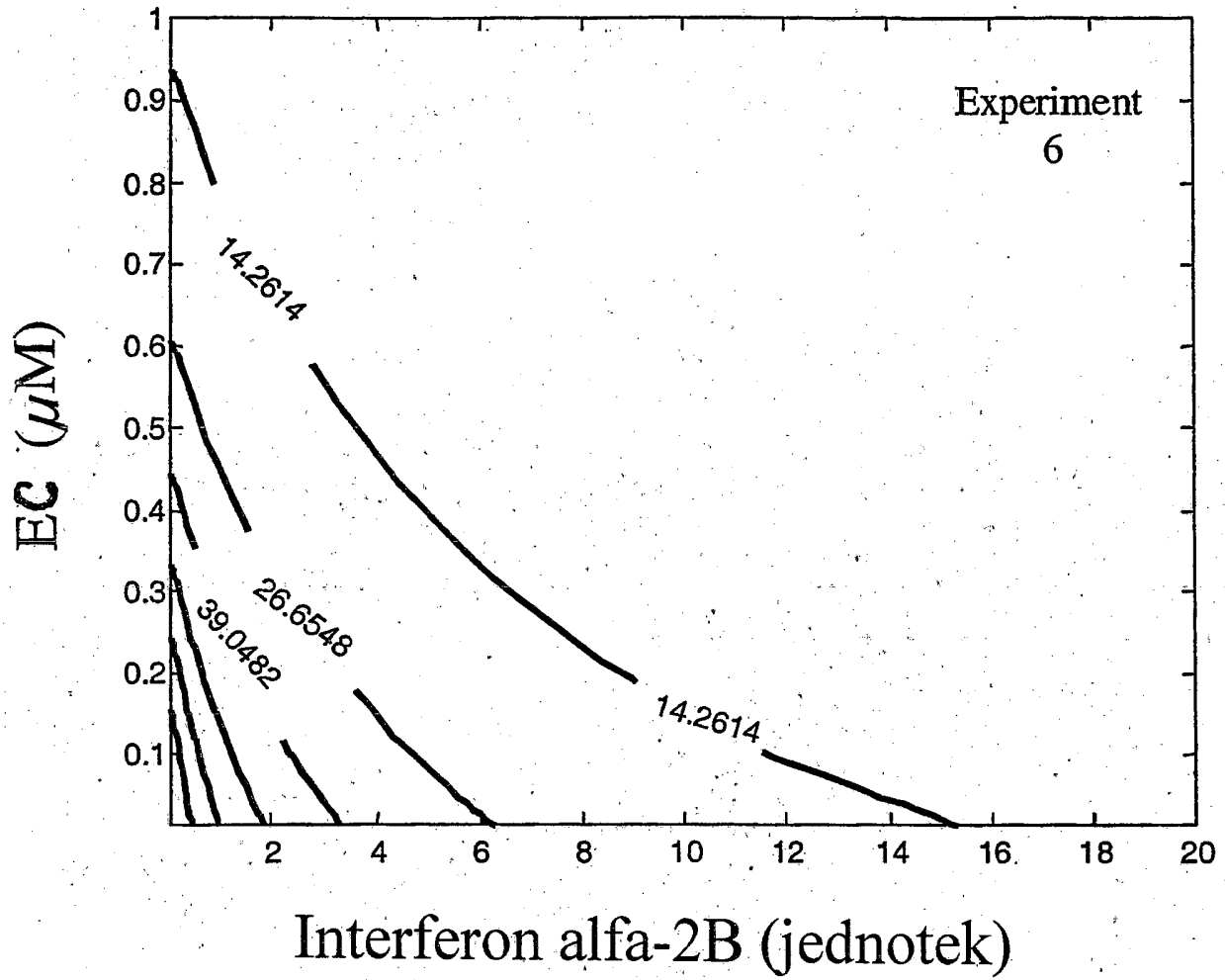
Ovčí interferon tau (jednotek)

07.04.03

9/14

2003-595

Obr. 9

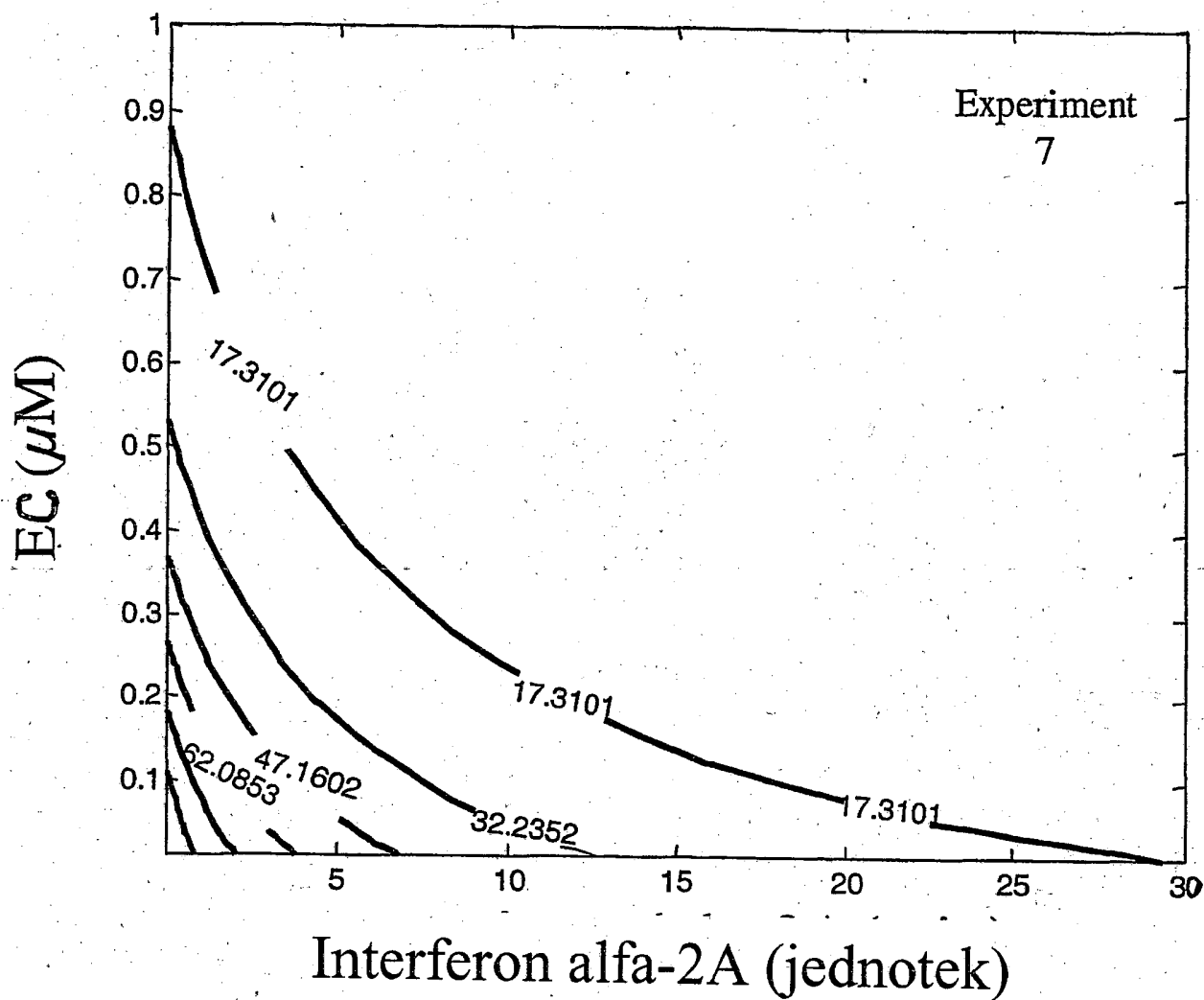


07.04.03

10/14

2003-595

Obr. 10

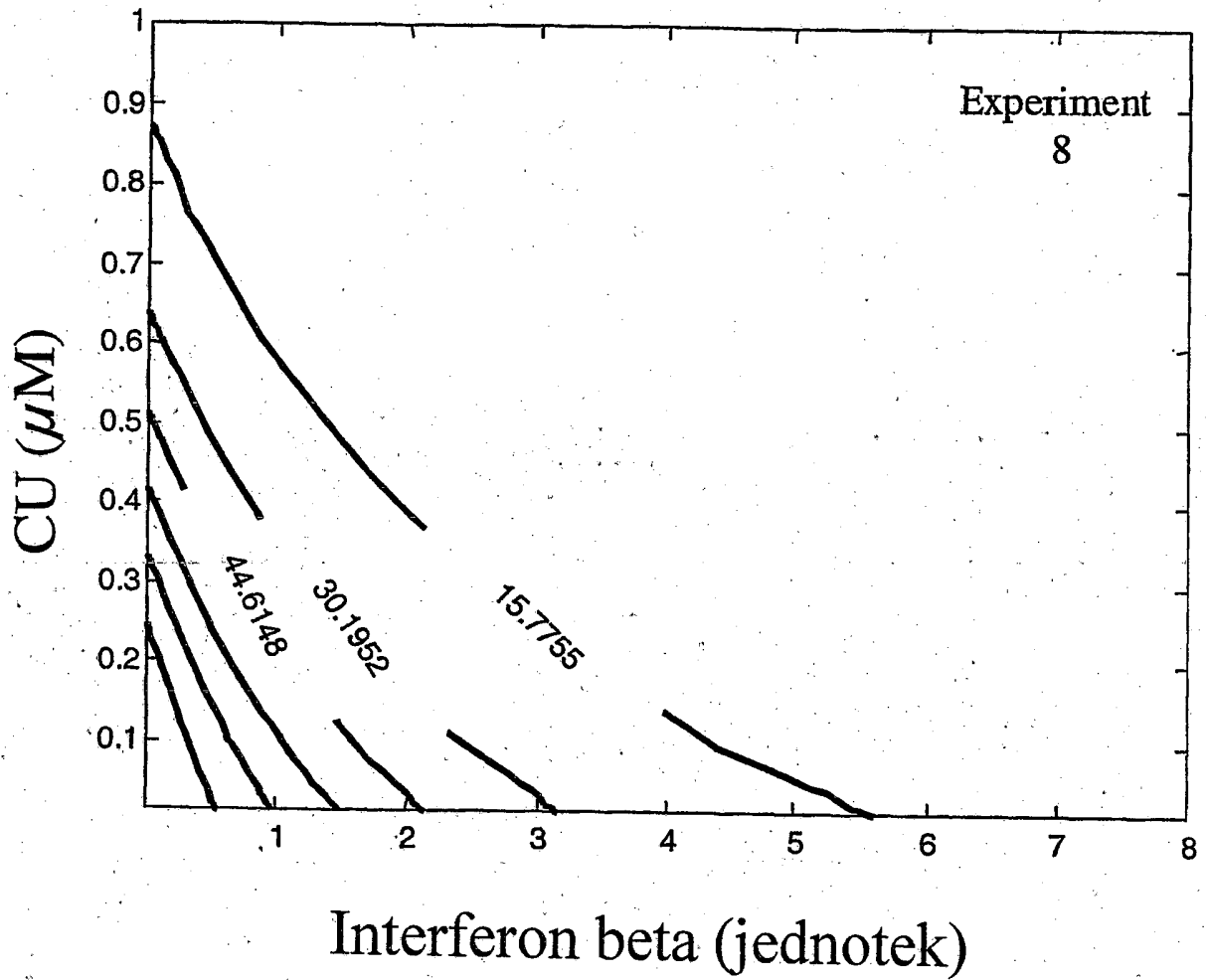


07.04.03

11/14

2003-595

Obr. 11

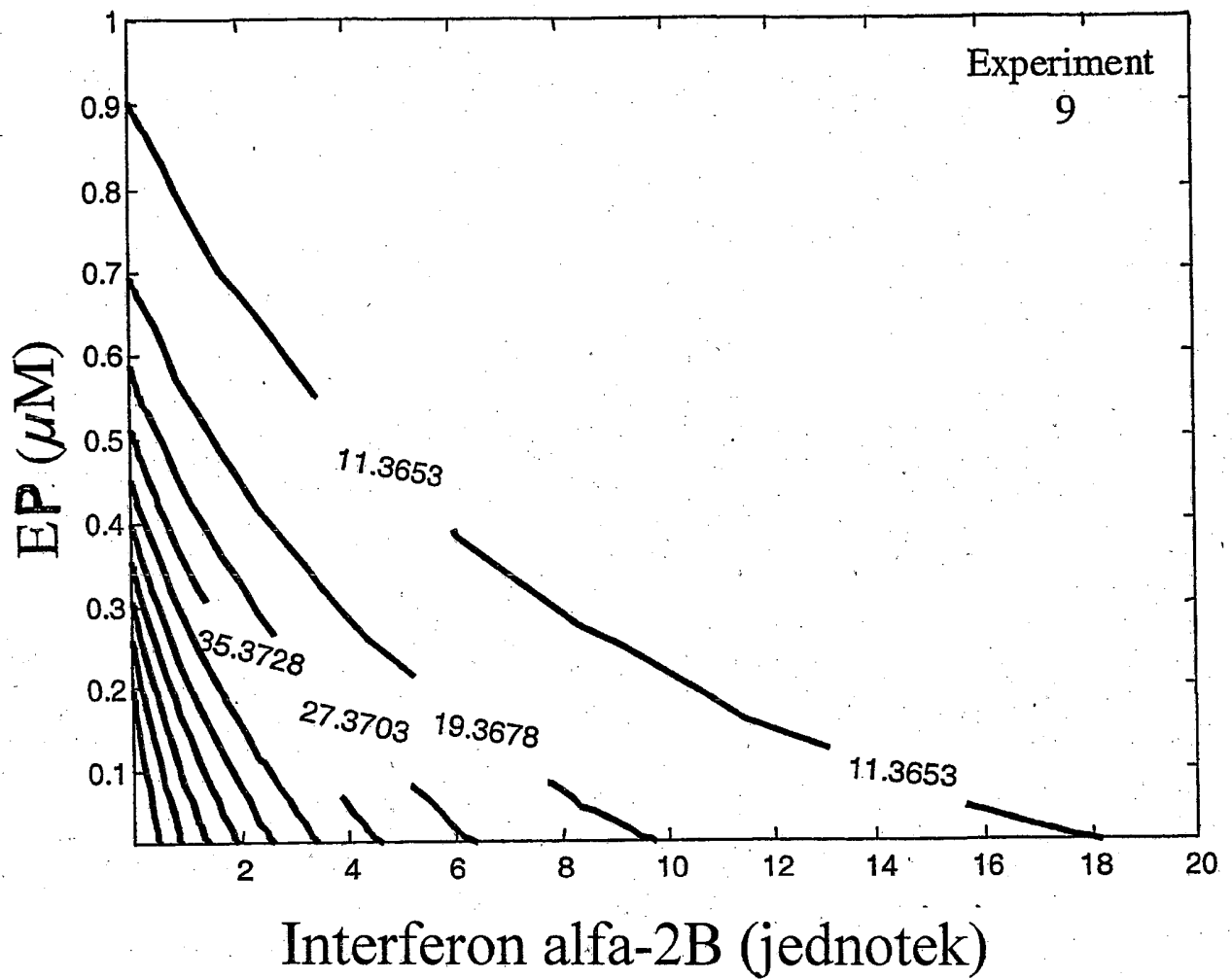


07.04.03

12/14

2003-595

Obr. 12

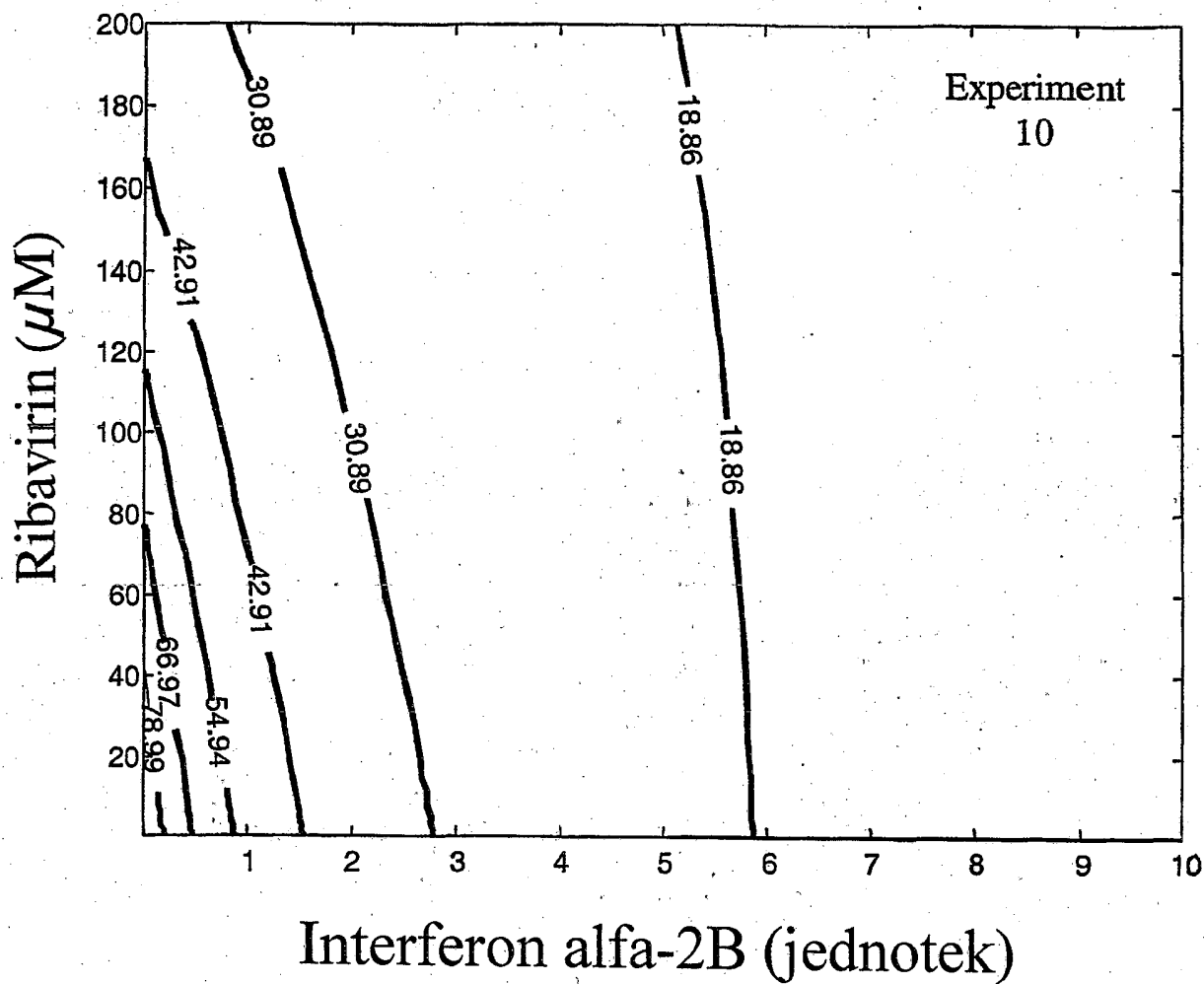


07.04.03

13/14

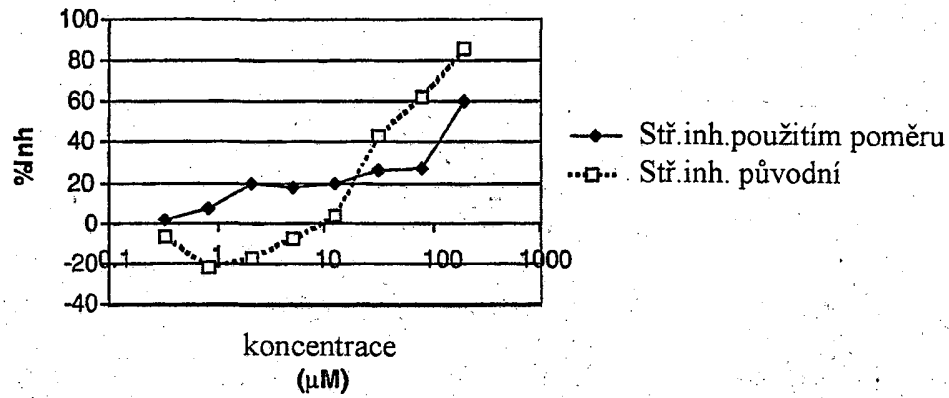
2003-595

Obr. 13



Obr. 14

A Samotný Ribavirin



B Interferon alfa-2B samotný

