

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.02.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.03.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/10111877**
(33) Země priority: **DE**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.12.2003**
(Věstník č. 12/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/EP02/01917**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/072573**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2429

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 401/12
C 07 D 233/74
C 07 D 233/76
A 61 K 31/4166
A 61 K 31/4178

(71) Přihlašovatel:
AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:
Wehner Volkmar, Sandberg, DE;
Blum Horst, Frankfurt, DE;
Rütten Hartmut, Idstein, DE;
Stilz Hans Ulrich, Frankfurt, DE;

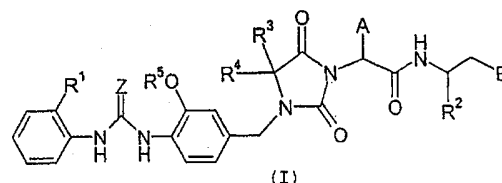
(74) Zástupce:
Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Imidazolidinové deriváty, způsob jejich přípravy
a jejich použití jako protizánětlivých prostředků**

(57) Anotace:

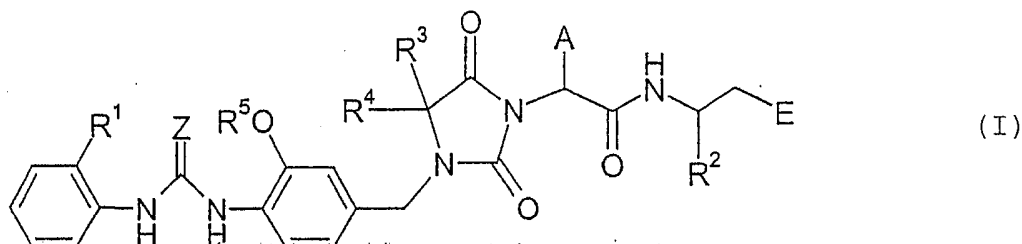
Předložené řešení se týká nových imidazolidinových derivátů vzorce I, kde A, E, Z, R¹, R², R³, R⁴ a R⁵ mají významy uvedené v nárocích. Sloučeniny vzorce I jsou cenné farmaceuticky aktivní sloučeniny, které jsou vhodné například pro terapii zánětlivých onemocnění, například reumatoidní artritidy, nebo alergických onemocnění. Sloučeniny vzorce I jsou inhibitory adheze a migrace leukocytů a/nebo antagonisté adhezního receptoru VLA-4, náležejícího ke skupině integrinů. Sloučeniny jsou obecně vhodné pro terapii onemocnění, která jsou způsobena nežádoucím rozsahem adheze a/nebo migrace leukocytů, nebo které jsou s nimi spojeny, nebo při kterých hrají roli interakce buňka.buňka nebo buňka.matrice, založené na interakcích receptorů VLA-4 s jejich ligandy. Řešení se dále týká způsobů přípravy sloučenin vzorce I, jejich použití a farmaceutických prostředků, obsahujících sloučeniny vzorce I.



Imidazolidinové deriváty, způsob jejich přípravy a jejich použití jako protizánětlivých prostředků

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových imidazolidinových derivátů vzorce I,



kde A, E, Z, R¹, R², R³, R⁴ a R⁵ mají významy, uvedené níže. Sloučeniny vzorce I jsou cenné farmaceuticky aktivní sloučeniny, které jsou vhodné například pro léčbu zánětlivých onemocnění, například reumatoidní artritidy, nebo alergických onemocnění. Sloučeniny vzorce I jsou inhibitory adheze a migrace leukocytů a/nebo antagonisté adhezního receptoru VLA-4, náležícího do skupiny integrinů. Sloučeniny jsou obecně vhodné pro léčbu onemocnění, která jsou způsobena nežádoucím rozsahem adheze leukocytů a/nebo migrace leukocytů nebo jsou s těmito jevy spojena, nebo při kterých hrají roli interakce buňka-buňka nebo buňka-matrice, které jsou založeny na interakcích receptorů VLA-4 s jejich ligandy. Vynález se dále týká způsobů přípravy sloučenin vzorce I, jejich použití a farmaceutických prostředků, obsahujících sloučeniny vzorce I.

Dosavadní stav techniky

Integriny jsou skupina adhezních receptorů, které hrají důležitou roli při pochodech, probíhajících při vazbě buňka-buňka a vazbě buňka-extracelulární matrice. Mají $\alpha\beta$ -heterodimerní strukturu a vykazují širokou celulární distribuci a velký

rozsah evolutivní konzervace. Mezi integriny patří například fibrinogenní receptor na destičkách, který interaguje zvláště s RGD sekvencí fibrinogenu, nebo vitronektinový receptor na osteoklastech, který speciálně interaguje s RGD sekvencí vitronektinu nebo osteopontinu. Integriny se dělí na tři hlavní skupiny: podrodina $\beta 2$, jejímiž reprezentanty jsou LFA-1, Mac-1 a p150/95, které jsou odpovědné zvláště za interakce buňka-buňka v imunitním systému, a podrodiny $\beta 1$ a $\beta 3$, jejichž reprezentanti hlavně zprostředkují adhezi buněk ke komponentům extracelulární matrice (Ruoslahti, Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 375). Integriny podrodiny $\beta 1$, také nazývané VLA-proteiny („very late (activation) antigen“), zahrnují přinejmenším šest receptorů, které specificky interagují s fibronectinem, kolagenem a/nebo lamininem jako ligandy. V rodině VLA je atypický integrin VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), protože je hlavně omezen na lymfoidní a myeloidní buňky a v nich je odpovědný za interakce buňka-buňka s velkým množstvím jiných buněk. Tak například, VLA-4 zprostředkuje interakce lymfocytů T a B s fragmentem fibronectinu z lidské plazmy (FN), který váže heparin II. Vazba VLA-4 s fragmentem plazmového fibronectinu, který váže heparin II, je založena speciálně na interakci se sekvencí LDVP. V protikladu k fibrinogenovému nebo vitronektinovému receptoru, VLA-4 není typický integrin, který váže RGD (Kilger a Holzmann, J. Mol. Meth. 1995, 73, 347).

Za normálního stavu leukocyty, cirkulující v krvi, vykazují jen nízkou afinitu k vaskulárním endoteliálním buňkám, které vystylají cévy. Cytokiny, které jsou uvolňovány ze zanícené tkáně, aktivují endoteliální buňky a tudíž expresi velkého množství antigenů na povrchu buněk. Mezi ně patří například adhezní molekula ELAM-1 („endothelial cell adhesion molecule-1“, rovněž nazývaná E-selektin), která mezi jiným váže neutrofile, dále ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“), která interaguje s LFA-1 („leukocyte function-associated

antigen 1) na leukocytech, a VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1“), která váže různé leukocyty, mezi jiným lymfocyty (Osborn a spol., Cell 1989, 59, 1203). VCAM-1 je, podobně jako ICAM-1, členem superrodiny imunoglobulinových genů. VCAM-1 (zpočátku známá jako INCAM-110) byla identifikována jako adhezní molekula, která je indukována na endoteliálních buňkách zánětlivými cytokiny jako TNF a IL-1 a lipopolysacharidy (LPS). Elices a spol. (Cell 1990, 60, 577) ukázali, že VLA-4 a VCAM-1 tvoří pár receptor-ligand, který zprostředkuje připojení lymfocytů k aktivovanému endotelu. Vazba VCAM-1 k VLA-4 se neuskutečňuje interakcí VLA-4 se sekvencí RGD, neboť VCAM-1 takovou sekvencí neobsahuje (Bergelson a spol., Current Biology 1995, 5, 615). VLA-4 se však vyskytuje také na jiných leukocytech, a adheze leukocytů jiných než lymfocytů je rovněž zprostředkována přes adhezní mechanismus VCAM-1/VLA-4. VLA-4 je tak individuálním příkladem $\beta 1$ -integrinového receptoru, který přes ligandy VCAM-1 a fibronektin hraje důležitou úlohu jak v interakcích buňka-buňka tak v interakcích buňka-extracelulární matrice.

Cytokinem indukované adhezní molekuly hrají důležitou roli v rekrutmentu leukocytů do oblastí extravaskulární tkáně. Leukocyty jsou rekrutovány do oblastí zanícené tkáně působením buněčných adhezních molekul, exprimovaných na povrchu endoteliálních buněk, a slouží jako ligandy pro proteiny nebo proteinové komplexy na povrchu leukocytových buněk (receptory) (pojmy ligand a receptor je možno též používat v obráceném smyslu). Leukocyty z krve se musí nejprve připojit k endoteliálním buňkám, dříve než mohou migrovat do synovia. VCAM-1 se váže na buňky, nesoucí integrin VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$), jako jsou eosinofily, lymfocyty T a B, monocyty nebo neutrofilové, a tak spolu s mechanismem VCAM-1/VLA-4 rekrutuje buňky tohoto typu z krevního řečiště do oblastí infekce a do zánětlivých ložisek (Elices a spol. Cell 1990, 60, 577;

Osborn, Cell 1990, 62, 3; Issekutz a spol., J. Exp. Med. 1996, 183, 2175).

Adhezní mechanizmus VCAM-1/VLA-4 je spojován s mnoha fyziologickými a patologickými pochody. Vedle cytokiny indukovaného endotelia je VCAM-1 dále exprimován, mezi jiným, následujícími buňkami: myoblasty, lymfoidními dendritickými buňkami a tkáňovými makrofágy, reumatoidním synoviem, cytokinem stimulovanými neurálními buňkami, parietálními epiteliálními buňkami Bowmanovy dutiny, renálním tubulárním epitelem, zanícenou tkání během odmítnutí srdečního a ledvinového transplantátu, a intestinální tkání při odmítání darované tkáně. Bylo rovněž nalezeno, že VCAM-1 je exprimována v tkáňových oblastech arteriálního endotelu, které odpovídají raným aterosklerotickým plátům na modelu králíka. VCAM-1 je rovněž exprimována na folikulárních dendritických buňkách lidských lymfatických uzlin a byla nalezena na stromatických buňkách kostní dřeně, například u myši. Posledně uvedený nález ukazuje na funkci VCAM-1 při vývoji buněk B. Vedle buněk hematopoetického původu byl VLA-4 nalezen rovněž například v melanomových buněčných liniích, a adhezní mechanizmus VCAM-1/VLA-4 je spojen s metastázou takových nádorů (Rice a spol., Science 1989, 246, 1303).

Hlavní forma, ve které se VCAM-1 vyskytuje in vivo na endoteliálních buňkách a která je dominantní formou in vivo, je označována VCAM-7D a nese sedm imunoglobulinových domén. Aminokyselinové sekvence v doménách 4, 5 a 6 jsou podobné sekvencím v doménách 1, 2 a 3. V další formě, sestávající ze šesti domén, která je zde označena jako VCAM-6D, je čtvrtá doména odstraněna alternativním splicingem. VCAM-6D může rovněž vázat buňky, exprimující VLA-4.

Další detaily, týkající se VLA-4, VCAM-1, integrinů a adhezních proteinů, je možno nalézt například v člancích: Kilger a Holzmann, J. Mol. Meth. 1995, 73, 347; Elices, Cell

Adhesion in Human Disease, Wiley, Chichester 1995, str. 79;
 Kuijpers, Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 379.

Vzhledem k roli, kterou hraje mechanismus VCAM-1/VLA-4 v pochodech buněčné adheze, které jsou důležité například při infekcích, zánětech nebo ateroskleróze, byly činěny pokusy ovlivňovat poruchy, zvláště záněty, zásahem do těchto adhezních pochodů (Osborn a spol., Cell 1989, 59, 1203).

Způsob, jak toho docílit, je použití monoklonálních protilátek směřovaných proti VLA-4. Monoklonální protilátky (mAB) tohoto typu, které jako antagonisté VLA-4 blokují interakci mezi VCAM-1 a VLA-4, jsou známy. Tak například anti-VLA-4 mAB HP2/1 a HP1/3 inhibují připojení VLA-4-exprimujících buněk Ramos („B-cell-like“ buněk) k endoteliálním buňkám pupeční šňůry a k VCAM-1-transfekovaným COS buňkám. Podobně anti-VCAM-1 mAB 4B9 inhibuje adhezi buněk Ramos, buněk Jurkat („T-cell-like“ buněk) a buněk HL60 („granulocyte-like“ buněk) k COS buňkám, transfekovaných s genetickými konstrukty, které způsobují expresi VCAM-6D a VCAM-7D. In vitro údaje, získané s protilátkami směřovanými proti $\alpha 4$ podjednotce VLA-4, ukazují, že adheze lymfocytů k synoviálním endoteliálním buňkám, která hraje roli u reumatoidní artritidy, je blokována (van Dinther-Janssen a spol., J. Immunol. 1991, 147, 4207).

Pokusy in vivo ukázaly, že experimentální autoimunní encefalomyelitidu je možno inhibovat anti- $\alpha 4$ mAB. Podobně migrace leukocytů do zánětlivého ložiska je blokována monoklonální protilátkou proti $\alpha 4$ řetězci VLA-4. Ovlivňování VLA-4-dependentního adhezního mechanismu použitím protilátek bylo rovněž zkoumáno na modelu astmatu za účelem studia role VLA-4 při rekrutmentu leukocytů do zanícené plicní tkáně (spis WO-A-93/13798). Podání anti-VLA-4 protilátek inhibovalo reakci pozdní fáze a hyperreakci dýchacích cest u alergických ovcí. Důležitost VLA-4 jako cíle pro terapii astmatu je podrobně

diskutována (Metzger, Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 467).

VLA-4-dependentní mechanizmus adheze buněk byl rovněž studován na zánětlivém střevním onemocnění („inflammatory bowel disease“, IBD) u primátů. U tohoto modelu, který odpovídá ulcerativní kolitidě u člověka, podání anti- α 4-protilátek významně zmírnilo akutní zánět.

Nadto bylo možno ukázat, že VLA-4-dependentní adheze buněk hraje roli v následujících klinických stavech, včetně následujících chronických zánětlivých pochodů: reumatoidní artritida (Cronstein a Weismann, Arthritis Rheum. 1993, 36, 147; Elices a spol., J. Clin. Invest. 1994, 93, 405), diabetes mellitus (Yang a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 10494), systémový lupus erythematosus (Takeuchi a spol., J. Clin. Invest. 1993, 92, 3008), alergie opožděného typu (alergie typu IV) (Elices a spol., Clin. Exp. Rheumatol. 1993, 11, S77), roztroušená skleróza (Yednock a spol., Nature 1992, 356, 63), malárie (Ockenhouse a spol., J. Exp. Med. 1992, 176, 1183), ateroskleróza (O'Brien a spol., J. Clin. Invest. 1993, 92, 945; Shih a spol., Circ. Res. 1999, 84, 345), transplantace (Isobe a spol., Transplantation Proceedings 1994, 26, 867), různé zhoubné nádory, například melanom (Renkonen a spol., Am. J. Pathol. 1992, 140, 763), lymfom (Freedman a spol., Blood 1992, 79, 206) a další (Albelda a spol., J. Cell. Biol. 1991, 114, 1059).

Interakce VLA-4 s VCAM-1 a fibronektinem souvisí s některými patofyziologickými pochody u kardiovaskulárních onemocnění. V in vitro buněčném systému infiltrované neutrofily inhibují buněčnou kontrakci (negativní inotropie) u kardiomyocytů o 35 %. Tento negativní inotropní účinek neutrofilů bylo možno inhibovat anti- α 4 protilátkou, ale nikoliv anti-CD18 protilátkou (Poon a spol., Circ. Res. 1999, 84, 1245). Důležitost VLA-4 v patogenezi aterosklerózy byla demonstrována na myším

modelu aterosklerózy. Tak peptid CS-1, který je směřován proti vazebnému místu VLA-4 na fibronektinu, inhibuje rekrutment leukocytů a akumulaci tuku v aortě, a tím zabraňuje tvorbě aterosklerotických plátů u aterogenicky krmených „LDL receptor knockout“ myši (Shih a spol., Circ. Res. 1999, 84, 345). Za použití téhož peptidu CS-1 bylo dále možno ukázat na modelu heterotopické transplantace srdce u králíka, že tvorba vaskulopatie u trasplantátu se může význačně snížit bloádou interakce VLA-4 a fibronektinu (Molossi a spol., J. Clin. Invest. 1995, 95, 2601).

Blokace VLA-4 vhodnými antagonisty tak nabízí účinné možnosti terapie například zvláště různých zánětlivých stavů včetně astmatu a IBD. Obzvláštní důležitost antagonistů VLA-4 pro léčbu reumatoidní artritidy je zde, jak již bylo řečeno, dána faktem, že leukocyty z krve musí nejdříve adherovat k endoteliálním buňkám, než mohou migrovat do synovia, a že receptor VLA-4 se účastní této adheze. Skutečnost, že VCAM-1 je indukována na endoteliálních buňkách zánětlivými faktory (Osborn, Cell 1990, 62, 3; Stoolman, Cell. 1989, 56, 907) a rekrutment různých leukocytů do oblastí infekce a zánětlivých ložisek byly již diskutovány výše. Buňky T adherují k aktivovanému endotelu zde převážně adhezním mechanismem LFA-1/ICAM-1 a VLA-4/VCAM-1 (Springer, Cell 1994, 76, 301). U reumatoidní artritidy má většina synoviálních T-buněk zvýšenou vazebnou kapacitu VLA-4 pro VCAM-1 (Postigo a spol., J. Clin. Invest. 1992, 89, 1445). Navíc byla pozorována zvýšená adheze synoviálních T-buněk k fibronektinu (Laffon a spol., J. Clin. Invest. 1991, 88, 546; Morales-Ducret a spol., J. Immunol. 1992, 149, 1424). Působení VLA-4 je tedy zvýšeno co se týče jeho exprimace i co se týče jeho působení na lymfocyty T reumatoidní synoviální membrány. Blokace vazby VLA-4 k jeho fyziologickým ligandům VCAM-1 a fibronektinu umožňuje účinnou prevenci nebo zmírnění artikulárních zánětlivých pochodů. To

bylo také potvrzeno pokusy s protilátkou HP2/1 na Lewisových potkanech s adjuvantní artritidou, u kterých byla pozorována účinná prevence tohoto onemocnění (Barbadillo a spol., Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 427). Peptidomimetika CS-1, jejichž molekuly obsahují jednotku kyseliny asparagové nebo jejího derivátu, a která inhibují vazbu VLA-4 k CS-1 sekvenci v matricovém proteinu fibronektinu, jsou popsána ve spisu WO-A-00/02903. VLA-4 je tedy z terapeutického hlediska důležitá molekula.

Výšeuvedené protilátky VLA-4, a použití protilátek jako jsou antagonisté VLA-4, jsou popsány v patentových přihláškách WO-A-93/13798, WO-A-93/15764, WO-A-94/16094, WO-A-94/17828 a WO-A-95/19790. Patentové přihlášky WO-A-94/15958, WO-A-95/15973, WO-A-96/00581, WO-A-96/06108 a WO-A-96/20216 popisují peptidické sloučeniny jako VLA-4 antagonisty. Použití protilátek a peptidických sloučenin jako léčiv s sebou však nese nevýhody, jako je například nemožnost perorálního podání, snadná degradabilita nebo imunogenní účinek při dlouhodobém podávání, a tedy stále trvá potřeba antagonistů VLA-4, které by měly výhodný profil vlastností pro použití v terapii a profylaxi různých chorobných stavů.

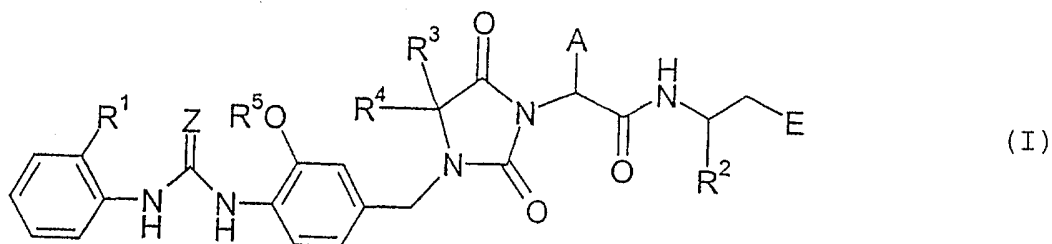
Spisy WO-A-95/14008, WO-A-93/18057, US-A-5 658 935, US-A-5 686 421, US-A-5 389 614, US-A-5 397 796, US-A-5 424 293 a US-A-5 554 594 popisují substituované pětičlenné heterocykly, které mají na N-terminálním konci molekuly aminovou skupinu, amidinovou skupinu nebo guanidinovou skupinu, a které inhibují agregaci destiček. Spis EP-A-796 855 popisuje další heterocykly, které inhibují kostní resorpci. Spisy EP-A-842 943, EP-A-842 945 a EP-A-842 944 popisují, že sloučeniny z těchto serií i další sloučeniny překvapivě také inhibují adhezi leukocytů a jsou antagonisté VLA-4.

Spisy EP-A-903 353, EP-A-905 139, EP-A-918 059, WO-99/23063, WO-A-99/24398, WO-A-99/54321 a WO-A-99/60015 popisují další

sloučeniny, které inhibují adhezi leukocytů a jsou antagonisté VLA-4. Vlastnosti těchto sloučenin nejsou však stále v mnoha ohledech uspokojivé a proto potřeba sloučenin s ještě lepším profilem vlastností stále trvá. Spis EP-A-918 059 mezi jiným zmiňuje deriváty imidazolidinu, ve kterých imidazolidinový kruh je vázán v poloze 1 své molekuly k atomu uhlíku v poloze 2 ve skupině 2-(cykloalkylalkyl)acetylaminové nebo ve skupině 2-isobutylacetylaminové. Nejsou však výslovně popsány imidazolidinové deriváty vzorce I předloženého vynálezu, které se vyznačují výhodným profilem vlastností a zvláště výrazně zvýšenou účinností.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká sloučenin vzorce I



kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{CO}-\text{R}^6$, skupina $-\text{CO}-\text{H}$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^7$;

Z je atom kyslíku nebo atom síry;

R^1 je atom vodíku nebo methylová skupina;

R^2 je fenylová skupina, pyridylová skupina nebo (C_1-C_4) -alkylová skupina, kde alkylová skupina může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru a fenylová skupina může být substituována jedním nebo několika identickými nebo rozdílnými substituenty z množiny obsahující (C_1-C_4) -alkylovou skupinu, (C_1-C_4) -alkoxylovou skupinu, methylendioxy-

skupinu, ethylendioxy-skupinu, atom halogenu, trifluor-methylovou skupinu a trifluormethoxylovou skupinu;

R^3 a R^4 jsou methylová skupina nebo trifluormethylová skupina;

R^5 je atom vodíku nebo (C_1-C_4) -alkylová skupina, kde alkylový zbytek může být substituován jedním nebo několika atomy fluoru;

R^6 je hydroxylová skupina, (C_1-C_{10}) -alkoxylová skupina, fenylová (C_1-C_8) -alkoxylová skupina, fenyl- (C_1-C_8) -alkoxylová skupina, (C_1-C_8) -alkylkarbonyloxy- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, fenylkarbonyloxy- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, fenyl- (C_1-C_6) -alkylkarbonyloxy- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, (C_1-C_8) -alkoxykarbonyloxy- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, fenyl- (C_1-C_6) -alkoxykarbonyloxy- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, aminová skupina, mono- (C_1-C_{10}) -alkylaminová skupina nebo di- (C_1-C_{10}) -alkylaminová skupina;

R^7 je atom vodíku nebo (C_1-C_4) -alkylová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

a jejich fyziologicky přijatelných solí.

Alkylové skupiny mohou být nerozvětvené nebo rozvětvené. Platí to i když nesou substituenty nebo samy jsou substituenty na jiných zbytcích, například pro fluoralkylové skupiny, alkoxylové skupiny nebo alkoxykarbonylové skupiny. Příklady alkylových skupin jsou methylová skupina, ethylová skupina, n-propylová skupina, isopropylová skupina (= 1-methylethylová skupina = iC_3H_7), n-butylová skupina, isobutylová skupina (= 2-methylpropylová skupina), sek-butylová skupina (= 1-methylpropylová skupina), terc-butylová skupina (= 1,1-dimethylethylová skupina), n-pentylová skupina, isopentylová skupina,

terc-pentylová skupina, neopentylová skupina, n-hexylová skupina, 3-methylpentylová skupina, isohexylová skupina, neoheptylová skupina, n-heptylová skupina, 2,3,5-trimethylhexylová skupina, n-oktylová skupina, n-nonylová skupina, n-decyllová skupina. Preferované alkylové skupiny jsou methylová skupina, ethylová skupina, n-propylová skupina, isopropylová skupina, n-butylová skupina, isobutylová skupina, sek-butylová skupina, a terc-butylová skupina. V alkylové skupině může být jeden nebo několik, například 1, 2, 3, 4 nebo 5, atomů vodíku nahrazeno atomy fluoru. Příklady takových fluoralkylových skupin jsou trifluormethylová skupina, 2,2,2-trifluorethylová skupina, pentafluorethylová skupina, nebo heptafluorisopropylová skupina. Substituované alkylové skupiny, například fenylalkylové skupiny nebo fluoralkylové skupiny, mohou být substituovány v jakýchkoliv žádaných polohách.

Fenylové skupiny mohou být nesubstituované nebo monosubstituované nebo polysubstituované, například mono-, di-, tri-, tetra- nebo pentasubstituované, a to identickými nebo odlišnými substituenty. Jestliže fenylová skupina je substituována, nese s výhodou jeden nebo dva identické nebo odlišné substituenty. To platí i pro substituované fenylové zbytky ve skupinách jako je fenylalkylová skupina, fenylkarbonylová skupina atd. Fenylalkylové skupiny jsou například benzylová skupina, 1-fenylethylová skupina nebo 2-fenylethylová skupina, zvláště benzylová skupina, přičemž všechny tyto skupiny mohou také být substituovány.

V monosubstituovaných fenylových skupinách může být substituent přítomen v poloze 2, v poloze 3 nebo v poloze 4. Disubstituovaná fenylová skupina může být substituována v poloze 2,3, v poloze 2,4, v poloze 2,5, v poloze 2,6, v poloze 3,4 nebo v poloze 3,5. V trisubstituovaných fenylových skupinách mohou být substituenty situovány v poloze

2,3,4, v poloze 2,3,5, v poloze 2,4,5, v poloze 2,4,6, v poloze 2,3,6 nebo v poloze 3,4,5. Jestliže fenylová skupina nese substituenty z množiny obsahující methylendioxy-skupinu ($-O-CH_2-O-$) a ethylendioxy-skupinu ($-O-CH_2-CH_2-O-$), s výhodou nese pouze jeden substituent z této množiny (pokud je to žádoucí, navíc k ostatním substituentům).

Příklady substituovaných fenylových skupin, které mohou reprezentovat R^2 , jsou 2-methylfenylová skupina, 3-methylfenylová skupina, 4-methylfenylová skupina, 2,3-dimethylfenylová skupina, 2,4-dimethylfenylová skupina, 2,5-dimethylfenylová skupina, 2,6-dimethylfenylová skupina, 3,4-dimethylfenylová skupina, 3,5-dimethylfenylová skupina, 2,4,5-trimethylfenylová skupina, 2,4,6-trimethylfenylová skupina, 3,4,5-trimethylfenylová skupina, 2-(n-butyl)fenylová skupina, 3-(n-butyl)fenylová skupina, 4-(n-butyl)fenylová skupina, 2-isobutylfenylová skupina, 3-isobutylfenylová skupina, 4-isobutylfenylová skupina, 3-terc-butylfenylová skupina, 4-terc-butylfenylová skupina, 2-methoxyfenylová skupina, 3-methoxyfenylová skupina, 4-methoxyfenylová skupina, 2,3-dimethoxyfenylová skupina, 2,4-dimethoxyfenylová skupina, 2,5-dimethoxyfenylová skupina, 2,6-dimethoxyfenylová skupina, 3,4-dimethoxyfenylová skupina, 3,5-dimethoxyfenylová skupina, 2,4,5-trimethoxyfenylová skupina, 2,4,6-trimethoxyfenylová skupina, 3,4,5-trimethoxyfenylová skupina, 2-(n-butoxy)fenylová skupina, 3-(n-butoxy)fenylová skupina, 4-(n-butoxy)fenylová skupina, 2-isobutoxyfenylová skupina, 3-isobutoxyfenylová skupina, 4-isobutoxyfenylová skupina, 2-terc-butoxyfenylová skupina, 3-terc-butoxyfenylová skupina, 4-terc-butoxyfenylová skupina, 2,3-methylendioxyfenylová skupina, 3,4-methylendioxyfenylová skupina, 2,3-ethylendioxyfenylová skupina, 3,4-ethylendioxyfenylová skupina, 2-fluorfenylová skupina, 3-fluorfenylová skupina, 4-fluorfenylová skupina, 2,3-difluorfenylová skupina, 2,4-difluorfenylová skupina, 2,5-difluor-

fenylová skupina, 2,6-difluorfenylová skupina, 3,4-difluorfenylová skupina, 3,5-difluorfenylová skupina, 2,4,5-trifluorfenylová skupina, 2,4,6-trifluorfenylová skupina, 3,4,5-trifluorfenylová skupina, 2,3,5,6-tetrafluorfenylová skupina, 2,3,4,5,6-pentafluorfenylová skupina, 2-chlorfenylová skupina, 3-chlorfenylová skupina, 4-chlorfenylová skupina, 2,3-dichlorfenylová skupina, 2,4-dichlorfenylová skupina, 2,5-dichlorfenylová skupina, 2,6-dichlorfenylová skupina, 3,4-dichlorfenylová skupina, 3,5-dichlorfenylová skupina, 2-bromfenylová skupina, 3-bromfenylová skupina, 4-bromfenylová skupina, 3-jodfenylová skupina, 4-jodfenylová skupina, 2-trifluormethylfenylová skupina, 3-trifluormethylfenylová skupina, 4-trifluormethylfenylová skupina, 3,4-bis(trifluormethyl)fenylová skupina, 3,5-bis(trifluormethyl)fenylová skupina, 2-trifluormethoxyfenylová skupina, 3-trifluormethoxyfenylová skupina, 4-trifluormethoxyfenylová skupina, atd.

V substituovaných fenylových skupinách však mohou být v jakékoliv požadované kombinaci přítomny tak rozdílné substituenty, jako například v 3-methoxy-4-methylfenylové skupině, 4-fluor-3-methoxyfenylové skupině, 3-fluor-4-methoxyfenylové skupině, 3,5-difluor-4-methoxyfenylové skupině, 3-fluor-4,5-methylen-dioxyfenylové skupině, 3-fluor-4,5-ethylendioxyfenylové skupině, 2-chlor-3-methylfenylové skupině, 3-chlor-4-methylfenylové skupině, 3-chlor-4-fluorfenylové skupině atd.

Halogen je fluor, chlor, brom nebo jod, s výhodou fluor nebo chlor.

Pyridylová skupina je 2-pyridylová skupina, 3-pyridylová skupina nebo 4-pyridylová skupina. V pyridylových skupinách může atom dusíku být také v oxidované formě a odpovídající sloučenina vzorce I může existovat ve formě pyridin-N-oxidu, který je rovněž zahrnut v předloženém vynálezu.

Fyziologicky přijatelné soli sloučenin vzorce I jsou zejména netoxické nebo farmaceuticky použitelné soli. Sloučeniny

vzorci I, které obsahují kyselé skupiny, například karboxylovou skupinu, reprezentující skupinu E, mohou existovat například jako soli alkalických kovů nebo soli kovů alkalických zemin, například sodné soli, draselné soli, hořečnaté soli a vápenaté soli, nebo jako amoniové soli, jako například soli s fyziologicky přijatelnými kvarterními amoniovými ionty a adiční soli s amoniakem a fyziologicky přijatelnými organickými aminy jako například s methylaminem, ethylaminem, triethylaminem, 2-hydroxyethylaminem, tris(2-hydroxyethyl)aminem, α, α, α -tris(hydroxymethyl)methylaminem (tromethaminem) nebo s aminokyselinami, zvláště bážickými aminokyselinami. Soli kyselé sloučeniny vzorce I s organickým aminem mohou obsahovat složky v poměru 1:1 nebo přibližně 1:1 nebo v jiném poměru, například v poměru od přibližně 1:0,5 do přibližně 1:4 (1 molekula vzorce I na 0,5 až 4 molekuly aminu), zvláště v poměru od přibližně 1:0,5 do přibližně 1:2 (1 molekula vzorce I na 0,5 až 2 molekuly aminu).

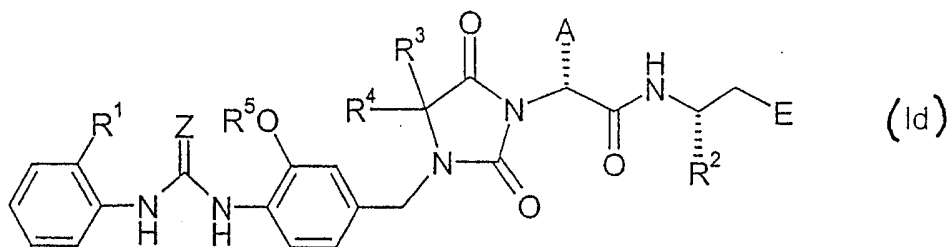
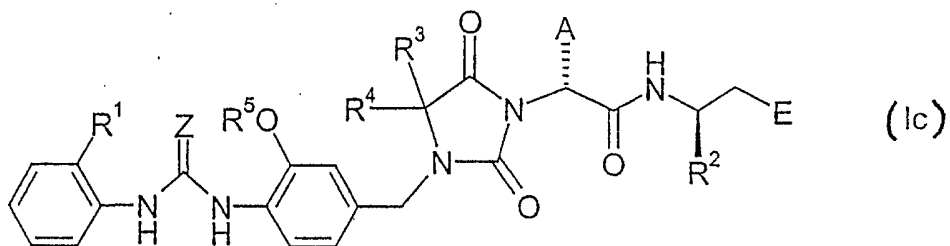
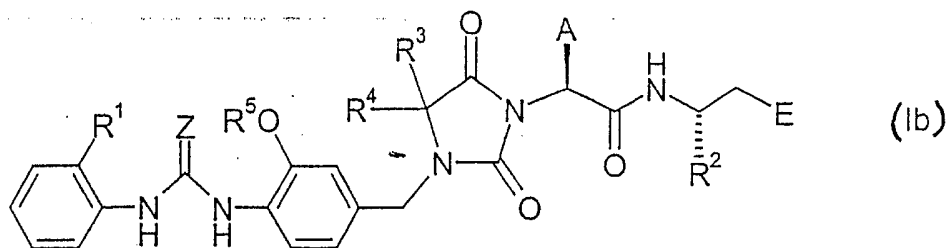
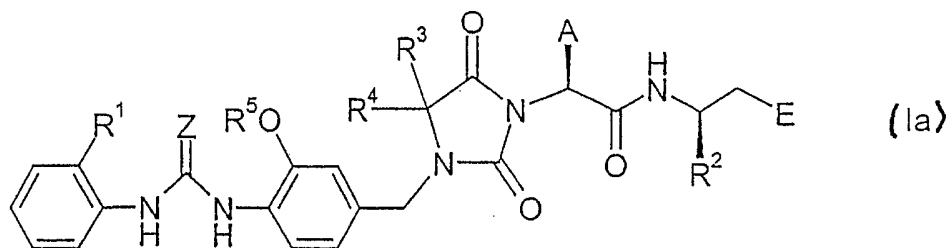
Sloučeniny vzorce I, které obsahují bážické skupiny, například pyridylovou skupinu, mohou být ve formě adičních solí s kyselinou, například jako soli s anorganickými kyselinami jako jsou například kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina fosforečná, nebo jako soli s organickými karboxylovými kyselinami nebo sulfonovými kyselinami, jako jsou například kyselina octová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina maleinová kyselina fumarová, kyselina vinná, kyselina methansulfonová nebo kyselina p-toluensulfonová. Sloučeniny, které obsahují jak kyselé tak bážické skupiny, mohou být přítomny také ve formě vnitřních solí, zwitteriontů nebo betainů, které jsou rovněž zahrnuty v předloženém vynálezu.

Soli se mohou získat ze sloučenin vzorce I obvyklými postupy, které jsou odborníkovi známé, například smícháním s organickou

nebo anorganickou kyselinou nebo bází v rozpouštědle nebo ředidle, nebo z jiných solí výměnou aniontu nebo kationtu.

Sloučeniny vzorce I mohou existovat ve stereoizomerních formách. Pro každé z asymetrických center ve sloučeninách vzorce I, nezávisle na jakémkoliv jiném asymetrickém centru, je možná konfigurace S nebo konfigurace R, nebo směs R/S. Tedy asymetrický atom uhlíku, ke kterému je vázán substituent R^2 , může mít konfiguraci R nebo konfiguraci S, nebo sloučenina vzorce I může být přítomna vzhledem k tomuto atomu uhlíku jako směs R/S. Podobně asymetrický atom uhlíku, ke kterému je vázána skupina A a imidazolidinový kruh, může mít konfiguraci R nebo konfiguraci S, nebo sloučenina vzorce I může být přítomna vzhledem k tomuto atomu uhlíku jako směs R/S. Všechny ostatní asymetrické atomy uhlíku mohou podobně mohou mít konfiguraci R nebo konfiguraci S, nebo sloučenina vzorce I může být přítomna vzhledem ke každému z těchto atomů uhlíku jako směs R/S. Ve směsích R/S mohou být individuální stereoizomery přítomny v jakémkoliv poměru, včetně poměru 1:1.

Vynález zahrnuje všechny možné stereoizomery sloučenin vzorce I, například čisté nebo převážně čisté enantiomery a čisté nebo převážně čisté diastereoizomery, a směsi dvou nebo více stereoizomerních forem, například směsi enantiomerů a/nebo diastereoizomerů, a to ve všech poměrech. Vynález se tedy týká enantiomerů v enantiomerně čisté formě, a to jako levotočivých i jako pravotočivých antipodů, ve formě racemátů a ve formě směsí obou enantiomerů ve všech poměrech. Vynález se rovněž týká diastereoizomerů v diastereoizomerně čisté formě a ve formě směsí ve všech poměrech. Jako příklady individuálních stereoizomerů, které vynález zahrnuje, jsou uvedeny sloučeniny vzorce Ia, Ib, Ic a Id.

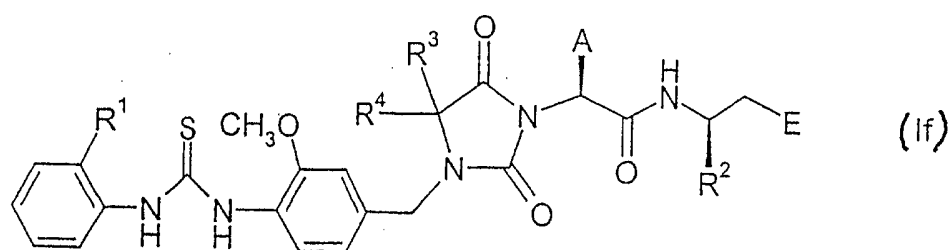
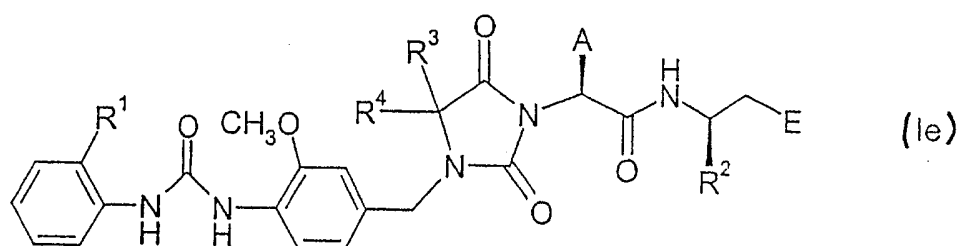


Pokud je to žádoucí, je možno připravit individuální stereoizomery syntézou ze stereochemicky jednotných výchozích látek, stereoselektivní syntézou nebo dělením směsi běžnými metodami, například chromatografií nebo krystalizací, u enantiomerů například chromatografií na chirálních fázích. Před dělením stereoizomerů je případně možno provést derivatizaci. Směs stereoizomerů se může dělit ve stadiu sloučenin vzorce I nebo ve stadiu výchozí látky nebo meziprojektu v průběhu syntézy.

Sloučeniny vzorce I podle vynálezu mohou obsahovat pohyblivé atomy vodíku, tj. mohou být přítomny v různých tautomerních

formách. Předložený vynález zahrnuje všechny tautomery sloučenin vzorce I. Předložený vynález rovněž zahrnuje solváty a adiční sloučeniny nebo adukty sloučenin vzorce I, například adukty s vodou, tj. hydráty, nebo adukty s alkoholy nebo aminy. Vynález dále zahrnuje deriváty sloučenin vzorce I, například estery, amidy, profarmaka a jiné fyziologicky přijatelné deriváty, a aktivní metabolity sloučenin vzorce I. Vynález se zvláště týká také profarmak sloučenin vzorce I, které in vitro nejsou nutně farmakologicky aktivní, ale které in vivo, za fyziologických podmínek, se přeměňují na aktivní sloučeniny vzorce I. Vhodná profarmaka pro sloučeniny vzorce I, tj. chemicky modifikované deriváty sloučenin vzorce I, mající vlastnosti zlepšené v žádaném směru, jsou odborníkovi známa. Podrobnější informace, týkající se profarmak, lze najít v literatuře (Fleisher a spol., Advanced Drug Delivery Reviews 19 (1996) 115; Design of Prodrugs, H. Bundgaard, Ed., Elsevier, 1985; H. Bundgaard, Drugs of the Future 16 (1991) 443). Vhodná profarmaka pro sloučeniny vzorce I jsou zvláště esterová profarmaka, amidová profarmaka, aldehydová profarmaka a alkoholová profarmaka karboxylových skupin, například karboxylové skupiny, reprezentující skupinu E. Tedy rovněž sloučeniny vzorce I, ve kterých skupina E je hydroxymethylová skupina, alkoxy-methylová skupina nebo formylová skupina a které vykazují in vivo antagonismus vůči VLA-4, jsou profarmaka sloučenin vzorce I, ve kterých E je hydroxykarbonylová skupina. Jako příklady esterových profarmak a amidových profarmak je možno zmínit (C₁-C₄)-alkylestery jako jsou methylestery, ethylestery, isopropylestery, isobutylestery, substituované alkylestery jako hydroxyalkylestery, acyloxyalkylestery, aminoalkyl-estery, acylaminoalkyl-estery, dialkyl-aminoalkyl-estery, nesubstituované amidy nebo N-(C₁-C₄)-alkyl-amidy jako jsou methylamidy nebo ethylamidy.

Jako příklady sloučenin vzorce I podle vynálezu je možno uvést následující sloučeniny vzorce Ie a If, které mají konfiguraci S na atomu uhlíku, nesoucím skupinu A a mají konfiguraci S na atomu uhlíku, nesoucím skupinu R², jestliže R² je fenylová skupina nebo pyridylová skupina, a mají konfiguraci R na atomu uhlíku, nesoucím skupinu R², jestliže R² je methylová skupina. Předložený vynález se rovněž týká fyziologicky přijatelných solí sloučenin vzorce Ie a If, například kovových solí nebo solí s organickými amoniovými kationty sloučenin vzorce Ie a If, které obsahují karboxylovou skupinu, nebo adičních solí s kyselinou u sloučenin vzorce Ie a If, obsahujících pyridylovou skupinu, například hydrochloridů.



Sloučeniny vzorce Ie a If:

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOC ₂ H ₅

08.09.03

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOic ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	CH ₂ OH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOic ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	CH ₂ OH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOic ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	CH ₂ OH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOic ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	CH ₂ OH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	2-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOic ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOic ₃ H ₇

08.09.03

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	2-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	2-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	2-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	3-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	3-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	3-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	3-pyridyl	COOiC ₃ H ₇

08.09.03

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	4-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	4-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	4-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	4-pyridyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	CH ₂ OH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOH
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COONa
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOC ₂ H ₅

08.09.03

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	CH ₂ OH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	CH ₂ OH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOH
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COONa
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOC ₂ H ₅
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOiC ₃ H ₇
CH ₃	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	CH ₂ OH
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOH
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COONa
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOC ₂ H ₅
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	COOiC ₃ H ₇
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	fenyl	CH ₂ OH
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOH
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COONa
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOC ₂ H ₅
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOiC ₃ H ₇
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	CH ₂ OH
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOH
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COONa
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOC ₂ H ₅

08.09.03

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	COOiC ₃ H ₇
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	fenyl	CH ₂ OH
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOH
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COONa
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOC ₂ H ₅
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	COOiC ₃ H ₇
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	fenyl	CH ₂ OH
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOH
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COONa
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOC ₂ H ₅
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	COOiC ₃ H ₇
H	CH ₃	CH ₃	isobutyl	methyl	CH ₂ OH
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOH
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COONa
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOC ₂ H ₅
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOiC ₃ H ₇
H	CH ₃	CH ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	CH ₂ OH
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOH
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COONa
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOC ₂ H ₅
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	COOiC ₃ H ₇
H	CF ₃	CF ₃	isobutyl	methyl	CH ₂ OH
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOH
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COONa
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COOC ₂ H ₅

R ¹	R ³	R ⁴	A	R ²	E
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	COO ⁱ C ₃ H ₇
H	CF ₃	CF ₃	cyklopropylmethyl-	methyl	CH ₂ OH

Jednotlivé strukturní prvky ve sloučeninách vzorce I podle vynálezu mají následující preferované významy, které mohou mít nezávisle jeden na druhém.

R² je preferovaně (C₁-C₄)-alkylová skupina, která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru, nebo pyridylová skupina, nebo nesubstituovaná fenylová skupina, nebo fenylová skupina substituovaná methylenedioxy skupinou nebo ethylenedioxy skupinou, nebo fenylová skupina substituovaná jednou nebo dvěma (C₁-C₄)-alkoxylovými skupinami. Alkylová skupina, reprezentující R², která může být popřípadě substituována fluorem, je zejména jedna z následujících skupin: methylová skupina, ethylová skupina, isopropylová skupina, trifluormethylová skupina a 2,2,2-trifluorethylová skupina. Alkoxylové substituenty ve fenylové skupině, reprezentující R², jsou zejména methoxylové skupiny. Zvláště preferováno je, když R² je methylová skupina, pyridylová skupina, nesubstituovaná fenylová skupina, fenylová skupina substituovaná methylenedioxy skupinou nebo ethylenedioxy skupinou, nebo fenylová skupina substituovaná jednou nebo dvěma methoxylovými skupinami. Zcela zvláště preferováno je, když R² je methylová skupina, nesubstituovaná fenylová skupina nebo pyridylová skupina.

R³ a R⁴ mohou být stejné nebo odlišné. Preferováno je, když obě skupiny R³ a R⁴ jsou stejné. V jedné variantě předloženého vynálezu jsou oba substituenty R³ a R⁴ methylové skupiny. V jiné variantě předloženého vynálezu jsou oba substituenty R³ a R⁴ trifluormethylové skupiny.

Alkylová skupina, reprezentující R^5 , která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru, je preferovaně methylová skupina, ethylová skupina nebo trifluormethylová skupina. Preferovaně je R^5 (C_1 - C_4)-alkylová skupina, která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru. Zvláště preferováno je, když R^5 je methylová skupina nebo trifluormethylová skupina, zcela zvláště je preferováno, když R^5 je methylová skupina.

R^6 je preferovaně hydroxylová skupina, (C_1 - C_6)-alkoxylová skupina, fenyl- (C_1 - C_4)-alkoxylová skupina, fenyloxylová skupina, nebo aminová skupina (NH_2), zvláště preferovaně R^6 je hydroxylová skupina, (C_1 - C_6)-alkoxylová skupina nebo aminová skupina, zcela zvláště preferovaně hydroxylová skupina nebo (C_1 - C_6)-alkoxylová skupina, obzvláště preferovaně hydroxylová nebo (C_1 - C_4)-alkoxylová skupina, zejména hydroxylová skupina.

R^7 je preferovaně atom vodíku nebo (C_1 - C_3)-alkylová skupina, zvláště preferovaně atom vodíku nebo methylová skupina, zcela zvláště preferovaně atom vodíku.

E je preferovaně skupina $-CO-R^6$, skupina $-CO-H$, skupina $-CH_2-OH$ nebo skupina $-CH_2-OCH_3$, zvláště preferovaně skupina $-CO-R^6$, skupina $-CH_2-OH$ nebo skupina $-CH_2-OCH_3$, zcela zvláště preferovaně je skupina $-CO-R^6$ nebo skupina $-CH_2-OH$, ještě více preferovaně skupina $-COOH$, skupina $-COOC_2H_5$, skupina $-COOiC_3H_7$ nebo skupina $-CH_2-OH$, zejména skupina $-COOH$.

V jedné variantě předloženého vynálezu Z je atom síry, v jiné variantě Z je atom kyslíku.

V jedné variantě předloženého vynálezu A je isobutylová skupina (2-methylpropylová skupina; $(CH_3)_2CH-CH_2-$), v jiné variantě A je cyklopropylmethylová skupina (skupina cyklopropyl- CH_2-).

Dále, v jedné variantě předloženého vynálezu R^1 je atom vodíku a v jiné variantě R^1 je methylová skupina.

Preferované sloučeniny vzorce I jsou takové, které mají homogenní konfiguraci na jednom nebo několika chirálních centrech, například na atomu uhlíku, který nese substituent R^2 , a/nebo na atomu uhlíku, který nese substituent A a imidazolidinový zbytek. To znamená, že jsou preferovány sloučeniny, které mají homogenní nebo v podstatě homogenní konfiguraci na jednom nebo několika chirálních centrech, tedy buďto konfiguraci R nebo konfiguraci S, ale nikoliv směs R/S. Jak však již bylo vysvětleno, individuální chirální centra v těchto sloučeninách vzorce I mohou nezávisle na sobě mít konfiguraci R nebo konfiguraci S a mít identické nebo odlišné konfigurace. Zvláště preferované sloučeniny vzorce I jsou takové, ve kterých atom uhlíku, nesoucí substituent A a imidazolidinový zbytek, má konfiguraci S, tj. konfiguraci jak je pro toto stereocentrum znázorněna ve vzorcích Ia a Ib. Zvláště preferované sloučeniny vzorce I jsou rovněž takové sloučeniny, ve kterých atom uhlíku, nesoucí skupinu R^2 , má konfiguraci znázorněnou ve vzorcích Ia a Ic. Jestliže je R^2 například fenylová skupina, substituovaná fenylová skupina nebo pyridylová skupina, pak v těchto zvláště preferovaných sloučeninách atom uhlíku, nesoucí skupinu R^2 , má konfiguraci S; jestliže R^2 je methylová, ethylová nebo isobutylová skupina, tento atom má konfiguraci R. Zcela zvláště preferované sloučeniny vzorce I jsou takové, ve kterých dvě výše uvedená stereocentra jsou přítomna v konfiguracích vyznačených ve vzorci Ia.

Preferované sloučeniny vzorce I jsou takové sloučeniny, ve kterých jeden nebo několik substituentů má preferovaný význam nebo mají specifikovaný význam zvolený z jmenovaných významů, přičemž předložený vynález se týká všech kombinací preferovaných významů a/nebo specifikovaných významů skupin. Jako příklady preferovaných sloučenin je možno uvést například sloučeniny, ve kterých současně R^1 , R^3 , R^4 a R^5 jsou methylové skupiny a A je isobutylová skupina, nebo sloučeniny, ve

kterých současně R^1 , R^3 , R^4 a R^5 jsou methylové skupiny a A je cyklopropylmethylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je methylová skupina, R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny, R^5 je methylová skupina a A je isobutylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je methylová skupina, R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny, R^5 je methylová skupina a A je cyklopropylmethylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je atom vodíku, R^3 , R^4 a R^5 jsou methylové skupiny a A je isobutylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je atom vodíku, R^3 , R^4 a R^5 jsou methylové skupiny a A je cyklopropylmethylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je atom vodíku, R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny, R^5 je methylová skupina a A je isobutylová skupina, nebo sloučeniny, ve kterých současně R^1 je atom vodíku, R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny, R^5 je methylová skupina a A je cyklopropylmethylová skupina, a ostatní skupiny mají obecné významy, uvedené výše ve sloučeninách vzorce I nebo mají preferované významy nebo mají specifikované významy z jejich příslušných definic.

Zvláště preferované sloučeniny jsou například sloučeniny vzorce I, kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{CO}-R^6$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je atom vodíku nebo methylová skupina;

R^2 je pyridylová skupina, nesubstituovaná fenylová skupina, fenylová skupina substituovaná methylenedioxy skupinou nebo ethylenedioxy skupinou, fenylová skupina substituovaná jednou nebo dvěma (C_1-C_4) -alkoxylovými skupinami, nebo (C_1-C_4) -alkylová skupina, která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru;

R^3 a R^4 jsou methylové skupiny;

R^5 je methylová skupina;

R^6 je hydroxylová skupina, (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, fenyl- (C_1-C_6) -alkoxylová skupina, fenyloxylová skupina nebo aminová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Obzvláště preferované sloučeniny jsou například sloučeniny vzorce I, kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-COOH$, skupina $-COOC_2H_5$, skupina $-COOiC_3H_7$ nebo skupina $-CH_2-OH$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je methylová skupina;

R^2 je pyridylová skupina, nesubstituovaná fenylová skupina, fenylová skupina substituovaná methylendioxyskupinou nebo ethylendioxyskupinou, fenylová skupina substituovaná jednou nebo dvěma methoxylovými skupinami, nebo (C_1-C_4) -alkylová skupina, která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru;

R^3 a R^4 jsou methylové skupiny;

R^5 je methylová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Speciálně preferované sloučeniny jsou například sloučeniny vzorce I, kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{COOH}$, skupina $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, skupina $-\text{COOic}_3\text{H}_7$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je methylová skupina;

R^2 je nesubstituovaná fenylová skupina, pyridylová skupina, methylová skupina nebo 2,2,2-trifluorethylová skupina;

R^3 a R^4 jsou methylové skupiny;

R^5 je methylová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Zvláště speciálně preferované sloučeniny jsou například sloučeniny vzorce I, kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{COOH}$, skupina $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, skupina $-\text{COOic}_3\text{H}_7$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je methylová skupina;

R^2 je nesubstituovaná fenylová skupina, pyridylová skupina nebo methylová skupina;

R^3 a R^4 jsou methylové skupiny;

R^5 je methylová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Všechny výše uvedené definice podskupin sloučenin vzorce I platí analogicky pro sloučeniny vzorce I, kde oba substituenty

R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny místo methylových skupin. Tak například zvláště speciálně preferované sloučeniny jsou rovněž sloučeniny vzorce I, kde

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{COOH}$, skupina $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, skupina $-\text{COO}i\text{C}_3\text{H}_7$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je methylová skupina;

R^2 je nesubstituovaná fenylová skupina, pyridylová skupina nebo methylová skupina;

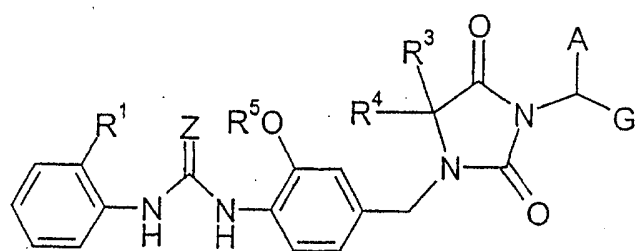
R^3 a R^4 jsou trifluormethylové skupiny;

R^5 je methylová skupina;

ve všech jejich stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech,

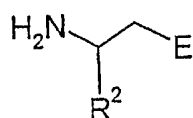
a jejich fyziologicky přijatelné soli.

Sloučeniny vzorce I je možno připravit například kondenzací sloučeniny vzorce II



(II)

se sloučeninou vzorce III



(III)

kde ve vzorcích II a III skupiny A, E, Z, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 jsou definovány výše, nebo funkční skupiny alternativně mohou

v těchto skupinách být v chráněné formě nebo ve formě prekurzorů, a kde G je hydroxykarbonylová skupina, (C_1-C_6) -alkoxykarbonylová skupina nebo aktivované deriváty karboxylové kyseliny jako jsou například chloridy kyseliny nebo aktivní estery kyseliny.

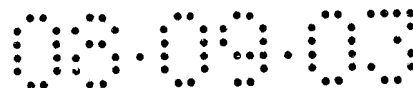
Při kondenzaci sloučenin vzorce II a III je zpravidla nezbytné aby karboxylová skupina, která je přítomna ale neúčastní se kondenzační reakce, byla chráněna odštěpitelnou chránicí skupinou a byla přítomna například ve formě vhodného (C_1-C_6) -alkylesteru jako je terc-butylester nebo benzylester. Jestliže se mají připravit sloučeniny vzorce I, ve kterých substituent E je například hydroxykarbonylová skupina nebo skupina, která se má připravit z hydroxykarbonylové skupiny, pak například ve sloučeninách vzorce III může být substituent E napřed hydroxykarbonylová skupina v chráněné formě a potom, po kondenzaci sloučenin vzorce II a III, může se hydroxykarbonylová skupina uvolnit, a/nebo se žádaná konečná skupina E může syntetizovat v jednom nebo více dalších krocích.

Prekurzory funkčních skupin jsou skupiny, které mohou být přeměněny na žádanou funkční skupinu obvyklými syntetickými postupy, které jsou odborníkovi známy. Tak například kyano skupinu, kterou je možno převést na karboxylovou skupinu hydrolýzou, můžeme označit jako prekurzor této skupiny.

Alkoholová skupina, kterou je možno oxidovat na skupinu aldehydovou, se může označit jako prekurzor této skupiny.

Příklady chránících skupin, které je možno zavést před provedením reakce nebo reakčního sledu a které je pak zase možno odstranit, byly již uvedeny výše.

Pro kondenzaci sloučenin vzorce II a III se s výhodou používají kondenzační metody peptidové chemie, které jsou samy o sobě odborníkovi známy (viz například Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie (Methods in Organic Chemistry), sv. 15/1 a 15/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974). Možnými



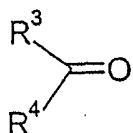
kondenzačními nebo kaplingovými činidly jsou například karbonyldiimidazol, karbodiimidy jako dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo diisopropylkarbodiimid, O-((kvan(ethoxykarbonyl)-methylen)amino)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborát (TOTU) nebo anhydrid kyseliny propylfosfonové (PPA).

Kondenzace se mohou provádět za standardních podmínek, které jsou odborníkovi dobře známy. Obecně se provádějí v inertním rozpouštědle nebo ředidle, například v aprotickém rozpouštědle jako je N,N-dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), N-methyl-2-pyrrolidon (NMP), tetrahydrofuran (THF) nebo dimethoxyethan (DME). Podle toho, o jakou konkrétní kondenzaci se jedná, může být výhodné přidat bázi jako je terciární amin, nebo pomocná činidla, například N-hydroxysloučeninu jako je 1-hydroxybenzotriazol (HOBt). Zpracování reakční směsi a čištění produktu se může provádět za použití obvyklých standardních postupů. Po kondenzaci se přítomné chránicí skupiny vhodným způsobem odstraní. Tak například benzylové skupiny v benzylesterech se mohou odstranit katalytickou hydrogenací, nebo chránicí skupiny terc-butylového typu lze odstranit působením vhodné kyseliny. Sloučeniny vzorce I je též možno připravit například postupnou syntézou na pevné fázi za použití běžných metod, přičemž je možno zavádět jednotlivé strukturní prvky molekuly v různém pořadí.

Aminosloučeniny vzorce III jsou komerčně dostupné nebo se dají syntetizovat podle dobře známých standardních postupů nebo analogicky k nim, přičemž výchozí sloučeniny jsou komerčně dostupné nebo se dají získat postupy, popsány v literatuře, nebo analogicky k nim. Tak například opticky aktivní 3-substituované 3-aminopropionové kyseliny vzorce III nebo jejich estery, zvláště estery kyseliny 3-fenyl-3-aminopropionové, se dají připravit z odpovídajících 3-substituovaných akrylových kyselin, které zase lze připravit z odpovídajících aldehydů. 3-Substituované akrylové kyseliny se působením oxalylchloridu

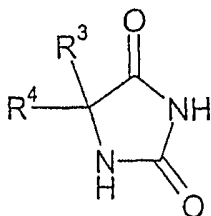
převědou na acylchloridy a ty působením alkoholů na estery, například působením terc-butylalkoholu se připraví terc-butyl-estery. Aminová skupina se zavede tak, že se ester podrobí reakci s lithnou solí opticky aktivního aminu, například s lithnou solí (R)-(+)-N-benzyl-N-(1-fenylethyl)aminu, a pak se benzylová skupina a fenethyllová skupina v získaném 3-substituovaném terc-butyl-3-(N-benzyl-N-(1-fenylethyl)amino)-propionátu odstraní katalytickou hydrogenací. Pro přípravu sloučenin vzorce III, kde E je hydroxymethylová skupina CH_2OH , nebo etherifikovaná hydroxymethylová skupina, je možno v kondenzační reakci použít 3-substituované 3-aminopropanoly nebo jejich estery, které se dají získat ze 3-substituovaných 3-aminopropionových kyselin nebo jejich esterů, například z ethylesteru nebo terc-butylesteru, redukcí karboxylové nebo esterové skupiny za použití hydridu lithnohlinitého nebo směsi hydrid lithnohlinitý/chlorid hlinitý.

Sloučeniny vzorce II se mohou připravit například tak, že se napřed sloučeniny vzorce IV



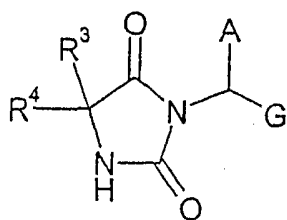
(IV)

podrobí Buchererově reakci, například s uhličitánem amonným a kyanidem draselným, čímž vzniknou sloučeniny vzorce V



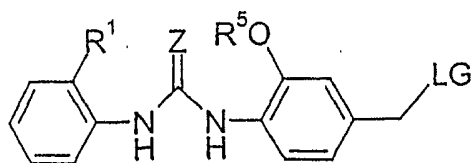
(V)

a ty se pak podrobí reakci s alkylačním činidlem vzorce LG-CHA-G, které zavede zbytek vzorce -CHA-G do molekuly, čímž se získají sloučeniny vzorce VI



(VI)

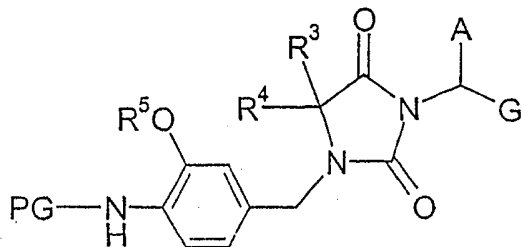
kde A, R³, R⁴ a G jsou definovány výše. Reakce sloučenin vzorce VI s druhým alkylačním činidlem vzorce VII



(VII)

kde Z, R¹ a R⁵ jsou definovány výše, vede pak k odpovídajícím sloučeninám vzorce II. Skupina LG je nukleofilně substituovatelná odstupující skupina, například halogen, zvláště chlor nebo brom, nebo sulfonyloxyskupina jako je tosyloxyskupina, methylsulfonyloxyskupina nebo trifluormethylsulfonyloxyskupina.

Sloučeniny vzorce II se také mohou připravit například tak, že se sloučenina vzorce VI napřed podrobí reakci s činidlem vzorce 4-(PG-NH)-C₆H₃(OR⁵)-CH₂-LG, kde LG je nukleofilně substituovatelná odstupující skupina jak bylo vysvětleno výše, čímž se získá sloučenina vzorce VIII



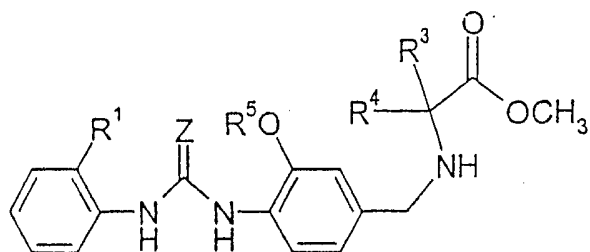
(VIII)

kde A, G, R³, R⁴ a R⁵ mají výše uvedené významy a PG je skupina, chránící aminoskupinu, například terc-butoxykarbonylová skupina nebo benzyloxykarbonylová skupina. Po odstranění chránící skupiny PG se sloučeniny vzorce II získají reakcí

uvolněné aminové skupiny H_2N s fenylisokyanátem, fenylisothiokyanátem, 2-methylfenylisokyanátem nebo 2-methylfenylisothiokyanátem. Právě tak jako sloučeniny vzorce VIII, je možno připravit a použít v syntéze i sloučeniny, ve kterých ve vzorci VIII je skupina PG-NH- zaměněna skupinou, která je prekurzorem aminové skupiny a která je pak převedena na aminovou skupinu v dalším reakčním stupni. Tak například sloučenina vzorce VI se může napřed podrobit reakci s nitrosloučeninou vzorce $4\text{-O}_2\text{N-C}_6\text{H}_3(\text{OR}^5)\text{-CH}_2\text{-LG}$ za vzniku sloučeniny odpovídající sloučenině vzorce VIII, načež se nitroskupina může převést na aminovou skupinu například katalytickou hydrogenací, a pak se aminová skupina může převést na žádanou sloučeninu vzorce II působením fenylisokyanátu, fenylisothiokyanátu, 2-methylfenylisokyanátu nebo 2-methylfenylisothiokyanátu.

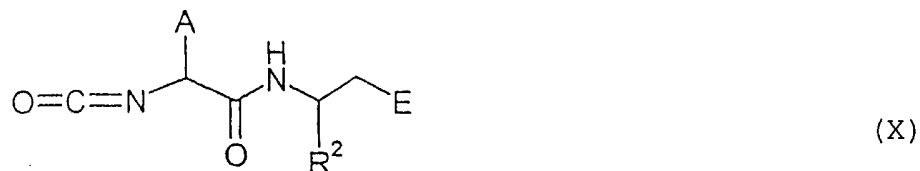
Obecně mohou být jednotlivé kroky při přípravě sloučenin vzorce I prováděny běžnými metodami, které jsou odborníkovi známy, nebo analogicky podle nich. Jak již bylo vysvětleno, podle okolností může být v individuálních případech vhodné v jakémkoliv stupni syntézy sloučenin vzorce I dočasně blokovat funkční skupiny, které by mohly vést k vedlejším reakcím nebo k nežádoucím reakcím, za použití chránicí strategie vhodné pro danou syntézu, kteréžto postupy jsou odborníkovi známy.

Sloučeniny vzorce I je také možno získat následujícím způsobem. N-Substituované aminokyseliny nebo lépe jejich estery, například methylestery, ethylestery, terc-butylestery nebo benzylestery, které je možno získat obvyklými metodami, například sloučeniny vzorce IX

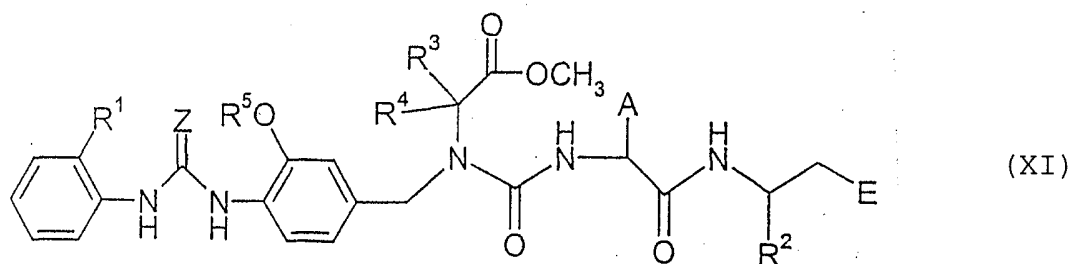


(IX)

kde Z, R¹, R³, R⁴ a R⁵ jsou definovány výše,
se podrobí reakci s isokyanáty vzorce X



pro které platí výše uvedené definice pro A, E a R² a které lze
získat standardními postupy z odpovídajících sloučenin
majících skupinu H₂N místo isokyanátové skupiny,
čímž se získají močovinné deriváty, například sloučeniny
vzorce XI

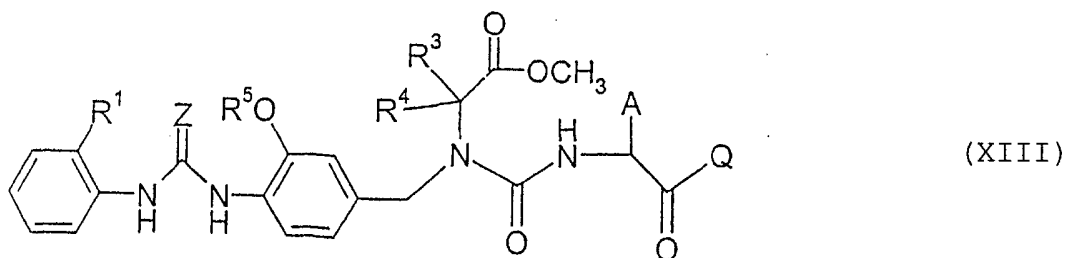


pro které platí výše uvedené definice. Sloučeniny vzorce XI se
pak mohou cyklizovat zahříváním s kyselinou za tvorby slou-
čenin vzorce I. Cyklizaci sloučenin vzorce XI na sloučeniny
vzorce I je též možno provést působením bází v inertních
rozpuštědlech, například působením hydridu sodného v
aprotickém rozpuštědle jako je dimethylformamid. Jak již bylo
zmíněno výše, mohou být funkční skupiny během reakcí přítomny
v chráněné formě.

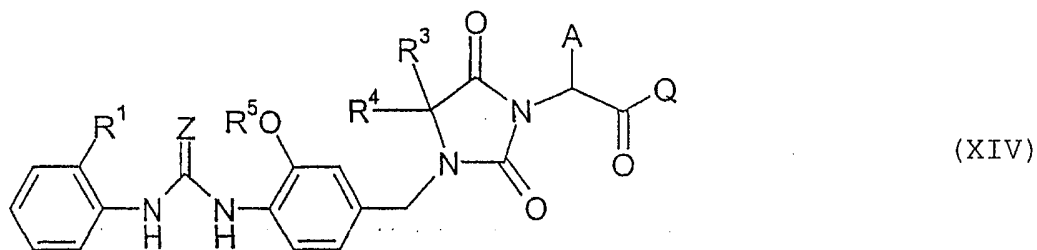
Sloučeniny vzorce I je také možno získat reakcí sloučenin
vzorce IX s isokyanáty vzorce XII



kde A má výše uvedené významy a Q je například alkoxylová skupina, například (C₁-C₄)-alkoxylová skupina jako je methoxylová, ethoxylová nebo terc-butoxylová skupina, nebo (C₆-C₁₄)-aryl-(C₁-C₄)-alkoxylová skupina, například benzyl-oxylová skupina. Tato reakce poskytne sloučeninu vzorce XIII

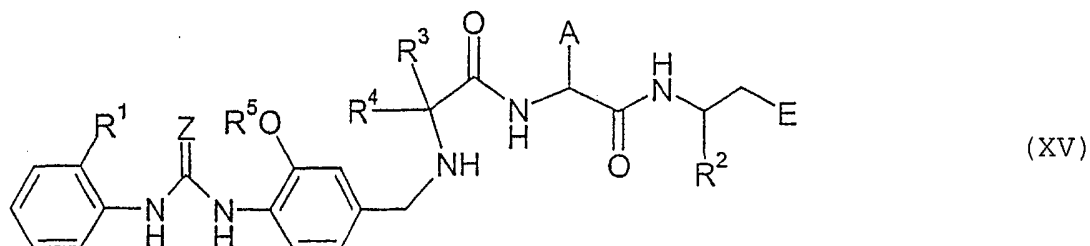


kde A, Q, Z, R¹, R³, R⁴ a R⁵ jsou definovány výše, která se pak cyklizuje v přítomnosti kyseliny nebo báze jak je popsáno výše pro cyklizaci sloučenin vzorce XI, na sloučeninu vzorce XIV



kde A, Q, Z, R¹, R³, R⁴ a R⁵ jsou definovány výše. Ve sloučenině vzorce XIV je potom možné přeměnit skupinu CO-Q na karboxylovou skupinu COOH, například hydrolýzou. Jestliže se cyklizace sloučeniny vzorce XIII na sloučeninu XIV provádí za použití kyseliny, konverzi skupiny CO-Q na skupinu COOH je možno provést současně s cyklizací. Následná kondenzace se sloučeninou vzorce III, jak je popsána výše pro kondenzaci sloučenin vzorce II a III, pak poskytne sloučeninu vzorce I. I v této syntetické cestě mohou být funkční skupiny přítomny v chráněné formě nebo ve formě prekurzorů.

Dalším způsobem přípravy sloučenin vzorce I je například reakce sloučenin vzorce XV



kde substituenty jsou definovány jak uvedeno výše,
s fosgenem nebo jeho ekvivalenty (analogicky jak popisují
S. Goldschmidt a M. Wick, Liebigs Ann. Chem. 575 (1952), 217,
a C. Tropp, Chem. Ber. 61 (1928), 1431).

Sloučeniny vzorce I je též možno připravit tak, že sloučenina
vzorce XVI

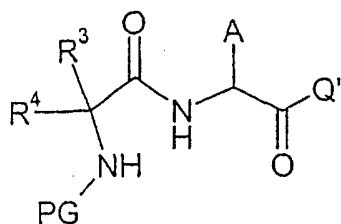


kde R³ a R⁴ mají významy uvedené výše a PG je aminy chránící
skupina jako je například benzyloxykarbonylová skupina,
se napřed kondenzuje se sloučeninou vzorce XVII



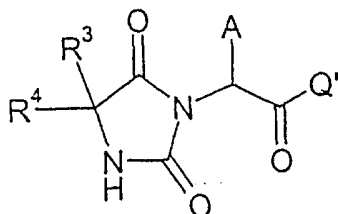
kde A má význam uvedený výše a Q' je chráněný hydroxyl
karboxylové kyseliny, například alkoxylová skupina jako je
terc-butoxylová skupina,

za vzniku sloučeniny vzorce XVIII



(XVIII)

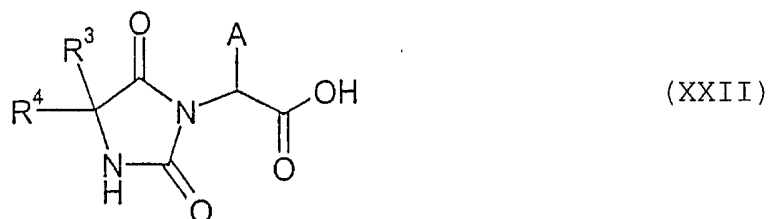
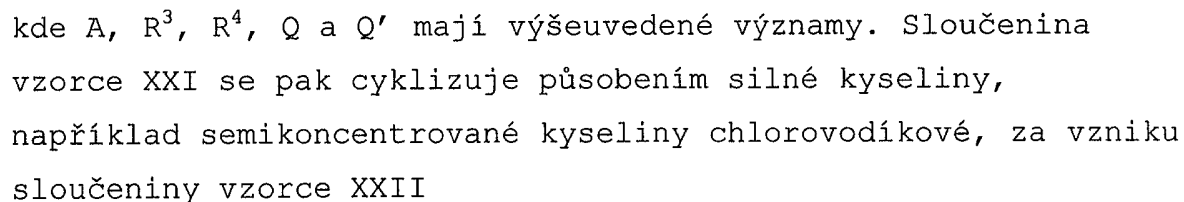
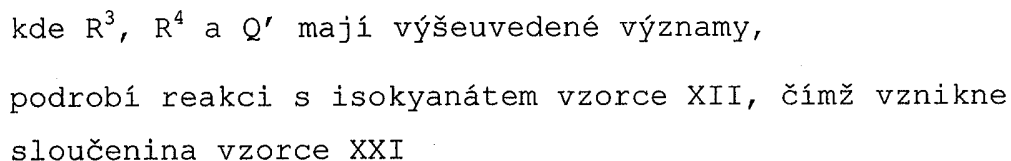
kde A, R³, R⁴, PG a Q' mají výše uvedené významy. V sloučenině vzorce XVIII se pak může chránicí skupina PG selektivně odstranit z aminové skupiny, například hydrogenací v případě benzyloxykarbonylové skupiny, a může se zavedením skupiny CO provést cyklizace na sloučeninu vzorce XIX



(XIX)

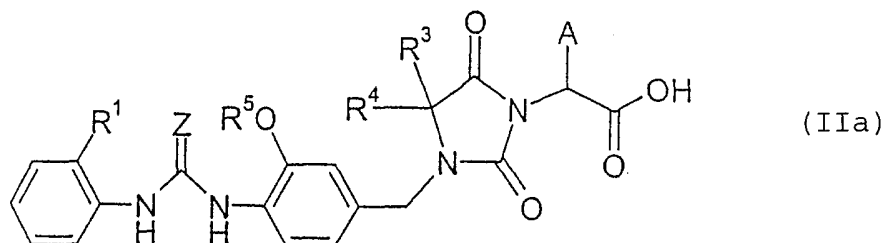
kde A, R³, R⁴ a Q' mají výše uvedené významy. Pro zavedení karbonylové skupiny je možno použít například fosgen nebo jeho ekvivalent jako je difosgen (analogicky jako při výšepopsané reakci sloučenin vzorce XV). Při převedení sloučeniny vzorce XVIII na sloučeninu vzorce XIX může jako meziprodukt vznikat například isokyanát, nebo se může speciálně připravit. Přeměna sloučeniny vzorce XVIII na sloučeninu vzorce XIX se může provést v jednom nebo ve více stupních. Tak například se může nejdříve zavést karbonylová skupina a pak v odděleném kroku lze provést cyklizaci v přítomnosti báze jako je hydrid sodný, jak je popsáno pro cyklizace, uvedené výše. Sloučeniny vzorce XVIII, kde PG je benzyloxykarbonylová skupina, se mohou také převést přímo na sloučeniny vzorce XIX, aniž by se pro zavedení karbonylové skupiny použil syntetický stavební blok jako je fosgen. Jestliže sloučeniny vzorce XVIII, kde PG je benzyloxykarbonylová skupina, jsou podrobeny působení báze jako je hydrid sodný, mohou být sloučeniny vzorce XIX získány přímo.

Sloučeniny vzorce I mohou být dále připraveny i tak, že se
napřed sloučenina vzorce XX



Sloučeniny vzorce XXII se mohou rovněž připravit tak, že se napřed připraví sloučenina vzorce XVIII, kde A, R³, R⁴ a Q' mají výše uvedené významy a PG je alkoxykarbonylová skupina jako je (C₁-C₄)-alkoxykarbonylová skupina, (C₆-C₁₄)-aryl-(C₁-C₄)-alkoxykarbonylová skupina jako je fenyl-(C₁-C₄)-alkoxykarbonylová skupina, nebo (C₆-C₁₄)-aryloxykarbonylová skupina jako je fenyloxykarbonylová skupina, načež se uvolněním chráněné karboxylové skupiny CO-Q' tato sloučenina převede na sloučeninu vzorce XVIII, kde CO-Q' je volná karboxylová skupina CO-OH, PG je (C₁-C₄)-alkoxykarbonylová skupina, (C₆-C₁₄)-aryl-(C₁-C₄)-alkoxykarbonylová skupina nebo (C₆-C₁₄)-aryloxykarbonylová skupina a A, R³ a R⁴ mají výše uvedené významy, a tato sloučenina se cyklizuje působením báze, jako je například uhličitán sodný, na sloučeninu vzorce XXII.

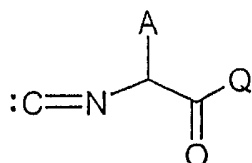
Sloučeniny vzorce IIa



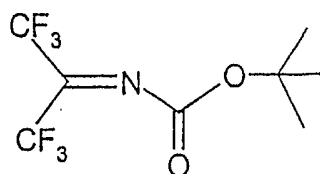
kde A, Z, R¹, R³, R⁴ a R⁵ mají výše uvedené významy, je možno připravit reakcí sloučenin vzorce XXII za přítomnosti přebytku báze, například za přítomnosti přebytku n-butyllithia, s alkylačním činidlem vzorce VII a následným oksylením. 4-(3-Aryluroido)benzylovou skupinu nebo 4-(3-aryltioureido)benzylovou skupinu je možno také zavést postupně, analogicky přípravě sloučenin vzorce VIII, a z nich získané sloučeniny vzorce II se převedou na sloučeniny vzorce XXII.

Sloučeniny vzorce I, kde substituenty R³ a R⁴ jsou trifluor-methylové skupiny, se mohou výhodně připravit reakcí

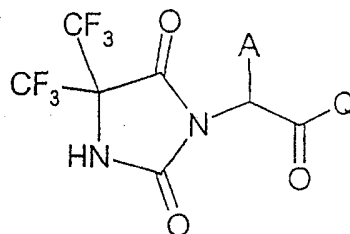
isonitrilu vzorce XXIII s 2-terc-butoxy-4,4-bis(trifluor-methyl)-1,3-oxazabuta-1,3-dienem vzorce XXIV za vzniku sloučeniny vzorce XXV,



(XXIII)



(XXIV)



(XXV)

kde A a Q mají výše uvedené významy. Tak například skupina $C(=O)-Q$ je esterová skupina a Q je například alkoxylová skupina jako je (C_1-C_4) -alkoxylová skupina včetně methoxylové skupiny, ethoxylové skupiny a terc-butoxylové skupiny, nebo (C_6-C_{14}) -aryl- (C_1-C_4) -alkoxylová skupina včetně benzyloxylové skupiny. Reakce sloučenin vzorce XXIII a XXIV, vedoucí ke sloučeninám vzorce XXV se s výhodou provádí v uhlovodíku nebo etheru jako rozpouštědle, například v benzenu nebo toluenu, za zahřívání například na teploty od přibližně 40°C do přibližně 80°C , například při přibližně 60°C .

Isonitrily (isokyanidy) vzorce XXIII se mohou získat standardními odborníky známými metodami z odpovídajících esterů aminokarboxylových kyselin vzorce $H_2N-CHA-C(=O)-Q$, kde A a Q mají výše uvedené významy. Ester aminokarboxylové kyseliny vzorce $H_2N-CHA-C(=O)-Q$ se s výhodou napřed převede reakcí s reaktivním esterem kyseliny mravenčí, například s kyanmethylformiátem, na ester N-formylaminokyseliny vzorce $HC(=O)-NH-CHA-C(=O)-Q$, který se pak převede, například reakcí s fosgenem nebo jeho ekvivalentem jako je difosgen nebo trifosgen za přítomnosti terciárního aminu jako je triethylamin, na isokyanid vzorce XXIII. Zmíněný 2-terc-butoxy-4,4-bis(trifluormethyl)-1,3-oxazabuta-1,3-dien vzorce XXIV

lze připravit postupem, který popsal Steglich a spol.

(Chemische Berichte 107 (1974), 1488), z terc-butylkarbamátu ($(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}_2$) a bezvodého hexafluoracetonu a následnou reakcí takto získaného 2-terc-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-1,1,1,3,3,3-hexafluorpropanu s anhydridem kyseliny trifluoroctové v přítomnosti báze jako je chinolin.

Sloučeniny vzorce XXV se pak mohou alkylovat na skupině NH, například sloučeninami vzorce VII, za vzniku sloučenin vzorce XIV, které po eventuelní konverzi esterové skupiny CO-Q na karboxylovou skupinu CO-OH reakcí se sloučeninami vzorce III poskytnou sloučeniny vzorce I, jak je popsáno výše. Ve sloučeninách XXV je též možno esterovou skupinu CO-Q napřed převést standardními postupy na karboxylovou skupinu CO-OH a sloučeninu vzorce XXII, získanou jak je popsáno výše, převést reakcí s alkylačním činidlem vzorce VII za přítomnosti přebytku báze na sloučeninu vzorce IIa, která pak reakcí se sloučeninou vzorce III poskytne sloučeninu vzorce I. Analogicky k přípravě výšepopsaných sloučenin vzorce VIII a z nich získaných sloučenin vzorce II nebo IIa, může se 4-(3-arylureido)benzylová skupina nebo 4-(3-arylthioureido)benzylová skupina rovněž zavést postupně do sloučenin vzorce XXV. U těchto reakcí mohou být funkční skupiny také přítomny v chráněné formě nebo ve formě prekurzorů.

Sloučeniny vzorce I, ve kterých E je například hydroxykarbonylová skupina nebo hydroxymethylová skupina, mohou být převedeny standardními postupy na sloučeniny vzorce I, ve kterých E má jiné významy, nebo na jiná profarmaka nebo deriváty sloučenin vzorce I. Tak při přípravě esterů sloučeniny vzorce I, ve kterých E je hydroxykarbonylová skupina, je možno esterifikaci provést s použitím příslušných alkoholů, například za přítomnosti kondenzačního činidla jako je DCC, nebo sloučeniny vzorce I, ve kterých E je hydroxykarbonylová skupina, se mohou alkylovat alkylhalogenidy jako jsou

alkylchloridy nebo alkylbromidy, například acyloxyalkylhalogenidy, za vzniku sloučenin vzorce I, ve kterých E je skupina acyloxyalkoxy-CO-. Sloučeniny vzorce I, ve kterých E je hydroxykarbonylová skupina, se mohou převést na amidy působením amoniaku nebo organických aminů v přítomnosti kondenzačního činidla. Sloučeniny vzorce I, ve kterých E je skupina CO-NH₂, je možno také s výhodou získat metodou syntézy na pevné fázi, a to kondenzací sloučeniny, ve které E je skupina COOH, k Rinkově amidové pryskyřici za přítomnosti kondenzačního činidla jako je TOTU, a jejím opětovným odstraněním z pryskyřice působením kyseliny trifluoroctové. Sloučeniny vzorce I, ve kterých E je hydroxymethylová skupina CH₂OH, se mohou za použití standardních postupů etherifikovat na hydroxymethylové skupině. Za použití standardních postupů pro selektivní oxidaci alkoholů na aldehydy, například za použití chlornanu sodného v přítomnosti 4-acetamido-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu (4-acetamido-TEMPO), se mohou sloučeniny vzorce I, ve kterých substituent E je skupina CH₂OH, převést na sloučeniny vzorce I, ve kterých E je aldehydická skupina -CO-H.

Sloučeniny vzorce I, ve kterých substituent R⁵ je atom vodíku, je též možno připravit etherickým štěpením ze sloučenin vzorce I, ve kterých R⁵ je methylová skupina. Tak například methoxylová skupina, reprezentující skupinu R⁵O, se může převést na hydroxylovou skupinu působením bromidu boritého.

Sloučeniny vzorce I jsou cenné farmakologicky aktivní sloučeniny, které jsou vhodné například pro ošetření zánětlivých onemocnění, alergických onemocnění nebo astmatu. Sloučeniny vzorce I a jejich fyziologicky přijatelné soli a deriváty se podle vynálezu mohou podávat živočichům, zejména savcům, a zvláště lidem, jako léčiva pro ošetření chorobných stavů, přičemž ošetřením se obecně rozumí jak terapie akutních nebo chronických symptomů nemoci, tak profylaxe nebo zabránění symptomů nemoci, t.j. například prevence výskytu symptomů

akutních alergických nebo astmatických onemocnění, nebo prevence infarktu myokardu nebo reinfarktu myokardu u příslušných pacientů. Sloučeniny vzorce I a jejich soli a deriváty je možno podávat jako takové, v jejich vzájemných směsích, nebo ve formě farmaceutických prostředků, které umožňují enterální nebo parenterální podání a které jako aktivní složku obsahují účinnou dávku přinejmenším jedné sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů, a farmaceuticky přijatelný nosič.

Předložený vynález se proto týká rovněž sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů pro použití jako léčebných prostředků (nebo léčiv), použití sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů pro výrobu léčebných prostředků pro ošetření výše i níže zmíněných onemocnění, například pro ošetření zánětlivých onemocnění, a použití sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů při ošetření těchto onemocnění. Předložený vynález se dále týká farmaceutických prostředků (nebo farmaceutických kompozic), které obsahují účinné množství přinejmenším jedné sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů a farmaceuticky přijatelný nosič, t.j. jedno nebo více neškodných vehikulí a/nebo přísad.

Léčebné prostředky se mohou aplikovat systemicky nebo lokálně. Mohou se podávat například orálně ve formě pilulek, tablet, potahovaných tablet, cukrem potahovaných tablet, granulí, tvrdých nebo měkkých želatinových tobolek, prášků, roztoků, syrupů, emulzí, suspenzí, nebo v jiných farmaceutických formách. Mohou se však podávat i vaginálně nebo rektálně, například ve formě čípků, nebo parenterálně nebo jako implantáty, například ve formě injekčních roztoků nebo infuzních roztoků, mikrokapslí nebo tyčinek, nebo topicky nebo perkutánně, například ve formě krémů, mastí, prášků, roztoků,

emulzí nebo tinktur, nebo jiným způsobem, například ve formě nosních sprejů nebo aerosolových směsí. Parenterální podání roztoků se může dít například intravenózně, intramuskulárně, subkutánně, intraartikulárně, intrasynoviálně nebo jiným způsobem.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu se připraví způsobem, který je sám o sobě znám, a to tak, že se sloučenina nebo sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelné soli a/nebo deriváty smísí s farmaceuticky inertními anorganickými a/nebo organickými vehikuly a/nebo přísadami a ze směsi se vytvoří vhodná dávková forma a aplikační forma. Pro přípravu pilulek, tablet, cukrem potahovaných tablet a tvrdých želatinných tobolek se může použít například laktosa, kukuřičný škrob nebo jeho deriváty, mastek, kyselina stearová nebo její soli, polyethylenglykoly atd., pro přípravu měkkých želatinných tobolek a čípků se mohou použít například tuky, vosky, polotuhé a kapalné polyoly, polyethylenglykoly, přírodní nebo ztužené oleje atd. Vhodná vehikula pro přípravu roztoků, například injekčních roztoků, nebo emulzí nebo syropů jsou například voda, alkoholy, glycerol, dioly, polyoly, sacharosa, invertní cukr, glukosa, rostlinné oleje apod. Vhodnými vehikuly pro mikrokapsle, implantáty nebo tyčinky jsou například kopolymery kyseliny glykolové a kyseliny mléčné.

Farmaceutické prostředky obvykle obsahují od přibližně 0,5 do přibližně 90 % hmotnostních sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů. Množství aktivní sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů ve farmaceutických prostředcích se pohybuje normálně od přibližně 0,2 do přibližně 1000 mg, s výhodou od přibližně 1 do přibližně 500 mg. Podle charakteru farmaceutického prostředku může však být toto množství i větší.

Vedle aktivních sloučenin a vehikulí mohou farmaceutické prostředky obsahovat také excipienty nebo přísady, například plnidla, desintegranty, pojiva, mazadla, zvlhčovadla, stabilizátory, emulgátory, preservanty, sladidla, barviva, chuťové přísady, aromatizační přísady, zahušťovadla, ředidla, pufry, rozpouštědla, sulubilizátory, činidla pro dosažení depotního efektu, soli pro změnu osmotického tlaku, potahové látky nebo antioxidanty. Rovněž mohou obsahovat dvě nebo několik sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů. Dále vedle přinejmenším jedné sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů mohou tyto prostředky obsahovat také jednu nebo několik farmaceuticky aktivních sloučenin s protizánětlivou účinností.

Jestliže sloučeniny vzorce I nebo farmaceutické prostředky je obsahující jsou aplikovány jako aerosoly, například nosní aerosoly nebo inhalačně, může se tak dít například s použitím spreje, nebulizéru, nebulizéru s pumpou, inhalačního aparátu, dávkovacího inhalátoru nebo inhalátoru pro suchý prach.

Farmaceutické formy pro aplikaci sloučenin vzorce I ve formě aerosolu se dají připravit postupy, které jsou odborníkovi dobře známy. Pro jejich přípravu se například mohou použít roztoky nebo disperze sloučenin vzorce I ve vodě, ve směsích voda-alkohol nebo ve vhodných roztocích solí, s použitím obvyklých přísad, například benzylalkoholu nebo jiných vhodných konzervačních látek, zvyšovačů absorpce pro zvýšení biologické dostupnosti, solubilizátorů, dispergentů a jiných látek, a pokud je to vhodné, i obvyklých hnacích plynů, například chlorfluoruhlovodíků a/nebo fluoruhlovodíků.

Jiné farmaceuticky aktivní sloučeniny, které mohou být kromě sloučenin vzorce I obsaženy ve farmaceutických prostředcích podle vynálezu, ale se kterými sloučeniny vzorce I mohou být rovněž kombinovány ve smyslu kombinační terapie, jsou zejména

takové aktivní sloučeniny, které jsou vhodné pro ošetření, t.j. pro terapii nebo profylaxi, výše uvedených i níže uvedených nemocí, pro které je ošetření sloučeninami vzorce I vhodné. Jako příklady druhů aktivních látek tohoto typu je možno uvést steroidy, nesteroidní protizánětlivé látky, nesteroidní protizánětlivé deriváty kyseliny octové, nesteroidní protizánětlivé deriváty kyseliny propionové, nesteroidní antiastmatika, deriváty kyseliny salicylové, pyrazolony, oxicamy, antagonisty leukotrienu, inhibitory biosyntézy leukotrienu, inhibitory cyklooxygenázy, inhibitory cyklooxygenázy-2 (inhibitory COX-2), antihistaminy, antagonisty H₁-histaminu, nesesedativní antihistaminy, sloučeniny zlata, β 2-agonisty, anticholinergní látky, antagonisty muskarinu, sloučeniny snižující hladinu lipidů, sloučeniny snižující hladinu cholesterolu, inhibitory HMG-CoA-reduktázy, statiny, deriváty kyseliny nikotinové, imunosupresanty, cyklosporiny, β -interferony, protinádorová léčiva, cytostatika, inhibitory metastáz, antimetabolity, deriváty kyseliny 5-aminosalicylové, antidiabetika, inzuliny, sulfonylmočoviny, biguanidy, glitazony, inhibitory α -glukosidázy a jiné. Jako příklady vhodných aktivních sloučenin je možno uvést kyselinu acetylsalicylovou, benorilát, sulfasalazin, fenylbutazon, oxyfenbutazon, metamizol, mofebutazon, feprazon, celecoxib, rofecoxib, diklofenac, fentiazac, sulindac, zomepirac, tolmetin, indometacin, acemetacin, ibuprofen, naproxen, carprofen, fenbufen, indoprofen, ketoprofen, piroprofen, tiaprofen-kyselinu, diflunisal, kyselinu flufenamovou, kyselinu meclofenamovou, kyselinu mefenamovou, kyselinu niflumovou, kyselinu tolfenamovou, piroxicam, isoxicam, tenoxicam, kyselinu nikotinovou, prednison, dexamethason, hydrokortison, methylprednison, betamethason, beclomethason, budesonid, montelukast, pranlukast, zafirlukast, zileuton, ciclosporin, cyklosporin A, rapamycin, tacrolimus, methotrexat, 6-merkaptopurin,

azathioprin, interferon-beta-1a, interferon-beta-1b, kyselinu 5-aminosalicylovou, leflunomid, D-penicilamin, chlorochin, glibenclamid, glimepirid, troglitazon, metformin, acarbosu, atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, simvastatin, prava-
statin, colestipol, colestyramin, probucol, clofibrat, fenofibrat, bezafibrat, gemfibrozil, ipatropiumbromid, clen-
buterol, fenoterol, metaproterenol, pirbuterol, tulobuterol, salbutamol, salmeterol, terbutalin, isoetharin, ketotifen, efedrin, oxitropiumbromid, atropin, kyselinu cromoglykovou („cromoglycic acid“), theofillin, fexofenadin, terfenadin, cetirizin, dimetinden, difenhydramin, difenylpiralin, feniramin, bromfeniramin, chlorfeniramin, dexchlorfeniramin, alimezain, antazolin, astemizol, azatadin, clemastin, cypro-
heptadin, hydroxyzin, loratidin, mepyramin, promethazin, tripelennamin, triprolidin a jiné.

Jestliže se sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelné soli a/nebo deriváty mají použít v kombinační terapii s jednou nebo několika jinými aktivními sloučeninami v jediném farmaceutickém prostředku, může se to provést jak bylo zmíněno podáním všech aktivních sloučenin společně v jediném farmaceutickém prostředku, například v tabletě nebo tobolce. Předložený vynález se též výslovně týká farmaceutic-
kých prostředků tohoto typu, pro které platí všechna výše-
vedená vysvětlení. Množství aktivních sloučenin v těchto farmaceutických prostředcích je obecně voleno tak, aby obsahovaly účinné množství každé z aktivních sloučenin.

Kombinační terapie se však může provádět i tak, že aktivní sloučeniny jsou přítomny ve dvou nebo několika samostatných farmaceutických prostředcích, které mohou být v jednom balení nebo ve dvou nebo několika samostatných baleních. Sloučeniny vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelné soli a/nebo deriváty a jiné aktivní sloučeniny se mohou podávat společně nebo odděleně a současně nebo po sobě, v jakémkoliv pořadí.

Aplikace se také může provést různými způsoby, například jedna aktivní sloučenina se může aplikovat orálně a druhá injekcí, inhalací nebo topicky. Všechny takové způsoby jsou v předloženém vynálezu zahrnuty.

Sloučeniny vzorce I mají například schopnost inhibovat pochody interakce buňka-buňka a interakce buňka-matrice, ve kterých hrají roli interakce mezi VLA-4 a jeho ligandy. Účinnost sloučenin vzorce I je možno demonstrovat například testem, ve kterém se měří vazba buněk, obsahujících receptor VLA-4, například leukocytů, k ligandům těchto receptorů, například k VCAM-1, který se za tímto účelem může s výhodou také připravit za použití genetického inženýrství. Podrobnosti takového testu jsou popsány níže. Sloučeniny vzorce I mají zejména schopnost inhibovat adhezi a migraci leukocytů, například adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám, která - jak bylo vyloženo výše - je řízena VCAM-1/VLA-4 adhezním mechanismem. Vedle svého protizánětlivého účinku jsou proto sloučeniny vzorce I a jejich fyziologicky přijatelné soli a deriváty obecně vhodné pro ošetření, tj. pro terapii a profylaxi, onemocnění na bázi interakce mezi receptorem VLA-4 a jeho ligandy, nebo onemocnění, která se dají ovlivnit inhibicí této interakce, a zejména vhodné jsou pro ošetření onemocnění, která jsou alespoň zčásti způsobena nežádoucí mírou adheze a/nebo migrace leukocytů nebo s ní jsou spojena, a pro jejichž prevenci, zmírnění nebo léčbu by se měla adheze a/nebo migrace leukocytů snížit.

Předložený vynález se proto rovněž týká použití sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů pro inhibici adheze a/nebo migrace leukocytů nebo pro inhibici receptoru VLA-4, a rovněž se týká použití sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů pro přípravu příslušných léčiv, tj. léčiv pro ošetření onemocnění ve kterých adheze a/nebo migrace leukocytů

vykazuje nežádoucí míru, nebo pro ošetření onemocnění, ve kterých hrají roli VLA-4-dependentní adhezní pochody, a rovněž se týká použití sloučenin vzorce I a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí a/nebo derivátů při ošetření onemocnění tohoto typu.

Sloučeniny vzorce I se mohou použít jako protizánětlivé látky v případech zánětlivých symptomů velmi různého původu za účelem prevence, snížení nebo potlačení nežádoucích nebo škodlivých následků zánětu. Použijí se například pro ošetření, tj. terapii nebo profylaxi, artritidy, reumatoidní artritidy, polyartritidy, zánětlivých onemocnění střev (ulcerativní kolitida, Crohnova nemoc), systemického lupus erythematosus, zánětlivých onemocnění centrálního nervového systému jako například roztroušené sklerózy, astmatu nebo alergií jako například alergií opožděného typu (alergie typu IV). Dále jsou vhodné pro kardioprotekci, ochranu před mrtvicí a pro sekundární profylaxi mrtvice a pro ošetření, tj. terapii a profylaxi, kardiovaskulárních onemocnění, aterosklerózy, infarktu myokardu, reinfarktu myokardu, akutního koronárního syndromu, mrtvice, restenóz, diabetu, poškození orgánových transplantátů, imunitních onemocnění, autoimunních onemocnění, růstu nádorů nebo metastázování při různých nádorových onemocněních, malárie a dalších onemocnění, u kterých pro prevenci, zmírnění nebo léčbu je vhodná blokáce integrinu VLA-4 a/nebo ovlivnění aktivity leukocytů. Preferované použití je prevence infarktu myokardu nebo reinfarktu myokardu.

Dávka při použití sloučenin vzorce I se může pohybovat v širokém rozmezí, a jak je obvyklé a lékaři zřejmě, musí se přizpůsobit v jednotlivých případech individuálním podmínkám. Tak například záleží na charakteru a závažnosti ošetřeného onemocnění, na stavu pacienta, na použité sloučenině, nebo na tom, zda jde o terapii či profylaxi akutního nebo chronického stavu nemoci, nebo na tom, zda se vedle sloučenin vzorce I

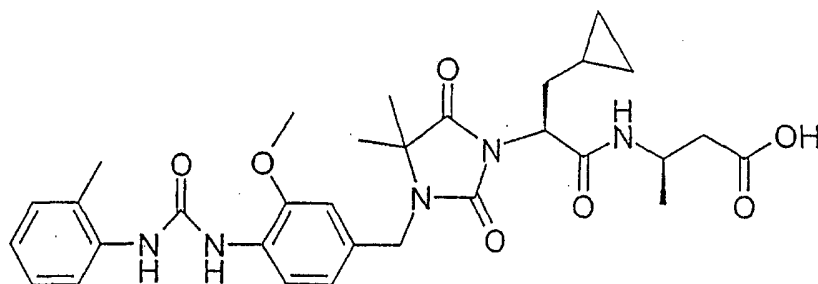
aplikují další aktivní sloučeniny. Obecně se při orálním podání dospělému člověku o tělesné hmotnosti 75 kg dosáhne dobrého výsledku aplikací denní dávky od přibližně 0,01 do přibližně 100 mg/kg, s výhodou od 0,1 do přibližně 10 mg/kg (ve všech případech mg na kg tělesné hmotnosti). Při intra-venózní aplikaci je denní dávka obecně od přibližně 0,01 do přibližně 50 mg/kg, s výhodou od přibližně 0,01 do přibližně 10 mg/kg (ve všech případech mg na kg tělesné hmotnosti). Denní dávka může být rozdělena, zvláště v případě aplikace relativně velkých množství, a to na několik, například 2, 3 nebo 4 dílčí dávky. Jestliže je to vhodné, může být podle individuálního chování nutno odchýlit se od výše uvedených denní dávky směrem nahoru i dolů.

Vedle toho, že slouží jako farmaceuticky aktivní látky v humánní i veterinární medicíně, sloučeniny vzorce I a jejich soli a deriváty, vhodné pro zamýšlené použití, se mohou použít i pro diagnostické účely, například pro in vitro diagnózy vzorků buněk nebo tkání, a jako pomocné látky nebo vědecké nástroje v biochemických výzkumech, ve kterých se má blokovat VLA-4 nebo ovlivnit interakce buňka-buňka nebo interakce buňka-matrice. Dále se sloučeniny vzorce I a jejich soli mohou použít jako meziprodukty při přípravě jiných sloučenin, zvláště jiných farmaceuticky aktivních sloučenin, které je možno získat ze sloučenin vzorce I například modifikací nebo zavedením funkčních skupin, například esterifikací, redukcí, oxidací nebo jinými přeměnami funkčních skupin.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionová



1a) 4-(3-(2-Methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzylalkohol

15 g (81,8 mmol) 3-methoxy-4-nitrobenzylalkoholu se hydrogenuje na 1,3 g palladia na uhlí (10 %; 50 % vody) v 500 ml methyl-terc-butyletheru za chlazení ledem. Po úplné absorpci vodíku se katalyzátor odfiltruje a k filtrátu se za míchání během 30 minut přidá 10,14 ml (81,8 mmol) 2-methylfenylisokyanátu. Reakční směs se nechá stát přes noc a vyloučená pevná látka se odsaje a promyje methyl-terc-butyletherem. Získá se 20,5 g (88 %) produktu.

1b) 4-(3-(2-Methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzylchlorid

7,65 ml (104,8 mmol) thionylchloridu se přikape za chlazení ledem k suspenzi 15 g (52,4 mmol) sloučeniny z příkladu 1a ve 300 ml dichlormethanu. Reakční směs se míchá 3 hodiny při laboratorní teplotě, nechá se stát přes noc a pak se nalije do 1000 ml heptanu. Heptan se odlije od vyloučeného oleje, ten se znovu suspenduje v heptanu, který se znovu odlije. Tento pochod se opakuje ještě dvakrát. Zbytek se pak rozpustí v dichlormethanu a nalije se do 800 ml ledového diisopropyl-



etheru. Směs se míchá 2 hodiny za chlazení ledem a produkt se odsaje, promyje diisopropyletherem a vysuší se nad oxidem fosforečným. Získá se 12 g (75 %) produktu.

1c) Benzyl (S)-2-amino-3-cyklopropylpropionát

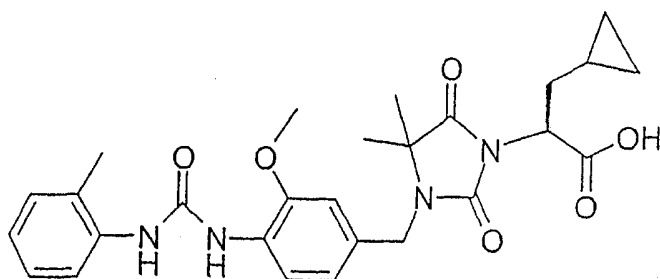
K suspenzi 10 g (77,5 mmol) kyseliny (S)-2-amino-3-cyklopropylpropionové ve 160 ml dioxanu se při 0°C přidává 1 N roztok hydroxidu sodného, až se dosáhne hodnoty pH 8-9. Pak se přidá 16,9 g (77,5 mmol) di-terc-butyldikarbonátu, ledová lázeň se odstraní a pH se udržuje na hodnotě 8-9 dalším přidáváním 1 N roztoku hydroxidu sodného. Směs se nechá stát přes noc, dioxan se odstraní ve vakuu, k vodné fázi se přidá ethylacetát a fáze se oddělí. Vodná fáze se nastaví na pH 4,5 přidávkem 1 N kyseliny chlorovodíkové a extrahuje se ethylacetátem. Získaná ethylacetátová fáze se vysuší nad síranem sodným, síran sodný se odfiltruje a filtrát se zahustí ve vakuu. Zbytek se rozpustí v 1000 ml dichlormethanu a k roztoku se přidá 53,4 ml benzylalkoholu, 8,37 g 4-dimethylamino-pyridinu a 18,8 g DCC. Směs se míchá 6 hodin, nechá se stát přes noc, pak se zfiltruje, filtrát se zahustí a ke zbytku se přidá 300 ml 90%ní kyseliny trifluoroctové. Směs se míchá 10 minut při laboratorní teplotě, kyselina trifluoroctová se odstraní ve vakuu a zbytek se dvakrát chromatografuje na silikagelu v soustavě dichlormethan-methanol (95:5). Získá se 11,48 g (68 %) produktu.

1d) Kyselina (S)-2-(4,4-dimethyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)octová

321 mg HOBT a 4,75 g (23,7 mmol) DCC se přidají k roztoku 3,82 g (23,7 mmol) kyseliny 2-methoxykarbonylamino-2-methylpropionové (přípravené z kyseliny 2-amino-2-methylpropionové a chlormravenčanu methylnatého) a 5,2 g (23,7 mmol) sloučeniny z

příkladu 1c ve 100 ml tetrahydrofuranu, a směs se míchá 4 hodiny při laboratorní teplotě. Směs se nechá stát přes noc, zfiltruje se, tetrahydrofuran se odstraní ve vakuu, zbytek se vyjme do methyl-terc-butyletheru a roztok se promyje dvakrát nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a dvakrát vodným roztokem $\text{KHSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Zbytek se rozpustí v ethylacetátu a podrobí se hydrogenaci za přítomnosti palladia na uhlí (10%; 50 % vody). Katalyzátor se odfiltruje a k organické fázi se přidá 500 ml vody a 10,1 g uhlíčitanu sodného. Po protřepání a oddělení fází se vodná fáze míchá 24 hodiny při 100°C . Směs se nechá stát přes noc a pak se přidá 500 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové a vodná fáze se extrahuje třikrát methyl-terc-butyletherem. Spojené organické fáze se vysuší nad síranem sodným a po filtraci se zahustí ve vakuu. Zbytek se krystaluje z diisopropyletheru a produkt se odfiltruje. Získá se 2,88 g (51 %) produktu.

1e) Kyselina (S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)octová



9,44 ml roztoku n-butyllithia (2,5 M v hexanu) se přidá při -40°C v atmosféře argonu k roztoku 2,85 g (11,8 mmol) sloučeniny z příkladu 1d v 60 ml absolutního tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá 30 minut při -40°C , pak se nechá ohřát na 0°C a přidá se roztok 3,6 g (11,8 mmol) sloučeniny z

příkladu 1b ve 20 ml N-methyl-2-pyrrolidonu. Reakční směs se nechá ohřát na 0°C a pak se míchá 2 hodiny při 0°C. Přidá se 15 ml 1 N kyseliny chlorovodíkové a tetrahydrofuran se odpaří ve vakuu. Zbytek se nalije do 300 ml methyl-terc-butyletheru a fáze se oddělí. Organická fáze se promyje vodou, vysuší se nad síranem sodným, zfiltruje se a zahustí se ve vakuu. Zbytek se přečistí preparativní HPLC. Produktové frakce se zahustí a zbytek se podrobí lyofilizaci. Získá se tak 1,33 g (22 %) titulní sloučeniny.

1f) Terc-butyl-(R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methyl-fenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionát

626 mg (1,91 mmol) TOTU a 308 µl (1,81 mmol) N,N-diisopropylethylaminu se přidají po sobě za chlazení ledem k roztoku 974 mg (1,91 mmol) sloučeniny z příkladu 1e a 305 mg (1,91 mmol) terc-butyl-(R)-3-aminobutanoátu v 10 ml absolutního dimethylformamidu. Směs se míchá 2 hodiny při laboratorní teplotě, rozpouštědlo se odpaří ve vakuu, zbytek se rozpustí v ethylacetátu a ethylacetátový roztok se promyje postupně dvakrát vodným roztokem KHSO₄/K₂SO₄, dvakrát nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a dvakrát vodou. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě ethylacetát-heptan (1:1). Zahuštění produktových frakcí poskytne 880 mg (71 %) titulní sloučeniny.

1g) Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methyl-fenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionová

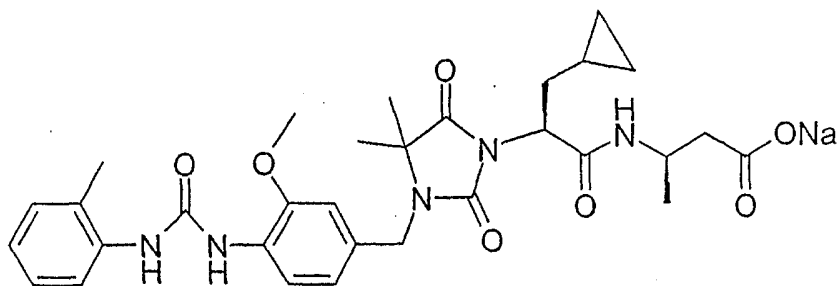
K 880 mg (1,35 mmol) sloučeniny z příkladu 1f se přidá 10 ml 90%ní kyseliny trifluoroctové. Po 15 minutách při laboratorní

teplotě se reakční směs zahustí ve vakuu. Zbytek se vyjme do dichlormethanu a zahustí se ve vakuu. Tento pochod se opakuje ještě jednou. Získaný zbytek se pak vyjme do dichlormethanu, dichlormethanový roztok se promyje třikrát vodou a vysuší se nad síranem sodným. Po filtraci a zahuštění ve vakuu se odpařek vyjme do směsi acetonitril-voda a podrobí se lyofilizaci. Získá se 730 mg (91 %) produktu.

ES(+)-MS: 594,2 (M+H)⁺.

Příklad 2

Sodná sůl kyseliny (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionové

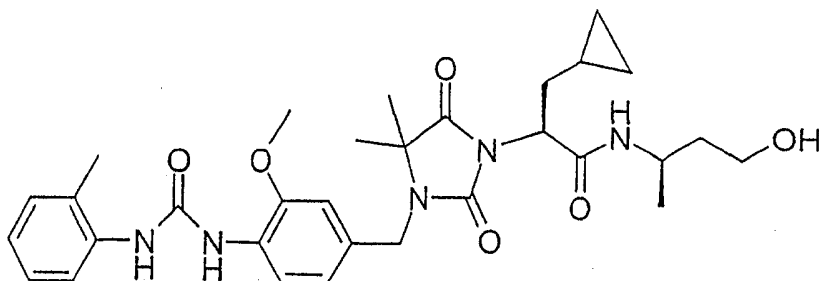


1,64 ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného se přidá po částech za míchání k suspenzi 100 mg (0,168 mmol) sloučeniny z příkladu 1 v 10 ml vody a směs se míchá jednu hodinu při laboratorní teplotě. Po filtraci se filtrát podrobí lyofilizaci, čímž se získá 104 mg (100 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 594,3 (kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionová + H)⁺, 616,2 (M⁺).

Příklad 3

(R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-methylpropanol



Ke 535 mg (1,05 mmol) sloučeniny z příkladu 1e v 15 ml absolutního dimethylformamidu se přidá za chlazení ledem 140 mg (1,05 mmol) HOBT a 260 mg (1,26 mmol) DCC. Směs se míchá 45 minut za chlazení ledem, pak se přidá 112 mg (1,26 mmol) (R)-3-amino-3-methylpropanolu, směs se míchá 2 hodiny při laboratorní teplotě a nechá se stát přes noc. Pak se zfiltruje, filtrát se zahustí, zbytek se rozpustí v ethylacetátu a ethylacetátová fáze se promyje dvakrát vodným roztokem $\text{KHSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$. Po vysušení nad síranem sodným, filtraci a zahuštění se zbytek podrobí chromatografii na silikagelu (eluent ethylacetát). Zahuštěním produktových frakcí se získá 423 mg (70 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 580,3 (M+H)⁺.

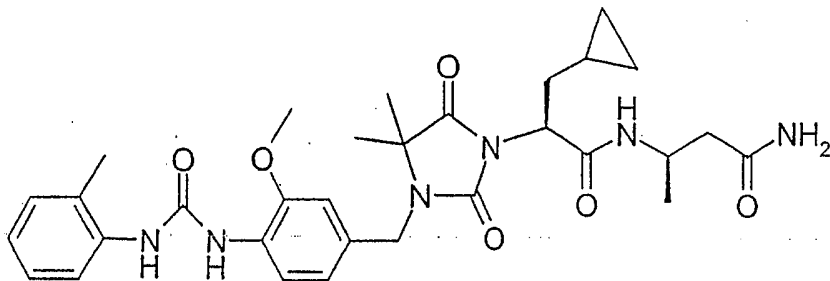
Příprava (R)-3-amino-3-methylpropanolu

5,68 g (149 mmol) hydridu lithnohlinitého se přidá po částech v atmosféře argonu k roztoku 19,9 g (149 mmol) chloridu hlinitého ve 250 ml absolutního diethyletheru a směs se refluxuje 30 minut. Pak se pomalu přikape 6 g (37,7 mmol) terc-butyl-(R)-3-aminobutanoátu v 50 ml absolutního diethyletheru a reakční směs se refluxuje 2 hodiny. Poté se opatrně přikape za chlazení ledem 10,8 ml vody a roztok 25,3 g hydroxidu draselného ve 43 ml vody. Směs se nechá stát přes

noc při laboratorní teplotě, etherická fáze se odlije a zbytek se vyvaří třikrát dichlormethanem. Spojené organické fáze se vysuší nad síranem sodným. Po filtraci a odpaření rozpouštědla ve vakuu se získá 2,5 g (75 %) titulní sloučeniny.

Příklad 4

(R)-3-((S)-2-(4,4-Dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionamid

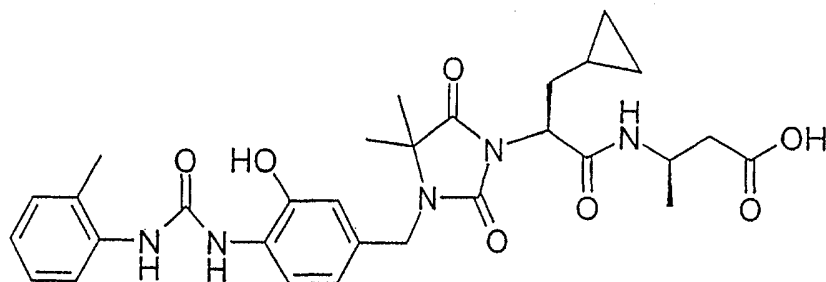


131 mg (0,636 mmol) DCC se přidá k roztoku 330 mg (0,555 mmol) sloučeniny z příkladu 1 a 125 mg (0,926 mmol) HOBT v 5 ml absolutního dimethylformamidu a směs se míchá 1 hodinu při laboratorní teplotě. Přidá se 47 μ l (0,555 mmol) 25%ního vodného roztoku amoniaku a směs se nechá stát při laboratorní teplotě přes noc. Pak se přidá dalších 16 μ l 25%ního vodného roztoku amoniaku a směs se míchá 4 hodiny. Po filtraci se filtrát zahustí ve vakuu, zbytek se rozpustí v ethylacetátu a ethylacetátová fáze se promyje dvakrát vodným roztokem $\text{KHSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$, dvakrát nasyceným roztokem NaHCO_3 a dvakrát vodou. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v ethylacetátu jako eluentu. Zahuštěním produktových frakcí a lyofilizací se získá 272 mg (82 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 593,3.

Příklad 5

Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-hydroxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamin)-3-methylpropionová

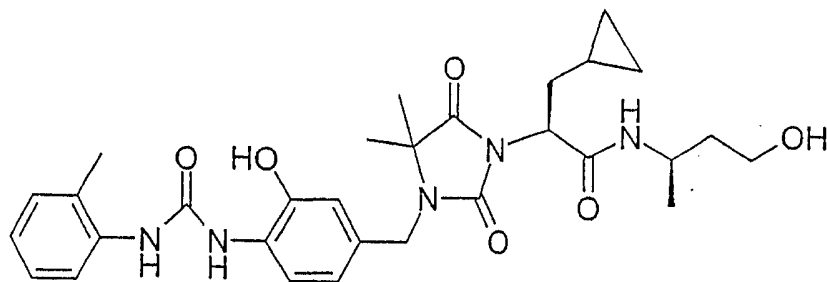


211 μ l bromidu boritého se přidá v atmosféře argonu k roztoku 100 mg (0,169 mmol) sloučeniny z příkladu 1 ve 20 ml absolutního dichlormethanu při -78°C a reakční směs se nechá ohřát na 0°C za chlazení ledem. Po 30 minutách při 0°C se přidá opatrně voda, oddělí se fáze a organická fáze se vysuší nad síranem sodným. Po filtraci se rozpouštědlo odpaří ve vakuu a produkt se přečistí preparativní HPLC. Lyofilizací produktových frakcí se získá 35 mg (36 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 580,2 (M+H) $^{+}$.

Příklad 6

(R)-3-((S)-2-(4,4-Dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-hydroxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamin)-3-methylpropanol



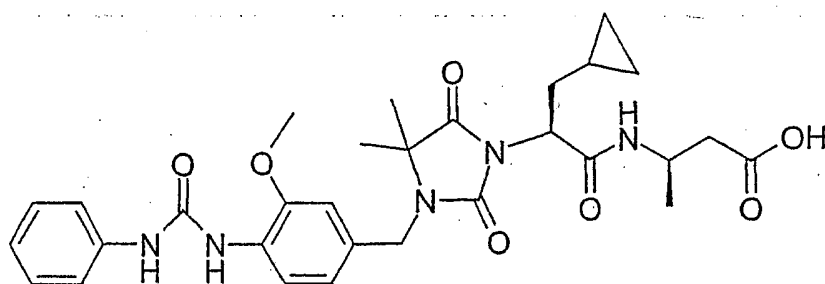
488 μ l bromidu boritého se přidá v atmosféře argonu k roztoku 220 mg (0,39 mmol) sloučeniny z příkladu 3 ve 40 ml absolut-

ního dichlormethanu při -78°C a reakční směs se nechá ohřát na 0°C za chlazení ledem. Po 30 minutách při 0°C se přidá opatrně voda, oddělí se fáze a organická fáze se promyje čtyřikrát vodou a vysuší se nad síranem sodným. Po filtraci se rozpouštědlo odpaří ve vakuu a produkt se přečistí preparativní HPLC. Lyofilizací produktových frakcí se získá 81 mg (37 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 566,3 (M+H)⁺.

Příklad 7

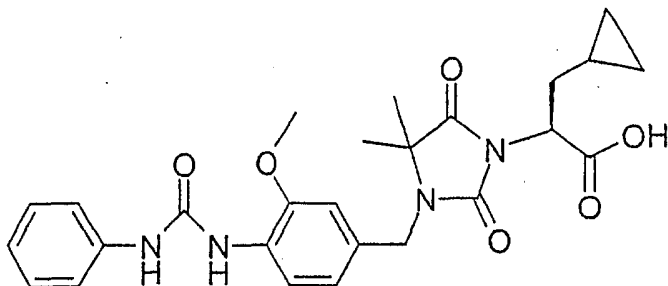
Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-fenylureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-methylpropionová



7a) 4-(3-Fenylureido)-3-methoxybenzylchlorid

7,55 ml (103,4 mmol) thionylchloridu se přikape k suspenzi 14,07 g (51,7 mmol) 4-(3-fenylureido)-3-methoxybenzylalkoholu (připraveného stejným způsobem jak je popsáno v příkladu 1, za použití fenylisokyanátu místo 2-methylfenylisokyanátu) ve 200 ml dichlormethanu. Směs se míchá 2 hodiny při laboratorní teplotě, nechá se stát přes noc a pak se naliže do 800 ml heptanu. Heptan se odlije od vyloučeného oleje, zbytek se suspenduje několikrát v heptanu, který se pokaždé odlije. Zbytek se rozpustí ve 100 ml dichlormethanu a roztok se přikape k 800 ml diisopropyletheru. Směs se míchá 1 hodinu za chlazení ledem a produkt se odsaje, promyje diisopropyletherem a vysuší ve vakuu.

7b) Kyselina (S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-fenylureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)octová



9,32 ml roztoku n-butyllithia (2,5 M v hexanu) se při -40°C v atmosféře argonu přidá k roztoku 2,8 g (11,6 mmol) sloučeniny z příkladu 1d v 60 ml absolutního tetrahydrofuranu. Směs se míchá při -40°C po dobu 30 minut, pak se nechá ohřát na 0°C a přidá se roztok 5,07 g (17,4 mmol) sloučeniny z příkladu 7a ve 20 ml N-methyl-2-pyrrolidonu. Reakční směs se nechá ohřát na 0°C a míchá se 2 hodiny při 0°C . Pak se přidá 15 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, tetrahydrofuran se odstraní ve vakuu a zbytek se nalije do 300 ml methyl-terc-butyletheru. Po oddělení fází se organická fáze promyje vodou, vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, zahustí se ve vakuu a zbytek se přečistí preparativní HPLC. Zahuštění produktových frakcí a následná lyofilizace poskytne 484 mg (8 %) titulní sloučeniny.

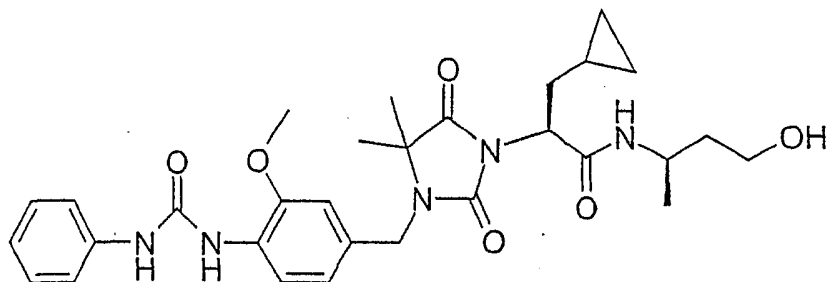
7c) Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-fenylureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-methylpropionová

Titulní sloučenina se připraví analogicky, jak je popsáno v příkladu 1, a to kondenzací 120 mg (0,242 mmol) sloučeniny z příkladu 7b se 38 mg (0,242 mmol) terc-butyl-(R)-3-aminobutanoátu, chromatografickým přečištěním, rozštěpením terc-butyl-esteru a lyofilizací. Výtěžek 113 mg (81 %).

ES(+)-MS: 580,2 (M+H)⁺.

Příklad 8

(R)-3-((S)-2-(4,4-Dimethyl-3-(4-(3-fenylureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)-acetylamino)-3-methylpropanol

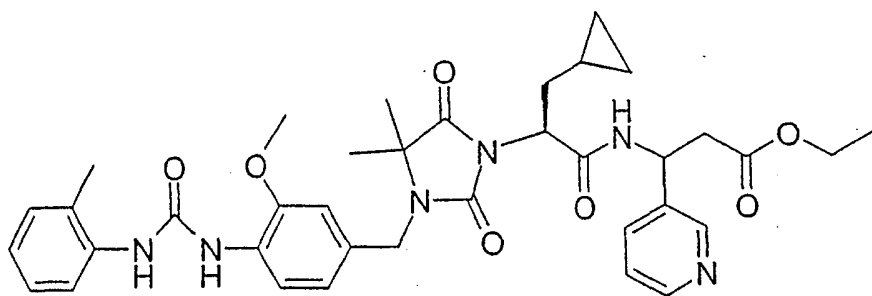


Titulní sloučenina se připraví analogicky jak je popsáno v příkladu 3, a to kondenzací 172 mg (0,348 mmol) sloučeniny z příkladu 7b s 31 mg (0,417 mmol) (R)-3-amino-3-methylpropanolu (viz příklad 3), chromatografickým přečištěním (v soustavě ethylacetát-heptan 9:1), zahuštěním produktových frakcí a lyofilizací. Výtěžek 117 mg (59 %).

ES(+)-MS: 566,3 (M+H)⁺.

Příklad 9

Ethyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-(3-pyridyl)propionát

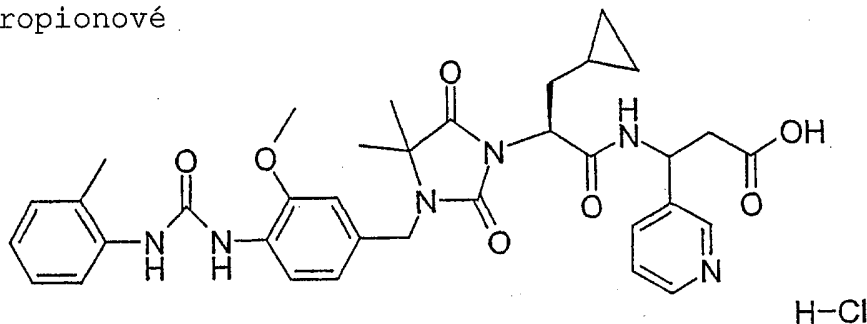


129 mg (0,393 mmol) TOTU a 64 µl (0,374 mmol) N,N-diisopropylethylaminu se přidá za chlazení ledem k roztoku 200 mg (0,393 mmol) sloučeniny z příkladu 1d a 76,4 mg (0,393) ethyl-3-amino-3-(3-pyridyl)propionátu (příprava J.G. Rico a spol.,

J. Org. Chem. 58 (1993), 7948) v 5 ml absolutního dimethylformamidu. Směs se míchá 30 minut při laboratorní teplotě, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek vyjme ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se promyje 2x nasyceným roztokem NaHCO_3 a 2x vodou. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se chromatografuje na silikagelu v ethylacetátu. Zahuštěním produktových frakcí se získá 195 mg (72 %) titulní sloučeniny. ES(+)-MS: 685,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Příklad 10

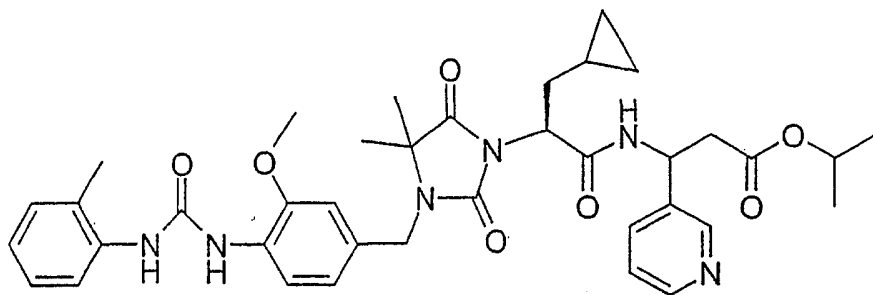
Hydrochlorid kyseliny 3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-(3-pyridyl)-propionové.



0,82 ml (0,82 mmol) 1M vodného roztoku hydroxidu lithného se přidá k roztoku 141 mg (0,206 mmol) sloučeniny z příkladu 9 v 7,25 ml methanolu a reakční směs se nechá stát přes noc při laboratorní teplotě. Pak se methanol odstraní ve vakuu, zbytek se nastaví na pH 2 přidávkem 1N kyseliny chlorovodíkové a směs se zahustí ve vakuu. Zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě dichlormethan-methanol-ledová kyselina octová-voda (95:5:0,5:0,5). Po zahuštění produktových frakcí se ke zbytku přidá 1,1 ekvivalentu 1N kyseliny chlorovodíkové a směs se lyofilizuje. Získá se 120 mg (89 %) produktu. ES(+)-MS: 657,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Příklad 11

Isopropyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-(3-pyridyl)propionát

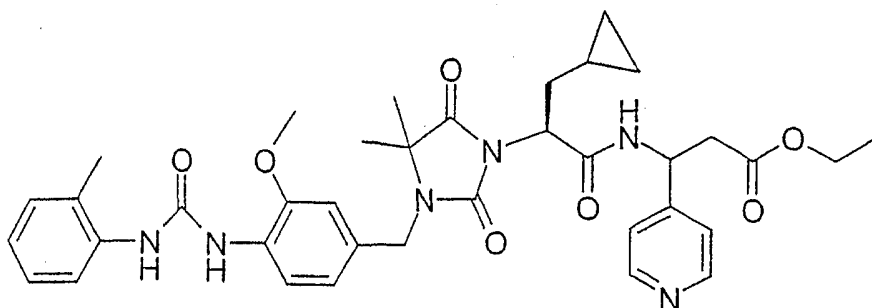


56 μ l (0,731 mmol) isopropanolu a 23,6 mg (0,193 mmol) 4-dimethylaminopyridinu se přidá k suspenzi 80 mg (0,122 mmol) sloučeniny z příkladu 11 ve 3 ml dichlormethanu. Ke vzniklému čirému roztoku se přidá roztok 38 mg (0,183 mmol) DCC v 1 ml dichlormethanu. Směs se míchá 2 hodiny při laboratorní teplotě a nechá se stát při této teplotě přes noc. Pak se zfiltruje, filtrát se zahustí ve vakuu a zbytek se chromatografuje na silikagelu v soustavě heptan-ethylacetát (3:1) a ethylacetát-heptan (20:1). Zahuštěním produktových frakcí se získá 70 mg (82 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 699,4 (M+H)⁺.

Příklad 12

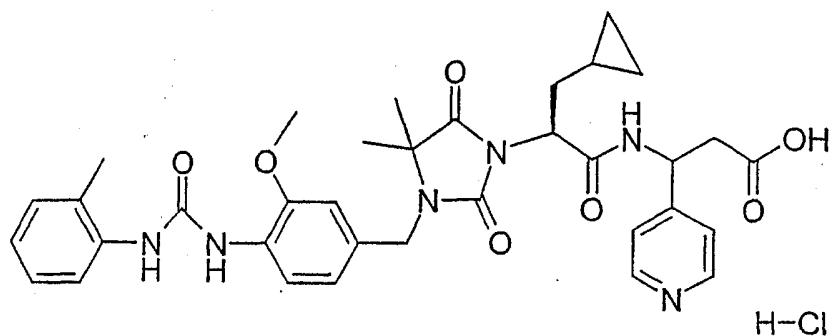
Ethyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-(4-pyridyl)propionát



Připraví se analogicky jak je popsáno v příkladu 9, ze 200 mg (0,393 mmol) sloučeniny z příkladu 1d a 76,4 mg (0,393 mmol) ethyl-3-amino-3-(4-pyridyl)propionátu (příprava J.G. Rico a spol., J. Org. Chem. 58 (1993), 7948). Výtěžek 199 mg (74 %). ES(+)-MS: 685,4 (M+H)⁺.

Příklad 13

Hydrochlorid kyseliny 3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-(4-pyridyl)propionové

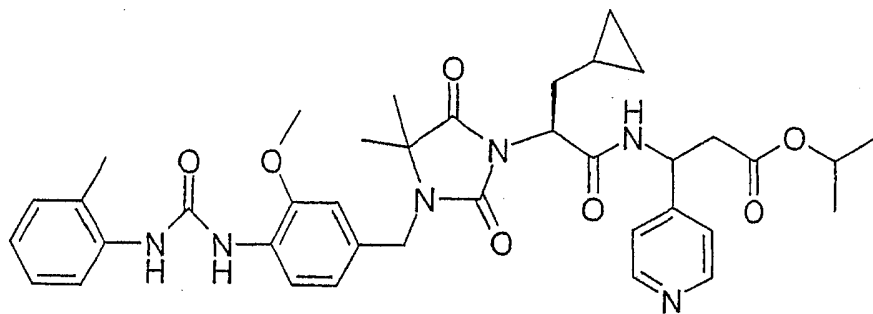


Titulní sloučenina se připraví analogickým způsobem, jak je popsáno v příkladu 10, a to ze 143 mg (0,209 mmol) sloučeniny z příkladu 12. Výtěžek 126 mg (87 %).

ES(+)-MS: 657,2 (M+H)⁺.

Příklad 14

Isopropyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-(4-pyridyl)propionát

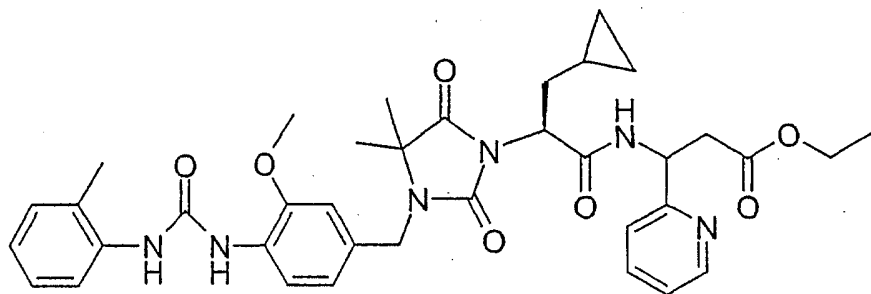


Titulní sloučenina se připraví analogickým způsobem, jak je popsáno v příkladu 11, a to z 83 mg (0,126 mmol) sloučeniny z příkladu 13. Výtěžek 34,6 mg (39 %).

ES(+)-MS: 699,4 (M+H)⁺.

Příklad 15

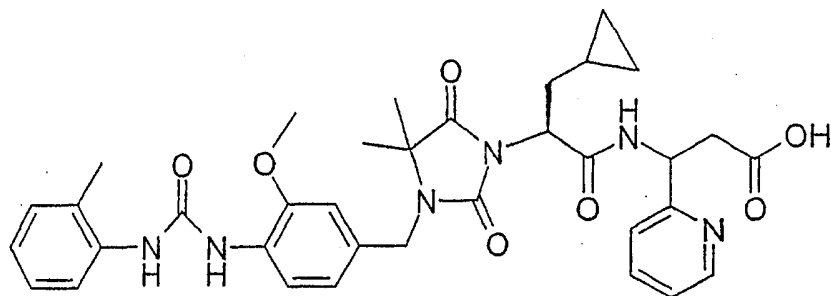
Ethyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-(2-pyridyl)propionát



Připraví se analogicky jak je popsáno v příkladu 9, ze 200 mg (0,393 mmol) sloučeniny z příkladu 1d a 76,4 mg (0,393 mmol) ethyl-3-amino-3-(2-pyridyl)propionátu (příprava J.G. Rico a spol., J. Org. Chem. 58 (1993), 7948). Výtěžek 226 mg (84 %). ES(+)-MS: 685,4 (M+H)⁺.

Příklad 16

Kyselina 3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamo)-3-(2-pyridyl)propionová

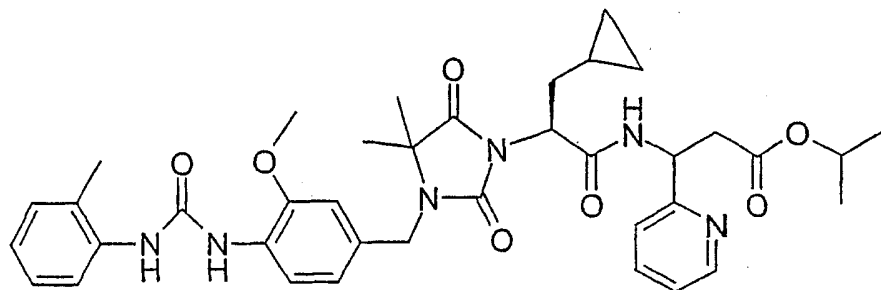


Připraví se analogicky jako v příkladu 10, ze 170 mg (0,248 mmol) sloučeniny z příkladu 15, avšak nepřevéde se kyselinou chlorovodíkovou na hydrochlorid. Výtěžek 160 mg (98 %).

ES(+)-MS: 657,4 (M+H)⁺.

Příklad 17

Isopropyl-3-((S)-2-(4,4-dimethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)-ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-(2-pyridyl)propionát

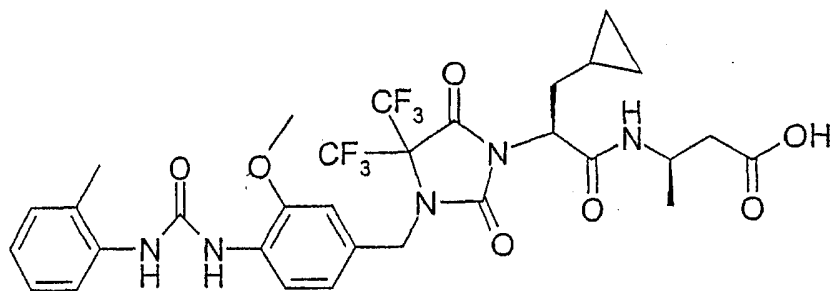


Titulní sloučenina se připraví analogickým způsobem, jak je popsáno v příkladu 11, a to z 90 mg (0,137 mmol) sloučeniny z příkladu 16. Výtěžek 39 mg (41 %).

ES(+)-MS: 699,4 (M+H)⁺.

Příklad 18

Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionová



18a) 2-Terc-butoxy-4,4-bis(trifluormethyl)-1,3-oxazabuta-
-1,3-dien

Sloučenina se připraví analogicky jak popisují W. Steglich a spol., Chem. Ber. 107 (1974), 1488-1498. Bezvodý hexafluoracetone (HFA) se připraví přikapáváním trihydrátu hexafluoracetonu do koncentrované kyseliny sírové, zahřáté na 80°C. Vzniklý plyn se ještě jednou promyje koncentrovanou kyselinou sírovou a uvádí se nad roztok v reakční baňce. Na vývod z baňky se nasadí zpětný chladič, chlazený směsí aceton-suchý led.

Jak bylo popsáno výše, roztok 20 g (170 mmol) terc-butylkarbamátu ve 150 ml dichlormethanu se podrobí reakci s bezvodým plynným hexafluoracetone, dokud reakční roztok není nasycen. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a výsledný surový 2-terc-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-1,1,1,3,3,3-hexafluorpropan (výtěžek 48,3 g; 100 %) se použije v následujícím stupni syntézy.

13,6 g anhydridu kyseliny trifluoroctové, následovaného 5 kapkami chinolinu, se přikape při 0°C k roztoku 50,05 g (176 mmol) 2-terc-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-1,1,1,3,3,3-hexafluorpropanu v 300 ml diethyletheru. Směs se míchá 10 minut při 0°C a pak se přikape dalších 27,2 g anhydridu kyseliny trifluoroctové. Reakční směs se míchá 30 minut při 0°C (vnější teplota), přičemž se vnitřní teplota zvýší na 8-10°C. Po ochlazení na 0°C se přidá 50,01 g (388 mmol) chinolinu, načež počne krystalovat sůl chinolinu s kyselinou trifluoroctovou. Směs se míchá 2 hodiny při 0°C a pak se zfiltruje. Produkt se od zbytku soli, přítomného ve filtrátu, oddělí destilací ve vakuu do jímadla, chlazeného směsí acetonu a suchého ledu. Destilát se pak redestiluje přes Vigreuxovu kolonu. Získá se 36,2 g (77 %) titulní sloučeniny, vroucí při 126-130°C.

18b) Terc-butylester (S)- β -cyklopropylalaninu

3,5 g (27,1 mmol) (S)- β -cyklopropylalaninu se přidá při laboratorní teplotě ke směsi 50 ml dioxanu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové (připravené opatrným přikapáním kyseliny k dioxanu při 5°C). Roztok se přenesse do ampule, do které bylo předem nakondenzováno 40 ml isobutylenu při -78°C. Zatavená ampule se pak na třepačce třepe 24 hodiny při laboratorní teplotě. Po otevření ampule (za chlazení) se reakční směs opatrně přidá k míchané, na 0°C vychlazené, směsi 30 ml triethylaminu a 50 ml vody. Po odpaření přebytného isobutylenu se produkt extrahuje etherem (2x50 ml). Etherické fáze se vysuší nad síranem hořečnatým, zfiltrují se a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Získaný surový produkt (ve formě slabě žlutého oleje) se bez dalšího čištění použije v následující reakci. Výtěžek 4,2 g (84 %).

18c) Terc-butylester (S)-N-formyl- β -cyklopropylalaninu

Směs 10 g (54 mmol) terc-butylesteru (S)- β -cyklopropylalaninu a 4,7 g (55,2 mmol) kyanomethylformiátu ve 100 ml dichlormethanu se míchá přes noc při laboratorní teplotě. Po odstranění rozpouštědla ve vakuu se získaný zbytek destiluje ve vakuu. Získá se tak 8,8 g (76 %) produktu, vroucího při 120°C/40 Pa (0,3 torr).

18d) Terc-butyl-(S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetát

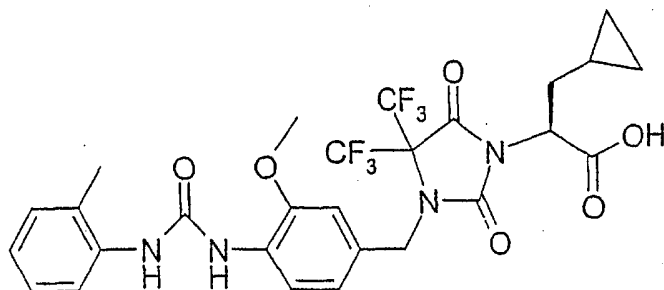
2,4 g (12,1 mmol) difosgenu se přidá při -30°C k roztoku 2,5 g (11,7 mmol) terc-butylesteru (S)-N-formyl- β -cyklopropylalaninu a 2,5 g (24,7 mmol) triethylaminu ve 100 ml suchého dichlormethanu. Reakční roztok se nechá ohřát na -15°C během 1 hodiny a v míchání při této teplotě se pokračuje, až je reakce skončena. Reakční roztok se pak při laboratorní teplotě

dvakrát promyje 7%ním roztokem hydrogenuhličitanu sodného a organická fáze se vysuší nad síranem hořečnatým. Po filtraci se rozpouštědlo odstraní ve vakuu a zbytek se vyjme do 70 ml benzenu. K tomuto roztoku se přikape při laboratorní teplotě roztok 3,05 g (11,5 mmol) 2-terc-butoxy-4,4-bis(trifluoromethyl)-1,3-oxazabuta-1,3-dienu v 10 ml benzenu. Reakční roztok se zahřívá přes noc na 60°C a benzen se pak odstraní ve vakuu. Zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě petrolether-ethylacetát (8:1). Získá se 3,7 g (78 %) produktu, tajícího při 76-77°C; $[\alpha]^{20} = -28^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3).

18e) Kyselina (S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)octová

Roztok 7 g (17,3 mmol) sloučeniny z příkladu 18d ve 20 ml dichlormethanu se přidá při 10°C ke směsi 30 ml kyseliny trifluoroctové a 50 ml dichlormethanu a reakční směs se míchá 16 hodin při laboratorní teplotě. Po odstranění kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu ve vakuu se získá 5,9 g (98 %) titulní sloučeniny, t.t. 123-125°C; $[\alpha]^{22} = -26^\circ$ ($c = 2$, methanol).

18f) Kyselina (S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)octová



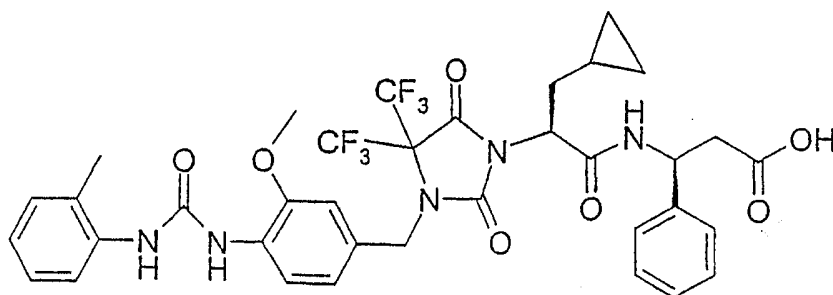
3,2 ml roztoku n-butyllithia (2,5 M v hexanu) se přidá při -40°C v atmosféře argonu k roztoku 1,39 g (4 mmol) sloučeniny

z příkladu 18e ve 40 ml absolutního tetrahydrofuranu. Reakční směs se za míchání nechá ohřát na 0°C a přidá se k ní roztok 2,43 g (8 mmol) 4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzylchloridu ve 20 ml absolutního tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá 3 hodiny při laboratorní teplotě a pak se k ní přidá 20 ml 1 N kyseliny chlorovodíkové. Tetrahydrofuran se odstraní ve vakuu a vodná fáze se extrahuje dvakrát methyl-terc-butyl-etherem. Spojené organické fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltrují se a zahustí ve vakuu. Zbytek se přečistí preparativní HPLC. Zahuštěním produktových frakcí a lyofilizací se získá 1,41 g (57 %) titulní sloučeniny.

18g) Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-methylpropionová
Titulní sloučenina se získá způsobem, popsáním v příkladech 1f a 1g, kondenzací sloučeniny z příkladu 18f s terc-butyl-(R)-3-aminobutanoátem a následným štěpením terc-butylesteru.

Příklad 19

Kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-fenylpropionová



19a) Ethyl-(S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-fenylpropionát

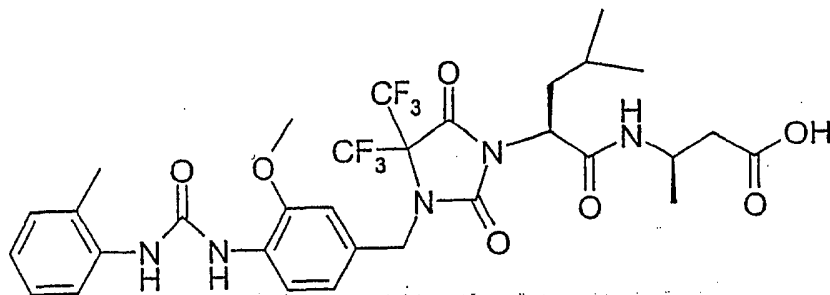
748 mg (2,28 mmol) TOTU (O-((kvan(ethoxykarbonyl)methylen)-amino)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborát) a 368 µl N,N-diisopropylethylaminu se přidá při 0°C k roztoku 1,41 g (2,28 mmol) sloučeniny z příkladu 18f a 442 mg (2,28 mmol) ethyl-(S)-3-amino-3-fenylpropionátu ve 20 ml absolutního dimethylformamidu. Směs se míchá 1 hodinu při laboratorní teplotě a pak se dimethylformamid odstraní ve vakuu. Zbytek se rozpustí v ethylacetátu a roztok se promyje postupně vodným roztokem KHSO₄/K₂SO₄, nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se chromatografuje na silikagelu v soustavě heptan-ethylacetát (3:2). Zahuštění produktových frakcí poskytne 1,48 g (82 %) titulní sloučeniny.

19b) Kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-fenylpropionová

Roztok 1,46 g (1,84 mmol) sloučeniny z příkladu 19a ve 40 ml N-methyl-2-pyrrolidonu a 20 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové se zahřívá 6 hodin na 60°C. Reakční směs se ochladí na laboratorní teplotu a nalije se do 300 ml vody. Sraženina se odsaje, promyje vodou a vysuší nad oxidem fosforečným. Surový produkt se dvakrát chromatografuje na silikagelu v soustavě dichlor-methan-methanol-kyselina octová-voda (95:5:0,5:0,5). Po zahuštění produktových frakcí se zbytek rozpustí v dichlormethanu a organická fáze se promyje vodou, vysuší se nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se podrobí lyofilizaci. Výtěžek 1,19 g (85 %) titulní sloučeniny. ES(+)-MS: 764,2 (M+H)⁺.

Příklad 20

Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamino)-3-methylpropionová



20a) Terc-butylester N-formyl-L-leucinu

Sloučenina se připraví analogicky jak popsal W. Duczek a spol., Synthesis 1996, 37-38. Roztok 4,04 g (40 mmol) triethylaminu v 10 ml dichlormethanu se přidá při 0°C k roztoku 8,94 g (40 mmol) hydrochloridu terc-butylesteru L-leucinu a 3,4 g (40 mmol) kyanmethylformiátu v 60 ml dichlormethanu. Reakční roztok se nechá ohřát na laboratorní teplotu a míchá se při laboratorní teplotě přes noc. Pak se dvakrát promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, fáze se oddělí a organická fáze se vysuší nad síranem hořečnatým. Po filtraci a odstranění rozpouštědla ve vakuu se zbytek podrobí destilaci ve vakuu. Získá se 7,5 g (87 %) produktu, vroucího při 118°C/2,7 Pa (0,02 torr).

20b) Terc-butyl-(S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetát

2,4 g (12,1 mmol) difosgenu se přidá při -30°C k roztoku 2,5 g (11,6 mmol) terc-butylesteru N-formyl-L-leucinu a 2,5 g (24,7 mmol) triethylaminu ve 100 ml suchého dichlormethanu. Reakční roztok se během 1 hodiny nechá ohřát na -10°C a v míchání při této teplotě se pokračuje, dokud reakce neproběhne

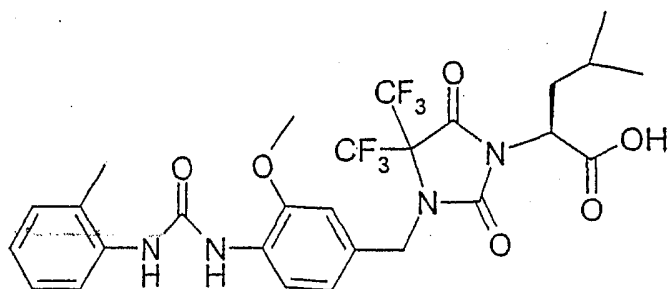
úplně. Pak se reakční roztok při laboratorní teplotě dvakrát promyje 7%ním roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného. Fáze se oddělí, organická fáze se vysuší nad síranem hořečnatým a zfiltruje se. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se vyjme do 70 ml benzenu. K tomuto roztoku se při laboratorní teplotě přikape roztok 3 g (11,3 mmol) 2-terc-butoxy-4,4-bis-(trifluormethyl)-1,3-oxazabuta-1,3-dienu v 10 ml benzenu. Reakční roztok se zahřívá přes noc na 60°C a pak se benzen odstraní ve vakuu. Zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě petrolether-ethylacetát (10:1), čímž se získá 3,7 g (80 %) titulní sloučeniny, t.t. 105-106°C; $[\alpha]^{20} = -24^\circ$ (c = 1, CHCl₃).

20c) Kyselina (S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)octová

Roztok 7 g (17,2 mmol) sloučeniny z příkladu 20b ve 20 ml dichlormethanu se přidá při 10°C ke směsi 30 ml kyseliny trifluoroctové a 50 ml dichlormethanu a reakční směs se míchá 16 hodin při laboratorní teplotě. Pak se kyselina trifluoroctová a dichlormethan odstraní ve vakuu a získá se tak 6,0 g (99 %) titulní sloučeniny, tající při 154-156°C; $[\alpha]^{22} = -23^\circ$ (c = 2, methanol).

20d) Kyselina (R)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamino)-3-methylpropionová

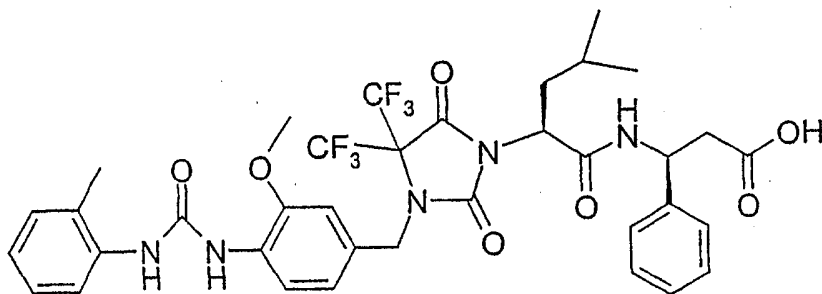
Titulní sloučenina se připraví způsobem, popsaným v příkladech 1f a 1g, a to z 500 mg (0,809 mmol) kyseliny (S)-2-(4,4-bis-(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)octové vzorce



(která se připraví z kyseliny (S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)octové a 4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzylchloridu způsobem, popsaným v příkladu 18f) a 128 mg (0,809 mmol) terc-butyl-(R)-3-aminobutanoátu. Po kondenzaci, chromatografickém přečištění na silikagelu (heptan-ethylacetát 3:2) a štěpení terc-butylesteru se získá 299 mg (53 %) titulní sloučeniny. ES(+)-MS: 704,5 (M+H)⁺.

Příklad 21

Kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamin)-3-fenylpropionová



21a) Ethyl-(S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamin)-3-fenylpropionát

1,89 g (5,77 mmol) TOTU a 932 μ l N,N-diisopropylethylaminu se přidá při 0°C k roztoku 3,57 g (5,77 mmol) kyseliny (S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methyl-

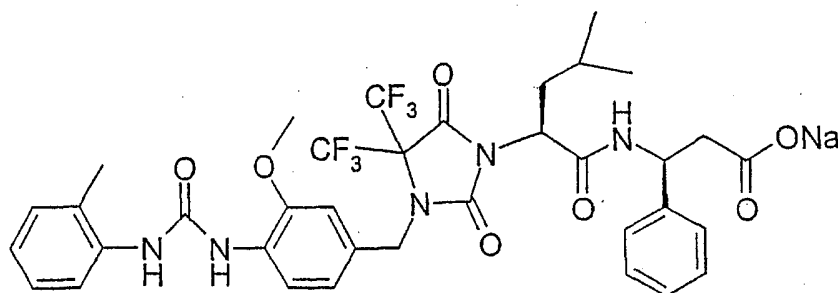
propyl)octové (připravené z kyseliny (S)-2-(4,4-bis(trifluoromethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)octové a 4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzylchloridu jak je popsáno v příkladu 18f) a 1,11 g (5,77 mmol) ethyl-(S)-3-amino-3-fenylpropionátu ve 30 ml absolutního dimethylformamidu. Směs se míchá 1 hodinu při laboratorní teplotě, dimethylformamid se odstraní ve vakuu, zbytek se vyjme do ethylacetátu a ethylacetátový roztok se promyje postupně vodným roztokem $\text{KHSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická fáze se vysuší nad síranem sodným, zfiltruje se, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě ethylacetát-heptan (2:3). Zahuštěním produktových frakcí se získá 3,26 g (71 %) titulní sloučeniny.

21b) Kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamino)-3-fenylpropionová 45 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové se přidá k roztoku 3,25 g (4,09 mmol) sloučeniny z příkladu 21a v 90 ml N-methyl-2-pyrrolidonu a směs se zahřívá 6 hodin na 60°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu se směs nalije do 600 ml vody. Sraženina se odsaje, promyje vodou a vysuší nad oxidem fosforečným. Surový produkt se přečistí dvojnásobnou chromatografií na silikagelu v soustavě dichlormethan-methanol-kyselina octová-voda (95:5:0,5:0,5). Produktové frakce se zahustí a odparek se vyjme do dichlormethanu. Organická fáze se dvakrát promyje vodou, vysuší se nad síranem hořečnatým, zfiltruje se, zahustí a podrobí se lyofilizaci. Získá se tak 2,7 g (86 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 766,2 (M+H)⁺.

Příklad 22

Sodná sůl kyseliny (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamino)-3-fenylpropionové

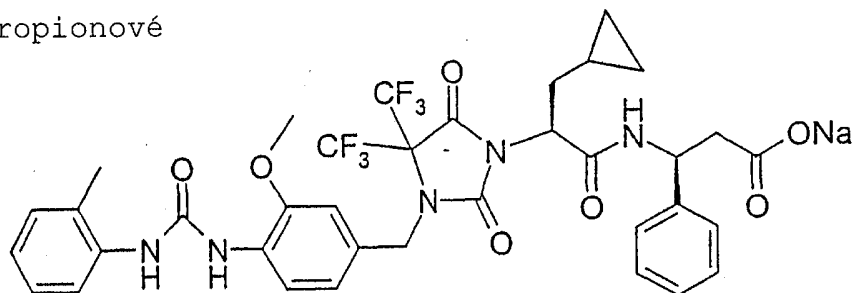


1,24 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného (zředěného 20 ml vody) se přidá za míchání k suspenzi 1 g (1,3 mmol) sloučeniny z příkladu 21 ve 100 ml acetonitrilu a 200 ml vody. Roztok se podrobí lyofilizaci, čímž se získá 1,01 g (79 %) titulní sloučeniny.

ES(+)-MS: 766,2 (kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(2-methylpropyl)acetylamino)-3-fenylpropionová + H)⁺.

Příklad 23

Sodná sůl kyseliny (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluormethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetylamino)-3-fenylpropionové



Ze 720 mg sloučeniny z příkladu 19b se získá 720 mg (99 %) titulní sloučeniny způsobem, popsáním v příkladu 22.

ES(+)-MS: 764,3 (kyselina (S)-3-((S)-2-(4,4-bis(trifluoromethyl)-3-(4-(3-(2-methylfenyl)ureido)-3-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-(cyklopropylmethyl)acetyl-amino)-3-fenylpropionová + H)⁺.

Studium biologické aktivity

A) Test adheze buněk U937/VCAM-1

Testovací metoda použitá pro studium působení sloučenin vzorce I na interakci mezi VCAM-1 a VLA-4 je popsána níže a je pro tuto interakci specifická. Buněčné vazebné složky, t.j. VLA-4 integriny, se dodají ve své přírodní formě jako povrchové molekuly na lidských buňkách U937 (ATCC CRL 1593), které patří do skupiny leukocytů. Jako specifické vazebné složky se použijí rekombinantní rozpustné fúzní proteiny, připravené genetickým inženýrstvím, sestávající z extracytoplasmatické domény lidské VCAM-1 a konstantní oblasti lidského imunoglobulinu subtrždy IgG1.

Měření adheze buněk U937 (ATCC CRL 1593) k hVCAM-1(1-3)-IgG

1. Příprava lidské VCAM-1(1-3)-IgG a lidského CD4-IgG

Použije se genetický konstrukt pro expresi extracelulární domény lidské VCAM-1, kombinovaný s genetickou sekvencí těžkého řetězce lidského imunoglobulinu IgG1 (pantová oblast, oblasti CH₂ a CH₃) (od fy Dr. Brian Seed, Massachusetts General Hospital, Boston, USA; srv. Damle a Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 6403). Rozpustný fúzní protein hVCAM-1(1-3)-IgG obsahuje tři amino-terminální extracelulární imunoglobulin-like domény lidské VCAM-1 (Damle a Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 6403). CD4-IgG (Zettlemeissl a

spol., DNA and Cell Biology 1990, 9, 347) slouží jako fúzní protein pro negativní kontroly. Rekombinantní proteiny se exprimují jako rozpustné proteiny po DEAE/dextranem zprostředkované transfekci DNA v buňkách COS (ATCC CRL 1651) podle standardních postupů (Ausubel a spol., Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

2. Měření adheze buněk U937 k hVCAM-1(1-3)-IgG

- 2.1 96jamkové testovací destičky (Nunc Maxisorb) se inkubují při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny s roztokem (100 μ l/jamka) kozí protilátky proti lidské IgG (10 μ g/ml v 59 mM tris, pH 9,5). Po odstranění roztoku protilátky se jednou provede promytí PBS.
- 2.2 Blokační pufr (1% BSA v PBS; 150 μ l/jamka) se inkubuje půl hodiny na destičkách při laboratorní teplotě. Po odstranění blokačního pufru se jednou provede promytí PBS.
- 2.3 Supernatant (100 μ l/jamka) kultury transfekovaných buněk COS se inkubuje na destičkách při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hodiny. Buňky COS se transfekují s plasmidem, kódujícím pro tři N-terminální imunoglobulin-like domény VCAM-1, připojené k Fc-části lidského IgG₁ (hVCAM-1(1-3)-IgG). Obsah hVCAM-1(1-3)-IgG je přibližně 0,5-1 μ g/ml. Po odstranění supernatantu se jednou provede promytí PBS.
- 2.4 Destičky se inkubují při laboratorní teplotě po dobu 20 minut se 100 μ l/jamku pufrem, blokujícím Fc-receptor (1 mg/ml γ -globulinu, 100 mM NaCl, 100 μ M MgCl₂, 100 μ M MnCl₂, 100 μ M CaCl₂, 1 mg/ml BSA v 50 mM HEPES, pH 7,5). Po odstranění pufru, blokujícího Fc-receptor, se jednou provede promytí PBS.
- 2.5 Přidá se 20 μ l vazebného pufru (100 mM NaCl, 100 μ M MgCl₂, 100 μ M MnCl₂, 100 μ M CaCl₂, 1 mg/ml BSA v 50 mM HEPES,

pH 7,5), přidají se testované sloučeniny v 10 μ l vazebného pufru a provede se inkubace po dobu 20 minut. Jako kontroly slouží protilátky proti VCAM-1 (BBT, No. BBA6) a proti VLA-4 (Immunotech, No. 0764).

- 2.6 Buňky U937 se inkubují 20 minut v pufru, blokujícím Fc-receptor, a pak se napipetují v koncentraci 1×10^6 /ml a v objemu 100 μ l na jamku (konečný objem 125 μ l/jamka).
- 2.7 Destičky se pomalu ponoří v úhlu 45° do stop-pufru (100 mM NaCl, 100 μ M $MgCl_2$, 100 μ M $MnCl_2$, 100 μ M $CaCl_2$ ve 25 mM tris, pH 7,5) a otřepou se. Postup se opakuje.
- 2.8 Roztok barvičky (50 μ l/jamka; 16,7 μ g/ml Hoechst dye 33258, 4 % formalinu, 0,5 % Triton X-100 v PBS) se pak inkubuje na destičkách po dobu 15 minut.
- 2.9 Destičky se otřepou a pomalu se ponoří v úhlu 45° do stop-pufru (100 mM NaCl, 100 μ M $MgCl_2$, 100 μ M $MnCl_2$, 100 μ M $CaCl_2$ ve 25 mM tris, pH 7,5). Postup se opakuje. Pak se destičky i s tekutinou (stop-pufrem) měří v cytofluorimetru (Millipore) (citlivost: 5, filtr: excitační vlnová délka: 360 nm, emisní vlnová délka: 460 nm).

Intenzita světla, emitovaného zbarvenými buňkami U937, je měřítkem počtu buněk U937, které adherovaly k hVCAM-1(1-3)-IgG a tudíž zůstaly na destičce, a tedy měřítkem schopnosti přidané testované sloučeniny inhibovat tuto adhezi. Z inhibice adheze při různých koncentracích testované sloučeniny se vypočte koncentrace IC_{50} , která způsobuje inhibici adheze z 50 procent.

3. Výsledky

V testu adheze buněk U937/VCAM-1 byly získány následující výsledky (hodnoty IC_{50} v nM (nanomoly/litr)).

Sloučenina z příkladu č.	IC ₅₀ (nM)
1	0,3
2	0,5
5	25,9
7	2,1
10	0,6
13	1,8
16	0,9
19	4,4

Farmakologické vlastnosti sloučenin vzorce I je možno též studovat na následujících modelech.

B) Adheze leukocytů u potkana

Na potkaním modelu adheze leukocytů se zkoumá vliv látek vzorce I na tuto adhezi ve venulích potkana. Adheze leukocytů k endotelu postkapilárních venulí se považuje za důležitý stupeň zánětlivých reakcí (J. M. Harlan, Blood 1985, 65, 513). Během rekrutmentu leukocytů z krve do zanícených oblastí probíhá dobře koordinovaný dynamický sled událostí, v němž aktivní roli mají chemotaktické cytokiny a buněčné adhezni molekuly. Zjistilo se, že interakce VCAM/VLA-4 hrají rozhodující úlohu při adhezi a výstupu leukocytů, a při zvýšené propustnosti cév pro makromolekuly, která se indukuje různými zprostředkujícími substancemi (mediátory) a cytokiny (D. Seiffge, Int. J. Microcirc. 1995, 15, 301). Na představeném modelu se celkový zánět nebo reumatoidní artritida, vedoucí k adhezi leukocytů a k jejich výstupu do postižených částí orgánů, vyvolá lokální nebo systemickou injekcí endotoxinů, např. zymosanem, bakteriálními toxiny, jako jsou liposacharidy (LPS), nebo Freundovým adjuvans. Stanoví se zvýšená adheze k endotelu venulí, způsobená endotoxinem.

Adheze leukocytů se stanoví pomocí snímkovacího inverzního mikroskopu (Zeiss), osazeného videosystémem. Zymosan nebo bakteriální endotoxin se injikuje samcům potkana Sprague-Dawley (tělesná hmotnost přibližně 250 g) pod lehkou premedikací halothanem. Kontrolní zvířata dostanou stejný objem 0,9% roztoku soli. Testované látky se potom aplikují zvířatům subkutánně nebo per os, a to buď v jednotlivé dávce, nebo ve více dávkách. Pro měření se potkani narkotisují intramuskulární injekcí urethanu 1,25 g/kg. Dýchají spontánně tracheální trubicí. Tělesná teplota se udržuje na 37°C pomocí regulované elektricky vyhřívané podušky. Na vyhřívaném okně stolku mikroskopu (37°C) se pečlivě obnaží mesenterium naříznutím podbřišku a překryje se při 37 °C kapalným parafinem. Ileocekální oblast mesenteria se fixuje pomocí tří tupých jehel a plasteliny. Po třicetiminutové ekvilibrační fázi, během níž se tkáň stabilizuje, se adheze leukocytů stanoví v postkapilárních venulích o průměru 20-30 μm a délce přibližně 100 μm počítáním ve 2-3 segmentech venulí, v 10 min intervalech po dobu jedné hodiny. Leukocyt se považuje za adherovaný k endotelu, jestliže se nepohybuje po dobu delší než 30 sec. Po ukončení experimentu se v krvi stanoví celkový počet leukocytů a obsah fibrinogenu. Inhibice adheze leukocytů testovanou látkou se vyjadřuje poklesem (v %) počtu adherovaných leukocytů u léčených zvířat, ve srovnání s počtem u zvířat kontrolních.

C) Přecitlivělost opožděného typu na myších

Protialergická a protizánětlivá účinnost látek vzorce I se studuje na modelu přecitlivělosti opožděného typu (DTH). DTH je zánětlivá reakce kůže, vyvolaná sensibilisací pomocí antigenní substance. Za účelem in vivo stanovení odpovídající zánětlivé reakce a rekrutmentu leukocytů do zasažené oblasti se sloučeniny testují na následujícím modelu DTH u myši (viz také T.B. Issekutz, J. Immunol. 1991, 147, 4178).

Skupina samic myši BALB/c (tělesná hmotnost přibližně 20 g) se na oholené části kůže zcitliví aplikací 150 μ l 3% oxazalonu, který indukuje silnou zánětlivou DTH reakci. Po 6 dnech se reakce podnítí aplikací 20 μ l 1% oxazalonu do pravého ucha zvířat. Testované látky se podávají v každém jednotlivém případě subkutánně nebo orálně 44 hod a 20 hod před podnícením reakce a 4 hod po podnícení. Těsně před podnícením a za 24 hod po podnícení reakce se mikrometrem (Mitutoyo Engineering) změří změna tloušťky pravého ucha, zduřelého v důsledku zánětu. Rozdíl těchto dvou měření se stanoví pro každé zvíře skupiny. Střední hodnoty rozdílů mezi skupinou zvířat ošetřených testovanou látkou a neošetřenou kontrolní skupinou se porovnají. Jako míra účinku látky je bráno procento inhibice zduření ucha.

D) Antiastmatické účinky na morčatech

Vliv na funkci plic a antiastmatický účinek sloučenin vzorce I se modelově stanoví na morčatech podle popsané metody (G. Moacevic, Arch. Toxicol. 1975, 34, 1). Technická příprava stanovení se v detailu provede jak popisuje Moacevic. Použijí se samci morčat albínů v rozsahu tělesné hmotnosti 300-500 g. Zvířata se umístí do pletysmografu (FMI) a zaznamenají se tři počáteční hodnoty parametrů respirační rychlosti a amplitudy. V tomto modelu je astmatická respirace charakterizována poklesem respirační amplitudy (= snížení respiračního objemu v důsledku bronchokonstrikce) a zvýšením respirační rychlosti (= reflexní reakce). Tento stav je u astmatiků znám jako dyspnea.

Morčata albíni se 22 dní před počátkem studie zcitliví 1 ml 0,1%ního roztoku ovalbuminu na zvíře, po dva následující dny. Experimentální astmatický záchvat se indukuje inhalací 0,3%ního roztoku ovalbuminu po dobu 1 minuty. Po 40-60 minutové ozdravovací fázi zvířata inhalují testovanou látku ve

vodném roztoku. Okamžitě potom se aplikuje 0,3%ní roztok ovalbuminu po dobu 1 minuty. V následné 30 min ozdravovací fázi zvířata dýchají normální vzduch. Tento postup se opakuje dvakrát. Jestliže astmatické záchvaty ohrožují život, podává se zvířatům kyslík.

Antiastmatický účinek na ovcích se stanoví například způsobem, popsaným Abrahamem a spol. (J. Clin. Invest. 1994, 93, 776).

E) Antiaterosklerotický účinek se může studovat na následujících zvířecích modelech.

Manžetový model tvorby neointimy

Použijí se myši divokého kmene C57BL/6J z chovného zařízení Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Německo) a homozygotní KO myši kmene C57BL/6J-ApoE tmlUnc (ApoE KO) z Jackson Laboratory (Maine, USA). Na počátku experimentu jsou všechny myši ve stáří 10 - 12 týdnů a chovají se v plně klimatizovaných místnostech se stálou teplotou 22°C. Světelný režim den/noc je řízeně nastaven na dobu 12 hod. Myši se nejdříve anestetizují pentobarbitalem sodným (60 mg/kg tělesné hmotnosti; i.p.). Každému zvířeti se ještě aplikuje xylazin (0,01 mg/10 g tělesné hmotnosti; i.m.).

Myši se fixují v pozici nznak a vnitřní strana zadních nohou se oholí a desinfikuje. Kůže na vnitřní levé straně stehna se otevře podélným řezem asi 1 cm dlouhým a stehenní tepna se vypreparuje od okolní tkáně, od stehenní žíly a sedacího nervu. Asi 2 mm dlouhý kousek polyethylenové hadičky (vnitřní průměr 0,58 mm, vnější průměr 0,965 mm, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) se podélně rozřízne a umístí kolem stehenní arterie a fixuje se nití Prolen (7/0, 0,5 metric, Ethicon, Nordstedt, Německo). Kůže se následně znovu uzavře kontinuálním stehem. Pravá zadní noha se operuje analogicky, ale bez nasazení manžety kolem stehenní arterie. Zvíře se potom vrátí

zpět do klece. Po operaci jsou zvířata denně ošetřována testovanou látkou.

Na konci experimentu se myši opět anestetizují pentobarbitalem sodným (60 mg/kg tělesné hmotnosti; i.p.) a xylazinem (0,01 mg/10 g tělesné hmotnosti; i.m.). Pro fixaci cév in situ dostane každá myš injekci 4%ního formalinu do břišní aorty. Potom se vyjme pravá a levá arterie. Na levé straně se oddělí část arterie, která obsahuje úsek dlouhý 1 mm blíže k manžetě, úsek uzavřený v manžetě a distální 1 mm úsek. Na pravé straně tato část odpovídá úseku izolovanému během operace, ale neuzavřenému manžetou.

Části levé a pravé stehenní arterie, fixované ve 4%ním roztoku formalinu, se zalijí do parafinu. Z úseku levé arterie a z odpovídajícího úseku pravé kontrolní arterie se připraví množství tkáňových řezů, které se pro softwarem řízenou morfometrickou analýzu (LeicaQWin od Leica Imaging Systems, Cambridge, Velká Británie) obarví hematoxylinem a eosinem.

Pro každou myš se vyhodnotí tři tkáňové řezy z oblasti levé stehenní arterie uzavřené manžetou a tři tkáňové řezy z odpovídající oblasti pravé kontrolní arterie. Po označení vnější elastické vrstvy (lamina elastica externa), vnitřní elastické vrstvy (lamina elastica interna) a rozhraní mezi lumenem a endotelem pak program vyhodnotí následující plochy: lumen, neointima a media. Velikost těchto ploch se vyjadřuje v μm^2 . Mírou účinku látky je snížení poměru neointima/media ve srovnání s kontrolní skupinou.

Transplantace srdce

Na modelu alogenní transplantace srdce se provádějí transplantace mezi dvěma geneticky inkompatibilními potkany. Pro tento účel se potkani Wistar-Furth použijí jako dárce a potkani Lewis jako příjemci. Zvířata se získají z chovného

zařízení Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Německo). Samci potkana Lewis o hmotnosti 270-330 g a stáří 2,5-3 měsíce a samci Wistar-Furth o hmotnosti 200-250 g ve stáří od 1,5 do 2 měsíců se chovají za konstantních řízených podmínek (teplota 19-22°C; relativní vlhkost 50-55%; světelný režim den/noc je řízeně nastaven na periodu 12 hod).

Před operací dostanou potkani kombinaci xylazinu (3,3 mg/kg tělesné hmotnosti) a ketaminu (115 mg/kg tělesné hmotnosti). Po nástupu anestese se břišní dutina příjemce otevře středovým řezem. Břišní aorta a dolní dutá žíla se od sebe oddělí mezi renální arterií a žílou a iliolumbálními cévami. Aorta se potom kraniálně uzavře za pomoci cévní svorky. Obě cévy se potom kaudálně zaškrtní hedvábnou nití. Druhé hedvábné vlákno leží volně podél kraniálního konce dolní duté žíly. Po otevření břišní dutiny dárce je zvíře utraceno přerušením hlavních břišních cév. Tento časový okamžik je počátkem ischemické periody orgánu dárce. Potom se otevře bránice a srdce se obnaží. Horní a dolní dutá žíla se podváží a odříznou distálně od srdce. Plicní cévy se hromadně podváží hedvábnou nití. Aorta a pulmonární arterie se potom vyjmou pinzetou a odstřihnou. Cévy transplantátu se zbaví zbytků krve. Srdce se potom zvedne, oddělí se spolu z ligaturou z plic a vloží se do ledového fyziologického roztoku chloridu sodného na jednu až dvě minuty. Potom se provede propojení (koncem ke straně) aorty a plicní arterie orgánu dárce s břišní arterií a s dolní dutou žílou příjemce. Po propojení cév se obnoví žilní a následně tepenná cirkulace. Nakonec se uzavře břišní dutina sešitím svalu peritonea a kůže. Po obnovení krevního oběhu a krátkém ozdravení, tepe transplantované srdce v rytmu se sinusovou frekvencí 100 až 120 tepů/min. Jako imunosupresivum se podává Cyklosporin A (CSA) buď subkutánně (s.c.) nebo orálně s pitnou vodou. Po překonání akutní odmítavé reakce lze, počínaje 15. dnem po operaci, snížit dávku z 25 mg/kg

tělesné hmotnosti na 5 mg/kg tělesné hmotnosti. Injekce se podávají jednou denně, ráno, do oblasti krku zvířete.

Z důvodu bezpečného překonání akutní odmítavé reakce dochází k přechodu ze subkutánní aplikace CSA na orální podání až 22. den po operaci. Zkoumaná sloučenina se podává po dobu 100 dní po operaci. Po uplynutí časového intervalu sledování (100 dní) se zvířatům pod anestezí otevře břišní dutina. Srdce s chráněnými výstupky břišních cév se vyjme a připraví se tkáňové řezy, které se skladují v 4%ním roztoku formalinu. Po fixaci se tkáňové řezy srdce zalijí do parafinu a obarví na elasticitu podle standardní histologické techniky van Giesona.

Klasifikace proliferace neointimy a s ní spojené konstrikce vaskulárního lumenu se vyhodnotí dle Adamse a spol. (Transplantation 1993, 56, 794). Klasifikuje se adheze mezi vnitřní elastickou vrstvou (lamina elastica interna) a endotelem.

Speciální barvení dle van Giesona, které selektivně zvýrazní elastická vlákna, usnadňuje vyhodnocení. Účinek sloučeniny se projevuje snížením proliferace neointimy a tedy aterosklerózy transplantátu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Model aterosklerózy u ApoE „knockout“ (KO) myši

Homozygotní KO myši kmene C57BL/6J-ApoE tmlUnc (ApoE KO) se získají od The Jackson Laboratory (Maine, USA). Všechny myši jsou na počátku experimentu 10 až 12 týdnů staré a jsou chovány na standardním stelivu pro laboratorní zvířata (Altromin, Lage, Německo) v plně klimatizovaných místnostech při teplotě 22°C. Světelný režim den/noc je řízeně nastaven na periodu 12 hodin. Zvířatům je podávána testovaná látka po dobu 4 měsíců. Na konci pokusu se myši anestetizují pentobarbitalem sodným (60 mg/kg tělesné hmotnosti; i.p.) a xylazinem (0,01 mg/10 g tělesné hmotnosti; i.m). Srdce, aortální oblouk a sestupná thorakální aorta se pak odstraní a fixují se ve 4%ním roztoku formalinu. Sestupná aorta se vybarví barvičkou

Oil Red O, aby se vybarvily tukové léze. Morfologická analýza tukových lézí se provádí za použití mikroskopu (typ Leitz DM RBE, Leica, Bensheim) s připojenou kamerou s řídící jednotkou (typ CF 15 MCC, Kappa Meßtechnik, Gleichen) a počítačem (Leica, Bensheim). Měření se provádějí za použití počítačového programu pro zobrazovací analýzu (LeicaQWin, Leica Imaging Systems, Cambridge, Velká Británie). Srdce a aortální oblouk se podélně rozříznou a obarví se hematoxylinem a eosinem pro morfo-metrickou analýzu. V každém případě se analyzuje 15-20 řezů. Další řezy se zkoumají imunohistochemicky na makrofágy a T-lymfocyty. Účinek testované sloučeniny se projeví zmenšením tvorby plaku v aortě ve srovnání s kontrolní skupinou.

F) Kardioprotektivní účinek ce může studovat například na následujícím zvířecím modelu.

Velikost srdečního infarktu u potkanů

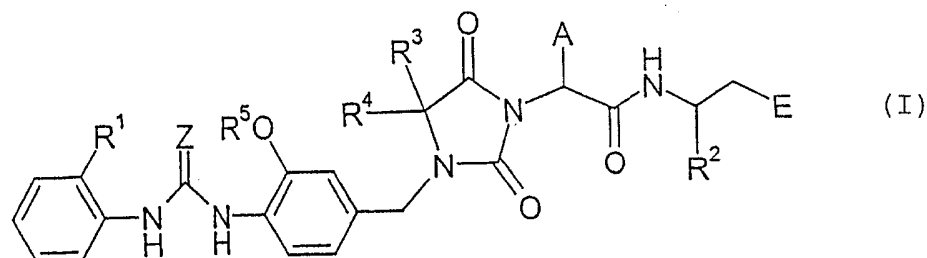
Potkaní samci kmene Wistar se získají z chovného zařízení Charles River Wiga, GmbH (Sulzfeld, Německo). Použijí se zvířata stará 2,5 až 3 měsíce, hmotnosti 270-330 g. Zvířata se chovají za konstantních řízených podmínek (teplota 19-22°C, relativní vlhkost 50-55 %, světelný režim den/noc je nastaven na 12 hodin). Před operací se myši anestetizují kombinací xylazinu (3,3 mg/kg tělesné hmotnosti) a ketaminu (115 mg/kg tělesné hmotnosti). Pak se zvířata intubují a ventilují se 30%ním kyslíkem. Hrudník se oholí, dezinfikuje se a otevře se levou laterální thorakotomií. Levá koronární tepna se podváže 2-3 mm pod levým srdečním ouškem po dobu 48 hodin nebo 4 týdnů, nebo se podváže po dobu 30 minut a reperfunduje se po dobu 47,5 hodiny, nebo po dobu 4 týdnů.

Po operaci se hrudník opět uzavře a zvířata se extubují když začnou spontánně dýchat. Testovaná sloučenina se podá 30 minut

po podvázání nebo bezprostředně před reperfúzí. Zvířata jsou pak každodenně ošetřována testovanou sloučeninou. Na konci pokusu se zvířata znovu anestetizují kombinací xylazinu (3,3 mg/kg tělesné hmotnosti) a ketaminu (115 mg/kg tělesné hmotnosti). Pro analýzu pohybů stěny se zvířata, u kterých byla srdce reperfundována, zkoumají pomocí „Nuclear Magnetic Resonance Imaging“. U zvířat s neperfundovaným srdcem se pravou krční tepnou zavede špičatý kateter pro měření ventrikulárního tlaku a kontraktility v levé srdeční komoře. Pak se všem zvířatům odstraní srdce a perfunduje se retrográdně přes aortu v Langendorffově aparátu teplým 1% roztokem Evansovy modři při 37°C, aby se zjistila oblast anatomického rizika a neischemická oblast. Srdce se rozříznou na 5-6 tenkých plátků a inkubují se 15 minut v roztoku 2,3,5-trifenyltetrazolium-chloridu, aby se zjistila vitální a mrtvá srdeční tkáň. Planimetrická analýza rizikové plochy a oblasti infarktu se provádí pomocí kamery (Leica, Bensheim) s připojenou počítačovou jednotkou s analytickým softwarem (Leitz, Bensheim). Riziková plocha se pak vyjádří v procentech vztažených na levou předsíň plus septum, a infarzní oblast v procentech vztažených na rizikovou plochu. Účinek sloučeniny se projeví jako zmenšení infarzní oblasti vztažené na rizikovou plochu v porovnání s kontrolní skupinou.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina vzorce I



kde

A je cyklopropylmethyllová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{CO}-\text{R}^6$, skupina $-\text{CO}-\text{H}$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^7$;

Z je atom kyslíku nebo atom síry;

R¹ je atom vodíku nebo methyllová skupina;

R² je fenylová skupina, pyridylová skupina nebo (C₁-C₄)-alkylová skupina, kde alkylová skupina může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru a fenylová skupina může být substituována jedním nebo několika identickými nebo rozdílnými substituenty z množiny obsahující (C₁-C₄)-alkylovou skupinu, (C₁-C₄)-alkoxylovou skupinu, methylenedioxy skupinu, ethylenedioxy skupinu, atom halogenu, trifluormethyllovou skupinu a trifluormethoxylovou skupinu;

R³ a R⁴ jsou methyllová skupina nebo trifluormethyllová skupina;

R⁵ je atom vodíku nebo (C₁-C₄)-alkylová skupina, kde alkylový zbytek může být substituován jedním nebo několika atomy fluoru;

R⁶ je hydroxylová skupina, (C₁-C₁₀)-alkoxylová skupina, fenyloxylová skupina, fenyloxylová skupina, (C₁-C₈)-alkylkarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová skupina,

fenylkarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová skupina,
 fenyl-(C₁-C₆)-alkylkarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová skupina,
 (C₁-C₈)-alkoxykarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová skupina,
 fenyloxykarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová skupina,
 fenyl-(C₁-C₆)-alkoxykarbonyloxy-(C₁-C₆)-alkoxylová
 skupina, aminová skupina, mono((C₁-C₁₀)-alkyl)aminová
 skupina nebo di((C₁-C₁₀)-alkyl)aminová skupina;

R⁷ je atom vodíku nebo (C₁-C₄)-alkylová skupina;

ve všech jejích stereoizomerních formách a směsích těchto
 forem ve všech poměrech,

nebo její fyziologicky přijatelné soli.

2. Sloučenina vzorce I podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
 s e t í m, že v ní substituenty R³ a R⁴ jsou oba methylové
 skupiny nebo jsou oba trifluormethylové skupiny, ve všech
 jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve
 všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.
3. Sloučenina vzorce I podle nároků 1 a/nebo 2, v y z n a č u -
 j í c í s e t í m, že v ní Z je atom kyslíku, ve všech
 jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve
 všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.
4. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1
 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní R¹ je
 methylová skupina a R⁵ je methylová skupina, ve všech jejích
 stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech
 poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.
5. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1
 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní R² je

pyridylová skupina, nesubstituovaná fenylová skupina, fenylová skupina, která je substituována methylendioxy-skupinou nebo ethylendioxyskupinou, fenylová skupina, která je substituována jednou nebo dvěma (C₁-C₄)-alkoxylovými skupinami, nebo (C₁-C₄)-alkylová skupina, která může být substituována jedním nebo několika atomy fluoru, ve všech jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.

6. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní E je skupina -CO-R⁶ nebo skupina -CH₂-OH, a R⁶ je hydroxylová skupina, (C₁-C₆)-alkoxylová skupina nebo aminová skupina, ve všech jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.

7. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní
 A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;
 E je skupina -COOH, skupina -COOC₂H₅, skupina -COOiC₃H₇ nebo skupina -CH₂-OH;
 Z je atom kyslíku;
 R¹ je methylová skupina;
 R² je nesubstituovaná fenylová skupina, pyridylová skupina nebo methylová skupina;
 R³ a R⁴ jsou methylová skupina;
 R⁵ je methylová skupina;
 ve všech jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.

8. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní

A je cyklopropylmethylová skupina nebo isobutylová skupina;

E je skupina $-\text{COOH}$, skupina $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, skupina $-\text{COO}i\text{C}_3\text{H}_7$ nebo skupina $-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Z je atom kyslíku;

R^1 je methylová skupina;

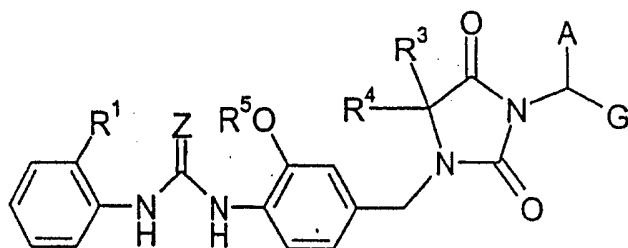
R^2 je nesubstituovaná fenylová skupina, pyridylová skupina nebo methylová skupina;

R^3 a R^4 jsou trifluormethylová skupina;

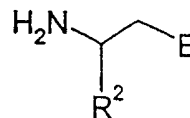
R^5 je methylová skupina;

ve všech jejích stereoizomerních formách a směsích těchto forem ve všech poměrech, nebo její fyziologicky přijatelné soli.

9. Způsob přípravy sloučenin vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina vzorce II se podrobí reakci se sloučeninou vzorce III



(II)



(III)

kde A, E, Z, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^5 jsou definovány v nárocích 1 až 8, nebo funkční skupiny jsou přítomny v chráněné formě

nebo ve formě prekurzorů, a kde G je hydroxykarbonylová skupina, (C₁-C₆)-alkoxykarbonylová skupina nebo aktivované deriváty karboxylové kyseliny.

10. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití jako léčivo.
11. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo několik sloučenin vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí, a farmaceuticky přijatelný nosič.
12. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití jako protizánětlivé látky.
13. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití při ošetření artritidy, reumatoidní artritidy, polyartritidy, zánětlivého onemocnění střev, systémického lupus erythematosus, roztroušené sklerózy nebo zánětlivých onemocnění centrální nervové soustavy.
14. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití při ošetření astmatu nebo alergií.

15. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití při ošetření kardiovaskulárních onemocnění, aterosklerózy, infarktu myokardu, akutního koronárního syndromu, mrtvice, restenózy, diabetu, poškození orgánových transplantátů, imunitních onemocnění, autoimunních onemocnění, růstu nádorů nebo nádorových metastáz, nebo malarie, nebo pro kardioprotekci nebo sekundární profylaxi mrtvice.
16. Sloučenina vzorce I podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 8 a/nebo její fyziologicky přijatelné soli pro použití jako inhibitory adheze a/nebo migrace leukocytů, nebo pro inhibici receptoru VLA-4.