PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2001 - 516

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 07 K 5/083
A 61 K 38/06
C 12 P 41/00
C 07 K 5/087
C 07 C 229/48
A 61 P 1/16
A 61 P 31/12

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.08.1998 04.05.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/095931 1999/132386**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/CA99/00736**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/09543**

(71) Přihlašovatel:
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD., Laval CA;

(72) Původce:
Llinas-Brunet Montse, Dollard-des-Ormeaux, CA;
Bailey Murray D., Pierrefonds, CA;
Cameron Dale, Rosemere, CA;
Faucher Anne-Marie, Oka, CA;
Ghiro Elise, Laval, CA;
Goudreau Nathalie, Mont-Royal, CA;
Halmos Teddy, Laval, CA;
Poupart Marc-André, Vimont, CA;
Rancourt Jean, Laval, CA;
Tsantrizos Youla S., Saint-Laurent, CA;
Wernic Dominik M., Laval, CA;

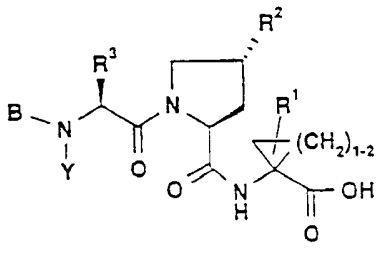
(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Peptidové inhibitory hepatidity typu C

(57) Anotace:

Racemáty, diastereoizomery a optické izomery sloučeniny obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají specifický význam, nebo jejich farmaceuticky vhodné soli nebo estery. Použití sloučenin obecného vzorce I pro výrobu léčiva pro léčení hepatitidy typu C.



(I)

CZ 2001 - 516 A3

27.04.01

PV

Peptidové inhibitory viru hepatitidy typu C

Oblast techniky

Současný vynález se týká sloučenin, způsobu jejich přípravy, přípravků a postupů terapie virové hepatitidy typu C. Vynález se především týká nových peptidových analogů, farmaceutických přípravků obsahujících tyto analoga a postupů jejich použití při terapii virové hepatitidy typu C. Vynález se také týká meziproduktů a způsobu jejich přípravy k syntéze shora uvedených peptidových analog.

Dosavadní stav techniky

Virus způsobující hepatitidu typu C (HCV) je hlavním etiologickým agens post-transfúzní nebo nenozokomiální non-A, non-B-hepatitidy. Přibližně 150 milionů lidí na světě je tímto virem infikováno. Vysoké procento nosičů v populaci je chronicky infikováno a přechází do chronického stadia onemocnění, tzv. chronické hepatitidy typu C. Tato skupina pacientů je ohrožena vážným až smrtelným onemocněním jater, jakými jsou jaterní cirhóza, hepatocelulární karcinom a jaterní selhání.

Mechanismus vzniku virové perzistence a příčina častého přechodu do chronického stadia jaterního onemocnění nejsou přesně vysvětleny. Není známé jak HCV napadá a poškozuje imunitní systém hostitele. Není ani objasněna role buněčné a humorální imunitní odpovědi proti infekci virem HCV. K profylaxi posttransfúzní virové hepatitidy jsou doporučovány imunoglobuliny, ačkoli the Centre for Disease Control (Ústav pro kontrolu infekčních chorob) v současné době použití imunoglobulinů k tomuto účelu nedoporučuje. Nedokonale účinná obranná imunitní odpověď znemožňuje vývoj vakcíny nebo zavedení profylaktických opatření po expozici nákaze.

27.04.01

Jedinou možností řešení v blízké budoucnosti jsou intervence namířené proti virům samotným.

Ke zjištění účinných farmaceutických činidel vhodných k terapii infekcí virem HCV u pacientů s chronickou hepatitidou typu C se již provedlo mnoho rozličných klinických studií. Během těchto studií se sledovalo užití interferonu alfa samotného nebo v kombinaci s ostatními antivirovými léčivy. Studie prokázaly, že u podstatné části sledovaných pacientů je tato terapie neúčinná, a pokud účinná je, pak ve velkém procentu případů dochází po ukončení terapie k relapsu onemocnění.

Jedinou a podle klinických studií prokazatelně vhodnou terapií chronické virové hepatitidy C bylo donedávna podávání interferonu (IFN). Taková terapie však vede jen u malého procenta případů k podstatnému zlepšení a navíc terapie interferonem má závažné vedlejší účinky (retinopatie, thyroiditis, akutní panktreatitida, deprese), které snižují kvalitu života takto léčených pacientů. Kombinace s ribavirinem má pozitivní účinek u pacientů neodpovídajících na léčbu samotným interferonem, tato kombinace však nesnižuje výskyt vedlejších nežádoucích účinků způsobených interferonem samostatně podaným.

Z uvedeného vyplývá nutnost účinného antivirového činidla k terapii infekce HCV, které překoná současné omezení farmakologické terapie tohoto závažného onemocnění.

HCV patří do skupiny jednořetězových RNA virů s pozitivní polaritou a lipidovou obálkou, čeleď Flaviviridae. Jediný řetězec RNA genomu HCV tvoří podélně přibližně 9500 nukleotidů s jednoduchým otevřeným čtecím rámcem (open reading frame ORF) k dekódování jediného velkého polyproteinu o přibližně 3000 aminokyselinách. V infikovaných buňkách je tento polyprotein mnohočetně štěpen buněčnými a virovými proteázami za vzniku strukturálních a nestrukturálních (NS) proteinů. V případě HCV je tvorba zralých

27.04.01

nestrukturálních proteinů (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, a NS5B) způsobená dvěmi virovými proteázami. První z nich, velmi špatně popsaná, štěpí místo spojení NS2-NS3. Druhá, serinová proteáza je v N-terminální oblasti molekuly NS3 (proto označovaná jako NS3 proteáza) zprostředkovává všechna štěpení za NS3 dolů, v *cis* pro NS3-NS4 štěpení a v *trans* pro štěpení ve zbývajících místech, tedy NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. Protein NS4A má zřejmě několik funkcí, je kofaktorem NS3 proteázy a pravděpodobně napomáhá membránové lokalizaci NS3 a ostatních virových replikových komponent. Komplex tvořící NS3 protein a NS4A je zřejmě důležitým mezičlánkem ovlivňujícím proteolytické pochody na popsaných místech štěpení proteinu. NS3 protein vykazuje nukleosid-trifosfatázovou a RNA-helikázovou aktivitu. Protein NS5B je RNA-dependentní RNA polymeráza ovlivňující replikaci viru HCV.

Při výzkumu a vývoji antivirového činidla se hlavním cílem stala taková látka, která inaktivuje virem kódované enzymy, které jsou esenciální pro replikaci viru. Zveřejněná přihláška WO č. 97/06804 popisuje (-)-enantiomer nukleosidového analoga cytosin-1,3-oxathiolanu (3TC), který je účinný proti HCV viru. Tato sloučenina, která byla označena v předchozími klinickými studiemi za bezpečnou, je prokazatelně účinná proti virům HIV a HBV. Stále ještě zbývá klinicky doložit její účinnost proti HCV a popsat mechanismus antivirového účinku.

Rozsáhlé úsilí objevit sloučeniny, které inhibují NS3-proteázu nebo RNA-helikázu viru HCV vedlo k následujícím odhalením:

US patent č. 5 633 388 popisuje heterocykly substituované karboxamidy a jejich analoga účinné proti viru HCV. Účinek těchto sloučenin je namířen proti helikázovému účinku protienu NS3. Výsledky klinických testů nejsou zatím k dispozici.

27.04.01

Podle studie vedené Chu a spol. (Tet. Lett., 1996, str. 7229-7232) je fenantren-chinon in vitro účinný proti proteáze NS3 proteinu. Výsledky dalšího výzkumu této sloučeniny nebyl zatím zveřejněn.

Studie prezentovaná na deváté mezinárodní konferenci o antivirovém výzkumu (Urabaai, Fukyshima, Japonsko 1996, Antiviral Research, 30. 1. 1996, A23 (článek 19)) popisuje thiazolidinové deriváty jako inhibitory HCV proteázy.

Několik studií se zabývalo sloučeninami inhibujícími jiné serinové proteázy, především lidskou leukocytární elastázu. Jedna skupina z těchto sloučenin je popsána ve zveřejněné přihlášce WO č. 95/33764 (Hoechst Marion Rousse, 1995). Peptidy popisované v této přihlášce jsou strukturálně odlišné od peptidů podle současného vynálezu.

Zveřejněná přihláška WO č. 98/17679 (Vertex Pharmaceuticals Inc.) se týká inhibitorů serinové proteázy, především proteázy NS3 proteinu HCV viru. Tyto inhibitory jsou analoga peptidů odvozená od NS5A/5B. Všechny tyto peptidy obsahují jako svoji základní vlastnost C-terminál peptidů aktivovaný karbonylovou funkční skupinou. Tyto peptidy jsou podle popisu účinné proti jiným serinovým proteázám a nejsou tudíž specificky účinné proti proteáze NS3 proteinu viru HCV.

Hoffman LaRoche také popisuje hexapeptidy jako antivirová činidla působící jako inhibitory proteináz vhodná k terapii infekcí HCV virem. Tyto peptidy obsahují na svém C-terminálu aldehyd nebo kyselinu boritou.

Steinkühler a spol. a Ingallinella a spol. popisují inhibici produkty štěpení na N-terminálu (Biochemistry 1998, 37, 8899-8905 a 8906-8914). Tyto peptidy a jejich analoga nijak nepřipomínají peptidy podle současného vynálezu.

Předností současného vynálezu je, že se týká tripeptidů inhibujících NS3 proteázu viru HCV.

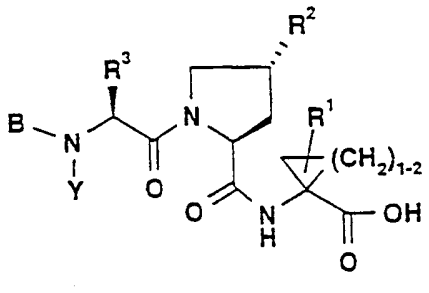
27.04.01

Jinou předností současného vynálezu je, že se týká shora uvedených peptidů, které specificky inhibují NS3 proteázu a které nemají do 300 μmol signifikantní inhibiční účinek na ostatní serinové proteázy, jakými jsou lidská leukocytární elastázy (HLE), prasečí pankreatická elastáza (PPE) nebo hovězí pankreatický chymotrypsin nebo na cysteinové proteázy (lidský jaterní katepsin B (Cat B)).

Další předností tohoto vynálezu je, že se týká malých peptidů o nízké molekulární hmotnosti, které dobře penetrují membránami buněk, působí uvnitř buněk a in vivo mají dobrý farmakokinetický profil.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou racemáty, diastereoizomery a optické izomery sloučeniny obecného vzorce I:



(I)

kde **B** je atom vodíku, C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16} aralkyl; heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem; C_{1-6}alkoxy, C_{1-6} alkanoyl, hydroxyskupina, hydroxy-alkylová skupina, atom halogenu, haloalkyl, nitroskupina, kyanoskupina, kyano-alkylová skupina, aminoskupina eventuálně substituovaná C_{1-6}alkylem; amidoskupina nebo (nižší alkyl)-amidoskupina nebo

27.04.01

B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)-, karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-, amidoskupina vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-, thio-amidoskupina vzorce R_4-N(R_5)-C(S)- nebo sulfonyl vzorce R_4-SO_2,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

ii/ C_{3-7} cykloalkyl, C_{3-7}cykloalkoxy nebo C_{4-10}alkyl-cykloalkyl, vždy eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylovou skupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

iii/ aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupina nebo (nižší alkyl)-amidoskupina nebo

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

R_5 je atom vodíku nebo C_{1-6}alkyl;

za předpokladu, že pokud R_4 je amidoskupina nebo thioamid, pak R_4 není ii/ cykloalkoxy;

a

27.04.01

Y je atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl;

R^3 je C_{1-8}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}thioalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou, C_6 nebo C_{10} arylem nebo C_{7-16} aralkylem,

R_2 je CH_2-R_{20}, NH-R_{20}, O-R_{20} nebo S-R_{20},

kde R_{20} je nasycený nebo nenasycený C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} (alkylcykloalkyl), vždy eventuálně mono-, di- nebo tri- substituované R_{21} nebo

R_{20} znamená C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-14} aralkyl, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituované R_{21} nebo

R_{20} je heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně mono-, di-nebo tri-substituované R_{21},

kde každé R_{21} je nezávisle C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thio-alkyl, sulfonyl, nitroskupina, hydroxyskupina, merkapto-skupina, atom halogenu, haloalkyl, aminoskupina eventuálně mono-nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-14}aralkyl, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het; amidoskupina eventuálně mono- substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-14} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het; karboxylová skupina, karboxy-(nižší alkyl), C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, sulfonylová skupina, (nižší alkyl)-sulfonylová skupina, nitroskupina, hydroxyskupina, merkaptoskupina, atom halogenu, haloalkyl, karboxylová skupina, amidoskupina, (nižší

alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem,

R^1 je atom vodíku, C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{2-6}alkenyl nebo C_{2-6} alkinyl, vždy eventuálně substituovaný atomem halogenu,

nebo jejich farmaceuticky vhodné soli nebo estery.

Podstatou vynálezu je farmaceutický přípravek obsahující účinné množství sloučeniny obecného vzorce 1, které působí proti viru HCV, nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru, v adiční směsi s farmaceuticky vhodným nosičem nebo pomocnou látkou.

Důležitou podstatou vynálezu je způsob terapie virové hepatitidy typu C savců, která spočívá v podání specificky anti-HCV působícího účinného množství sloučeniny obecného vzorce 1 nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru nebo shora uvedeného přípravku.

Jinou podstatou vynálezu je způsob inhibice replikace viru hepatitidy typu C působením takovým množstvím sloučeniny obecného vzorce I nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru nebo shora uvedeného přípravku, které způsobí inhibici virové proteázy NS3 proteinu viru HCV.

Další podstatou vynálezu je způsob terapie virové hepatitidy C u savců podáním specificky proti HCV viru působícího účinného množství kombinace sloučeniny obecného vzorce I nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru. Podstatou vynálezu je přípravek obsahující další imunomodulační činidlo. Příkladem takového činidla jsou α-, β- a δ-interferony.

Radikály označené R a S, popisují konfiguraci radikálu ve vztahu ke sloučenině (například R_1 sloučeniny obecného vzorce I). Jde o vztah radikálu ke sloučenině.

27.04.01

Přirozeně se vyskytující aminokyseliny kromě glycinu obsahují chirální atom uhlíku. Pokud není dále uvedeno jinak, pak preferujeme aminokyseliny v L-konfiguraci. V případech blíže určených předkladatelé předpokládají, že některé aminokyseliny obecného vzorce I mohou mít konfiguraci buď D- nebo L- nebo se mohou vyskytovat ve směsi D- a L-izomerů, včetně racemických směsí.

Výrazy „P1, P2, P3...“ se používají k označení pozice zbytku aminokyseliny od C-konce peptidu směrem k N-konci (P1 označuje pozici 1 od C- konce, P2 označuje druhou pozici od C-konce...). Literatura: A. Berger & I. Schechter, Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970)).

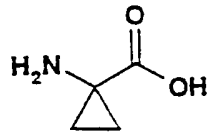
Zkratky pro α-aminokyseliny jsou uvedeny v následující tabulce A:

aminokyselina	symbol
1-aminocyklopropyl-karboxylová kyselina	Acca
Alanin	Ala
Asparťová kyselina	Asp
Cystein	Cys
Cyklohexylglycin (2-amino-2-cyklohexyloctová kyselina)	Chg
Glutamová kyselina	Glu
Izoleucin	Ile
Leucin	Leu
Fenylalanin	Phe
Prolin	Pro

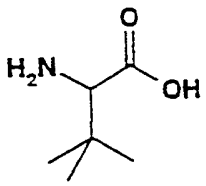
27.04.01

terc.butylglycin	Tbg
Valin	Val

Termín "1-aminocyklopropyl-karboxylová kyselina" (Acca) znamená sloučeninu obecného vzorce:



Termín "terc.-butylglycin" (Tbg) znamená sloučeninu obecného vzorce:



Termín "zbytek" aminokyseliny nebo derivátu aminokyseliny znamená radikál odvozený od odpovídající α-aminokyseliny odštěpením hydroxylu karboxylové skupiny a jednoho vodíkového atomu α-aminoskupiny. Například termíny Gln, Ala, Gly, Ile, Arg, Asp, Phe, Ser, Leu, Cys, Asn, Sar a Tyr znamenají "zbytky" L-glutaminu, L-alaninu, glycinu, L-izoleucinu, L-argininu, L-aspartové kyseliny, L-fenylalaninu, L-serinu, L-leucinu, L-cysteinu, L-asparaginu, sarkosinu a L-tyrosinu.

Jako "vedlejší řetězec" aminokyseliny nebo zbytku aminokyseliny znamená skupinu vázanou na atom α-uhlíku α-aminokyseliny. Například, R- vedlejší řetězec u glycinu je atom vodíku, u alaninu je to metyl, u valinu je to izopropyl. Specifické R-skupiny nebo vedlejší řetězce α-aminokyselin jsou uvedeny v učebnici A. L. Lehninger's text on Biochemistry (kapitola 4).

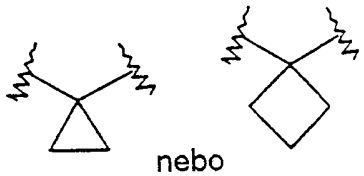
27.04.01

Jako "halogen" označujeme atom halogenu, a to atom brómu, chlóru, fluóru nebo jódu.

Termín "C_{1-6}alkyl" nebo "(nižší) alkyl", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená přímý nebo větvený řetězec alkylových zbytků obsahující až šest atomů uhlíku včetně, například metyl, etyl, propyl, butyl, hexyl, 1-metyletyl, 1-metylpropyl, 2-metylpropyl, 1,1-dimetyletyl (tj. terc-butyl).

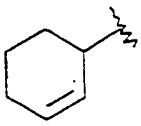
Termín „C_{3-7}cykloalkyl", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená zbytek cykloalkylu obsahující od tří do sedmi atomů uhlíku a zahrnuje cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl a cykloheptyl.

Termín „spiro“ -cyklická skupina označuje například spiro-cyklopropyl nebo spiro-cyklobutyl:



nebo

Termín „nenasycený cykloalkyl" například označuje cyklohexenyl:



Termín „C_{4-10} (alkylcykloalkyl)“ znamená zbytek cykloalkylu obsahující od čtyř do deseti atomů uhlíku vázaný na zbytek alkylu. Vázané zbytky obsahují až deset atomů uhlíku, například cyklopropylmetyl, cyklopentyletyl, cyklohexylmetyl, cyklohexyletyl nebo cykloheptyletyl.

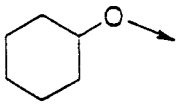
27.04.01

Termín „C_{2-10} alkenyl" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená zbytek alkylu obsahující od 2 do 10 atomů uhlíku a dále obsahující nejméně jednu dvojnou vazbu. Jde například o alkenyl včetně alylu a vinylu.

Termín „C_{1-6} alkanoyl", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená přímý nebo větvený zbytek 1-oxoalkylu obsahující jeden až šest atomů uhlíku. Mezi takové alkanyly patří formyl, acetyl, 1-oxopropyl (propionyl), 2-metyl-1-oxopropyl, 1-oxohexyl.

Termín „C_{1-6} alkoxy", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným radikálem, znamená zbytek -O(C_{1-6}alkyl), kde shora definovaný alkyl obsahuje až šest atomů uhlíku. Alkoxy znamená metoxy, etoxy, propoxy, 1-metyl-etoxy, butoxy a 1,1-dimetyl-etoxy (známý jako terc.-butoxy).

Termín „C_{3-7}cykloalkoxy" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená C_{3-7}cykloalkylovou skupinu vázanou na atom kyslíku, například:

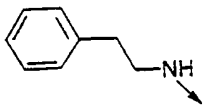


Termín „C_6 nebo C_{10}aryl" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená buď aromatickou monocyklickou skupinu obsahující 6 atomů uhlíku nebo aromatickou bicyklickou skupinu obsahující 10 atomů uhlíku. Například aryl znamená fenyl, 1-naftyl nebo 2-naftyl.

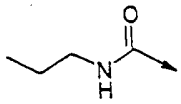
Termín „C_{7-16}aralkyl" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená C_6 nebo C_{10} aryl vázaný na alkylovou skupinu,

kde shora definovaný alkyl obsahuje od 1 do 6 atomů uhlíku. Mezi C_{7-16}aralkyly patří například butylfenyl a 1-naftylmetyl.

Termín „amino-aralkyl", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená aminoskupiny substituované s C_{7-16}aralkylovou skupinu. Jde například o amino-aralkyl:



Termín „(nižší alkyl)amid", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným radikálem znamená amidoskupinu mono-substituovanou C_{1-6}alkylem:

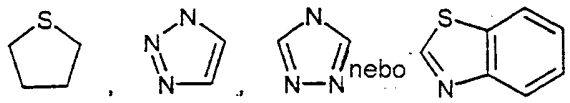


Termín „karboxy-(nižší)alkyl", použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená karboxylovou skupinu (COOH) vázanou na (nižší) alkylovou skupinu. Jde například o kyselinu máselnou.

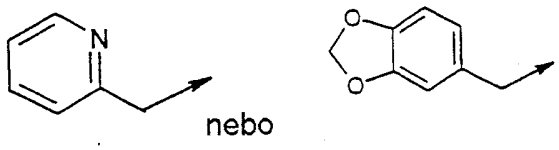
Termín „heterocyklus" nebo "Het" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená monovalentní zbytek odvozený odštěpením atomu vodíku z pěti-, šesti- nebo sedmičetného nasyceného nebo nenasyceného (včetně aromatického) heterocyklu obsahujícího od jednoho do čtyř heteroatomů, a to atomu dusíku, kyslíku a síry. Navíc výraz "Het", znamená shora definovaný heterocyklus fúzovaný do jednoho nebo více jiných cyklů za vzniku heterocyklu nebo jiného dalšího cyklu. Příkladem vhodných heterocyklů jsou: pyrolidin, tetrahydrofuran, thiazolidin, pyrol, thiofen, diazepin, 1H-imidazol,

27.04.01

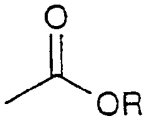
izoxazol, thiazol, tetrazol, piperidin, 1,4-dioxan, 4-morfolin, pyridin, pyrimidin, thiazol-[4,5-b]-pyridin, chinolin nebo indol nebo následující heterocykly:



Termín „(nižší alkyl)-Het", zde uváděný, znamená heterocyklický zbytek vázaný na řetězec nebo větvenou alkylovou skupinu, kde shora definovaný alkyl obsahuje od 1 do 6 atomů uhlíku. Příkladem „(nižší alkyl)-Het" je:



Termín „farmaceuticky vhodný ester" použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným zbytkem, znamená estery sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém jakákoli karboxylová funkční skupina, ale především karboxy-terminál, je nahrazena alkoxykarbonylovou funkční skupinou:



, ve které **R** skupina esteru nezávisle znamená alkyl (metyl, etyl, n-propyl, t-butyl, n-butyl), alkoxyalkyl (metoxymetyl), alkoxyacyl

(acetoxymetyl), aralkyl (benzyl), aryloxyalkyl (fenoxymetyl) nebo aryl (fenyl) eventuálně substituovaný halogenem, C_{1-4} alkylem nebo zbytkem C_{1-4} alkoxy. Ostatní vhodné farmaceuticky vhodné estery lze nalézt v publiklaci „Design of prodrugs" Bundgaard, H. Ed. Elsevier (1985). Takové farmaceuticky vhodné estery jsou hydrolyzovány in vivo po injekční aplikaci savcům a přeměněny na kyselinu sloučeniny obecného vzorce 1.

S odkazem na shora popsané estery a pokud není uvedeno jinak, obsahuje každá alkylová skupina od jednoho do šestnácti atomů uhlíku, především od jednoho do šesti atomů uhlíku. Je vhodné, když každá arylová skupina přítomná v takových esterech obsahuje fenylovou skupinu.

Především jde o tyto estery: C_{1-16}alkylester, nesubstituovaný benzylester nebo benzylester substituovaný nejméně jedním atomem halogenu, C_{1-6}alkylem, zbytkem C_{1-6}alkoxy, nitroskupinou nebo trifluormetylem.

Termín „farmaceuticky vhodné soli" znamená soli odvozené od farmaceuticky vhodných zásad. Příkladem vhodných zásad jsou cholin, etanolamin a etylen-diamin. Podstata tohoto vynálezu se týká i sodných, draselných a vápenatých solí. Literatura: „Pharmaceutical salts", S. M. Birge a spol., J. Pharm. Sci. (1977), 66, 1-19).

Podstata současného vynálezu se především týká sloučeniny obecného vzorce I, kde **B** je především C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupina eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

B je heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je především R_4-SO_2, kde R_4 je především C_{1-6}alkyl, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6} alkylem nebo

B je především acylový derivát vzorce R_4-C(O)-

kde R_4 je především i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6} alkoxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem;

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem.

B je především a karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem;

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem;

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituovaný C_{1-6} alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou.

B je především amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-

kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3} alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem

27.04.01

a

R_5 je především atom vodíku nebo metyl.

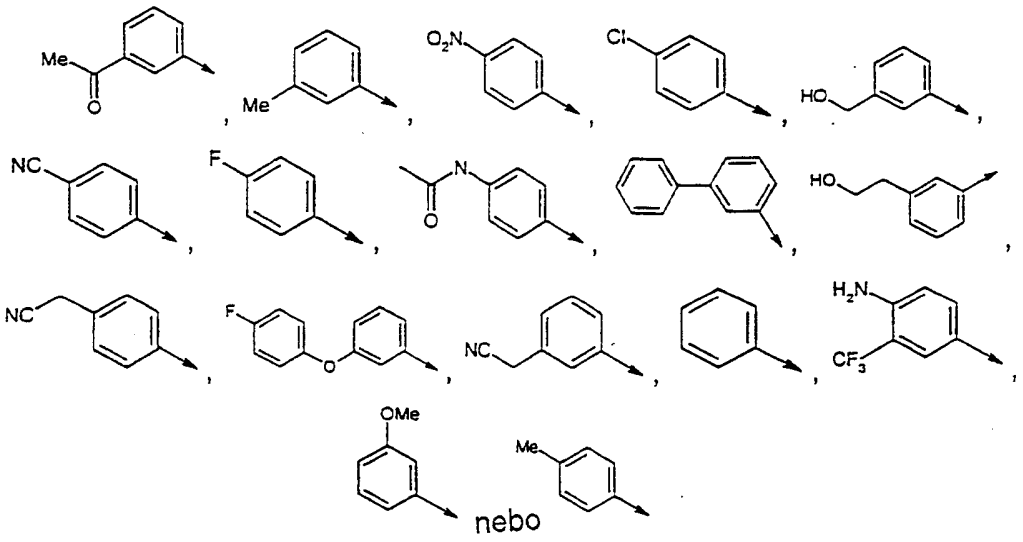
B znamená především thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6} alkanoylem nebo C_{1-6}alkoxy;

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou nebo amidoskupinou.

B především znamená C_6 nebo C_{10} aryl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

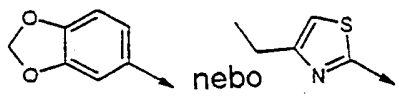
takže B je například:



nebo

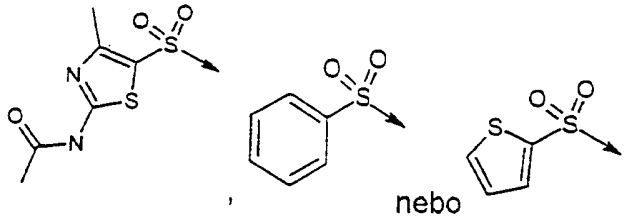
nebo B je především heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, atomem

halogenu, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,
takže **B** je například:



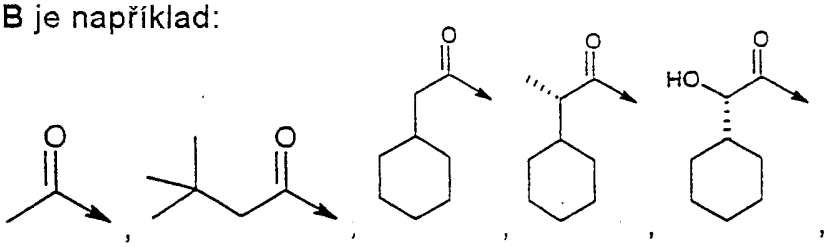
B je především R_4-SO_2,

kde R_4 je především C_6 nebo C_{10} aryl, C_{1-14}aralkyl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina,
takže B je například **B**:

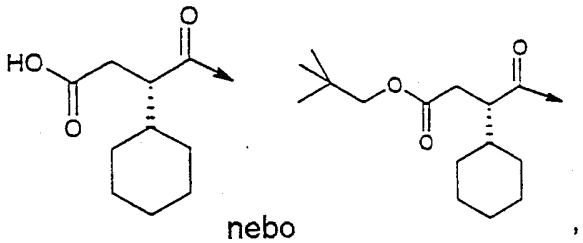


B je především acylový derivát vzorce R_4-C(O)-,
kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxy;

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem,
takže **B** je například:

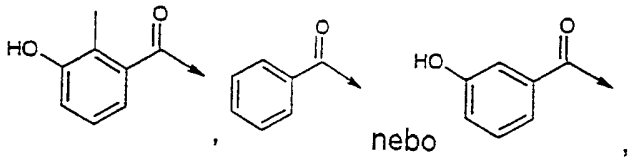


27.04.01



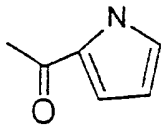
nebo ,

nebo R_4 je především iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou,
takže **B** je například:



, , nebo ,

nebo R_4 je především v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou,
takže **B** je například:

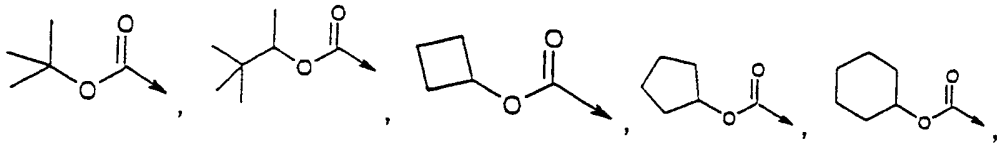


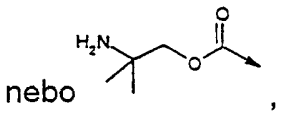
B je především karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6} alkoxy nebo amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou, aminoskupinou eventuálně mono-nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

ii) C_{3-7} cykloalkyl, C_{4-10} alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)karbonylem,

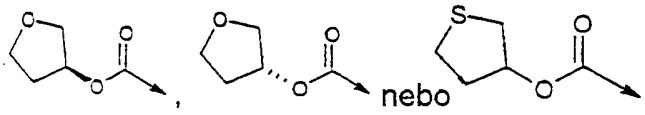
amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,
takže **B** je například:





nebo R_4 je především iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono-substituovanou C_{1-6}alkylem,
takže **B** je například:



B je především amid vzorce R_4-N (R_5)-C(O)-,

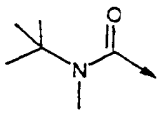
kde R_4 je především i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem

a

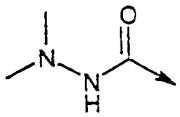
R_5 je atom vodíku nebo metyl,

takže **B** je například:



nebo R_4 je především iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3}alkylem,

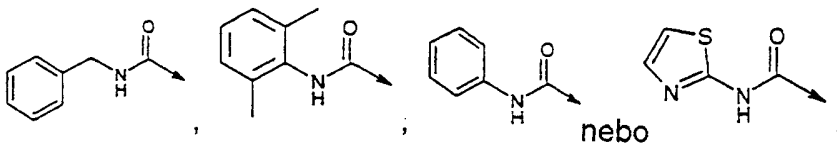
takže **B** je například:



nebo R_4 je především iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou,

takže **B** je například:



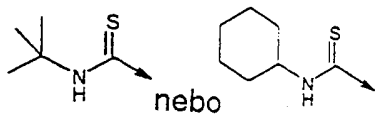
27.04.01

B je především thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je především i/ C_{1-10}alkyl nebo

ii/ C_{3-7}cykloalkyl,

takže **B** je například:

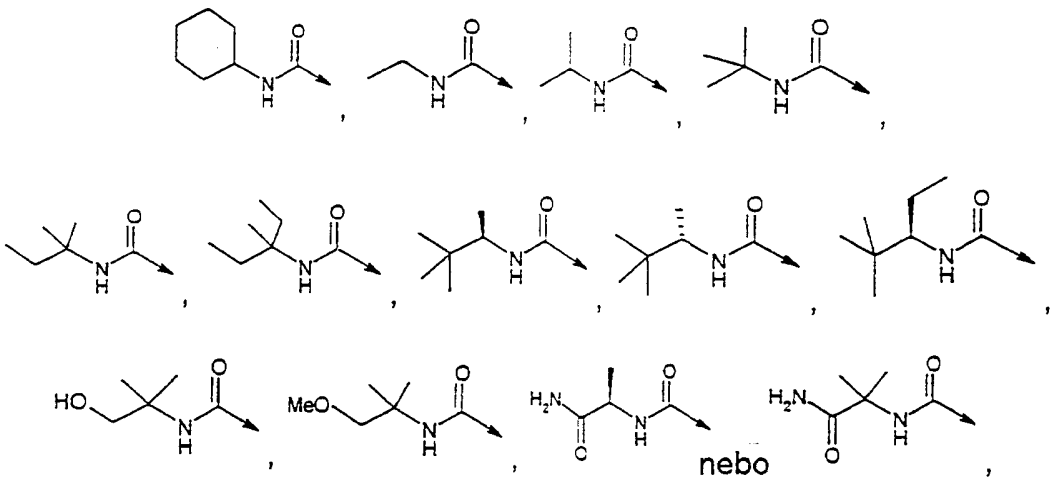


nebo

Velmi výhodné je, když **B** znamená amid vzorce R_4-NH-C(O)-,

kde R_4 je především i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

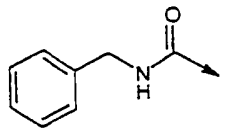
ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,



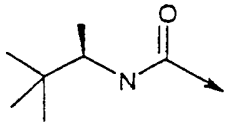
nebo

27.04.01

nebo R_4 je především iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou,
takže **B** je například:

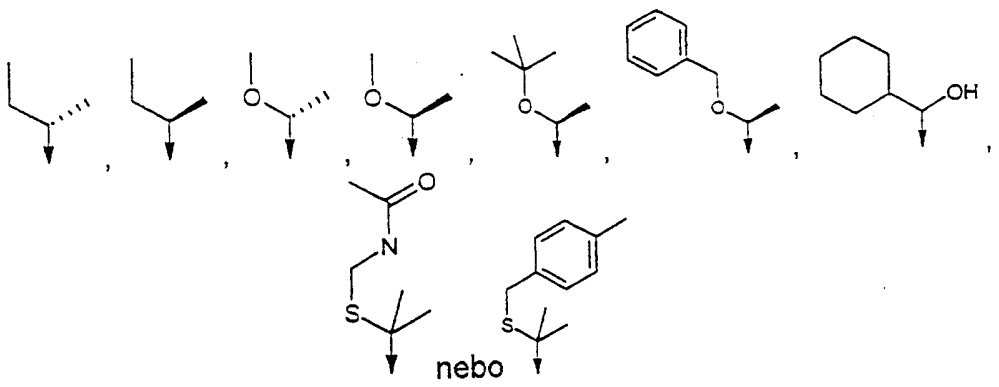


Preferujeme, když **B** je terc.-butoxykarbonyl (Boc) nebo

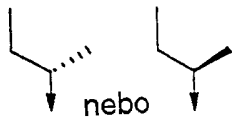


Preferujeme, když **Y** je atom vodíku nebo metyl. Nejvíce preferujeme, když **Y** je atom vodíku.

Preferujeme, když R^3 je C_{1-8} alkyl, C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkyl-cykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6} thioalkylem, acetamidovou skupinou, C_6 nebo C_{10}arylem nebo C_{7-16} aralkylem,
takže R^3 je například:



Preferujeme, když R^3 je vedlejší řetězec terc.-butylglycinu (Tbg) , Ile, Val, Chg nebo



Nejvíce preferujeme, když R^3 je vedlejší řetězec Tbg, Chg nebo Val.

Podstata současného vynálezu se týká sloučeniny vzorce I, kde preferujeme, když

R^2 je S-R_{20} nebo O-R_{20} ,

kde R_{20} je především C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16} aralkyl, heterocyklus nebo -CH_2-Het, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituované R_{21},

kde R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, amino skupina nebo amidoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-16} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-heterocyklem, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16}aralkyl, nebo heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22}.

Preferujeme, když R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný pomocí R_{22}.

Preferujeme, když R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid,

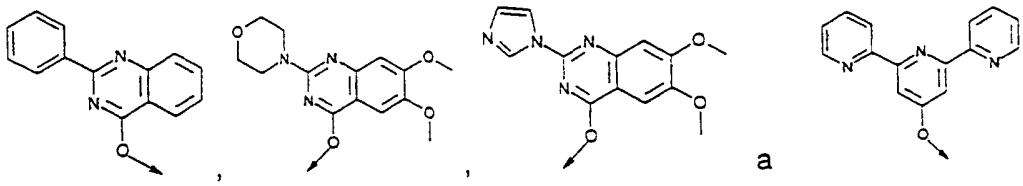
27.04.01

sulfonylalkyl, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina nebo heterocyklus.

Především preferujeme, když R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6} alkoxy, halogen, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná nižším alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus.

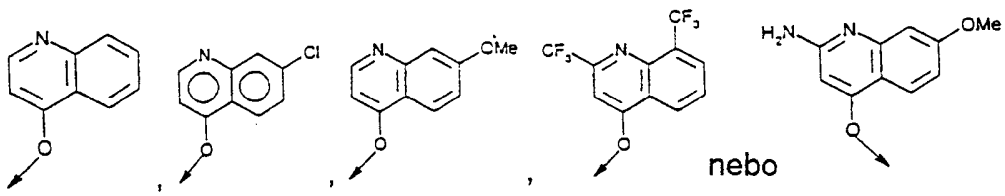
Nejvíce preferujeme, když R_{22} je metyl, etyl, izopropyl, terc.butyl, alkyl, amidoskupina, (nižší alkyl)amidoskupina nebo (nižší alkyl) 2-thiazol.

Preferujeme, když R_2 je jedna z následujících skupin:



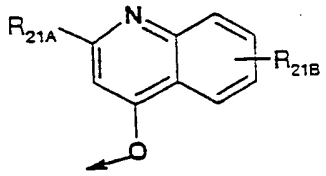
Preferujeme, když R_2 je 1-naftylmetoxy-, 2-naftylmetoxy-, benzyloxy-, 1-naftyloxy-, 2-naftyloxy- nebo chinolinoxy- nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21}.

Nejvíce preferujeme, když R_2 je 1-naftylmetoxy- nebo chinolinoxy, nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21} (shora definovaný), takže R_2 je například:

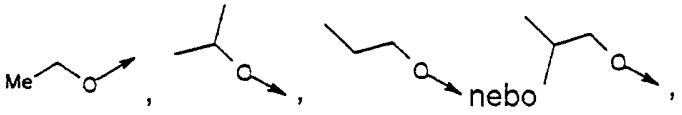


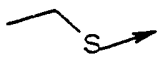
27.04.01

Nejvíce preferujeme, když R_2 je:



Preferujeme, když R_{21A} je C_{1-6}alkyl (izopropyl, terc.butyl nebo cyklohexyl), C_{1-6}alkoxy (metoxy) a dále:



nižší thioalkyl: 

halogen (chlór), aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem nebo C_6 nebo C_{10}aryl,

takže R_{21A} je například dimetylamino, Ph-N(Me)-,

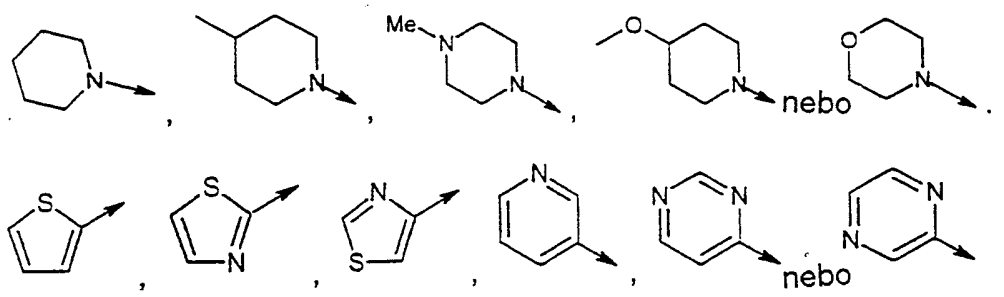
dále nesubstituovaný C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16} arylalkyl (fenyl) nebo 

nebo R_{21A} je především heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná nižším alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus,

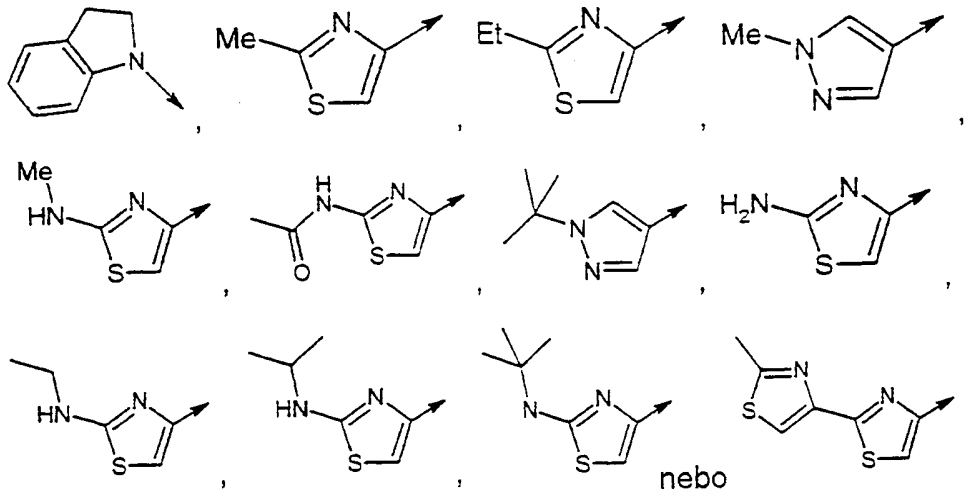
27.04.01

takže R_{21A} je například:

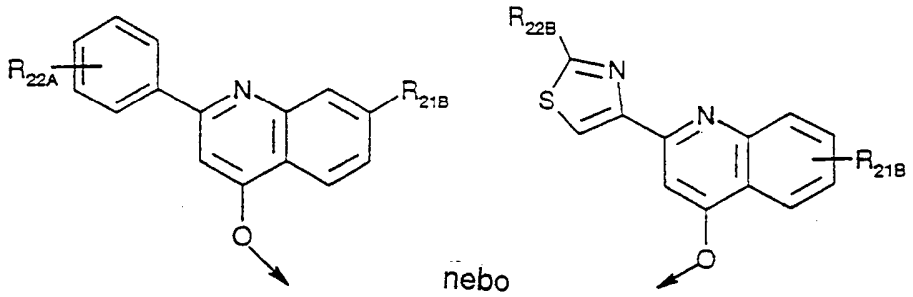


Nejvíce preferujeme, když R_{21A} je C_6, C_{10}aryl nebo Het, vždy eventuálně substituovaný R_{22},

takže R_{21A} je například:



Nejvíce preferujeme, když R_2 je:



kde R_{22A} je především C_{1-6} alkyl (metyl), C_{1-6} alkoxy (metoxy) nebo halogen (chlór),

R_{22B} je především C_{1-6}alkyl, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6} alkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou a

R_{21B} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl nebo karboxyl.

Především preferujeme, když R_{21B} je C_{1-6}alkoxy nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina.

Nejvíce preferujeme, když R_{21B} je metoxy.

Vynález se především týká sloučeniny obecného vzorce I, kde P1 segment (cyklopropylový nebo cyklobutylový kruh) je substituovaný R_1.

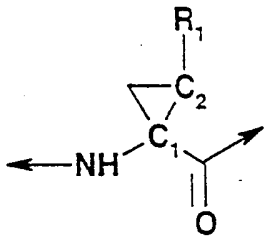
Je vhodné, když R^1 je atom vodíku, C_{1-3}, C_{3-5}cykloalkyl nebo C_{2-4}alkenyl eventuálně substituovaný halogenem.

Preferujeme, když R^1 je etyl, vinyl, cyklopropyl, 1- nebo 2-brom-etyl nebo 1- nebo 2-brom-vinyl.

Nejvíce preferujeme, když R_1 je vinyl.

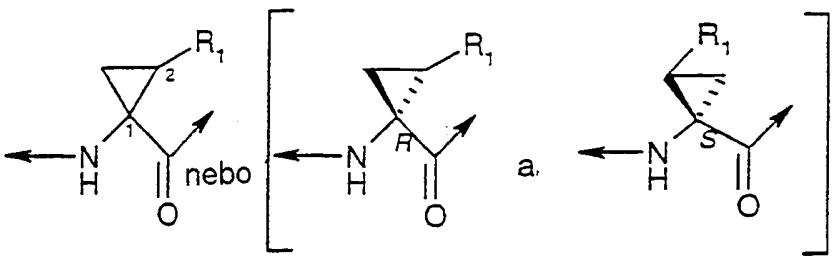
27.04.01

Pokud R_1 není atom vodíku, a pak **P1** je především cyklopropylový kruh vzorce:



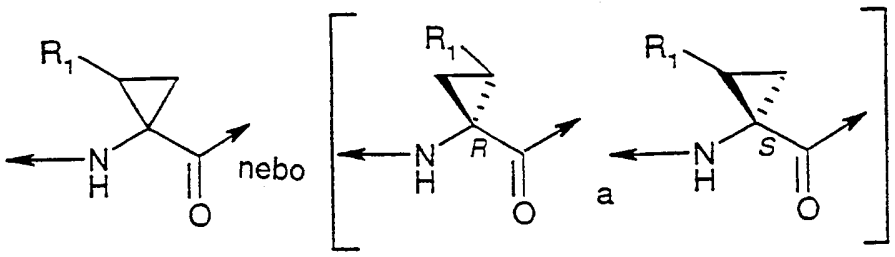
, kde C_1 a C_2 znamenají asymetrické atomy uhlíku v pozicích 1 a 2 cyklopropylového kruhu. Ikdyž nevylučujeme přítomnost ostatních možných center asymetrie v jiných segmentech sloučeniny obecného vzorce I, přítomnost těchto dvou center asymetrie způsobuje, že sloučeniny obecného vzorce I mohou existovat jako racemické směsi diastereoizomerů. Jak je následně popsáno v příkladech provedení vynálezu, tyto racemické směsi se připraví, a pak se rozdělí do jednotlivých optických izomerů nebo lze tyto optické izomery připravit chirální syntézou.

Sloučenina obecného vzorce I se může vyskytovat jako racemická směs diastereoizomerů na uhlíku 1, kde R_1 na uhlíku 2 je orientováno do *syn* pozice vzhledem ke karbonylu na pozici 1, a zbytek je charakterizován následujícím vzorcem:



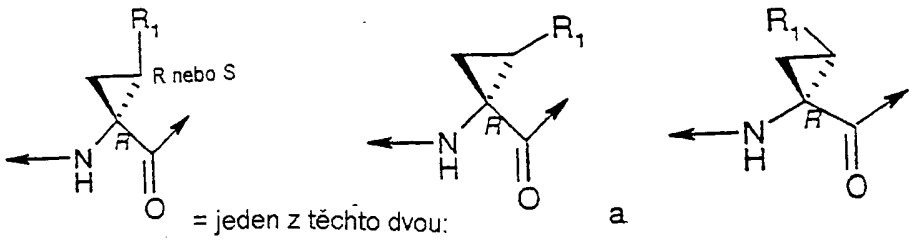
27.04.01

nebo sloučenina obecného vzorce I, může být racemickou směsí diastereoizomerů, kde R_1 na uhlíku 2 je orientováno do *anti* pozice ke karbonylu na uhlíku 1, a zbytek je charakterizován následujícím vzorcem:



Racemické směsi lze separovat na individuální optické izomery.

Nejzajímavější vlastnost současného vynálezu spočívá v prostorovém uspořádání P1 segmentu a v adici R_1 substituentu na atomu uhlíku 2. Podstata vynálezu se týká konfigurace asymetrického atomu uhlíku na pozici 1. Preferovanou podstatou vynálezu je sloučenina podle vzorce I, kde R_1 není atom vodíku a asymetrický atom uhlíku na pozici 1 má R konfiguraci.

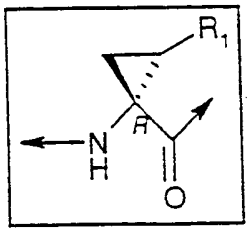


27.04.01

Přítomnost substituenta R_1 na uhlíku C2 zvyšuje účinnost sloučeniny, pokud C1 je pak v R konfiguraci. Například sloučeniny **901** (1R,2S) a **203** (1R,2R) mají účinnost 25 a 82 nM, nesubstituovaná cyklopropylová sloučenina **111** má účinnost 475 nM.

Pokud atom uhlíku v pozici 1 má R konfiguraci (např. sloučenina **901** a **203**), pak inhibice proteázy NS3 viru HCV je dále zvýšena pozicí substituenta R_1 (alkylu nebo alkylenu) na uhlíku 2 cyklopropylového kruhu, tzn. že sloučenina, kde R_1 je *syn* ke karboxylové skupině, má vyšší účinnost (25nM) než v případě *anti* enantiomeru (82nM). Z porovnání účinnosti sloučenin **801** (1R, 2S), která je 6 nM a jejího odpovídajícího (1S,2S) izomeru, jehož účinnost je vyšší než 10μM, vyplývá, že izomer (1R,2S) je 1500x účinnější než izomer (1S,2S)!!

Nejvíce preferovanou sloučeninou podle současného vynálezu je optický izomer s R_1 substituentem a karbonylem v orientaci *syn* v následující absolutní konfiguraci:



V případě, že například R_1 je etyl, pak asymetrické atomy uhlíky pozicích 1 a 2 mají R,R konfiguraci.

Podstata současného vynálezu se týká sloučeniny obecného vzorce I, kde **B** je především C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoyl, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo je heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je R_4-SO_2,

kde R_4 je především amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, všechny eventuálně substituované C_{1-6} alkylem nebo

B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcyklo-alkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem,

substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituované karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituované C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

B je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem;

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-

substituovaná C_{1-3} alkylem;

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem

a

R_5 je především atom vodíku nebo metyl nebo

B je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6} alkanoylem nebo C_{1-6}alkoxy;

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou nebo amidoskupinou,

Y je atom vodíku nebo metyl,

R_3 je C_{1-8} alkyl, C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituované hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}thioalkylem, acetamidem, C_6 nebo C_{10}arylem nebo C_{7-16} aralkylem,

R_2 je S-R_{20} nebo O-R_{20} ,

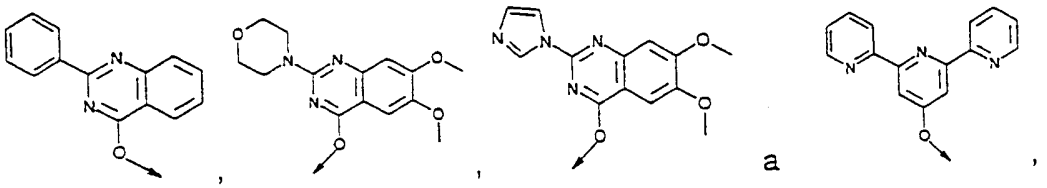
kde R_{20} je především C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16}aralkyl, Het nebo -CH_2-Het, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituované R_{21},

kde R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, aminoskupina nebo amidoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-16} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het, dále nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16} aralkyl nebo

heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný pomocí R_{22}, kde

R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, sulfonylalkyl, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina nebo heterocyklus nebo

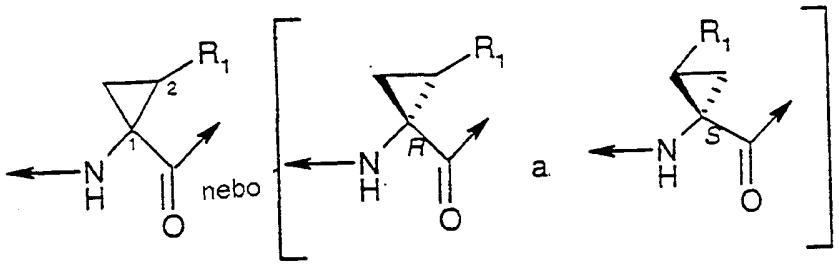
R_2 je jedna z následujících skupin:



R_2 je 1-naftylmetoxy-, 2-naftylmetoxy-, benzyloxy-, 1-naftyloxy-, 2-naftyloxy- nebo chinolinoxy- nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21} ,

P1 segment je cyklopropylový nebo cyklobutylový kruh, oba eventuálně substituované R_1, kde

R^1 je atom vodíku, C_{1-3}alkyl, C_{3-5}cykloalkyl nebo C_{2-4}alkenyl eventuálně substituované halogenem a zároveň R_1 na atomu uhlíku v pozici 2 je *syn* vzhledem ke karbonylu v pozici 1:



27.04.01

Podstata současného vynálezu se týká sloučeniny obecného vzorce I, kde **B** je především C_6 nebo C_{10}aryl, eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoyl, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

B je heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, halogenem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je R_4-SO_2,

kde R_4 je C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6} alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl) amidoskupina nebo

B je především acylový derivát vzorce R_4-C(O)-,

kde R_4 je i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxyskupinou nebo

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem nebo

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou,

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou nebo

B je karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

27.04.01

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem;

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou eventuálně mono-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3} alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou, nebo amidoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou

a

R_5 je atom vodíku nebo metyl nebo

B je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl nebo

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo

B je amid vzorce R_4-NH-C(O)-,

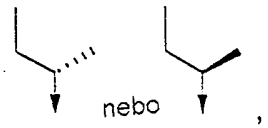
kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou,

Y je atom vodíku nebo metyl,

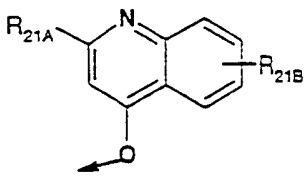
R_3 je vedlejší řetězec terc-butylglycinu (Tbg), Ile, Val, Chg nebo:



,

R_2 je 1-naftylmetoxy nebo chinolinoxy nesubstituovaný, mono- nebo di- substituovaný R_{21} (shora uvedený) nebo

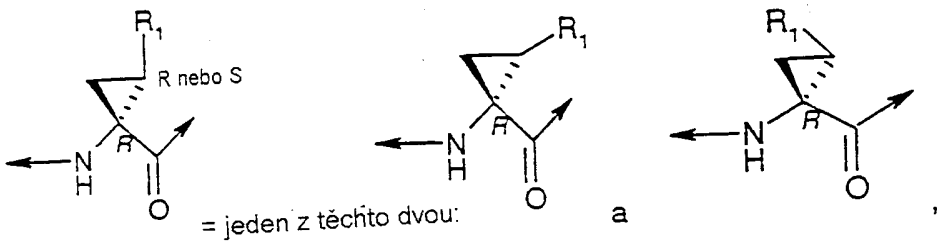
R_2 je:



, kde R_{21A} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, C_6, C_{10}aryl nebo heterocyklus, nižší thioalkyl, halogen, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem, nebo C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16} arylalkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22} ,

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6} alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus,

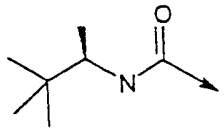
P1 je cyklopropylový kruh, kde atom v pozici 1 má R konfiguraci,



,

a R^1 je etyl, vinyl, cyklopropyl, 1- nebo 2-brom-etyl nebo 1- nebo 2-brom-vinyl.

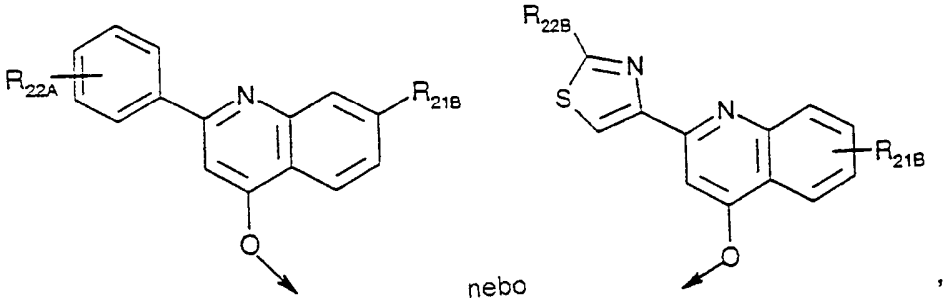
Podstata současného vynálezu se týká sloučenin obecného vzorce I, kde **B** je terc-butoxykarbonyl (Boc) nebo



,

R_3 je vedlejší řetězec Tbg, Chg nebo Val;

R_2 je:



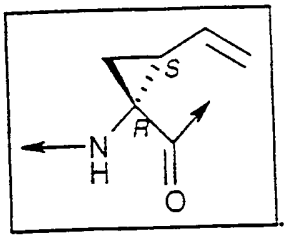
,

kde R_{22A} je C_{1-6} alkyl (metyl), C_{1-6} alkoxy (metoxy) nebo halogen (chlór),

R_{22B} je C_{1-6} alkyl, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6} alkylem, amidoskupina nebo (nižší alkyl)amid a

R_{21B} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-amino-skupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl nebo karboxyl a

P1 je:



Podstatou současného vynálezu je každá sloučenina obecného vzorce I, která je uvedená v tabulkách 1 – 10.

Podstatou vynálezu je farmaceutický přípravek, který obsahuje další anti-HCV činidla. Příkladem takových látek jsou α- nebo β-interferon, ribavirin a amantadin.

Podstatou současného vynálezu je farmaceutický přípravek podle současného vynálezu, který také obsahuje jiné inhibitory HCV proteázy.

Další podstatou současného vynálezu je farmaceutický přípravek podle současného vynálezu, který obsahuje jiná inhibiční činidla zasahující jiným způsobem do biologických pochodů viru HCV, včetně například helikázy, polymerázy, metaloproteázy nebo IRES.

Farmaceutický přípravek podle současného vynálezu lze podat orálně, parenterálně nebo cestou implantovaného zásobníku. Preferujeme podání orální nebo injekční. Součástí farmaceutického přípravku podle současného vynálezu mohou být obvyklé netoxické farmaceuticky vhodné nosiče, pomocné látky a jiné přísady. Ke zvýšení stability některých sloučenin nebo jejich lékových forem, je v některých případech nutná úprava pH přípravku přidáním farmaceuticky vhodných kyselin, zásad nebo pufrů.

Jako parenterální podání označujeme podání subkutánní, intrakutánní, intravenózní, intramuskulární, intra-artikulární, intrasynoviální, intrasternální, intrathékální, injekční aplikace do léze nebo infuzní formou.

Jednou z vhodných forem farmaceutického přípravku podle současného vynálezu je sterilní injekční přípravek, respektive sterilní injekční přípravek ve formě vodné nebo olejová suspenze. Tuto suspenzi lze připravit obecně známými postupy za použití vhodných disperzních činidel nebo smáčedel (Tween 80) a suspenzních činidel.

Farmaceutický přípravek podle současného vynálezu lze orálně podat ve formě kapslí, tablet, vodných suspenzí a roztoků. Tablety pro orální podání obsahují nosiče obecně používané pro orální podání, včetně laktózy a kukuřičného škrobu. Obvykle se přidají i lubrikační činidla (stearát hořečnatý). Při výrobě kapslí pro orální podání se použijí ředidla (laktóza) a sušený kukuřičný škrob. V případě vodných suspenzí podávaných orálně se účinná látka sloučí s emulzifikačními a suspenzními činidly. Do přípravku lze přidat i určitá sladidla a/nebo látky pro úpravu chuti a/nebo látky pro úpravu barvy.

Ostatní vhodné přísady a nosiče pro přípravu farmaceutického přípravku podle současného vynálezu jsou uvedeny ve farmaceutické literatuře: "Remington's Pharmaceutical Sciences", The Science and

Practice of Pharmacy, 19th Ed. Mack Publishing Company, Easton, Penn, (1995).

V případě použití sloučenin podle současného vynálezu jako inhibitorů proteázy HCV k prevenci a k léčbě onemocnění způsobených virem HCV, pak je dávkování v rozmezí od přibližně 0,01 do přibližně 100 mg/kg tělesné hmotnosti a den, především v rozmezí od přibližně 0,5 do přibližně 75 mg/kg tělesné hmotnosti a den. Farmaceutické přípravky podle současného vynálezu se podávají jedenkrát až pětkrát denně nebo eventuálně jako kontinuální infuze. Tuto formu podání lze použít při léčbě chronického nebo akutního onemocnění. Velikost jediné dávky lékové formy, která obsahuje účinnou složky eventuálně s materiálem nosiče, se liší podle stavu pacienta a způsobu podání léčiva. Obvykle obsahuje od přibližně 5%hmotnostních do přibližně 95%hmotnostních účinné složky. Preferujeme, když tyto přípravky obsahují od přibližně 20% do přibližně 80% účinné sloučeniny.

Velikost jednotlivých dávek účinné sloučeniny ovlivňuje mnoho v oboru známých okolností. Dávkování a režimy dávkování se u jednotlivých pacientů liší podle věku, tělesné hmotnosti, celkového zdravotního stavu, pohlaví, dietních návyků, době podání a míře vylučování. Závisí také na použité lékové kombinaci, závažnosti a průběhu infekčního onemocnění, a dále na dispozici pacienta k infekčním onemocněním a také na terapeutické zkušenosti lékaře.

Terapie obvykle začíná podáváním malých dávek, podstatně nižších než je optimální dávka peptidu. Dávkování se pak postupně pomalu zvyšuje přidáváním malých množství účinné látky do nastavení optimálního dávkování s požadovaným účinkem. Je důležité, aby dávkování bylo stanoveno tak, aby nezpůsobovalo pacientovi vážné a kvalitu života omezující vedlejší účinky.

Pokud přípravek podle současného vynálezu obsahuje kombinaci sloučeniny obecného vzorce I a jedno nebo více dalších terapeutických

nebo profylaktických činidel, pak by jednotlivá dávka sloučeniny podle současného vynálezu spolu s dalším činidlem měla být přítomna v množství od 10 do 100%. Preferujeme množství účinné látky a dalších terapeutických nebo profylaktických činidel podávaných jako monoterapeutikum v rozmezí od přibližně 10 do 80%.

Pokud se sloučeniny podle současného vynálezu nebo jejich farmaceuticky vhodné soli podávají společně s farmaceuticky vhodným nosičem k inhibici proteáz NS3 viru HCV nebo k terapii nebo prevenci infekce virem HCV, pak lze vytvořený přípravek podávat in vivo savcům (člověku). Tuto terapii lze provést podáním sloučeniny podle současného vynálezu v kombinaci s činidly, mezi které také patří: imunomodulační činidla (α-, β-, nebo γ-interferony), jiná antivirová činidla (ribavirin, amantadin), další inhibitory proteáz NS3 viru HCV, inhibitory dalších životně důležitých biologických procesů viru HCV (inhibitory helikázy, polymerázy, metaloproteázy, IRES nebo kombinace těchto činidel. Tyto další terapeutická a profylaktická činidla lze sloučit se sloučeninami podle současného vynálezu za vzniku jediné účinné dávky. Tyto další složky lze také savcům podat odděleně jako součást mnohočetných jednotlivých dávek.

Podstata současného vynálezu se týká způsobu inhibice NS3 proteázy viru HVC u savců podáním sloučeniny obecného vzorce I, substituované podle shora uvedených definic.

Preferovaná podstata současného vynálezu se týká způsobu snížení proteázové aktivity NS3 viru HCV u savců. Pokud farmaceutický přípravek obsahuje pouze sloučeninu podle současného vynálezu jako účinnou složku, pak tento způsob navíc zahrnuje následné podání imunomodulačních činidel, antivirových činidel, inhibitorů HCV proteáz nebo inhibitoru jiných životně důležitých funkcí viru HCV (inhibitoru helikázy, polymerázy, metaloproteázy nebo IRES). Tyto činidla lze podat

savcům před, současně nebo následně po podání přípravku podle současného vynálezu.

Jiná podstata současného vynálezu se týká inhibice virové replikace u savců. Tento postup je významný v terapii a prevenci infekčních onemocnění způsobených virem HCV. Pokud farmaceutický přípravek obsahuje pouze sloučeninu podle současného vynálezu jako účinnou složku, pak tento způsob navíc zahrnuje následné podání imunomodulačních činidel, antivirových činidel, inhibitorů HCV proteáz nebo inhibitoru jiných životně důležitých funkcí viru HCV (inhibitoru helikázy, polymerázy, metaloproteázy nebo IRES). Tyto činidla lze podat savcům před, současně nebo následně po podání přípravku podle současného vynálezu.

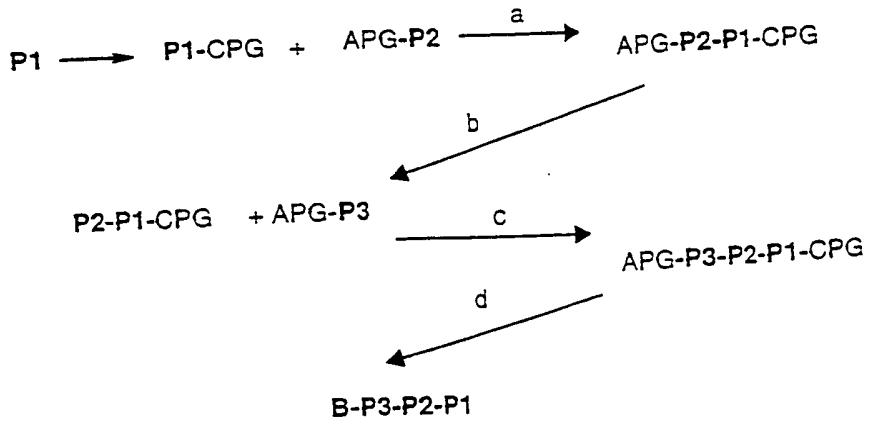
Sloučeniny podle současného vynálezu lze použít jako laboratorní reakční činidla. Sloučeniny podle současného vynálezu lze také použít k terapii nebo prevenci virové kontaminace materiálu, a tak snížit riziko virové infekce laboratorního nebo lékařského personálu, pacientů nebo osob, které jsou vystaveny styku s infekčním materiálem (krev, tkáně, chirurgické a laboratorní nástroje a prádlo, zásobníky krve a transfúzních zařízení).

Sloučeniny podle současného vynálezu lze použít jako reakční činidla pro výzkum. Sloučeniny podle současného vynálezu lze také použít jako pozitivní kontrolu při stanoveních za použití náhradních buněk (surrogate cell-based assay) nebo při replikačních in vitro nebo in vivo stanoveních.

Přehled postupu přípravy

Sloučeniny podle současného vynálezu se připraví podle postupu popsaného schématem I (kde CPG znamená ochrannou skupinu karboxylu a APG znamená ochrannou skupinu aminoskupiny):

Schéma I



Zbytky P1, P2 a P3 lze navázat obecně známými technikami pro vazbu peptidů. Skupiny P1, P2 a P3 lze společně spojit jakýmkoli způsobem tak, aby výsledné peptidy odpovídaly sloučenině uvedeného vzorce I. Například, skupinu P3 lze navázat ke P2-P1 nebo P1 navázat na P3-P2.

Peptidy se obvykle prodlouží odštěpením ochranné skupiny z α-amino skupiny N-konce peptidu a následnou vazbou na nechráněnou karboxylovou skupinu aminokyseliny s chráněným N-koncem, a to peptidovou vazbou popsaným způsobem. Tato deprotekce a následná vazba se opakuje do vzniku požadované sekvence. Vazebná reakce se provede metodou postupné syntézy (schéma I) nebo kondenzací fragmentů (o dvou nebo několika aminokyselinách) nebo kombinací obou metod. Peptidy lze připravit syntézou peptidů na pevné fázi podle

27.04.01

popsaného postupu Merrifielda uveřejněného v J. Am. Chem., Soc. (1963), 85, 2149-2154.

Vazbu dvou aminokyselin, aminokyseliny a peptidu nebo dvou zbytků peptidů lze provést standartními vazebnými postupy – azidovou metodou, metodou směsných anhydridů kyseliny karbonylové a karboxylové (izobutyl-chlormravenčan), metodou karbodiimidovou (dicyklohexyl-karbodiimid, diizopropyl-karbodiimid nebo ve vodě rozpustný karbodiimid), metodou aktivovaného esteru (p-nitrofenyl-ester, imido-ester kyseliny N-hydroxysukcinové), K-metodou Woodwardým činidlem, metodou karbonyl-diimidazolovou, metodou s činidly fosforu nebo oxidačně-redukčními metodami. Některé uvedené metody (především karbodiimidovou metodu) lze pozitivně ovlivnit přidáním 1-hydroxy-benzotriazolu. Uvedené vazebné reakce lze provést buď v roztoku (kapalná fáze) nebo na pevné fázi.

Vazebná reakce, která vede ke vzniku amidové vazby, zahrnuje vazbu volného karboxylu jednoho reakčního činidla s volnou aminoskupinou druhého reakčního činidla za přítomnosti vazebného činidla. Popisem vazebných činidel se zabývá učebnice chemie peptidů (M. Bodanszky, "Peptide Chemistry", druhé upravené vydání, Springer-Verlag, Berlin, Germany, (1993)).

Příkladem vhodných vazebných činidel je N,N'-dicyklohexyl-karbodiimid, 1-hydroxybenzotriazol za přítomnosti N,N'-dicyklohexyl-karbodiimidu nebo N-etyl-N'-[(3-dimetylamino)-propyl]-karbodiimidu. Velmi praktická a použitelná jsou komerčně dostupná vazebná činidla (benzotriazol--1-yl-oxy)tris-(dimetylamino)-fosfonium-hexafluorfosfát, a to buď samostatný nebo za přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu. Jiným komerčně dostupným činidlem je 2- (1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyl-uronium-tetrafluor-borát. Dalším komerčně dostupným činidlem je O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluronium-hexafluorfosfát.

Vazebná reakce se provede v inertním rozpouštědle (dichlormetanu, acetnitrilu nebo dimetylformamidu). Do reakční směsi se v přebytku přidá terciární amin (diizopropyletylamin, N-metylmorfolin nebo N-metylpyrolidin) k pH reakční směsi přibližně 8. Teplota reakční směsi je v rozmezí 0°C a 50°C a reakční doba je v rozmezí 15 minut až 24 hodin .

Pokud se peptid připravuje metodou na pevné fázi, pak karboxylová skupina na C-konci je připevněna na nerozpustný nosič (obvykle polystyren). Tento nerozpustný nosič obsahuje skupinu, která vstoupí do reakce s karboxylovou skupinou za vzniku vazby, která je vůči elongaci stabilní, ale je později štěpena. Lze použít: chlor- nebo brom-metylovou pryskyřici, hydroxymetylovou pryskyřici, tritylovou pryskyřici a 2-metoxy-4-alkoxy-benzyl-alokonolovou pryskyřici.

Většina těchto pryskyřic s již inkorporovaným C-koncem aminokyseliny je na trhu dostupná. Aminokyseliny lze eventuálně inkorporovat do pevné fáze obecně známými postupy (S.S Wang, J. Am. Chem. Soc, (1973), 95, 1328, E. Atherton, R. C. Shepard "Solid-phase peptide synthesis, a practical approach" IRL Press: Oxford, (1989), 131-148.

Dalšími postupy syntézy peptidů se zabývají následující publikace: Stewart a Young "Solid-Phase Peptide Synthesis", druhé vydání, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984),
Gross, Meienhofer, Udenfriend, Eds., "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", sv. 1,2,3,5, a 9, Academic Press, New-York, (1980-1987), Bodansky a spol., "The Practice of Peptide Synthesis" Springer-Verlag, New-York (1984).

Funkční skupiny jednotlivých aminokyselin vstupujících do vazebné reakce musí být chráněny, tak aby se zabránilo vzniku nežádoucích vazeb. Popisem ochranných skupin se zabývají publikace: Green - "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons,

27.04.01

New York (1981) a
"The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", sv. 3, Academic Press, New York (1981).

Karboxylové skupiny vázané na α-uhlíkový atom C-konce peptidu jsou obvykle chráněny estery (CPG), jejichž oddělením vznikne kyselina karboxylová. Vhodnými ochrannými skupinami jsou:
1) alkylestery (metylu, trimetylsilyletylu a t-butylu),
2) aralkylestery (benzylestery a estery substituovaného benzylu) nebo
3) estery, které lze štěpit mírným působením zásadou nebo mírným redukčním činidlem (trichloretylem a fenacyl-estery).

Aminoskupina vázaná na α uhlíkový atom každé aminokyseliny musí být pro uvedení do vazebné reakce na narůstajícím peptidovém řetězci chráněna ochrannou skupinou aminokyselin (APG). Lze použít jakoukoli v oboru známou ochrannou skupinu. Příkladem vhodných skupin jsou:
1) acylové skupiny (formyl, trifluoracetyl, ftalyl, a p-toluensulfonyl),
2) aromatické karbamátové skupiny (benzyloxykarbonylová skupina (Cbz nebo Z), substituované benzyloxykarbonylové skupiny a 9-fluorfenyl-metyloxykarbonyl (Fmoc),
3) alifatické karbamátové skupiny (terc.-butyloxykarbonyl (Boc), etoxy-karbonyl, diizopropyl-metoxykarbonyl a alyloxykarbonyl),
4) cyklické alkyl-karbamátové skupiny (cyklopentyl-oxykarbonyl a adamantyl-oxykarbonyl),
5) alkylové skupiny (trifenyl-metyl a benzyl),
6) trialkyl-silyl (trimetylsilyl) a
7) thiol obsahující skupiny (fenyl-thiokarbonyl a dithiasukcinoyl).

Preferovanou ochrannou skupinou aminoskupiny vázané na α uhlíkovém atomu aminokyseliny je buď Boc nebo Fmoc. Na trhu je pro syntézu peptidů k dispozici mnoho eventuálně chráněných derivátů aminokyselin.

Před uvedením do reakce s další aminokyselinou je nutné odštěpení ochranné skupiny z α-aminoskupiny. Pokud je ochrannou skupinou Boc, pak k odštěpení ochranné skupiny lze zvolit čistou kyselinu trifluoroctovou nebo její roztok v dichlormetanu, dále kyselinu chlorovodíkovou v dioxanu nebo v etylacetátu. Vytvořená amoniová sůl se pak neutralizuje buď před vazebnou reakcí nebo in situ přidáním zásaditých roztoků (vodných roztoků pufrů, terciárních aminů v dichlormetanu, acetnitrilu nebo dimetylformamidu). Pokud se použije skupina Fmoc, pak činidlem volby je piperidin nebo substituovaný piperidin v dimetylformamidu, ale lze také zvolit některý sekundární amin. Odštěpení ochranných skupin se provede při teplotě v rozmezí od 0°C do teploty místnosti (RT), obvykle 20-22°C.

Každá funkční skupina vedlejšího řetězce aminokyseliny se během přípravy peptidu musí chránit shora uvedenými ochrannými skupinami. Výběr a použití vhodných ochranných skupin těchto funkčních skupin závisí na druhu aminokyseliny a přítomnosti jiných ochranných skupin v peptidu. Výběr ochranných skupin se řídí také tím, že se tyto skupiny nesmí odstranit během deprotekce a vazebných reakcí α-aminoskupin.

Pokud je Boc ochrannou skupinou α-aminoskupiny, pak jako ochrannou skupinu vedlejšího řetězce lze použít následující skupiny: p-toluen-sulfonylovou (tosylovou) skupinu lze použít k ochraně aminoskupiny vedlejšího řetězce lysinu a argininu. Acetamidometylovou, benzylovou nebo t-butylsulfonylovou skupinu lze použít k ochraně sulfidové skupiny vedlejšího řetězce cysteinu. Benzyl-(Bn)-étery jsou vhodné k ochraně hydroxyskupiny vedlejšího řetězce serinu, threoninu nebo hydroxyprolinu. Benzylestery se používají k ochraně karboxyskupiny vedlejšího řetězce aspartové kyseliny a glutamové kyseliny.

Pokud jako ochranou skupinu α-aminoskupiny použijeme Fmoc, pak lze vedlejší řetězce aminokyselin chránit vazbou s ochrannými skupinami založenými na terc.-butylu. Pro lysin a arginin lze použít terc.-butyloxy-karbonyl (Boc), terc.-butyléter pro serin, threonin a hydroxyprolin a terc.butyl-ester pro kyseliny aspartovou a glutamovou. Trifenylmetylovou (tritylovou) skupinu lze použít k ochraně sulfidové skupiny vedlejšího řetězce cysteinu.

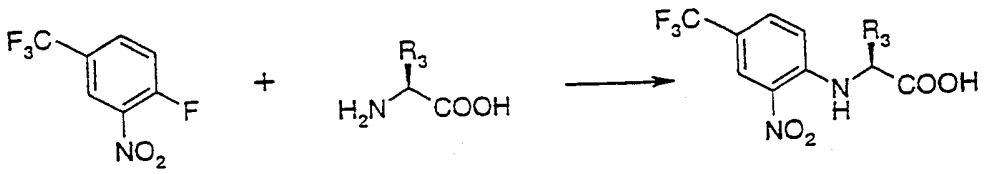
Po elongaci peptidu se všechny ochranné skupiny odstraní. Pokud jsme zvolili metodu syntézy peptidu v roztoku, pak se ochranné skupiny odštěpí sloučeninami typickými pro jednotlivé ochranné skupiny.

Pokud se peptidy připravují metodou syntézy na pevné fázi, pak je vytvořený peptid odštěpen z pryskyřice se současným odstraněním ochranných skupin. V případě použití ochranné terc.butyloxy-karbonylové skupiny (Boc), pak preferovaným způsobem odštěpení peptidu z pryskyřice je působení bezvodým roztokem fluorovodíku obsahujícího přísady (dimetyl-sulfid, anizol, thioanizol nebo p-kresol) při teplotě 0°C. Odštěpení peptidu lze dosáhnout i jinými kyselými reakčními činidly (směsí trifluormetan-sulfonové kyseliny a kyseliny trifluoroctové). Při použití Fmoc ochranných skupin se skupina Fmoc na N-terminálu peptidu odštěpí činidly shora popsanými. Ostatní ochranné skupiny a peptidy se z pryskyřice odštěpí za použití roztoku kyseliny trifluoroctové a různých přísad (anizolu atd.).

Syntéza ochranné (capping) skupiny B

1.1) Pokud B znamená aryl, aralkyl, pak se arylované aminokyseliny připraví jednou z následujících tří metod:

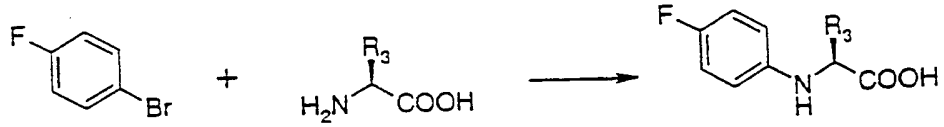
a) Přímé nukleofilní nahrazení fluor-nitroskupiny arylu:



(a) (b) (c)

4-Fluor-3-nitro-benz-trifluorid (a) se při teplotě 80°C uvede do reakce s L-aminokyselinou (b) za přítomnosti zásady (uhličitanu draselného) za vzniku požadované N-aryl-aminokyseliny (c).

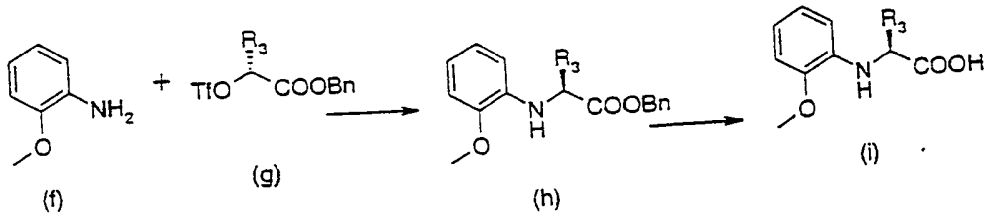
b) Vazebná reakce katalyzovaná mědí (podle Ma a spol., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 12459-12467):



(d) (b) (e)

Brom-4-fluor-benzen (d) se uvede do reakce s L-aminokyselinou (b) za přítomnosti zásady (uhličitanu draselného) a katalytického množství jodidu měďného při teplotě 90°C za vzniku požadované N-aryl-aminokyseliny (e) nebo

c) Nukleofilní nahrazení trifluoracetátu anilinem:

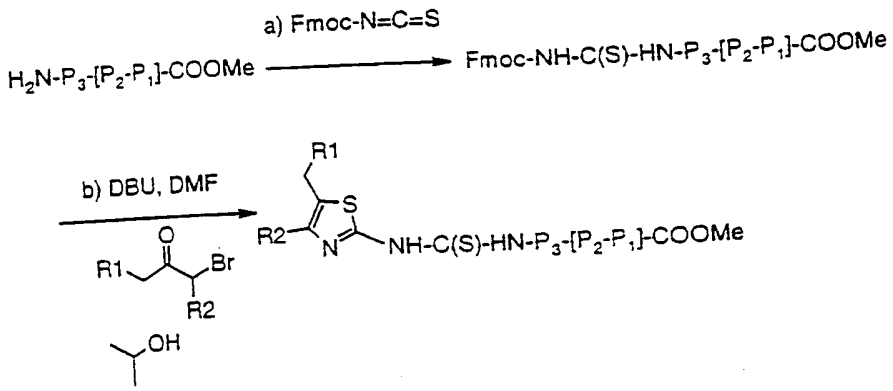


(f) (g) (h) (i)

27.04.01

Do reakce se uvede o-anisidin (f) s trifluoracetátem (g) za přítomnosti zásady (2,6-lutidinu) při teplotě 90°C za vzniku benzyl-esteru (h). Hydrogenací za přítomnosti 10% katalyzátoru paladia na aktivním uhlí vznikne požadovaná N-aryl-aminokyselina (i).

1.2) Pokud B znamená amino-thiazolový derivát:



a) Fmoc-thiokyanát (připravený podle Kearney a spol., 1998, J. Org. Chem, 63, 196) se uvede do reakce s chráněným zbytkem P3 nebo celým peptidem nebo peptidového segmentu za vzniku thiomočoviny.

b) Derivát thiomočoviny je uveden do reakce s vhodným bromketonem za vzniku odpovídajícího thiazolového derivátu.

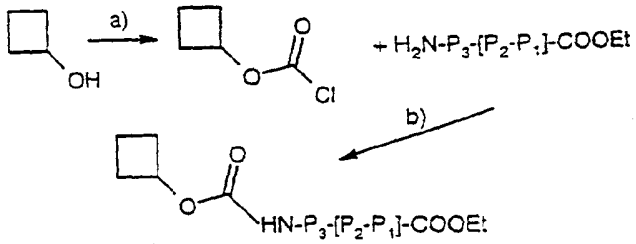
1.3) Pokud B je R_4-C(O)-, R_4-S(O)$_2$:

Chráněný P3 nebo celý peptid nebo peptidový segment se naváže na vhodný acyl-chlorid nebo sulfonyl-chlorid, které jsou buď na trhu dostupné nebo je jejich syntéza v oboru známá.

1.4) Pokud B je $R_4$0-C (O)- :

Chráněný P3, celý peptid nebo peptidový segment se naváže na vhodný chlormravenčan, který je buď na trhu dostupný nebo je jeho syntéza v oboru známá. Pro Boc-deriváty se používá $(Boc)_2O$.

Například:



a) Na cyklobutanol se působí fosgenem za vzniku odpovídajícího chlormravenčanu.

b) Na chlormravenčan se působí požadovaným NH_2-tripeptidem za přítomnosti zásady (trietylaminu) za vzniku cyklobutyl-karbamátu.

1.5) Pokud **B** je R_4-N (R_5)-C(O)-, nebo R_4-NH-C(S)-,

pak se na chráněný P3 nebo celý peptid nebo peptidový segment působí fosgenem, a následně aminem podle SynLett., únor 1995; (2); 142-144.

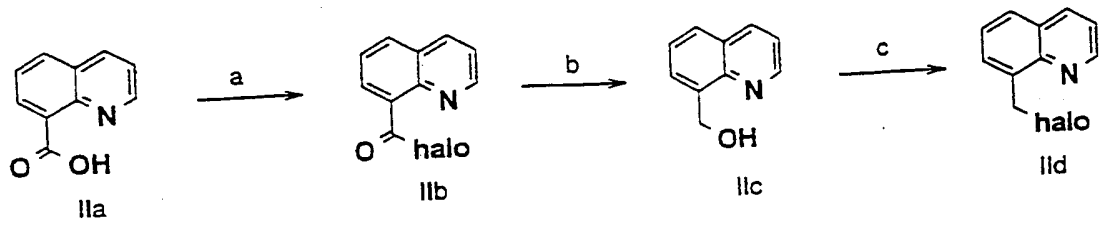
2. Syntéza P2 zbytků

2.1 Syntéza prekurzorů:

A) Syntéza haloaryl-metanových derivátů

Příprava halometyl-8-chinolinu **IId** se provede podle postupu K. N. Campbella a spol., J. Amer. Chem. Soc, (1946), 68,1844.

SCHÉMA II

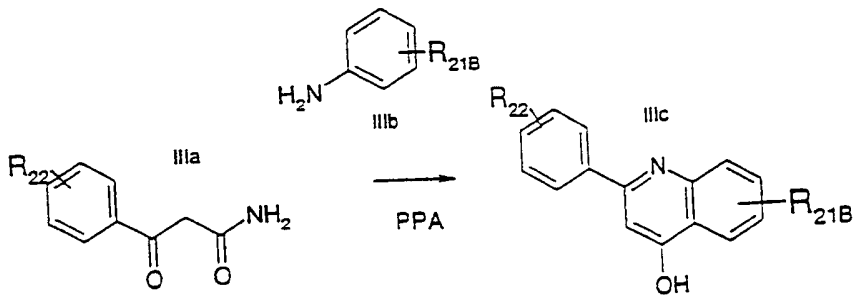


Kyselina 8-chinolin-karboxylová **IIa** se přemění na odpovídající alkohol **IIc** redukcí odpovídajícího acyl-halogenidu **IIb** redukčním činidlem (lithium-aluminium-hydridem). Působením odpovídající halogenvodíkovou kyselinou vznikne požadovaný derivát **IId**. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 1.

B) Syntéza aryl-alkoholových derivátů:

2-fenyl-4-hydroxychinolinové deriváty **IIIc** se připraví podle Giardina a spol.. (J. Med. Chem, (1997), 40, 1794-1807).

SCHÉMA III



27.04.01

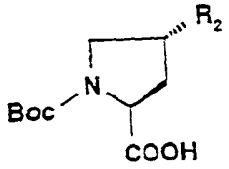
R_{22} & R_{21B} = alkyl, hydroxyskupina, merkaptoskupina, atom halogenu, aminoskupina, nitroskupina.

Kondenzací benzoyl-acetamidu IIIa s vhodným anilinem **IIIb** vznikne imin, který se cyklizuje působením kyseliny polyfosforečné za vzniku odpovídajícího 2-fenyl-4-hydroxychinolinu **IIIc**. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 2.

Jiným způsobem přípravy je postup popsaný v příkladě 3: Benzylester **IIIa** se kondenzuje odpovídajícím anilinem **IIIb** za přítomnosti kyseliny nebo iminu získaného cyklizací zahříváním k teplotě 260-280°C za vzniku odpovídajícího 2-fenyl-4-hydroxychinolinu **IIIc**. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 3 (sloučenina **3e**).

2.2. Syntéza P2:

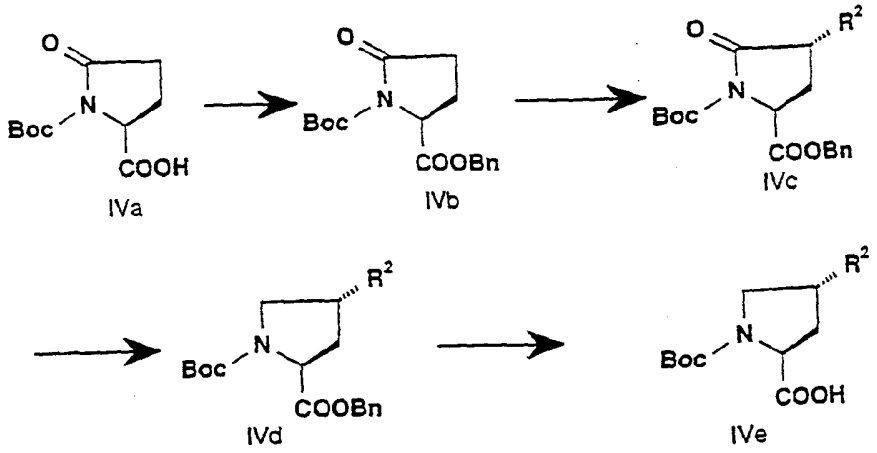
A) Syntéza 4-substituovaného prolinu, kde R_2 je s uhlíkovým cyklem spojeno atomem uhlíku podle znázorněného prostorového uspořádání:



Sloučenina se připraví podle schématu IV a podle postupů J. Ezquerra a spol. (Tetrahedron, 1993, 38, 8665-8678) a C. Pedregal a spol. (Tetrahedron Lett, 1994, 35, 2053-2056).

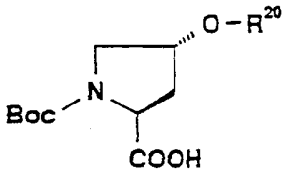
27.04.01

SCHÉMA IV



Boc-pyroglutamová kyselina je chráněna za vzniku jejího benzylesteru. Působením silnou zásadou (diizopropylamidem lithným), a následným přidáním alkylačního činidla (Br-R^{20} nebo I-R^{20}) se po redukci amidem a odštěpením esterové ochranné skupiny vytvoří požadovaná sloučenina IVe.

B) Syntéza O-substituovaného-4-(R)-hydroxyprolinu:



se provede různými způsoby následně popsanými:

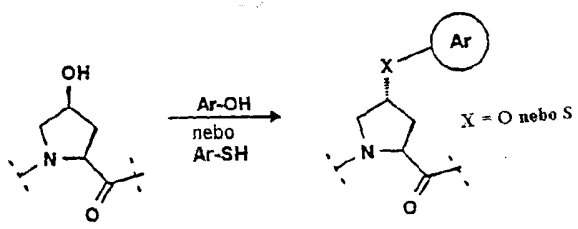
1) Pokud je R^{20} aryl, heterocyklus, aralkyl nebo (nižší alkyl)-heterocyklus, pak je postup přípravy popsán E. M. Smithem a spol. (J. Med. Chem. (1988), 31, 875-885). Na komerčně dostupný Boc-4(R)--hydroxyprolin se působí zásadou (hydridem sodným nebo terc.

27.04.01

butyloxidem draselným) a vytvořený alkoxid se uvede do reakce s halogen-R^{20} (Br-R^{20}, I-R^{20}, atd..) za vzniku požadovaných sloučenin. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladech 4,5 a 7.

2) Pokud R^{20} je aryl nebo heterocyklus, pak lze sloučeniny také připravit Mitsunobuvou reakcí (Mitsunobu 1981, Synthesis, leden, 1-28; Rano a spol., 1995, Tet. Lett. 36 (22), 3779-3792; Krchnak a spol., 1995, Tet. Lett. 36 (5), 62193-6196; Richter a spol., (1994), Tet. Lett. 35 (27), 4705-4706). Na komerčně dostupný metylester Boc-4(S)-hydroxyprolinu se působí vhodným aryl-alkoholem nebo thiolem za přítomnosti trifenylfosfinu a dietylazo-dikarboxylátu (DEAD). Vytvořený ester se hydrolyzuje na kyselinu. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladech 6 a 8.

SCHÉMA V



Va Vb

Mitsunobuvu reakci lze provést na pevné fázi (Schéma V). Na desku s 96 prohlubněmi pro Model 396 syntetizátoru (advanced ChemTech) vybavené alikvoty pryskyřici vázající sloučeniny **Va** se přidají aryl-alkoholy nebo thioly a vhodná reakční činidla. Po inkubaci, se produkt **Vb** vázaný na pryskyřici promyje, suší a odštěpí z pryskyřice.

Reakcí podle Suzuki (Miyaura a spol., 1981, Synth. Comm. 11,513, Sato a spol., 1989, Chem. Lett, 1405, Watanabe a spol., 1992, Synlett, 207, Takayuki a spol., 1993, J. Org. Chem. 58,2201, Frenette a

27.04.01

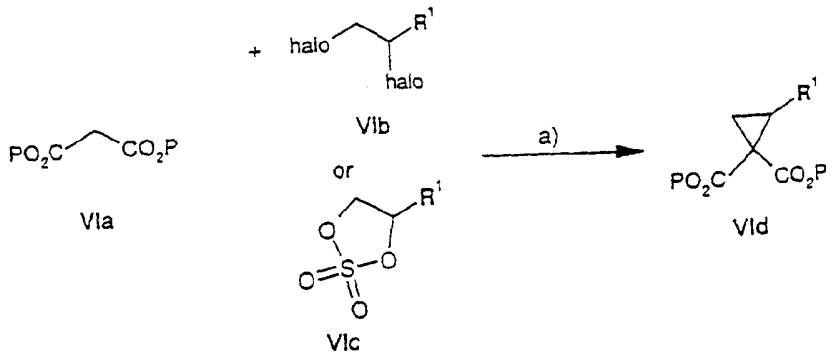
spol., 1994, Tet. Lett. 35 (49), 9177-9180, Guiles a spol., (1996), J. Org. Chem. 61, 5169-5171) lze k arylovému substituentu vázat další funkční skupiny.

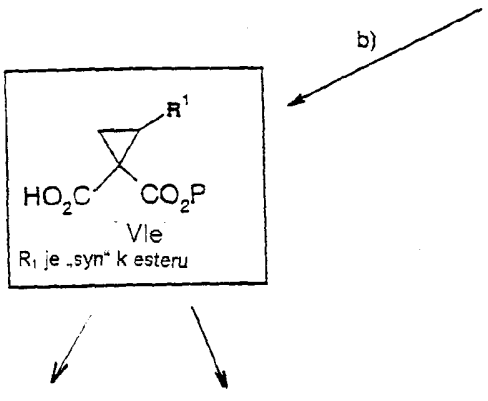
3. Syntéza skupin P1

3.1 Syntéza 4 možných izomerů 2-substituovaných 1-aminocyklopropyl-karboxylových kyselin

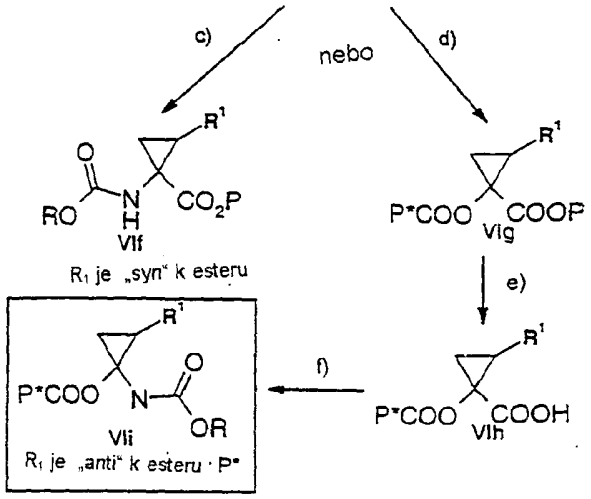
Syntéza se provede podle schématu VI.

SCHÉMA VI





27.04.01



a) Di-chráněný malonát **VIa** a 1,2-dihaloalkan **VIb** nebo cyklický sulfát **VIc** (K. Burgess a Chun-Yen KE, Synthesis, 1996, 1463-1467) se uvedou do reakce při zásaditém pH za vzniku diesteru **VId**.

b) Místně selektivní hydrolýzou méně blokovaného esteru vznikne kyselina **VIe**.

c) Reakcí podle Curtise se kyselina **VIe** uspořádá za vzniku racemické směsi derivátů 1-aminocyklopropyl-karboxylové kyseliny **VIf**, kde R^1 je *syn* vzhledem ke karboxylové skupině. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 9.

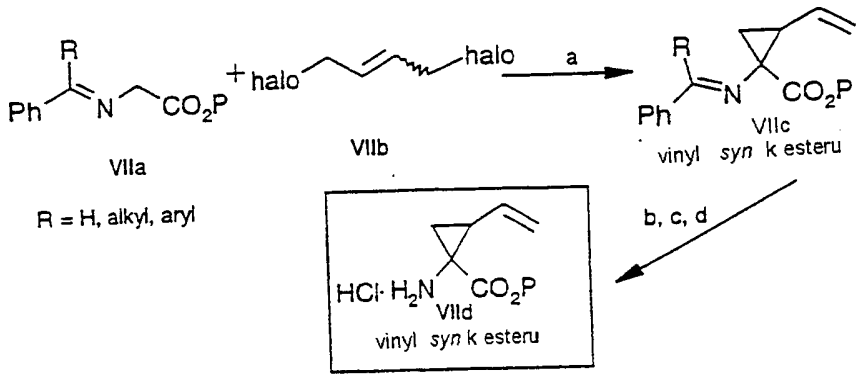
d) e) Alternativním způsobem přípravy je vytvoření selektivního esteru z kyseliny **VIe** za použití vhodného halogenidu (P*Cl) nebo alkoholu (P*OH) za vzniku diesteru **VIg**, kde P* ester se odštěpí selektivní hydrolýzou. Hydrolýzou P esteru vznikne kyselina **VIh**.

f) Uspořádáním podle Curtiuse kyseliny **VIh** se vytvoří racemická směs derivátů 1-aminocyklopropyl-karboxylové kyseliny **VIi**, kde R^1 je v *anti* ke karboxylové skupině. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 14.

27.04.01

Alternativní syntéza přípravy derivátů VIf, kde R_1 je vinyl *syn* ke karboxylové skupině, je popsána dále.

SCHÉMA VII



Na komerčně dostupný nebo snadno vyrobitelný imin **VIIa** se za přítomnosti zásady působí 1,4-dihalobutenem **VIIb**. Po hydrolýze vytvořeného iminu **VIIc** vznikne **VIId** s alylovým substituentem v poloze *syn* ke karboxylové skupině. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladech 15 a 19.

Rozdělení shora uvedených směsí enantiomerů s asymetrickým atomem uhlíku v poloze 1 (**VIe** a **VIId**) lze provést:

1) Enzymatickou separací (příklady 13, 17 a 20),

2) krystalizací s chirální kyselinou (příklad 18) nebo

3) chemickou derivatizací (příklad 10).

Po rozdělení lze absolutní stereochemii izomerů určit postupem podle příkladu 11.

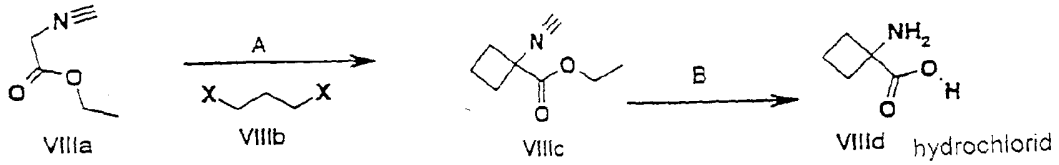
Rozdělení a následné určení absolutní stereochemie izomerů, kde substituent na atomu uhlíku v poloze 2 je v poloze *anti* ke karboxylové

skupině (VIi), lze provést způsobem uvedeným pro směsi enantiomerů na asymetrickém uhlíku v poloze 1.

3.2 Syntéza 1-amino-cyklobutyl-karboxylové kyseliny

Syntéza 1,1-amino-cyklobutan-karboxylové kyseliny se provede podle Kavin Douglas; Ramaligam Kondareddiar; Woodard Ronald, Synth. Commun. (1985), 15 (4), 267-72.

SCHÉMA VIII

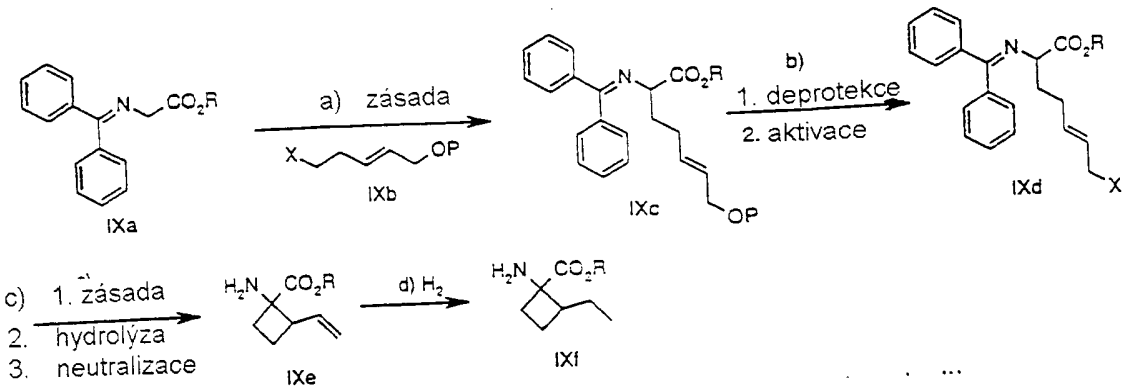


Na sloučeninu **VIIIa** se působí zásadou za přítomnosti **VIIIb** za vzniku odpovídajícího cyklobutylového derivátu **VIIIc**. Hydrolýzou izokyanátových a esterových skupin VIIIc za přítomnosti kyseliny (HCl) vznikne hydrochlorid 1-amino-cyklobutyl-karboxylové kyseliny **VIIId**. Karboxylová kyselin se následně esterifikuje za přítomnosti metanolu v chlorovodíku. Podrobný popis této podstaty vynálezu je uveden v příkladě 21.

3.3 Syntéza 2-substituované 1-amino-cyklobutyl-karboxylové kyseliny

27.04.01

SCHÉMA IX



a) Chráněný glycin-esterový derivát (imin **IXa**) se alkyluje homoalylickým elektrofilem **IXb** za použití vhodné zásady (hydrid, hydroxid nebo alkoxid kovu). Vhodnými odštěpitelnými skupinami v **IXb** jsou halogeny (X = atom chlóru, brómu nebo jódu) nebo sulfonát-estery (mesylát, tosylát nebo trifluroacetát). Funkční skupina alylického alkoholu v **IXb** je chráněna hydroxylovými ochrannými skupinami (acetát, silyl, acetaly).

b) Druhým krokem přípravy je odstranění ochranné skupiny z hydroxylu monoalkylovaného derivátu **IXc** a přeměna na vhodnou elektrofilní funkční skupinu X (podle shora popsaného postupu pro sloučeninu **IXb**).

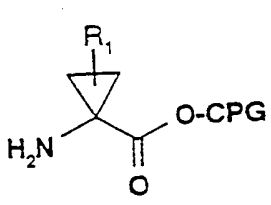
c) Cyklizace **IXd** na cyklobutanový derivát **IXe** se provede působením zásadou (hydridy, alkoxidy kovu), a následně hydrolýzou za použití vodného roztoku minerální kyseliny a neutralizací mírnou zásadou. Následně lze *syn* a *anti*–izomery **IXe** oddělit rychlou chromatografií.

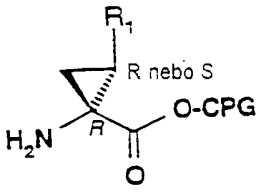
d) Eventuálně se dvojná vazba v **IXe** hydrogenuje za standardních podmínek za vzniku odpovídajícího nasyceného derivátu **IXf**.

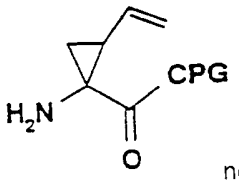
27.04.01

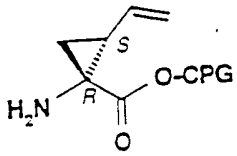
Další podstatou vynálezu je postup přípravy peptidového analoga obecného vzorce I, kde P1 je substituovaný zbytek aminocyklopropyl-karboxylové kyseliny, který má tyto části:

- vazebná reakce APG-P3-P2 nebo APG-P2
- s P1 meziproduktem vzorce:



,


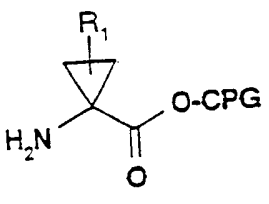
,


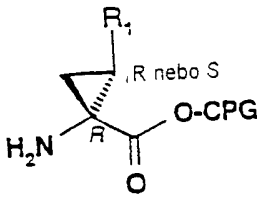
nebo


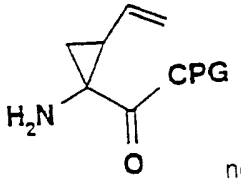
,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituované halogenem, CPG je ochranná skupina karboxylové skupiny aminokyseliny a APG znamená ochrannou skupinu aminoskupiny a P3 a P2 jsou shora popsány.

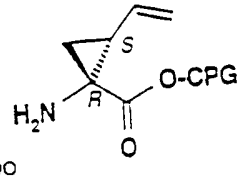
Podstata vynálezu se týká postupu přípravy: 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy, který zahrnuje:

- vazebnou reakci (vhodně chráněné) aminokyseliny, peptidu 1nebo peptidového fragmentu
- s P1 meziproduktem vzorce:



,


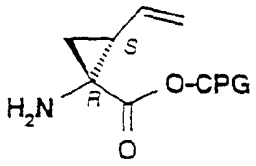
,


nebo


,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituovaný halogenem a CPG je ochranná skupina karboxyskupiny.

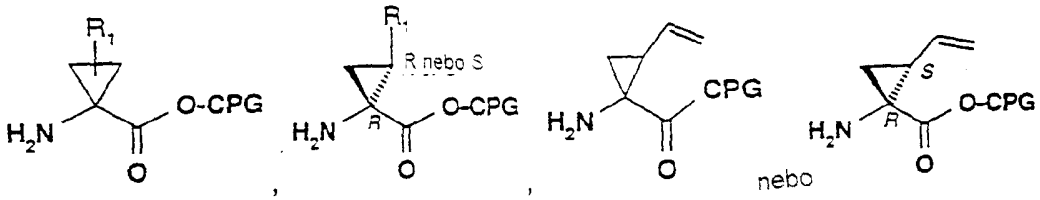
Podstata vynálezu se týká postupu přípravy: 1) peptidového analoga inhibitoru proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy, který zahrnuje:

- vazebnou reakci (vhodně chráněné) aminokyseliny, peptidu nebo peptidového fragmentu
- s meziproduktem vzorce:



,kde CPG je ochranná skupiny karboxylu.

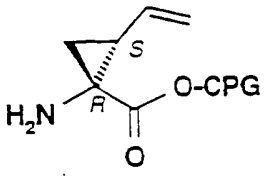
Podstatou vynálezu je použití P1 meziproduktu vzorce:



,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituované halogenem, CPG znamená ochrannou skupinu karboxyskupiny

pro přípravu 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy.

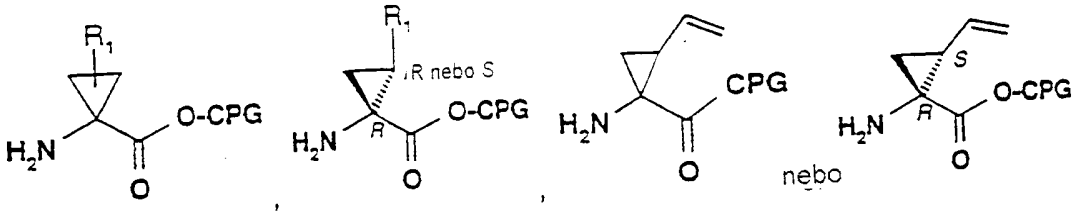
Podstatou vynálezu je použití P1 meziproduktu vzorce:



,kde CPG znamená ochrannou skupinu karboxyskupiny,

pro přípravu 1) peptidového analoga inhibitoru proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy.

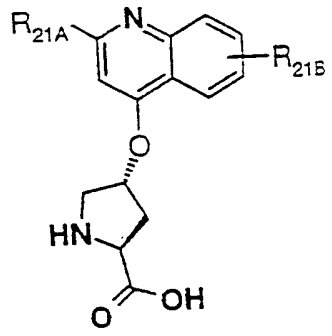
Podstatou vynálezu je použití P1 meziproduktu vzorce:



,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituované halogenem, CPG znamená ochrannou skupinu karboxyskupiny

pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I.

Podstata současného vynálezu se týká použití prolinového analoga vzorce:



kde R_{21A} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, halogen, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem, dále C_6, C_{10} aryl, C_{7-16} aralkyl nebo heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6}alkoxy, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6} alkylem nebo Het,

a kde R_{21B} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl) amid, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetylová nebo karboxylová skupina

v přípravě: 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo
2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy nebo
3) peptidového analoga shora uvedeného obecného vzorce I.

Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny podle současného vynálezu jsou podrobněji popsány následnými nelimitujícími příklady.

Teplota je uvedena ve stupních Celsia. Roztoky jsou vyjádřeny ve hmotnostně objemových procentech, poměry roztoků jsou vyjádřeny ve

27.04.01

vztahu objemů, pokud není uvedeno jinak. Hodnoty spektra NMR se odečítají na spektrometru Bruker 400 MHz, hodnoty chemického posunu se udávají v částicích na milion (ppm). Rychlá chromatografie se provede na silikagelu (SiO_2) podle Stillovy techniky rychlé chromatografie (W. C. Still a spol., J. Org. Chem., 1978, 43, 2923).

Použité zkratky:

Bn	benzyl
Boc	terc.-butyloxykarbonyl {$Me_3COC(O)$}
BSA	hovězí sérový albumin
CHAPS	3-[(3-cholamido-propyl)dimetyl-amonio]-1--propan-sulfonát
DBU	1,8-diazabicyklo-[5,4,0]-undec-7-en
CH_2Cl_2 = DCM	metylen-chlorid
DEAD	dietylazodikarboxylát
DIAD	diizopropyl-azodikarboxylát
DIEA	diizopropyletylamin
DIPEA	diizopropyletylamin
DMAP	dimetylaminopyridin
DCC	1,3-dicyklohexyl-karbodiimid
DME	1,2-dimetyl-oxyetan
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	dithiothreitol nebo threo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol
DPPA	difenylfosforyl-azid

27.04.01

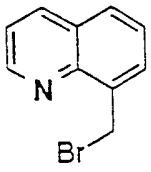
EDTA	etylen-diamin-tetraoctová kyselina
Et	etyl
EtOH	etanol
EtOAc	etylacetát
Et_2O	dietyléter
HATU	[0-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyl-uronium-hexafluorfosfát]
HPLC	kapalinová chromatografie s vysokou rozlišovací schopností
MS	hmotnostní spektrometrie
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF
FAB	bombardování rychlými atomy
LAH	lithium-aluminium-hydrid
Me	metyl
MeOH	metanol
MES	(2-{N-morfolino}-etan-sulfonová kyselina)
NaHMDS	bis-(trimetylsilyl)-amid sodný
NMM	N-metylmorfolin
NMP	N-metylpyrolidin
Pr	propyl
Succ	3-karboxypropanoyl
PNA	4-nitrofenyl-amino- nebo p-nitroanilin
TBAF	tetra-n-butylammonium-fluorid
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3--tetrametyluronium-tetrafluorborát

TCEP	tris-(2-karboxyetyl)-fosfin-hydrochlorid
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TIS	triizopropylsilan
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TMSE	trimetylsilyletyl
Tris/HCl	tris-(hydroxymetyl)-aminometan--hydrochlorid.

Stavební jednotky P2

Příklad 1

Syntéza brom-metyl-8-chinolinu (1):



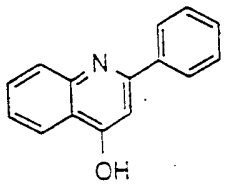
(1)

Do 2,5 g (14,4 mmol) komerčně dostupné 8-chinolin-karboxylové kyseliny se přidá 10 ml (144 mmol) čistého thionyl-chloridu. Tato směs se 1 hodinu zahřívá na teplotu 80°C, a pak se přebytek thionyl-chloridu se odstraní destilací za sníženého tlaku. Do vytvořené nahnědlé pevné látky se přidá 15 ml absolutního etanolu, směs se 1 hodinu zahřívá na teplotu 80°C, a pak se zahustí ve vakuu. Vytvořený zbytek se rozdělí mezi etylacetát a nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za

vzniku 2,8 g hnědého oleje. Tento materiál (přibližně 14,4 mmol) se po kapkách přidá během 35 minut do suspenze 0,76 g (20,2 mmol) lithium-aluminium-hydridu v dietyletéru, která se zchladí na teplotu –60°C. Reakční směs se během 1,5 hodiny pomalu zahřeje –35°C. Reakce se ukončí pomalým přidáním během 30 minut vodného roztoku síranu hořečnatého ($MgSO_4 . 10H_2O$), a pak vodného roztoku tetrahydrofuranu. Směs se rozdělí mezi dietyléter a 10% vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku 2,31 g (výtěžek 80%) nažloutlé pevné látky odpovídajícího alkoholu. Ve 20 ml 30% roztoku kyseliny octové v bromovodíku (Aldrich) se rozpustí 2,3 g (11,44 mmol) tohoto alkoholu a reakční směs se 2,5 hodiny zahřívá na teplotu 70°C. Směs se zahustí ve vakuu do sucha, rozdělí se mezi 100 ml etylacetátu a nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, produkt se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku 2,54 g požadované sloučeniny 1 jako nahnědlé pevné látky s výtěžkem 100%.

Příklad 2

Syntéza 2-fenyl-4-hydroxychinolinu (2):



(2)

V uzavřené trubici se na teplotu 85°C 2 hodiny zahřívá roztok 6,00 g (31,2 mmol) komerčně dostupného etyl-benzylacetátu v 75 ml 30% roztoku hydroxidu amonného. Pevný produkt získaný zchlazením reakční směsi se filtruje a 2 hodiny zahřívá pod refluxem ve vodě. Roztok se třikrát extrahuje metylenchloridem. Organické podíly se sloučí, suší se nad síranem hořečnatým, filtrují se a zahustí. Vytvořený

27.04.01

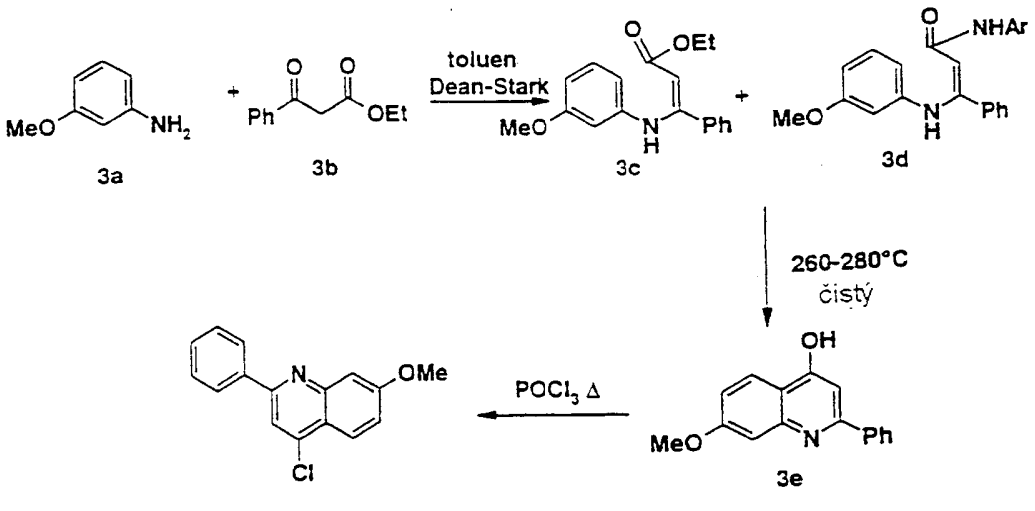
žlutý zbytek se čistí rychlou chromatografií na koloně silikagelu při eluci směsí etylacetátu a hexanu v poměru 3 : 7 za vzniku 1,60 g odpovídajícího amidu jako bílé pevné látky s výtěžkem 31%.

Směs 250 mg (1,53 mmol) tohoto amidu, 143 mg (1,53 mmol) anilinu a 10 mg (0,08 mmol) anilin-hydrochloridu v 10 ml toluenu se 16 hodin zahřívá pod refluxem za použití Dean-Starkova zařízení. Roztok se zahustí za vzniku hnědého oleje, který se smísí se 2 g fosforečné kyseliny a směs se 20 minut zahřívá na teplotu 135°C. Reakční směs se vlije do vody a přivede se k pH 8 přidáním 5 M roztoku hydroxidu sodného. Vodná suspenze se dvakrát extrahuje etylacetátem. Organické podíly se sloučí, promyjí se nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým, filtrují se a zahustí. Vytvořený zbytek se po absorbci na kolonu silikagelu čistí rychlou chromatografií při eluci 3% roztokem metanolu v etylacetátu za vzniku 67 mg (20% výtěžek) 2-fenyl-4-hydroxychinolinu (2).

^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 8,11 (d, J = 7 Hz, 1H), 7,86-7,83 (m, 2H), 7,77 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,68 (dd, J = 8,7 Hz, 1H), 7,61-7,58 (m, 3H), 7,35 (dd, J = 8,7 Hz, 1H), 6,34 (s, 1H).

Příklad 3

Syntéza 4-hydroxy-2-fenyl-7-metoxychinolinu (3)



4-hydroxy-2-fenyl-7-metoxychinolin (e):

Roztok 100,0 g (0,52 mol) etyl-benzylacetátu (**b**), 128,1 g (1,04 mol) m-anisidinu (**a**) a 5,2 ml 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu v 1,0 l toluenu se 6,25 hodin zahřívá pod refluxem za použití Dean-Starkova zařízení. Zchlazený toluenový roztok se postupně promyje dvakrát 300 ml 10% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, dvakrát 300 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného, jedenkrát 300 ml vody a jedenkrát 150 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Toluenový podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za sníženého tlaku za vzniku 144,6 g směsi esteru c a amidu **d** (45% / 38% surový výtěžek) v poměru 1,2 : 1,0 jako tmavě hnědého oleje. Surový olej se 80 minut zahřívá na teplotu 280°C, přičemž se destilací odstraní etanol. Zchlazením vytvořená tmavá pevná látka se rozetře s 200 ml metylen-chloridu. Suspenze se filtruje a vytvořená pevná látka se promyje metylenchloridem za vzniku 22,6 g (17% z produktu **a**) produktu **e** jako béžové pevné látky.

1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,00 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,81-7,82 (m, 2H), 7,57-7,59 (m, 3H), 7,20 (d, J = 2,2Hz, 1H), 6,94 (dd, J = 9,0,2,2Hz, 1H), 6,26 (s, 1H), 3,87 (s, 3H).

4-chloro-2-fenyl-7-metoxychinolin (3)

Suspenze 8,31 g (33,1 mmol) produktu **e** v 90 ml chloridu fosforylu ($POCl_3$) se 2 hodiny zahřívá pod refluxem. Zahříváním vznikne čirý roztok, který se zahustí za sníženého tlaku. Vytvořený zbytek se rozdělí mezi 1 N roztok hydroxidu sodného (exotermní reakce, přidá se 10N roztok hydroxidu sodného k vysoké hodnotě pH) a 500 ml etylacetátu. Organický podíl se promyje 100 ml vody a 100 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za sníženého tlaku za vzniku 8,60 g (96%) 4-chloro-2-fenyl-7-metoxychinolinu (**3**) jako světle žluté pevné látky.

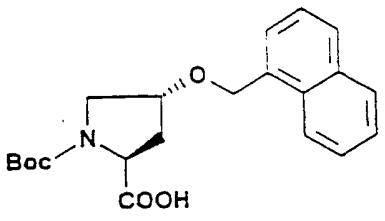
27.04.01

1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,28-8,30 (m, 2H), 8,20 (s, 1H), 8,10 (d, J = 9, 1Hz, 1H), 7,54-7,58 (m, 3H), 7,52 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,38 (dd, J = 9,1,2,5 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

Tato reakce se opakuje třikrát s 96-98% výtěžkem, který je významně vyšší než 68% výtěžek podle J. Med. Chem. 1997, 40,1794.

Příklad 4

Syntéza Boc-4(R)-(naftalen-1-yl-metoxy)prolinu (4):



(4)

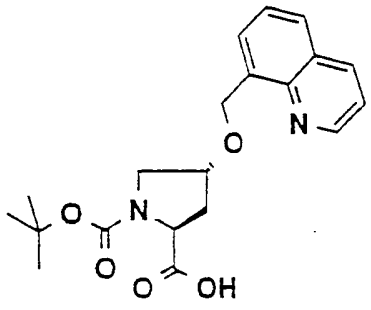
Ve 100 ml tetrahydrofuranu se rozpustí 5,00 g (21,6 mmol) komerčně dostupného Boc-4(R)-hydroxyprolinu a roztok se zchladí na teplotu 0°C. Po částech se během 10 minut přidá 1,85 g (45,4 mmol) 60% disperze hydridu sodného v oleji a suspenze se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Následně se přidá 8,00 g (36,2 mmol) 1-(brom-metyl)naftalenu, jehož příprava je popsána v E. A. Dixon a spol.. Can. J. Chem, (1981), 59,2629-2641. Směs se 18 hodin zahřívá na teplotu refluxu, vlije se do 300 ml vody a promyje se hexanem. Vodný podíl se okyselí přidáním 10% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a dvakrát se extrahuje se etylacetátem. Organické podíly se sloučí a promyjí nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým, filtrují se a zahustí. Vytvořený zbytek se čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu, etylacetátu a kyseliny octové v poměru 49:49:2 za poskytnutí v názvu uvedené sloučeniny jako 4,51 g (56% výtěžek) bezbarvého oleje.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) zjistila přítomnost dvou rotamerů: δ 8,05 (m, 1H),

7,94 (m, 1H), 7,29 (d, J = 14 Hz, 1H), 7,55 - 7,45 (m, 4H), 4,96 (m, 2H), 4,26 (br s, 1H), 4,12 (dd, J = 8 Hz, 1H), 3,54-3,42 (m, 2H), 2,45 - 2,34 (m, 1H), 2,07-1,98 (m, 1H) 1,36 (s, (3/9) 9H), 1,34 (s, (6/9) 9H).

Příklad 5

Syntéza Boc-4(R)-(8-chinolin-metoxy)-prolinu (**5**):



(**5**)

Do suspenze 1,4 g (34 mmol) 60% disperze hydridu sodného v oleji ve 100 ml tetrahydrofuranu se přidá 1,96 g (8,5 mmol) Boc-4(R)-hydroxyprolinu v 20 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Tato reakční směs se nejprve 30 minut míchá, a pak se přidá roztok 2,54 g (11,44 mmol) brom-metyl-8-chinolinu (příklad 1) v 30 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs se 5 hodin zahřívá na teplotu 70°C, přebytek hydridu sodného se opatrně odstraní vodným roztokem tetrahydrofuranu. Reakční směs se zahustí ve vakuu a vytvořený materiál se rozpustí v etylacetátu a vodě. Zásaditý vodný podíl se oddělí a okyselí k pH přibližně 5 přidáním 10% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, a následně se extrahuje 150 ml etylacetátu. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku hnědého oleje. Čištění rychlou chromatografií při eluci 10% roztokem metanolu v chloroformu se získá 2,73 g (86%) požadované sloučeniny (5) jako světle žluté pevné látky.

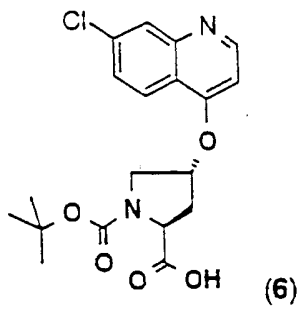
HPLC (97,5%),

27.04.01

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) prokázala rotamery v poměru 6:4: δ 12-11,4 (bs, 1H), 8,92 (dvakrát d, J = 4,14 a 4,14 Hz, 1H), 8,38 (dvakrát d, J = 8,27 a 8,27 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 7,94 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,63-7,54 (m, 2H), 5,14 (dvakrát s, 2H), 4,32-4,29 (m, 1H), 4,14-4,07 (m, 1H), 3,523,44 (m, 2H), 2,43-2,27 (m, 1H), 2,13-2,04 (m, 1H), 1,36 a 1,34 (dvakrát s, 9H).

Příklad 6

Příprava Boc-4(R)-(7-chlor-chinolin-4-oxo)prolinu (**6**):



(**6**)

Směs 500 mg (2,04 mmol) komerčně dostupného metylesteru Boc-4(S)-hydroxyprolinu a 440 mg (2,45 mmol) 7-chlor-4-hydroxy-chinolinu se umístí do 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu při teplotě 0°C. Nejprve se přidá 641 mg (2,95 mmol) trifenylfosfinu, a následně se pomalu přidá 426 mg (2,45 mmol) diizopropyl-azodikarboxylátu DIAD. Směs se 20 hodin míchá při teplotě místnosti. Reakční směs se pak zahustí, zpracuje etylacetátem a třikrát se extrahuje 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové. Vodný podíl se převede na zásadité pH přidáním uhličitanu sodného a dvakrát se extrahuje etylacetátem. Organické podíly se sloučí, suší se nad síranem hořečnatým, filtrují se a zahustí za vzniku zbytku jako žlutého oleje, který se čistí rychlou

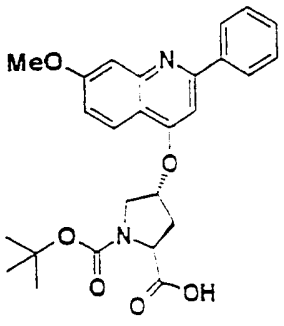
chromatografií za vzniku 498 mg metylesteru výsledné sloučeniny **6** jako bílé pevné látky s 58% výtěžkem.

Za použití 1,7 ml (1,7 mmol) 1M vodného roztoku hydroxidu sodného ve 4 ml metanolu se při teplotě 0°C 3 hodiny hydrolyzuje 400 mg (0,986 mmol) shora vyrobeného metylesteru sloučeniny **6**. Roztok se zahustí k odstranění metanolu a neutralizuje se přidáním 1M vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové. Suspenze se zahustí do sucha a zpracuje ve 20 ml metanolu, soli se odstraní filtrací a filtrát se zahustí za vzniku 387 mg (kvantitativní výtěžek) požadované sloučeniny **6** jako bílé pevné látky.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) (směs rotamerů v poměru 1:1): δ 8,74 (d, J = 5 Hz, 1H), 8,13 - 8,09 (m, 1H), (s, 1H), 7,58 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 5 Hz, 1H), 5,26 - 5,20 (m, 1H), 4,10 – 4,01 (m, 1H), 3,81 - 3,72 (m, 1H), 3,59 (dd, J = 12,10 Hz, 1H), 2,41-2,31 (m, 2H), 1,34 a 1,31 (s, 9H).

Příklad 7

Syntéza Boc-4(R)-(2-fenyl-7-metoxychinolin-4-oxo)-prolinu (7):



(7)

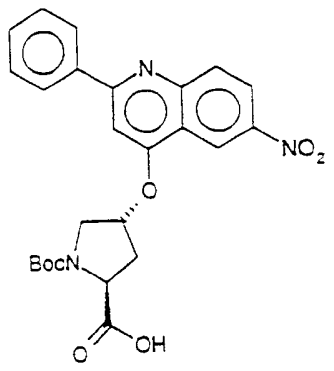
Boc-4(R)-[(7-metoxy-2-fenyl-4- -chinolinyl)oxy]-L-prolin (7):

Do roztoku 6,73 g (29,1 mmol) komerčně dostupného 4-(S)-hydroxyprolinu v 83 ml DMSO se při teplotě 25°C po malých částech

během 15 minut přidá 8,16 g (72,7 mmol) terc-butoxidu draselného. Směs se míchá 1,5 hodiny při teplotě 25°C. Do vytvořené reakční směsi se během 15 minut přidá ve čtyřech částech 8,61 g (32,0 mmol) chlor-2-fenyl-7-metoxychinolinu (3). Reakční směs se 19 hodin míchá při teplotě 25°C. Vytvořená suspenze se vlije do 650 ml vody a směs se třikrát promyje 150 ml dietyléteru k odstranění přebytku chlor-chinolinu (účinnější byl následně shledán etylacetát). Vodný podíl se okyselí k pH 4-5 přidáním 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (vypočteno 38 ml 1,5 ekv., požadováno 43,6 ml). Bílá pevná látka jako sraženina se oddělí filtrací. Vlhká pevná látka se suší za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným za vzniku 12,6 g (výtěžek 91%, obsahuje 2,3% hmotnostních DMSO) prolinového derivátu (7) jako béžové pevné látky.
1H NMR (DMSO-d_6) (směs rotamerů v poměru 2:1): δ 8,27 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 8,00, 7,98 (2d, J = Hz, 1H), 7,48-7,56 (m, 3H), 7,45, 7,43 (2s, 1H), 7,39 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 9,2, 2,5 Hz, 1H), 5,53 - 5,59 (m, 1H), 4,34 - 4,41 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,76 (široké s, 2H), 2,63 - 2,73 (m, 1H), 2,32 - 2,43 (m, 1H), 1,36, 1,33 (2s, 9H).

Příklad 8

Syntéza Boc-4 (R)-(2-fenyl-6-nitrochinolin-4-oxo)prolinu (8)



(8)

Do míchaného roztoku 1,28 g (4,88 mmol) trifenylfosfinu v 15 ml tetrahydrofuranu se při teplotě 0°C po kapkách přidá 0,77 ml (4,89 mmol) dietyl-azodikarboxylátu. Po 30 minutách míchání v atmosféře

27.04.01

dusíku se přidá roztok 1,00 g (4,08 mmol) metylesteru Boc-4(S)-hydroxyprolinu v 5 ml tetrahydrofuranu, a následně suspenze 1,30 g (4,88 mmol) komerčně dostupného 6-nitro-2-fenyl-4-chinolinolu v 10 ml stejného rozpouštědla. Červená směs se při teplotě 0°C míchá 15 minut a přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpařuje ve vakuu. Olej se zředí etylacetátem a promyje se dvakrát hydrogenuhličitanem sodným, jedenkrát vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje ve vakuu. Vytvořený zbytek se čistí chromatografií na silikagelu při eluci směsí hexanů a etylacetátu 70:30 za vzniku 1,70 g (výtěžek 85%) požadovaného metylesteru jako světle žluté pevné látky.
^{1}H NMR ($CDCl_3$) rotamery = 3 : 7: δ 9,03 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 8,46 (dd, J = 9,2,5 Hz, 1H), 8,18 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,14-8,07 (m, 2H), 7,59 - 7,50 (m, 3H), 7,19 (s, 1H), 5,39 - 5,30 (m, 1H), 4,67 (t, J = 8 Hz, 0,3H), 4,61 (t, J = 8 Hz, 0,7H), 4,07 - 4,01 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 2,89 - 2,73 (m, 1H), 2,55 - 2,47 (m, 1H), 1,49 (s, 2,7H), 1,45 (s, 6,3H).

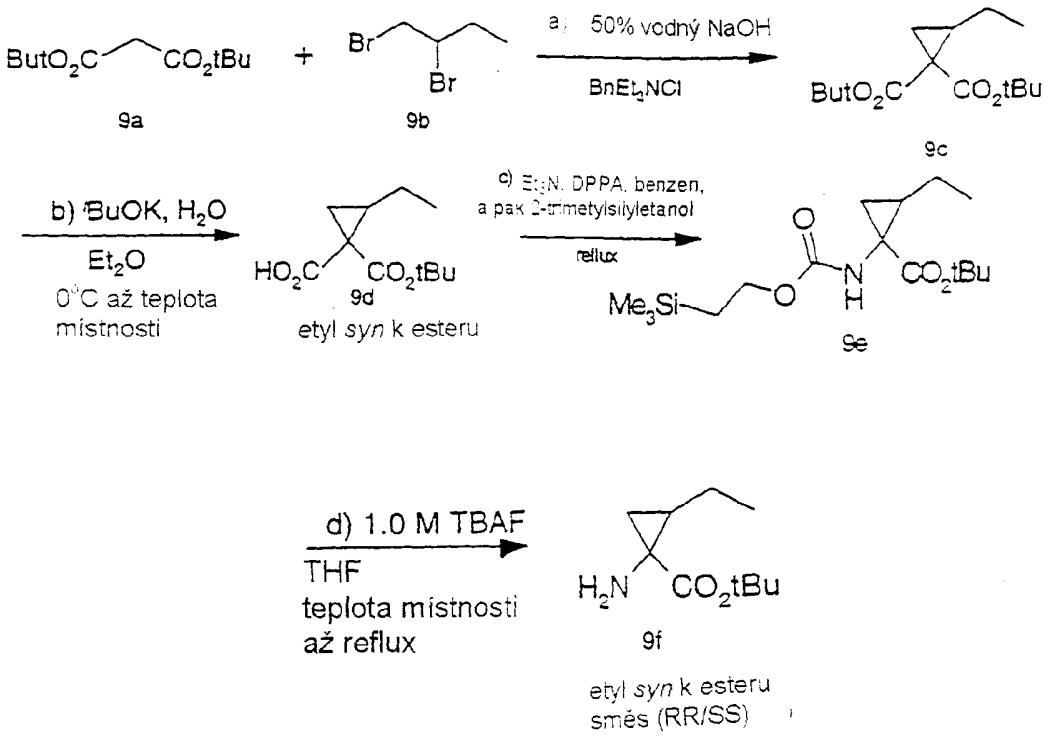
Do roztoku 503 mg (1,02 mmol) metylesteru ve směsi 10 ml tetrahydrofuranu a 4 ml vody se přidá 85 mg (2,05 mmol) monohydrátu hydroxidu lithného. Do vzniku homogenního roztoku se přidají 2 ml metanolu. Po 30 minutách vznikne bílá sraženina. Vytvořená suspenze se dalších 6 hodin míchá při teplotě místnosti. Reakční směs se zředí 10% vodným roztokem citrónové kyseliny a extrahuje se etylacetátem. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje ve vakuu za vzniku 416 mg (85%) požadované kyseliny (8).
1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,92-8,87 (m, 1H), 8,47 (dd, J = 9,3Hz, 1H), 8,38 - 8,32 (m, 2H), 8,19 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,62 - 7,55 (m, 3H), 5,73 - 5,66 (m, 1H), 4,41 (t, J = 8 Hz, 1H), 3,89 - 3,76 (m, 2H), 2,83 - 2,72 (m, 1H), 2,47 - 2,35 (m, 1H), 1,38 (s, 9H).

27.04.01

Stavební jednotky P1

Příklad 9

Syntéza směsi (1R, 2R) / (1S, 2R) 1-amino-2-etyl-cyklopropyl--karboxylové kyseliny



a) Do suspenze 21,0 g (92,19 mmol) benzyl-trietyl-amonium--chloridu v 50% vodného roztoku 92,4 g hydroxidu sodného v 185 ml vody se postupně přidá 20,0 g (92,47 mmol) diterc.-butylmalonátu a 30,0 g (138,93 mmol) 1,2-dibrombutanu. Reakční směs se energicky míchá přes noc při teplotě místnosti, pak se přidá směs ledu a vody. Surový produkt se třikrát extrahuje metylenchloridem, a postupně se třikrát promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí. Vytvořený zbytek se čistí rychlou chromatografií (7 cm, 2 až 4 % roztok dietyléteru v hexanu) za vzniku 19,1 g (70,7 mmol, výtěžek 76%) požadovaného cyklopropanového derivátu **9c**.

27.04.01

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 1,78-1,70 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,46 (s, 9H), 1,441,39 (m, 1H), 1,26-1,64 (m, 3H), 1,02 (t, 3H, J = 7,6 Hz).

b) Do suspenze 6,71 g (59,79 mmol, 4,4 ekv.) terc-butoxidu draselného v 100 ml bezvodého éteru se při teplotě 0°C přidá 270 μl (15,00 mmol, 1,1 ekv.) vody. Po 5 minutách se do suspenze přidá 3,675 g (13,59 mmol) diesteru **9c** v 10 ml éteru. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, a pak se vlije do směsi ledu a vody a třikrát se promyje éterem. Vodný podíl se při teplotě 0°C okyselí přidáním 10% vodného roztoku kyseliny citrónové a třikrát se extrahuje etylacetátem. Sloučený organický podíl se postupně dvakrát promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po obvyklém zpracování (sušení nad síranem sodným, filtraci a zahuštění) vznikne 1,86 g (8,68 mmol, 64% výtěžek) požadované kyseliny **9d** jako světle žlutého oleje. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 2,09-2,01 (m, 1H), 1,98 (dd, J = 3,8, 9,2Hz, 1H), 1,81-1,70 (m, 1H), 1,66 (dd, J = 3,0, J = 8,2Hz, 1H), 1,63-1,56 (m, 1H), 1,51 (s, 9H), 1,0 (t, J = 7,3Hz, 3H).

c) Do směsi 2,017 g (9,414 mmol) kyseliny **9d** ve 32 ml bezvodého benzenu se postupně přidá 1,50 ml (10,76 mmol, 1,14 ekv.) trietylnitritu a 2,20 ml (10,21 mmol, 1,08 ekv.) DPPA. Reakční směs se zahřívá pod refluxem 3,5 hodiny, pak se přidá 2,70 ml (18,84 mmol, 2,0 ekv.) 2-trimetyl-silyl-etanolu. Reakční směs se pod refluxem přes noc zahřívá, pak se reakční směs zředí dietyléterem a postupně se promyje 10 % vodným roztokem citrónové kyseliny, vodou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, dvakrát vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po obvyklém zpracování (sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění) se zbytek čistí rychlou chromatografií (5 cm, 10% roztok etylacetátu v hexanu) za vzniku 2,60 g (7,88 mmol, 84% výtěžek) požadovaného karbamátu **9e** jako světle žlutého oleje.

Hmotnostní spektrometrie (FAB) 330 (MH+),

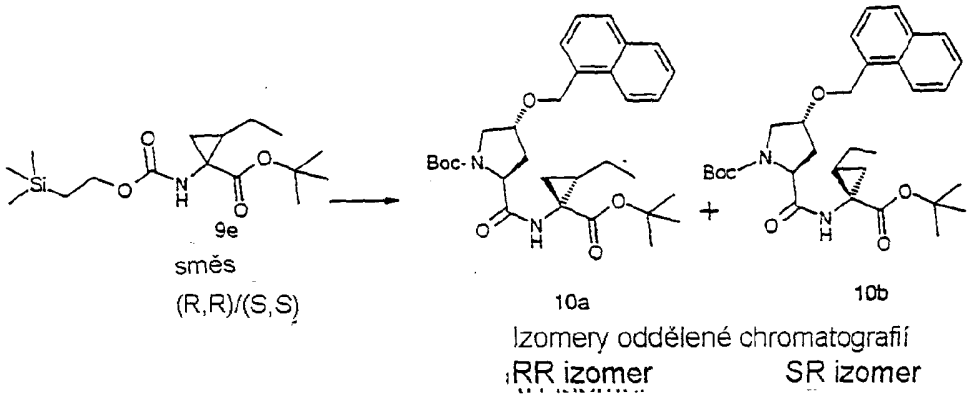
27.04.01

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 5,1 (bs, 1H), 4,18 - 4,13 (m, 2H), 1,68 - 1,38 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,24 - 1,18 (m, 1H), 1,00 - 0,96 (m, 5H), 0,03 (s, 9H).

d) Do 258 mg (0,783 mmol) karbamátu **9e** se přidá roztok 940 µl (0,94 mmol, 1,2 ekv.) 1,0 M roztoku tetra-n-butylammonium-fluoridu (TBAF) v tetrahydrofuranu. Po 4,5 hodině se přidá dalších 626 µl (0,63 mmol, 0,8 ekv.) 1,0 M roztoku TBAF. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, 30 minut se refluxuje, a pak se zředí etylacetátem. Roztok se postupně promyje dvakrát vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po obvyklém zpracování (sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění) se získá 84 mg (0,453 mmol, výtěžek 58%) požadovaného aminu **9f** jako světle žluté kapaliny.
^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 1,96 (bs, 2H), 1,60 - 1,40 (m, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,31 - 1,20 (m, 1H), 1,14 (dd, J = 4,1, 7,3Hz, 1H), 1,02 (dd, J = 4,1, 9,2Hz, 1H), 0,94 (t, J = 7,3Hz, 3H).

Příklad 10

Chemické rozdělení t-butyl-(1R,2R)/(1S,2R)-1-amino-2-etyl-cyklo-propyl-karboxylátu (výsledné sloučeniny příkladu 9):



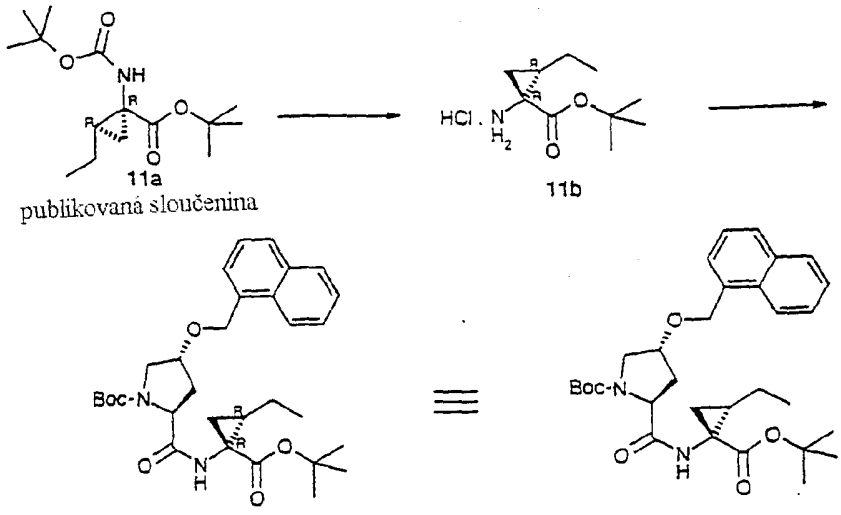
Na 8,50 g (25,86 mmol) sloučeniny **9e** (příklad 9) se při teplotě refluxu 45 minut působí 26 ml 1M roztoku tetra-n-butylamonium-fluoridu (TBAF) v tetrahydrofuranu. Zchlazená reakční směs se zředí

27.04.01

etylacetátem, třikrát se promyje vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného, a pak se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje za vzniku volného aminu jako světle žlutého oleje. Volný amin se rozpustí ve 120 ml bezvodého metylenchloridu a do roztoku se postupně přidá 8,5 ml (77,57 mmol) roztoku N-metylmorfolinu, 10,08 g (27,15 mmol) sloučeniny **4** (příklad 4) a 11,79 g (31,03 mmol) HATU. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti, a pak zpracuje podle shora uvedeného postupu. Surová diastereomerická směs se rozdělí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a dietyléteru v poměru 25:75 za vzniku dipeptidu **10a** (méně polární eluční skvrna) jako 4,42 g bílé pěny (64% teoretického výtěžku) a **10b** (méně polární eluční skvrna) jako 4 g nažloutlé pěny (57% teoretického výtěžku). V tomto případě jsou odděleny oba izomery, ikdyž jejich stereochemické vlastnosti stále nejsou známé.

Příklad 11

Zjištění stereochemické konfigurace sloučeniny **10a** a **10b** korelací se známou konfigurací t-butyl-(1R-amino-2R-etylcyklopropyl-karboxylátu



11a
publikovaná sloučenina

11b

11c

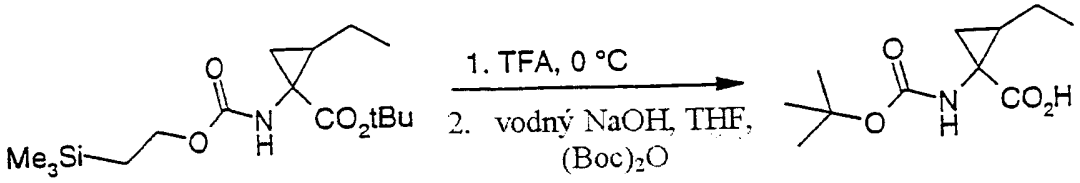
10a
přímé porovnání pomocí TLC, HPLC a NMR

27.04.01

Prof. A. Charette z University of Montreal popsal přípravu sloučeniny **11a**, jejíž stereochemickou konfiguraci určil rentgenovou krystalografií (J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 12721). Ve 240 µl 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové v etylacetátu se rozpustí 13,2 mg (0,046 mmol) sloučeniny **11a** a směs se míchá přibližně 48 hodin. Směs se odpařuje do sucha za vzniku sloučeniny **11b** jako světle žluté pasty, která se sloučí se 18 mg (0,049 mmol) sloučeniny **4** (příklad 10) za použití 20,3 µl (0,185 mmol) N-metylmorfolinu a 21,1 mg (0,056 mmol) HATU v metylenchloridu. Surový materiál se čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu v dietyléteru v poměru 50:50 za vzniku dipeptidu **11c** jako 7,7 mg oleje (výtěžek 31 %). TLC, HPLC a NMR analýzou dipeptidu **11c** se zjistilo, že jde o identickou sloučeninu s méně polární sloučeninou **10a** (příklad 10) s konfigurací (1R, 2R).

Příklad 12

(1R,2R) / (1S,2R)-1-Boc-amino-2-etyl-cyklopropyl-karboxylová kyselina **(12a)**



9e **12a**

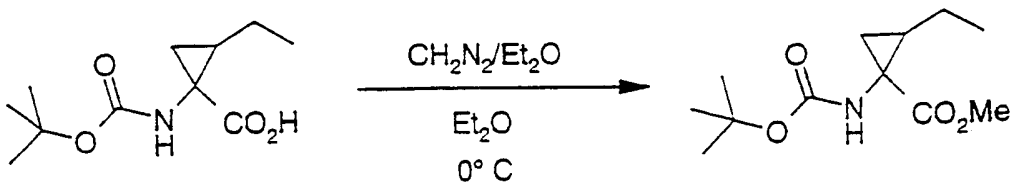
Roztok 2,6 g (7,88 mmol) karbamátu **9e** (příklad 9) v TFA se 40 minut míchá při teplotě 0°C. Směs se pak zahustí a zředí 10 ml tetrahydrofuranu. Přidá se 700 mg (17,5 mmol) vodného roztoku hydroxidu sodného v 8,8 ml vody, a následně roztok 2,06 g (9,44 mmol, 1,2 ekv.) $(Boc)_2O$ v 13 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti při udržování pH 8 eventuálním přidáváním 10

27.04.01

% vodného roztoku hydroxidu sodného, zředí se vodou, třikrát se promyje dietyléterem a při teplotě 0°C se okyselí přidáním 10% vodného roztoku kyseliny citrónové. Vodný podíl se třikrát extrahuje etylacetátem a postupně se dvakrát promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění vznikne 788 mg (3,44 mmol, výtěžek 44%) požadované Boc-chráněné aminokyseliny (**12a**).

1H NMR ($CDCl_3$): δ 5,18 (bs, 1H), 1,64-1,58 (m, 2H), 1,55-1,42 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,32-1,25 (m, 1H), 0,99 (t, 3H, J = 7,3Hz).

Příprava metylesteru (1R,2R) / (1S,2R)-1-Boc-amino-2-etyl-cyklo--propyl-karboxylové kyseliny (**12b**)



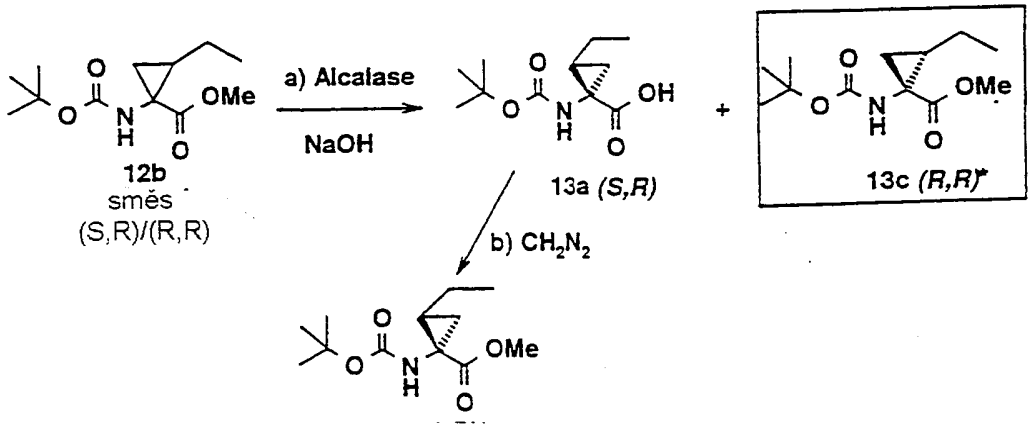
12a **12b**

V 10 ml dietyléteru se rozpustí 0,30 g (1,31 mmol) Boc-derivátu **12a** a na reakční roztok se při teplotě 0°C působí čerstvě připraveným roztokem diazometanu v dietyléteru za vzniku žlutého zabarvení roztoku, způsobeného mírným přebytkem roztoku diazometanu. Po 20 minutách míchání při teplotě místnosti se reakční směs zahustí do sucha za vzniku sloučeniny **12b** jako 0,32 g (100%) čirého bezbarvého oleje.

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 5,1 (bs, 1H), 3,71 (s, 3H), 1,62 - 1,57 (m, 2H), 1,55 (s, 9H), 1,53 - 1,43 (m, 1H), 1,28 - 1,21 (m, 2H), 0,95 (t, J = 7,3Hz, 3H).

Příklad 13

Enzymatická rezoluce metyl-(1R, 2R) / (1S, 2R)-Boc-1-amino-2-etyl--cyklopropyl-karboxylátu



* analýza pomocí HPLC za použití Chiracel® OD-H-kolony

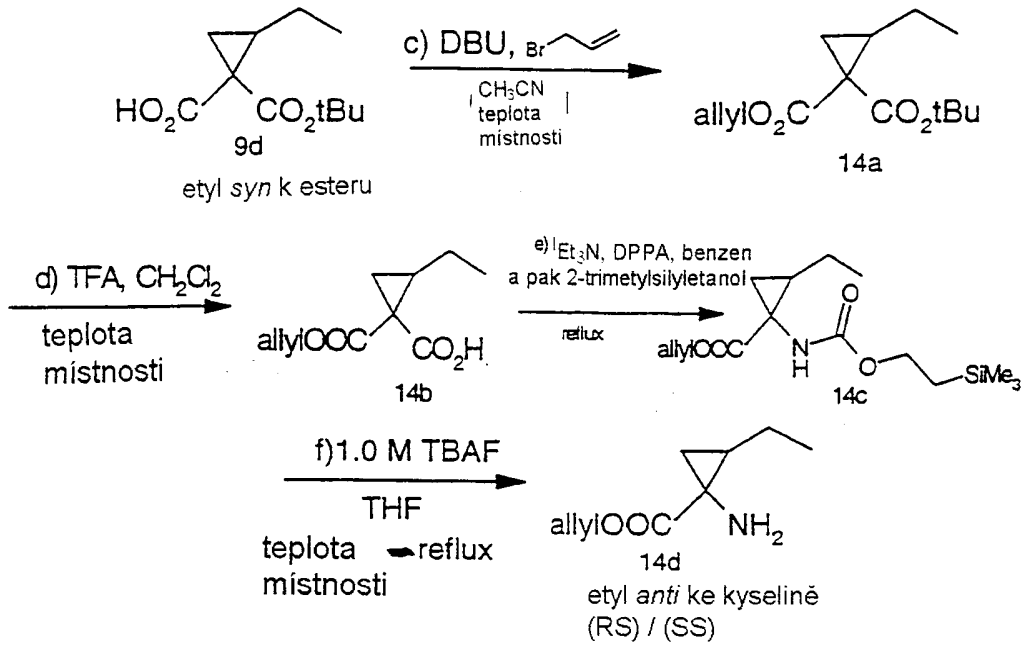
** ostatní estery jsou také přijatelné (Et)

a) Ve 3 ml acetonu se rozpustí 0,31 g (1,27 mmol) směsi enantiomerů metylesteru (1S,2R) / (1R,2R)-1-Boc-amino-2-etyl-karboxylové kyseliny (příklad 10), a pak se roztok za energického míchání zředí 7 ml vody. Hodnota pH roztoku se udržuje na 7,5 přidáváním 0,05 M vodného roztoku hydroxidu sodného, a následně se přidá 300 mg Alcalase® (2,4 l extraktu vyrobeného v Novo Nordisk Industrials). Během inkubace se pH stabilizuje přidáváním hydroxidu sodného za použití pHstat titrátoru. Po 40 hodinách se směs zředí etylacetátem a vodou (obsahujícího 5 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného) a podíly se oddělí. Vodný podíl se okyselí přidáním 10% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a extrahuje se etylacetátem, suší se nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku 48,5 mg kyseliny 13a. Stereochemická konfigurace se určí analýzou popsanou v příkladech 10 a 11.

b) Na podíl kyseliny **13a** se působí roztokem diazometanu v dietyléteru za vzniku metylesteru, který se analyzuje HPLC za použití chirální kolony Chiralcel® OD-H eluci 2,5% roztokem izopropanolu v hexanu za izokratických podmínek. Z analýzy vyplývá, že jde o směs s přítomností (1S, 2R) izomeru 51:1.

Příklad 14

(1R,2S) / (1S,2S)-1-amino-2-etyl-cyklopropyl-karboxylová kyselina



Výchozí sloučeninou přípravy je sloučenina **9d**, jejíž příprava je popsána v příkladě 9:

c) Do roztoku 1,023 g (4,77 mmol) sloučeniny **9d** ve 25 ml metylkyanidu se postupně přidá 860 µl (5,75 mmol, 1,2 ekv.) DBU a 620 µl (7,16 mmol, 1,5 ekv.) alyl-bromidu. Reakční směs se 4 hodiny míchá při teplotě místnosti, a pak se zahustí. Vytvořený zbytek se zředí dietyléterem a postupně se dvakrát promyje 10% vodným roztokem kyseliny citrónové, vodou,

nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, dvakrát vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění se získá 1,106 g (3,35 mmol) esteru sloučeniny **14a** s 91% výtěžkem jako bezbarvého oleje.

Hmotnostní spektrometrie (FAB) 255 (MH+),

1H NMR ($CDCl_3$): δ 5,96-5,86 (m, 1H), 5,37-5,22 (m, 2H), 4,70-4,65 (m, 1H), 4,57-4,52 (m, 1H), 1,871,79 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,45-1,40 (m, 1H), 1,33-1,24 (m, 3H), 1,03 (t, J = 7,3Hz, 3H).

d) Do roztoku 1,106 g (4,349 mmol) esteru **14a** v 5 ml bezvodého metylenchloridu se při teplotě místnosti přidá 5 ml kyseliny trifluor-octové. Reakční směs se 1,5 hodiny míchá, a pak se zahustí za vzniku 854 mg (4,308 mmol) sloučeniny **14b** s 99 % výtěžkem.

Hmotnostní spektrometrie (FAB) 199 (MH+),

1H NMR ($CDCl_3$): δ 5,99-5,79 (m, 1H), 5,40-5,30 (m, 2H), 4,71-4,62 (m, 2H), 2,22-2,00 (m, 2H), 1,95-1,88 (m, 1H), 1,84-1,57 (m, 2H), 0,98 (t, J = 7,3Hz, 3H).

e) Do roztoku 853 mg (4,30 mmol) kyseliny **14b** v 14,8 ml bezvodého benzenu se postupně přidá 684 µl (4,91 mmol, 1,14 ekv.) trietylnitritu a 992 µl (4,60 mmol, 1,07 ekv.) DPPA. Reakční směs se 4,5 hodiny zahřívá pod refluxem, a pak se přidá 1,23 ml (8,58 mmol, 2,0 ekv.) 2-trimetyl-silyl-etanolu. Směs se pod refluxem zahřívá přes noc, a pak se zředí dietyléterem a postupně se promyje jedenkrát 10% vodným roztokem kyseliny citrónové, jedenkrát vodou, jedenkrát nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, dvakrát vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a

zahuštění se zbytek čistí rychlou chromatografií (5 cm) při eluci 10 až 15 % roztokem etylacetátu v hexanu za vzniku 1,212 g (3,866 mmol) karbamátu **14c** jako světle žlutého oleje s 90% výtěžkem.

Hmotnostní spektrometrie (FAB) 314 (MH+),

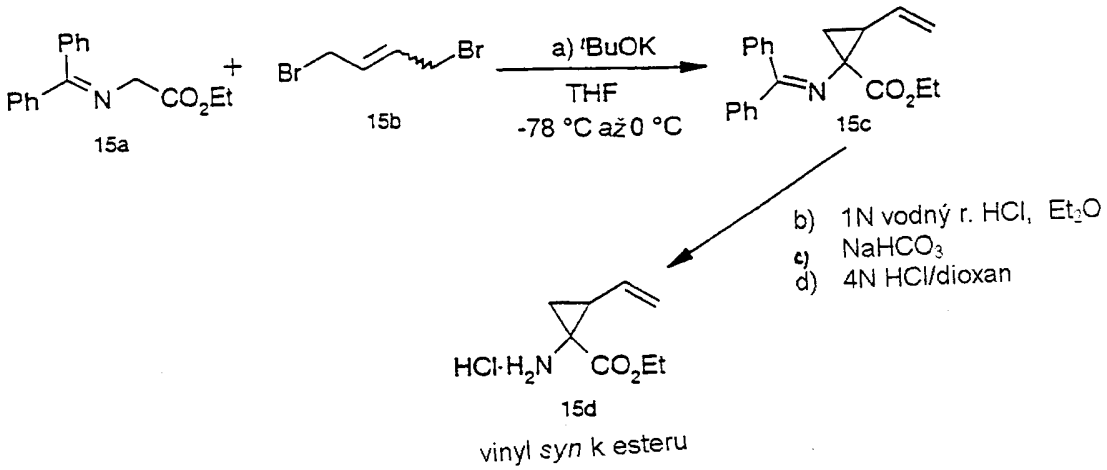
1H NMR ($CDCl_3$): δ 5,93 - 5,84 (m, 1H), 5,32 - 5,20 (m, 2H), 5,05 (bs, 1H), 4,60 - 4,56 (m, 2H), 4,20 - 4,11 (m, 2H), 1,71 - 1,60 (m, 3H), 1,39 - 1,22 (m, 1H), 1,03 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 0,96 - 0,86 (m, 1H), 0,04 (s, 9H).

f) Do 267 mg (0,810 mmol) karbamátu **14c** se přidá 1,62 ml (1,62 mmol, 2,0 ekv.) 1,0M roztoku tetra-n-butylamonium-fluoridu v tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, refluxuje se 30 minut, a pak se zředí etylacetátem. Roztok se postupně promyje dvakrát vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění se připraví 122 mg (0,721 mmol) požadovaného aminu **14d** s 89% výtěžkem jako světle žluté kapaliny.

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 5,94 - 5,86 (m, 1H), 5,31 - 5,22 (m, 2H), 4,58 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 1,75 (bs, 2H), 1,61 – 1,53 (m, 2H), 1,51 - 1,42 (m, 2H), 1,00 (t, J = 7,3Hz, 3H), 0,70 - 0,62 (m, 1H).

Příklad 15

Syntéza etyl-(1R, 2S) / (1S, 2S)-1-amino-2-vinyl-cyklopropyl-karboxylátu



a) Do 180 ml tetrahydrofuranového roztoku 4,62 g (41,17 mmol, 1,1 ekv.) terc-butoxidu draselného se při teplotě –78°C přidá 10,0 g (37,41 mmol) komerčně dostupného iminu **15a** ve 45 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs se zahřeje na teplotu 0°C a 40 minut se míchá při této teplotě. Směs se opět zchladí na teplotu –78°C a přidá se 8,0 g (37,40 mmol) 1,4-dibrombutenu **15b**. Reakční směs se pak 1 hodinu míchá při teplotě 0°C, zchladí se na teplotu -78°C,a pak se přidá 4,62 g (41,17 mmol, 1,1 ekv.) terc-butoxidu draselného. Nakonec se reakční směs míchá další jednu hodinu při teplotě 0°C a zahustí se za vzniku sloučeniny **15c**.

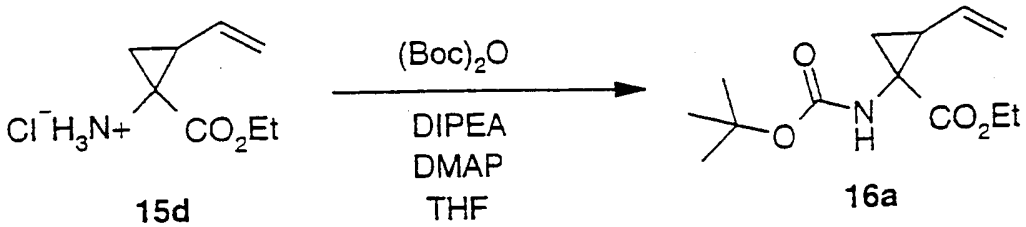
b) c) d) Sloučenina **15c** se zpracuje 265 ml dietyléteru, a na roztok se působí 106 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové. Po 3,5 hodinách při teplotě místnosti se podíly oddělí a vodný podíl dvakrát se promyje dietyléterem a převede na zásadité pH přidáním nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Požadovaný amin se třikrát extrahuje dietyléterem a kombinovaný organický extrakt se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem hořečnatým, filtraci a zahuštění se na vytvořený zbytek působí 187 ml (748 mmol) 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Po zahuštění se získá hydrochlorid

15d jako 2,467 g (12,87 mmol) hnědé pevné látky s 34% výtěžkem.

1H NMR (CDCl3): δ 9,17 (bs, 3H), 5,75 - 5,66 (m, 1H), 5,39 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 5,21 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,35 - 4,21 (m, 2H), 2,77 - 2,70 (m, 1H), 2,05 (dd, J = 6,4, 10,2 Hz, 1H), 1,75 (dd, J = 6,4, 8,3Hz, 1H), 1,33 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Příklad 16

etyl-ester (1R,2S / 1S,2S)-1-Boc-amino-2-vinyl-cyklopropyl-karboxylové kyseliny



15d **16a**

vinyl *syn* k esteru

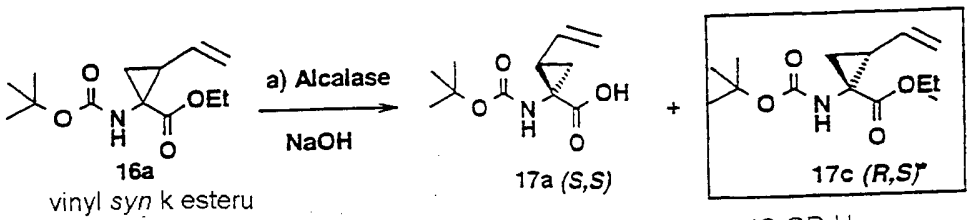
Ve 30 ml tetrahydrofuranu se rozpustí 1,0 g (5,2 mmol) hydrochloridu **15d** a 1,2 g (5,7 mmol) $(Boc)_2O$ a na směs se působí 0,13 g (1,04 mmol, 0,2 ekv.) dimetyl-aminopyridinu a 2,8 ml (15,6 mmol) diizopropyl-etylaminu. Reakční směs se 24 hodin míchá, a následně se zředí 40 ml etylacetátu a postupně se promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, 5% vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí. Zbytek se čistí rychlou chromatografií při eluci 15% roztokem etylacetátu v hexanu za vzniku 0,29 g výsledné sloučeniny **16a** s výtěžkem 23%.

^1H NMR ($CDCl_3$): δ 5,80 - 5,72 (m, 1H), 5,29 - 5,25 (dd, J = 17,2 Hz, 1H), 5,24 - 5,1 (bs, 1H), 5,10 (dd, J = 9,2, 9,2 Hz, 1H), 4,22 – 4,13 (m,

2H), 2,15 - 2,04 (m, 1H), 1,85 - 1,73 (bs, 1H), 1,55 - 1,5 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,26 (t, J= 7,3 Hz, 3H).

Příklad 17

Enzymatické rozdělení etyl-(1R,2S) / (1S,2S)-1-amino-2-vinyl--cyklopropyl-karboxylátu



16a
vinyl *syn* k esteru

17a *(S,S)*

17c *(R,S)**

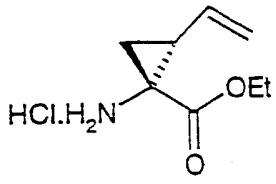
* analýza pomocí HPLC za použití Chiracel® OD-H kolony

a) V 5 ml acetonu se rozpustí 0,29 g (1,14 mmol) racemického derivátu **17a** a směs se zředí 10 ml vody. Hodnota pH se upraví přidáním 0,2N vodného roztoku hydroxidu sodného na pH 7,2, a následně se přidá 300 mg Alcalase®. Po dobu 9 dní inkubace se roztok hydroxidu sodného přidává pH/stat titrátorem, přičemž se během této doby přidá teoreticky vypočítané množství zásady. Následná extrakce je popsána v příkladě 13 za vzniku 0,15 g (100%) nehydrolyzovaného esteru a 0,139 g (95%) hydrolyzovaného materiálu. Analýzou nehydrolyzovaného esteru pomocí HPLC za použití chirální kolony se prokázala přítomnost požadované sloučeniny **17c** v poměru 43:1 (chemická korelace popsaná v příkladech 10 a 11).

Podmínky HPLC analýzy: kolona Chiralcel® OD-H (4,6 mm x 25 cm), izokratické podmínky, mobilní fáze: 2,5% roztok izopropanolu v hexanu.

Příklad 18

Rozdělení (1R,2S) / (1S,2S)-1-amino-2-vinyl-cyklopropyl-karboxylátu krystalizací s dibenzyl-D-vinnou kyselinou



(18)

Do roztoku surového racemického (1S,2S a 1R,2S)-etyl-1-amino--2-vinyl-cyklopropyl-karboxylátu (získaného z 25,0 g (93,5 mol) etylesteru N-(difenyl-metylen)-glycinu podle postupu příkladu 15) v 800 ml etylacetátu se přidá 33,5 g (93,5 mol) dibenzyl-D-vinné kyseliny. Směs se zahřívá pod refluxem, nechá se 15 minut při teplotě místnosti, a pak se zchladí na teplotu 0°C. Po 30 minutách se získá bílá pevná látka. Pevný produkt se filtruje, promyje se 100 ml etylacetátu a suší se na vzduchu. Pevný produkt se uvede do suspenze v 70 ml acetonu, a po působením ultrazvukem se třikrát filtruje. Pevný produkt se nechá krystalizovat dvakrát z horkého acetonu (získaná část A). Matečné louhy se zahustí a vytvořený zbytek se třikrát krystalizuje z horkého acetonu (získaná část B). Získané amorfní bílé produkty části A a B jako soli kyseliny dibenzyl-D-vinné se sloučí za vzniku 5,53 g produktu, který se uvede do suspenze ve směsi 250 ml dietyléteru a 150 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Organický podíl se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým a filtruje se. Filtrát se zředí 100 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dietyleteru a zahustí se za sníženého tlaku. Olejovitý zbytek se odpařuje s tetrachlórmetanem za vzniku 940 mg etyl-1(R)-amino-2(S)-vinyl-cyklopropan-karboxylát-hydrochloridu s 11% výtěžkem jako bílé hygroskopické pevné látky.

$[\alpha]^{25}_D$ +39.5°C (c 1,14 metanol),

$[\alpha]^{25}_D$ +88,5 °C (c 1,14 metanol),

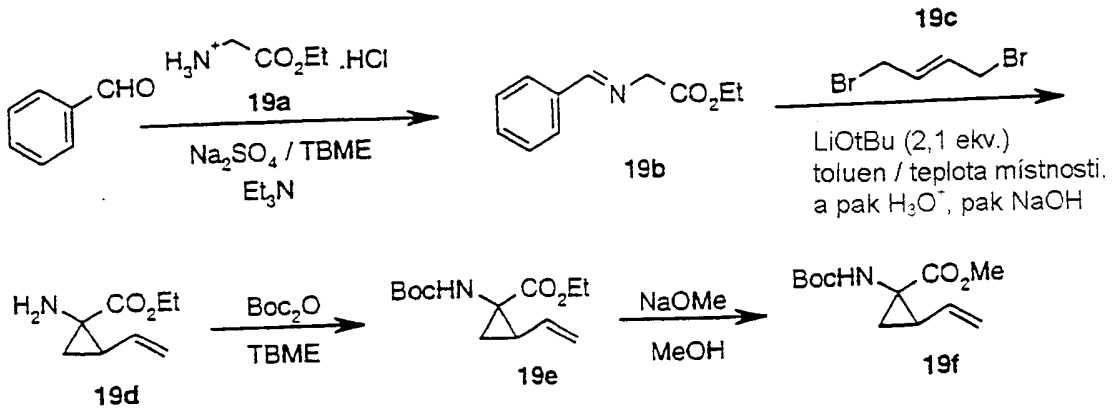
1H NMR (DMSO-d_6): δ 9,07 (široké s, 2H), 5,64 (ddd, J = 17,2, 10,4, 8,7 Hz, 1H), 5,36 (dd, J = 17,2, 1,6 Hz, 1H), 5,19 (dd, J = 10,4, 1,6 Hz, 1H), 4,24-4,16 (m, 2H), 2,51-2,45 (m, vrcholy bráněné DMSO, 1H), 1,84 (dd, J = 10,0, 6,0 Hz, 1H), 1,64 (dd, J = 8,3, 6,0 Hz, 1H), 1,23 (t, J = 7, 1Hz, 3H),

hmotnostní spektrometrie (ESI) m/z 156 (MH) +,

čistota enantiomerů: 91 % přebytek enantiomerů HPLC analýzou Boc derivátu (kolona CHIRALPAK AS®, směs hexanu a izopropanolu).

Příklad 19

Příprava hydrochloridu metyl-esteru (1R,2S) / (1S,2S)-1-amino-2-vinyl--cyklopropan-karboxylové kyseliny (**19f**)



Příprava iminu **19b**

Do suspenze se uvede 1519,2 g (10,88 mol, 1,0 ekv.) hydrochloridu etylesteru glycinu **19a** v 8 l terc-butylmetyléteru. Po přidání 1155 g (10,88 mol, 1 ekv.) benzaldehydu a 773 g (5,44 mol, 0,5 ekv.) bezvodého sulfátu sodného se směs zchladí na teplotu 5°C v lázni ledu a vody. Po kapkách se během 15 minut přidá 2275 ml (16,32 mol, 1,5

ekv.) trietylaminu (za použití 0,5 l terc-butylmetyléteru). Reakční směs se míchá 40 hodin při teplotě místnosti . Reakce se pak ukončí přidáním 5 l ledově studené vody a organický podíl se oddělí. Vodný podíl se extrahuje 1 l terc-butylmetyléteru a kombinované organické podíly se promyjí směsí 400 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 1,6 l vody, a pak nasyceným roztokem chloridu sodného. Roztok se suší se nad síranem hořečnatým, zahustí za sníženého tlaku a vytvořený žlutý olej se suší ve vakuu do konstantní hmotnosti. Získá se 2001 g (96% výtěžek) iminu **19b** jako hustého žlutého oleje, který tuhne při teplotě –20°C.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8,30 (s, 1H), 7,79 (m, 2H), 7,48 - 7,39 (m, 3H), 4,40 (d, J = 1,3Hz, 2H), 4,24 (q, J = 7Hz, 2H), 1,31 (t, J = 7 Hz, 3H).

Příprava racemického hydrochloridu etyl-esteru N-Boc-(1R,2S)/ (1S,2S)--1-amino-2-vinyl-cyklopropan-karboxylové kyseliny **19e**:

Do suspenze se uvede 4,203 g (52,5 mmol, 2,1 ekv.) terc-butoxidu lithného v 60 ml bezvodého toluenu. Ve 30 ml bezvodého toluenu se rozpustí 5,020 g (26,3 mmol, 1,05 ekv.) iminu **19b** a 5,348 g (25 mmol, 1 ekv.) dibromidu **19c** a tento roztok se při teplotě místnosti během 30 minut po kapkách přidá do míchaného roztoku terc-butoxidu lithného. Vytvořená temně červená směs se míchá dalších 10 minut a reakce se ukončí přidáním 50 ml vody a 50 ml terc-butylmetyléteru (TBME). Vodný podíl se oddělí a podruhé se extrahuje 50 ml TBME. Organické podíly se sloučí, přidá se 60 ml 1 N roztoku kyseliny chlorovodíkové a směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti. Organický podíl se oddělí a extrahuje se 40 ml vody. Vodné podíly se pak sloučí, sytí se 35 g soli a 50 ml TBME. Míchaná směs se pak převede na zásadité pH 13-14 opatrným přidáním 10 N roztoku hydroxidu sodného. Organický podíl se oddělí a vodný podíl dvakrát extrahuje 50 ml TBME. Organické extrakty obsahující volný amin **19d** se sloučí a přidá se 5,46 g (25 mmol, 1 ekv.)

diterc.-butyldikarbonátu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti, a pak se podle TLC zjistí přítomnost nezpracovaného volného aminu. Po přidání 1,09 g (5 mmol, 0,2 ekv.) diterc.-butyldikarbonátu se směs 2 hodiny zahřívá pod zpětným chladičem. Následná TLC potvrdí úplnou přeměnu sloučeniny **19d** na **19e**. Roztok se zchladí na teplotu místnosti, suší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se čistí rychlou chromatografií při eluci nejprve 10%, a pak 20% roztokem etylacetátu v hexanu. Čištěním se vytvoří 4,014 g (63% výtěžek) čirého žlutého oleje sloučeniny **19d**, který pomalu tuhne ve vakuu.

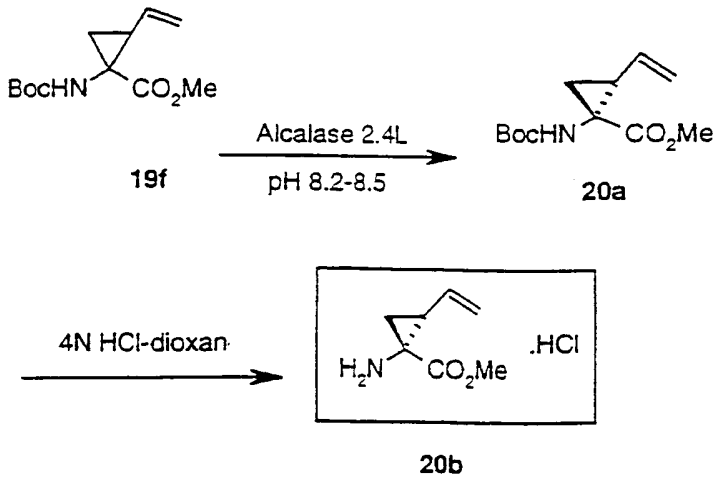
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 5,77 (ddd, J = 17,10,9 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 17,1,5 Hz, 1H), 5,18 (široké s, 1H), 5,11 (dd J = 10,1,5 Hz, 1H), 4,24-4,09 (m, 2H), 2,13 (q, J = 8,5 Hz, 1H), 1,79 (široké m, 1H), 1,46 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,26 (t, J = 7 Hz, 3H).

Příprava výsledné sloučeniny **19f** trans-esterifikací sloučeniny **19e**:
V 50 ml bezvodého metanolu se rozpustí 10,807 g (42,35 mmol) etyl-esteru **19e**, a následně se přidá 9,7 ml (42 mmol, 1 ekv.) 25 %hmotnostních roztoku metoxidu sodného v metanolu. Směs se 2 hodiny zahřívá na teplotu 50°C. TLC analýzou se potvrdí zpracování výchozích sloučenin trans-esterifikací (**19e**: R_f = 0,38, **19f**: R_f = 0,34, v 20% roztoku etylacetátu v hexanu). Reakční směs se zchladí na teplotu místnosti a okyselí k pH 4 za použití 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Chlorid sodný jako sraženina se odstraní filtrací (promytí terc-butylmetyl-éterem) a těkavé podíly se odstraní za sníženého tlaku. Do vytvořeného zbytku se přidá 100 ml terc-butyl-metyléteru a pevná látka se odstraní filtrací. Odpařováním filtrátu za sníženého tlaku a sušením ve vakuu se získá 10,11 g (99% výtěžek) čistého metylesteru **19f**.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 5,75 (ddd, J = 17,10,9 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 17, 1Hz, 1H), 5,18 (široké s, 1H), 5,11 (ddd, J = 10,1,5,0,5 Hz, 1H),

3,71 (s, 3H), 2,14 (q, J = 9 Hz, 1H), 1,79 (široké m, 1H), 1,50 (široké m, 1H), 1,46 (s, 9H).

Příklad 20

Enzymatická rezoluce hydrochloridu metylesteru (1R, 2S)-1-amino-2--vinyl-cyklopropan- karboxylové kyseliny



Příprava metylesteru N-Boc-(1R,2S)-1-amino-2-vinyl-cyklopropan-karboxylové kyseliny **20a**:

Ve 3 ml acetonu se rozpustí 0,200 g (0,83 mmol) racemického esteru **19f**, a následně se přidá v 3 ml acetonu a 7 ml vody. K hodnotě pH 8 se přidá 1 kapka 0,05 M roztoku hydroxidu sodného, a pak se přidá 2,4 l Alcalase® (Novo Nordisk Biochem, 0,3 g v 1 ml vody). Směs se míchá energicky při teplotě místnosti při udržování pH roztoku 8 za použití automatického titračního zařízení. Začátkem 4. a 5. dne míchání při pH 8 se přidají 0,3 g enzymatického roztoku. Po celkem 5 dnech se spotřebuje celkem 8,3 ml 0,05 M roztoku hydroxidu sodného. Reakční

směs se zředí etylacetátem a vodou a organický podíl se oddělí. Po promytí nasyceným roztokem chloridu sodného se organický extrakt suší nad síranem hořečnatým a zahustí ve vakuu. Získá se 0,059 g (30% výtěžek) sloučeniny **20a** jako čirého oleje .

1H NMR identická se sloučeninou **19f**.

HPLC (Chiralcel ODH 4,6 x 250 mm, izokratická eluce 1% roztokem etanolu v hexanu rychlostí průtoku 0,8 ml/min):

(1R, 2S)-2: Rt = 19,3 min (97%);

(1S, 2R)-2: Rt = 17,0 min (3%).

Příprava hydrochloridu metylesteru (1R,2S)-1-amino-2-vinyl--cyklopropan-karboxylové kyseliny **20b**:

Ve 25 ml dioxanu se rozpustí 39,96 g (165,7 mmol) sloučeniny **20a** a roztok se za stálého míchání po kapkách přidá do 250 ml 4 N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu (Aldrich). Po 45 minutách se TLC analýzou potvrdí zpracování výchozích sloučenin. Těkavé podíly se odstraní za sníženého tlaku a zbytek dvakrát odpařuje se 100 ml metanolu. Do hnědého olejovitého zbytku se přidá 300 ml éteru a 10 ml metanolu, směs se míchá přes noc při teplotě místnosti za vzniku sraženiny jako polotuhé látky. Po dalším přidání 15 ml metanolu se v míchání pokračuje 6 hodin, a pak se nažloutlá pevná látka sebere filtrací. Produkt se promyje 50 ml 5% roztokem metanolu v éteru a dvakrát 50 ml éteru. Po sušení ve vakuu vznikne 22,60 g (76% výtěžek) sloučeniny **20b** jako nažloutlé pevné látky. Filtrát (včetně promývacích podílů) se odpařuje ve vakuu za vzniku dalšího podílu sloučeniny **20b** jako 7,82 g (26% výtěžek) hnědého oleje. Oba podíly jsou dostatečně čisté pro použití k výrobě inhibitorů HCV proteáz:

$[\alpha]_D^{25}$ +38,2 (c 1,0, metanol).

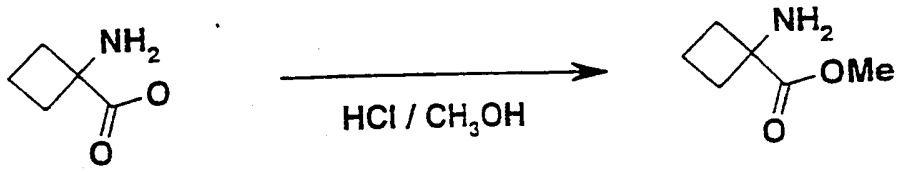
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9,15 (široké s, 3H), 5,65 (ddd, J = 17,10,9 Hz, 1H), 5,36 (dd, J = 17,1,5 Hz, 1H), 5,19 (dd, J = 10,1,5 Hz,

27.04.01

1H), 3,74 (s, 3H), 2,50 (q, překrytý DMSO, J = 9 Hz, 1H), 1,86 (dd, J = 10, 6 Hz, 1H), 1,64 (dd, J = 8, 6 Hz, 1H).

Příklad 21

Syntéza metylesteru 1-aminocyklobutyl-karboxylové kyseliny



hydrochlorid 21a

21b

1,1-Amino-cyklobutan-karboxylová kyselina se připraví podle Kavin Douglas; Ramaligam Kondareddiar; Woodard Ronald, Synth. Commun. (1985), 15 (4), 267-72. Ve 40 ml bezvodého metanolu se při teplotě – 20°C míchá 1,00 g (6,6 mmol) sůl aminokyseliny (**21a**). Směs se sytí bezvodým chlorovodíkem za vzniku sloučeniny (**21 b**). Míchání této směsi pokračuje další 4 hodiny, horký roztok se filtruje a filtrát se zahustí (Rotavap, 30°C) za vzniku zbytku, který se čistí rozetřením v etyléteru. Po filtraci a sušení vznikne 0,907 g (83%) bílého prášku. ^{1}H NMR (400MHz, D_2): δ CH_3O (3H s, 3,97 ppm); CH_2 (2H, m, 2,70-2,77 ppm); CH_2 (2H, m, 2,45-2,53 ppm) a CH_2 (2H, m, 2,14-2,29 ppm).

Tripeptidy

Příklad 22

Obecný postup vazebných reakcí na pevné fázi.

Syntéza se provede na paralelním syntetizátoru (model ACT396, Advanced ChemTechs) na deskách s 96 prohlubněmi. Obvykle se vyrábí 24 peptidů v paralele za použití standardních technik syntézy na

pevné fázi. Výchozí komplex (Fmoc-amino)-cyklopropan (eventuálně substituovaná)-karboxylová kyselina – pryskyřice Wang se připraví vazebnou reakcí DCC/DMAP (E. Atherton, R. C. Scheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach; IRL Press: Oxford (1989); str. 131-148).

Každá prohlubeň se naplní 100 mg výchozí pryskyřice (přibližně 0,05 mmol). Pryskyřice se promyje postupně 1,5 ml podíly jedenkrát NMP a třikrát dimetylformamidu. Ochranné skupiny Fmoc se odstraní působením 20 minut 1,5 ml 25%objemových roztoku piperidinu v dimetyl-formamidu. Pryskyřice se promyje 1,5 ml podíly, a to čtyřikrát dimetyl-formamidem, třikrát metanolem a třikrát dimetyl-formamidem. Vazebná reakce se provede v 350 µl dimetylformamidu, za použití 400 µl (0,2 mmol) 0,5 M roztoku Fmoc-aminokyseliny v HOBt-hydrátu v dimetylformamidu, 400 µl (0,4 mmol) 1M roztoku DIPEA v dimetyl-formamidu a 400 µl (0,2 mmol) 0,5M roztoku TBTU v dimetylformamidu. Po 1 hodině protřepávání se prohlubně vysuší, pryskyřice se promyje 1,5 ml dimetylformamidu a vazebná reakce se opakuje ještě jednou za stejných podmínek. Pryskyřice se pak promyje podle shora uvedeného postupu a cyklus se opakuje pro každou aminokyselinu.

Ochranné (capping) skupiny se uvedou do vazby dvěma způsoby:

1. V podobě karboxylové kyseliny, která se naváže podle shora uvedeného postupu nebo
2. jako acylační činidlo (anhydrid nebo kyselý chlorid).

Následující příklad popisuje ochranu anhydridem kyseliny sukcinové:

Po oddělení ochranné skupiny Fmoc a následným promytím se přidá 350 µl dimetylformamidu, a následně 400 µl (0,2 mmol) 0,5 M dimetyl-formamidového roztoku anhydridu kyseliny sukcinové a 400 µl (0,4 mmol) 1,0 M roztoku DIPEA. Pryskyřice se 2 hodiny míchá, a pak se provede vazebná reakce. Nakonec se pryskyřice promyje 1,5 ml podíly, a to třikrát roztokem dichlormetanu, třikrát metanolem, třikrát roztoku

dichlormetanu a suší se 2 hodiny ve vakuu. Odštěpení z pryskyřice a průvodní vazba ochranné skupiny na vedlejší řetězec se provede přidáním 1,5 ml směsi kyseliny trifluoroctové, vody, dithiothreitolu (DTT) a triizopropyl-silanu (TIS) v poměru 92,5 : 2,5 : 2,5 : 2,5. Po 2,5 hodinách protřepávání se pryskyřice filtruje a promyje 1,5 ml roztokem dichlormetanu. Filtrát se sloučí a zahustí vakuovou centrifugací. Každá sloučenina se čistí preparativní HPLC na reverzní fázi za použití kolony C_{18} (22 mm x 500 mm). Podíly obsahující produkt se určil hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF, sloučí se a lyofilizují.

Příklad 23

Obecný postup vazebných reakcí v kapalné fázi

{viz také R. Knorr a spol., Tetrahedron Letters, (1989), 30,1927.}

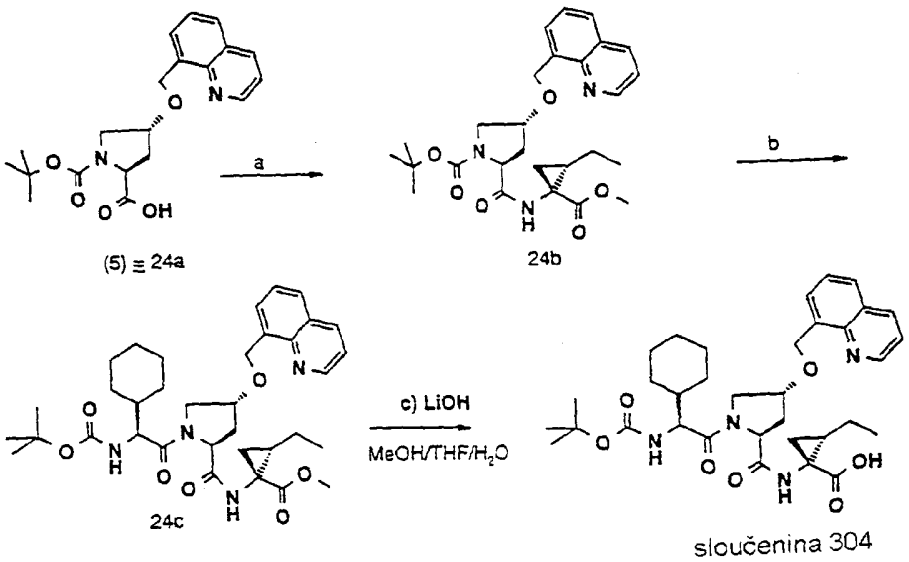
Reakční činidla, t.j. 1 ekv. volného aminu (nebo jeho hydrochloridu) a 1 ekv. volné karboxylové kyseliny se rozpustí v metylenchloridu, metylkyanidu nebo dimetylformamidu. V atmosféře dusíku se do míchaného roztoku přidají 4 ekv. N-metylmorfolinu a 1,05 ekv. vazebného činidla. Po 20 minutách se přidá 1 ekv. druhého reakčního činidla, tj. volné karboxylové kyseliny. (Praktickými a účinnými vazebnými činidly jsou k tomuto účelu: (benzotriazol-1-yl--oxy)tris-(dimetyl-amino)-fosfonium-hexafluorfosfát (HOBT) nebo především 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluronium-tetrafluorborát (TBTU) nebo O-(7azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluronium-tetrafluorborát (HATU). Průběh reakce se sleduje TLC.

Po ukončení reakce se rozpouštědlo odpařuje za sníženého tlaku. Vytvořený zbytek se rozpustí v etylacetátu. Roztok se promyje postupně 10% vodným roztokem kyseliny citrónové, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za

snížený tlaku. Pokud se zbytek čistí, pak se čištění provede rychlou chromatografií shora uvedeným postupem.

Příklad 24

Syntéza sloučeniny **304**



a) Na 0,12 g (0,49 mmol) (R,R)-izomeru Boc-Et-Acca-OMe **13c** získaného enzymatickou rezolucí (příklad 13) se 45 minut působí 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu, a pak se směs zahustí ve vakuu za vzniku bílé pevné látky. Do přibližně 0,49 mmol hydrochloridu se přidá 0,17 g (0,54 mmol) TBTU, 0,18 g (0,49 mmol) Boc-4(R)-(8-chinolin-metyloxy)prolinu **5** (příklad 5) a 0,3 ml (1,7 mmol) DIPEA v 10 ml metylkyanidu. Směs se 3,5 hodiny míchá při teplotě místnosti, a pak se zahustí ve vakuu. Vytvořený materiál

27.04.01

se rozpustí v etylacetátu a promyje postupně nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného. Suší se nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku sloučeniny **24b** jako 0,122 g (50% výtěžek) bílé pevné látky.

b) Na 0,12 g (0,25 mmol) sloučeniny **24b** se 30 minut působí při teplotě místnosti 4N roztokem kyseliny chlorovodíkové v dioxanu, a pak se zahustí ve vakuu. Na přibližně 0,25 mmol vytvořeného hydrochloridu se působí 75 mg (0,27 mmol) Boc-Chg-OH · H_2O, 87 mg (0,27 mmol) TBTU v 10 ml metylkyanidu, a nakonec při teplotě 0°C 0,15 ml (0,87 mmol) DIPEA. Zbytek se zředí etylacetátem, postupně se promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku 0,2 g sloučeniny **24c** jako špinavě bílé pevné látky. Vznikne 0,14 g produktu, který se rozpustí v dimetylsulfoxidu a čistí se preparativní HPLC. Po lyofilizaci vznikne 35 mg (33%výtěžek) sloučeniny **24c** jako bílé pevné látky. HPLC (98%);

Hmotnostní spektrum (FAB) m/z: 637,3 (MH+);

HRMS vypočteno pro $C_{35}H_{48}N_4O_7$ (MH+): 637,36011: nalezeno: 637,36250;

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) výskyt rotamerů: δ 8,91 (dvakrát d, J = 4,1 a 4,1Hz, 1H), 8,40 - 8,36 (m, 2H), 7,90 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,6 - 7,54 (m, 2H), 6,80 (d, J = 8. 6 Hz, 1H), (dvakrát s, 2H), 4,40 (bs, 1H), 4,31 (t, J = 8,3Hz, 1H), 4,12 (d, J = 11,44 Hz, 1H), 4,03 (t, J = 7,9Hz, 1H), 3,78 - 3,72 (m, 1H), 3,56 (s, 3H), 2,35 - 2,27 (m, 1H), 2,06 - 1,97 (m, 1H), 1,71 - 1,55 (m, 10H), 1,53 - 1,38 (m, 2H), 1,26 (s, 9H), 1,18 - 1,06 (m, 2H), 1,02 - 0,93 (m, 2H), 0,89 (t, J = 7,3Hz, 3H).

sloučenina **304**:

c) Do 30 mg (přibližně 0,047 mmol) sloučeniny **24c** se přidá 1 ml metanolu, 1 ml tetrahydrofuranu a 12 mg (0,29 mmol) monohydrátu hydroxidu lithného v 1 ml vody. Čirý roztok se energicky míchá 48 hodin, a pak se zahustí ve vakuu. Surový peptid se rozpustí v dimetylsulfoxidu a čistí se preparativní HPLC. Po lyofilizaci vznikne 21 mg (72% výtěžek) sloučeniny **304** jako bílé pevné látky. HPLC (99%);

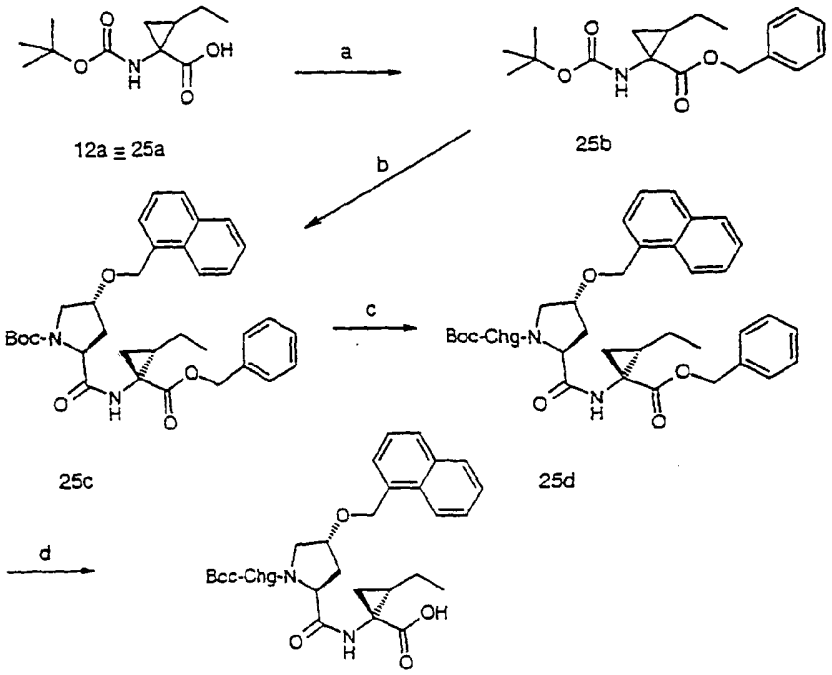
Hmotnostní spektrum (FAB) m/z: (MH+) 623,3;

HRMS vypočteno pro $C_{34}H_{46}N_4O_7$ (MH+): 623,34448, nalezeno: 623,34630,

^{1}H NMR (DMSO-d_6) výskyt rotamerů 1:1: δ 8,90 (dvakrát d, J = 4, 1Hz, 1H), 8,37 (d, J = 8,3Hz, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,3Hz, 1H), 7,77 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 7,67,53 (m, 2H), 6,88 a 6,79 (dvakrát d, J = 8,6 a 7,9 Hz, 1H), 5,17 a 5,16 (dvakrát s, 2H), 4,43 - 4,35 (bs, 1H), 4,29 (t, J = 8,3Hz, 1H), 3,82 - 3,71 (m, 1H), 2,35 - 2,27 (m, 1H), 2,06 - 1,97 (m, 1 H), 1,72 - 1,53 (m, 10 H), 1,52 - 1,44 (m, 2H), 1,37 a 1,29 (dvakrát s, 9H), 1,18 - 1,05 (m, 3H), 1,0 - 0,94 (m, 1H), 0,91 (t, J = 7,3Hz, 3H).

Příklad 25

Syntéza sloučeniny **301**



sloučenina 301

a) Do suspenze se uvede 282 mg (1,23 mmol) sloučeniny **25a** (**=12a**) v 6 ml bezvodého metylkyanidu. Postupně se přidá 221 µl (1,48 mmol) DBU a 161 µl (1,35 mmol) benzylbromidu a vytvořená reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Směs se zahustí, vytvořený olej se zředí etylacetátem a 10% vodným roztokem citrónové kyseliny a postupně dvakrát se promyje 10% roztokem citrónové kyseliny, dvakrát nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, dvakrát vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Etylacetátový podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje se do sucha. Surový bezbarvý olej se čistí rychlou chromatografií při eluci gradientem poměrů směsi hexanu a etylacetátu od 95: 5 do 90: 10 za vzniku 368 mg (93%) benzylovaného produktu **25b** jako bezbarvého oleje.

Hmotnostní spektrum (FAB): 318,2 MH^-, 320,2 MH+, 342,2 (M+Na)+,

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,37 - 7,28 (m, 5H), 5,22 - 5,10 (m, 1H), 5,19 (d, J = 12Hz, 1H), 5,16 (d, J = 12Hz, 1H), 1,60 - 1,40 (m, 4H), 1,39 (s, 9H), 1,31 - 1,22 (m, 1H), 0,91 (t, J = 7,5,14,5 Hz, 3H).

b) Na 368 mg (1,15 mmol) sloučeniny **25b** se působí 6 ml 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu podle shora uvedeného postupu. Surový hydrochlorid se naváže na 470,8 mg (1,27 mmol) sloučeniny **4** (příklad 4) za použití 507µl (4,61 mmol) NMM a 525,6 mg (1,38 mmol) HATU (namísto TBTU) v 6 ml metylenchloridu podle postupu popsaného v příkladě 22 za vzniku surového racemického dipeptidu jako oranžového oleje. Surový materiál se čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a dietyléteru v poměru 50: 50 za vzniku 223 mg (teoretický výtěžek 68%) čistého dipeptidu **25c** (méně polární skvrna) jako bílé pěny.

Hmotnostní spektrum 571,4 MH-, 573,3 MH+, 595,3 (M+Na)+, ^{1}H NMR ($CDCl_3$) směs rotamerů přibližně 1: 1: δ 8,03 (b d, J = 8Hz, 1H), 7,86 (b d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,82 (b d, J = 6,5 Hz, 1H), 7,61 (bs, 0,5 H), 7,57 - 7,40 (m, 4H), 7,31 - 7,21 (m, 5H), 6,48 (bs, 0,5H), 5,22 - 5,11 (m, 1 H), 5,08 - 4,81 (m, 3H), 4,41 - 3,74 (m, 3H), 3,49 - 3,18 (m, 1H), 2,76 - 1,90 (m, 2H), 1,69 - 1,48 (m, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,40 - 1,23 (m, 2H), 0,92 (t, J = 7,5, 15 Hz, 3H).

c) Na 170,1 mg (0,297 mmol) dipeptidu **25c** se působí 2 ml 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu podle shora uvedeného postupu. Surový hydrochlorid se naváže na 84,1 mg (0,327 mmol) Boc-Chg-OH za použití 130,7 µl (1,19 mmol) NMM a 135,5 mg (0,356 mmol) HATU (namísto TBTU) v 2 ml metylenchloridu během 2,75 hodin při teplotě místnosti, a pak se zpracuje podle shora uvedeného postupu za vzniku přibližně 211,4 mg surového tripeptidu **25d** jako bílé pěny s výtěžkem 100%.

Hmotnostní spektrum (FAB): 712,5 MH+.

sloučenina **301**:

d) Ve 2 ml absolutního etanolu se rozpustí přibližně 15,4 mg (0,022 mmol) surového tripeptidu **25d**, a následně se přidá odhadnuté množství (špička špachtle) 10% roztoku paladia na aktivním uhlí a octanu amonného. Směs se hydrogenuje přes noc v atmosféře vodíku při teplotě místnosti a při atmosférickém tlaku. Reakční směs se filtruje přes 0,45 µm Millex® filtr, odpařuje se do sucha, zředí se etylacetátem a 10% vodným roztokem kyseliny citrónové a promyje se znovu jedenkrát 10% vodným roztokem citrónové kyseliny, dvakrát vodou a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se, odpařuje do sucha a lyofilizuje za vzniku 11,0 mg (výtěžek 82%) tripeptidu **301** bílé pevné látky.

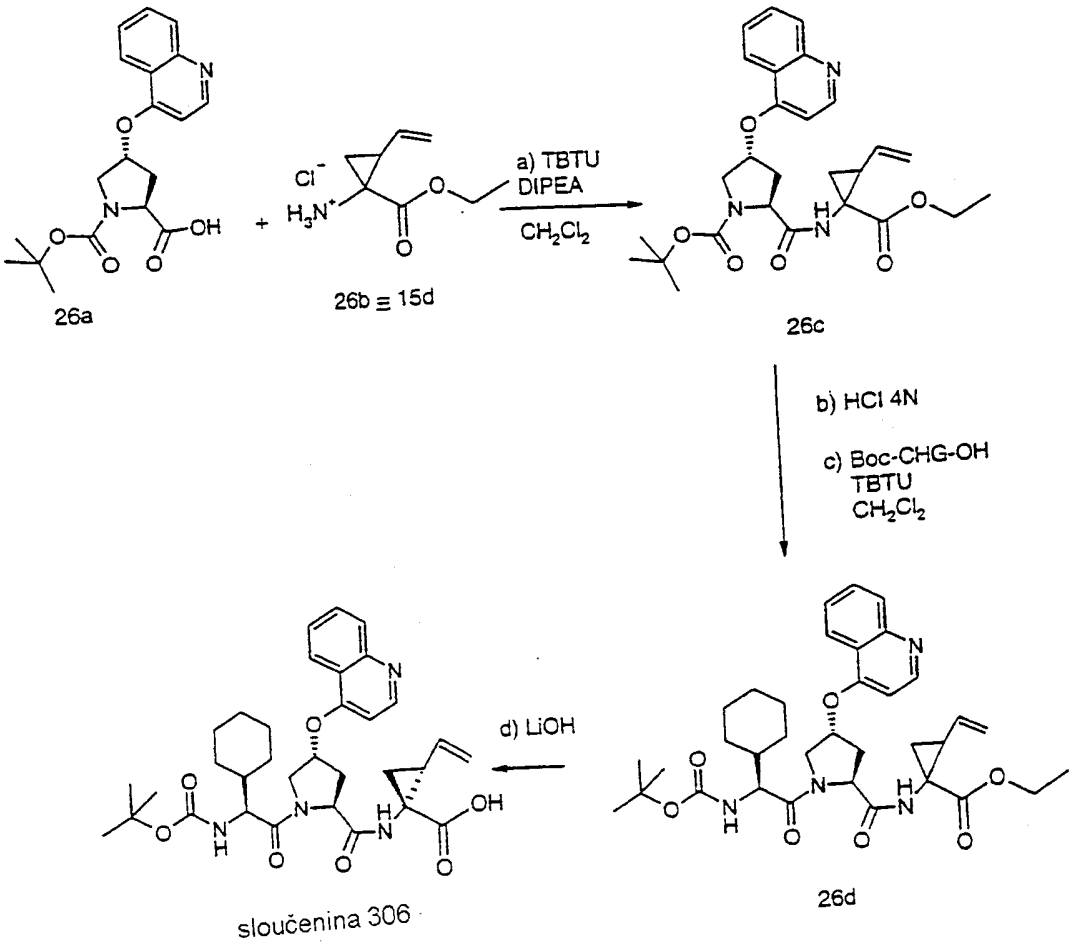
Hmotnostní spektrum (FAB): 622,5 MH+, 644,5 (M+Na)+,

^{1}H NMR (DMSO), směs rotamerů přibližně 1:4: δ 8,54 & 8,27 (s, 1H), 8,06 - 7,99 (m, 1H), 7,96 - 7,91 (m, 1 H), 7,87 (d, J = 8Hz, 1H), 7,57 - 7,42 (m, 4H), 6,81 (d, J = 8Hz, 1H), 4,99 (d, J = 12Hz, 1H), 4,88 (d, J = 12Hz, 1H), 4,46 - 4,19 (m, 2H), 4,17 - 4,02 (m, 2H), 3,88 - 3,67 (m, 1H), 2,28 - 2,19 (m, 1H), 2,05 - 1,93 (m, 1H), 1,73 - 1,43 (m, 8H), 1,32 - 1,07 (m, 6H), 1,28 (s, 9H), 1,03 - 0,85 (m, 2H), 0,91 (t, J = 7,5, 15Hz, 3H).

27.04.01

Příklad 26

Syntéza sloučeniny **306**



26a

26b ≡ 15d

26c

26d

sloučenina 306

a) Za použití 192 mg (0,600 mmol) TBTU a 226 mg (1,75 mmol) DIPEA v 10 ml metylenchloridu se během 20 hodin sloučí 180 mg (0,500 mmol) kyseliny **26a** a 96 mg (0,500 mmol) aminu **15d**. Reakční směs se zahustí, zpracuje se etylacetátem, promyje se dvakrát nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku **26c** jako hnědého oleje, který se použije v následujícím kroku syntézy bez dalšího čištění.

b) c) Přibližně 0,500 mmol surové sloučeniny **26c** se 30 minut míchá v 4 ml chlorovodíku v dioxanu a zahustí se do sucha. Pevný produkt se

27.04.01

zpracuje 10 ml metylenchloridu, a pak se postupně přidá 226 mg (1,75 mmol) DIPEA, 138 mg (0,500 mmol) monohydrátu Boc-Chg-OH a 192 mg (0,600 mmol) TBTU. Roztok se 5 hodin míchá při teplotě místnosti. Reakční směs se zahustí, zpracuje se etylacetátem, promyje se dvakrát nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a zahustí za vzniku hnědého oleje, který se čistí rychlou chromatografií za vzniku 204 mg (výtěžek 64% během dvou vazebných reakcí) sloučeniny **26d** jako žlutého oleje.

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,77 - 8,74 (m, 1H), 8,14 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,69 (dd, J = 9, 7 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 5 Hz, 1H), 7,47 (dd, J = 8,7 Hz, 1H), 6,78 (d, J = 5 Hz, 1H), 5,80 - 5,70 (m, 1H), 5,35 - 5,27 (m, 2H), 5,14 - 5,07 (m, 2H), 4,89 - 4,83 (m, 1H), 4,39 - 4,32 (m, 1H), 4,30 - 4,24 (m, 1H), 4,20 - 4,07 (m, 2H), 4,00 - 3,92 (m, 1H), 3,04 - 2,92 (m, 1H), 2,39 - 2,29 (m, 1H), 2,16 - 2,04 (m, 1H), 1,91 - 1,83 (m, 1H), 1,82 - 1,62 (m, 7H), 1,45 - 1,35 (m, 9H), 1,27 - 1,07 (m, 8H).

c) Ve 4 ml tetrahydrofuranu a 2 ml metanolu se rozpustí 136 mg (0,214 mmol) sloučeniny **26d**. Přidají se 2 ml vodného roztoku 72 mg (1,72 mmol) hydrátu hydroxidu lithného a reakční směs se 20 hodin míchá při teplotě místnosti. Roztok se zahustí a čistí preparativní HPLC za vzniku 25 mg sloučeniny **306** (méně polární izomer) jako bílé pevné látky.

sloučenina **306**:

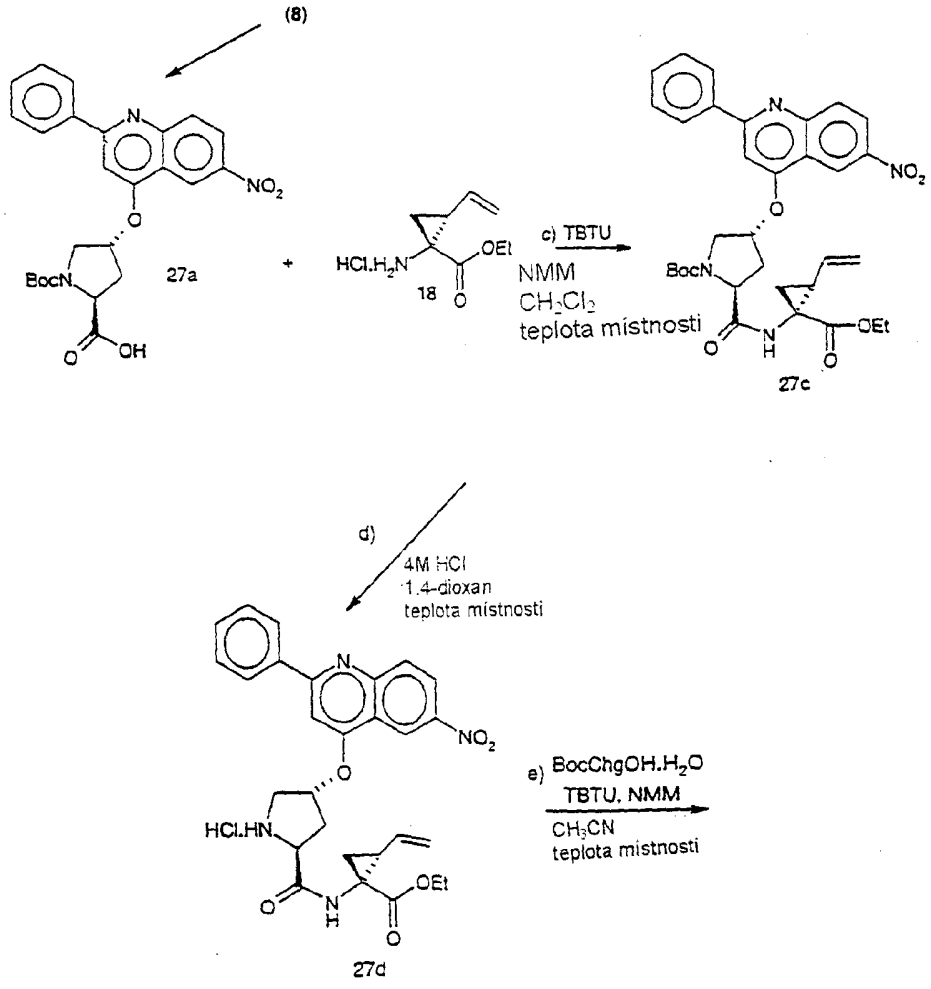
Hmotnostní spektrum (FAB) 607,4 (MH+),

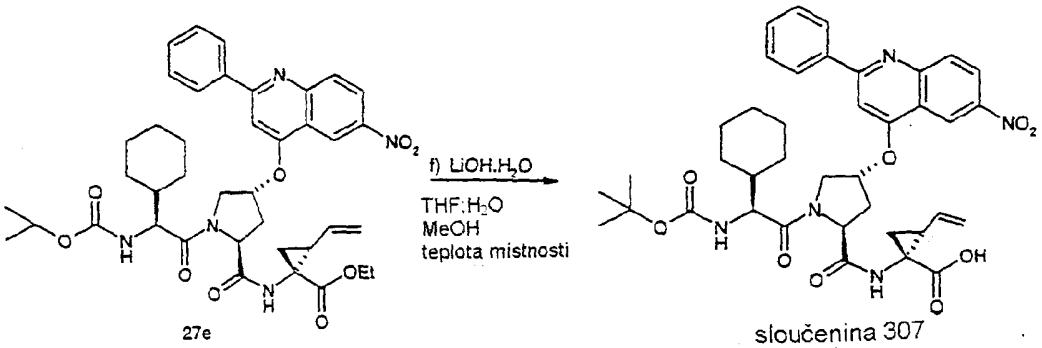
^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9,16 (d, J = 6 Hz, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,35 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,05 (dd, J = 8, 7 Hz, 1H), 7,76 (dd, J = 8, 7 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 6 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 8Hz, 1H), 5,75 - 5,66 (m, 2H), 5,19 (d, J = 18 Hz, 1 H), 5,07 (d, J = 10 Hz, 1H), 4,55 (d, J = 12Hz, 1H), 4,43 (dd, J = 10,8 Hz, 1H), 4,03 (d, J =

10 Hz, 1H), 3,87 - 3,83 (m, 1H), 2,66 - 2,59 (m, 1H), 2,36 - 2,30 (m, 1H), 1,98 (dd, J = 18,9 Hz, 1H), 1,75 - 1,56 (m, 8 H), 1,38 - 1,35 (m, 1H), 1,25-1,22 (m, 1 H), 1,09 (s, 9 H), 1,12 - 0,95 (m, 3H).

Příklad 27

Syntéza sloučeniny **307**





c) Na roztok 505 mg (105 mmol) kyseliny (8) (příklad 8) v 5 ml dichlormetanu se působí 376 mg (1,17 mmol) TBTU. Do roztoku aktivovaného esteru se přidá 279 mg (1,46 mmol) hydrochloridu (R,S)-vinyl-AccaOEt (18) (příklad 18) v 7 ml dichlormetanu obsahující 0,60 ml (5,46 mmol) N-metyl-morfolinu. Vytvořený roztok se přes noc míchá při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpařuje ve vakuu. Vytvořený zbytek zředí se etylacetátem, dvakrát se promyje nasyceným roztokem bikarbonátu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje ve vakuu. Vytvořený zbytek se čistí chromatografií na silikagelu při eluci směsí hexanů a etylacetátu v poměru 60:40 za vzniku 173 mg dipeptidu **27c** s výtěžkem 27%.

d, e) Při teplotě místnosti se 1 hodinu míchá roztok 70 mg (0,114 mmol) dipeptidu **27c** v 3 ml 4,0 M roztoku chlorovodíku v 1,4-dioxanu (po 10 minutách vznikne sraženina). Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a vytvořených 0,114 mmol amin-hydrochloridu **27d** se zředí 1,5 ml acetnitrilu. Roztok neutralizuje přidáním 65 µl (0,591 mmol) N-metyl-morfolinu. Na roztok 39 mg (0,142 mmol) Boc- ChgOH · H_2O v 1,5 ml acetnitrilu se působí 46 mg (0,143 mmol) TBTU, a pak se vytvořený roztok přidá do shora uvedeného roztoku aminu. Vytvořený roztok se 2 dny míchá při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu. Vytvořený zbytek se zředí etylacetátem, dvakrát se promyje

nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje ve vakuu. Vznikne 86 mg (výtěžek 100%) tripeptidu **27e**. Surová výsledná sloučenina se použije v následujícím postupu syntézy bez dalšího čištění.

d) Do roztoku 86 mg (0,114 mmol) tripeptidu **27e** v 5 ml směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 2,5 : 1 se přidá 22 mg (0,524 mmol) monohydrátu hydroxidu lithného. Přidá se dalších 0,25 ml metanolu za vzniku homogenního roztoku, který se přes noc míchá při teplotě místnosti, a pak se rozpouštědlo odpařuje ve vakuu. Vytvořený zbytek se rozdělí mezi vodu a etylacetát. Vodný podíl se okyselí přidáním 1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové, a pak extrahuje dvakrát etylacetátem. Požadovaná sloučenina se vyskytuje v etylacetátu z první zásadité extrakce. Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým, filtruje se a odpařuje ve vakuu za vzniku 69 mg surové kyseliny, která se čistí preparatorní HPLC. Sloučenina se rozpustí ve 4 ml metanolu a nastřikuje se na ekvilibrovaný sorbent Whatman Partisil 10-ODS-3 (2,2 x 50cm) C18 reversní fáze kolony. (λ = 230 nm, rozpouštědlo A = 0,06% roztok kyseliny trifluoroctové ve vodě, rozpouštědlo B = 0,06% roztok kyseliny trifluoroctové v metylkyanidu). Program čištění: od 20% do 70% rozpouštědla B během 60 minut. Podíly se analyzují analytickou HPLC. Podíly obsahující výsledný produkt se seberou a lyofilizují za vzniku 50 mg (60%) požadovaného tripeptidu **307** jako bílé pevné látky.

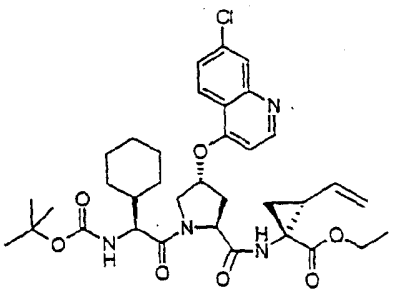
sloučenina **307**:

^{1}H NMR (DMSO-d_6) rotamery: δ 8,86 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 8,85 (s, 0,2H), 8,64 (s, 0,8H), 8,49 (dd, J = 9,5, 3Hz, 0,2H), 8,45 (dd, J = 9,2Hz, 0,8H), 8,39 - 8,33 (m, 2H), 8,20 (d, J = 9,5 Hz, 0,2H), 8,18 (d, J = 9,5 Hz, 0,8H), 7,81 (s, 0,2H), 7,78 (s, 0,8H), 7,64 - 7,56 (m, 3H), 6,87 (d, J = 8 Hz, 0,8H), 6,36 (d, J = 9 Hz, 0,2H), 5,82 - 5,67 (m, 2H), 5,27 - 5,17 (m, 1H), 5,09 - 5,03 (m, 1H), 4,73 (t, J = 8 Hz, 0,2H), 4,55 (dd, J =

10,7,5 Hz, 0,8H), 4,49 - 4,40 (m, 1H), 4,00 - 3,95 (m, 1H), 3,83 - 3,76 (m, 1H), 2,87 - 2,80 (m, 0,2H), 2,69 - 2,62 (m, 0,8H), 2,39 - 2,26 (m, 1H), 2,08 - 2,00 (m, 1H), 1,75 - 1,41 (m, 7H), 1,37 (s, 1,8H), 1,32 - 1,27 (m, 1H), 1,17 - 0,82 (m, 5H), 0,94 (s, 7,2H).

Příklad 28

Syntéza sloučeniny **311**



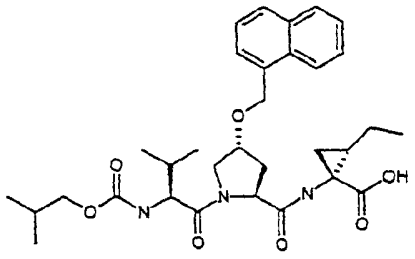
sloučenina 310

Sloučenina **311** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 24, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

Sloučenina **310**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 8,98 (d, J = 6 Hz, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,24 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 2Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 6 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 8 Hz, 1H), 5,75 - 5,66 (m, 1H), 5,57 (br s, 1H), 5,24-5,19 (m, 1H), 5,08 - 5,01 (m, 1H), 4,57 - 4,40 (m, 2H), 4,00 - 3,96 (m, 1H), 3,82 (dd, J = 9,8 Hz, 1H), 2,59 - 2,54 (m, 1H), 2,32 - 2,26 (m, 1H), 1,99 (dd, J = 17,9 Hz, 1H), 1,74 - 1,55 (m, 8 H), 1,37 (s, 1H), 1,26 - 1,22 (m, 1H), 1,14 - 1,08 (m, 9 H), 1,02 - 0,91 (m, 3H).

Příklad 29

Syntéza sloučeniny **302**



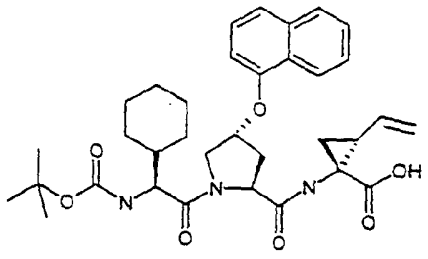
302

Sloučenina **302** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 27, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,34 (s, 1H), 8,04-8,01 (m, 1H), 7,94-7,92 (m, 1 H), 7,87 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,54-7,50 (m, 3H), 7,45 (dd, J = 17, 8 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,94 (dd, J = 55,12Hz, 2H), 4,34 (s, 1H), 4,27 (dd, J = 8, 8 Hz, 1H), 4,16 (d, J = 11 Hz, 1H), 4,07 (dd, J = 8,8 Hz, 1H), 3,72-3,65 (m, 2H), 3,59-3,54 (m, 1H), 2,24 - 2,18 (m, 1H), 2,02-1,95 (m, 2H), 1,75 - 1,70 (m, 1H), 1,53 - 1,44 (m, 2H), 1,32 - 1,27 (m, 1H), 1,21 - 1,17 (m, 1H), 0,96 - 0,85 (m, 10 H), 0,80 – 0,77 (m, 5 H), 0,62-0,57 (m, 1 H).

Příklad 30

Syntéza sloučeniny **308**



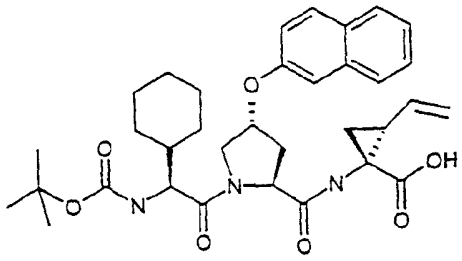
308

Sloučenina **308** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 27, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) rotamery ≈ 2 : 8: δ 8,77 (s, 0,2H), 8,45 (s, 0,8H), 8,13 (d, J = 8,5 Hz, 0,8H), 8,03 (d, J = 8,5 Hz, 0,2H), 7,89 - 7,83 (m, 1H), 7,55 - 7,37 (m, 4H), 7,05 - 6,59 (m, 1H), 6,95 (d, J = 8 Hz, 0,8H), 6,26 (d, J = 8,5 Hz, 0,2H), 5,81 - 5,64 (m, 1H), 5,33 - 5,28 (m, 1H), 5,26 - 5,15 (m, 1H), 5,08 - 5,02 (m, 1H), 4,60 (t, J = 7,5 Hz, 0,2H), 4,38 - 4,27 (m, 1,8H), 4,09 - 3,91 (m, 1,8H), 3,74 (dd, J = 12,5, 4 Hz, 0,2H), 2,69 - 2,60 (m, 0,2H), 2,50 - 2,40 (m, 1H), 2,36 - 2,28 (m, 0,2H), 2,23 - 2,14 (m, 0,8H), 2,05 - 1,97 (m, 0,8H), 1,76 - 1,44 (m, 7H), 1,37 (s, 1,8H), 1,29 (s, 7,2H), 1,28 - 1,20 (m, 1H), 1,16 - 0,88 (m, 5H).

Příklad 31

Syntéza sloučeniny **309**



309

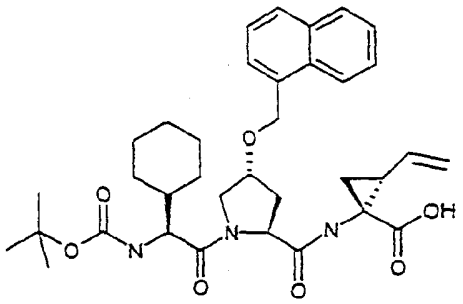
Sloučenina **309** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 27, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) rotamery ≈ 2 : 8: δ 8,75 (s, 0,2H), 8,50 (s, 0,8H), 7,89 - 7,78 (m, 3H), 7,50 – 7,44 (m, 1H), 7,42 - 7,32 (m, 2H), 7,17 - 7,09 (m, 0,8H), 7,08 - 7,03 (m, 0,2H), 6,79 (d, J = 8,5 Hz, 0,8H), 6,33 (d, J = 9 Hz, 0,2H), 5,81 - 5,65 (m, 1H), 5,30 - 5,16 (m, 2H), 5,10 - 5,02 (m, 1H), 4,56 (t, J = 7,5 Hz, 0,2H), 4,33 (t, J = 8 Hz, 0,8H), 4,10 - 3,90 (m, 2,8H), 3,74 - 3,68 (m, 0,2H), 2,45 - 2,37 (m, 1H), 2,34 - 2,17 (m,

1H), 2,05 - 1,97 (m, 1H), 1,76 - 1,48 (m, 7H), 1,37 (s, 1,8H), 1,23 (s, 7,2H), 1,21 - 0,88 (m, 6H).

Příklad 32

Syntéza sloučeniny **305**



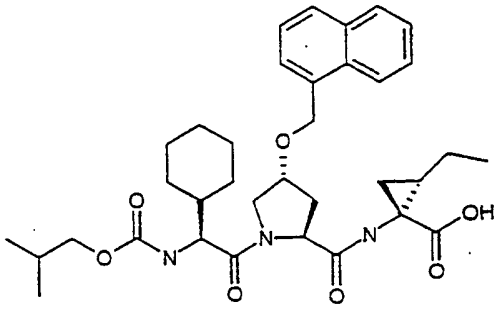
305

Sloučenina **305** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 27, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) rotamery (1: 9): δ 8,68 (s, 0,1H), 8,43 (s, 0,9H), 8,04 - 8,00 (m, 1H), 7,95 - 7,91 (m, 1H), 7,87 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,57 - 7,49 (m, 3H), 7,47 - 7,42 (m, 1H), 6,82 (d, J = 8,5 Hz, 0,9H), 6,21 (d, J = 8,5 Hz, 0,1H), 5,80 - 5,64 (m, 1H), 5,21 (dd, J = 17,2Hz, 0,1H), 5,18(dd, J = 17,2Hz, 0,9H), 5,06 (dd, J = 10,5, 2Hz, 1H), 5,02 - 4,85 (m, 2H), 4,43 (t, J = 7,5 Hz, 0,1H), 4,34 (brs, 1H), 4,23(t,J = 8,5 Hz, 0,9H), 4,16 – 4,05 (m, 1,8H), 3,89 - 3,82 (m, 0,2H), 3,74 (dd, J = 11, 3,5 Hz, 0,9H), 3,53 (dd, J = 12, 5,4 Hz, 0,1 H), 2,30 - 2,21 (m, 1H), 2,02 - 1,94 (m, 2H), 1,74 - 1,38 (m, 7H), 1,36 (s, 0,9H), 1,28 (s, 8, 1H), 1,25 - 0,87 (m, 6H).

Příklad 33

Syntéza sloučeniny **303**



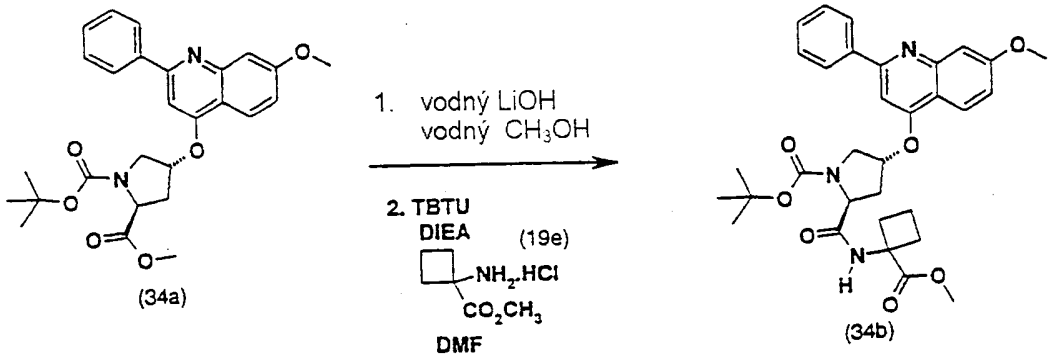
303

Sloučenina **303** se připraví podle postupu popsaného v příkladě 27, ale za použití odpovídajících stavebních jednotek.

^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 8,29 (s, 1H), 8,04 - 8,01 (m, 1H), 7,94 - 7,92 (m, 1 H), 7,87 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,56 - 7,52 (m, 3H), 7,46 (dd, J = 8,7 Hz, 1H), 7,19 (d, J = 9 Hz, 1H), 5,01 (d, J = 12Hz, 1H), 4,86 (d, J = 12Hz, 1H), 4,34 (br s, 1H), 4,24 (t, J = 8Hz, 1 H), 4,18 - 4,09 (m, 2H), 3,74 - 3,53 (m, 3H), 2,24 - 2,18 (m, 1H), 2,04 - 1,95 (m, 1H), 1,74 - 1,45 (m, 10 H), 1,31 - 1,13 (m, 4 H), 0,96 - 0,86 (m, 7 H), 0,79 - 0,76 (m, 5 H).

Příklad 34

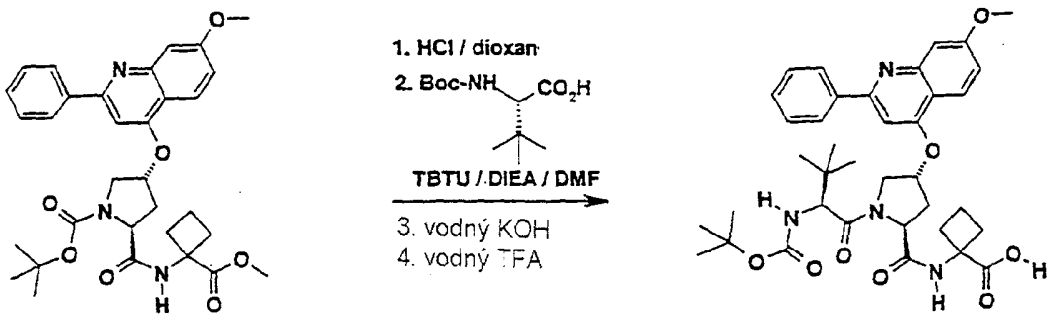
Syntéza sloučeniny **403**



a) Vazebná reakce P2 s P1

Při teplotě místnosti se 1hodinu míchá 170 mg (0,355 mmol) metylesterového derivátu **7** (**34a**) ve 4 ml 50% roztoku tetrahydrofuranu v metanolu a 1 ml 1M vodného roztoku hydroxidu lithného. Roztok se zahustí (Rotavap, 30°C), zbytek se okyselí k pH 6 a roztok se lyofilizuje. Vytvořený prášek se míchá v 3 ml bezvodého dimetylformamidu za přítomnosti 0,4 ml DIEA, a následně se postupně přidá 140 mg (0,845 mmol) hydrochloridu metylesteru 1,1-amino-cyklobutyl-karboxylové kyseliny **34b** a 134 mg (0,417 mmol) TBTU. Po 18 hodinách míchání při teplotě místnosti se směs čistí rychlou chromatografií na silikagelu (230-400 Mesh) při eluci směsí etylacetátu a hexanu v poměru 1:2 za vzniku 98 mg (čistota podle HPLC 90%) oranžového oleje.

b) Vazebná reakce P1-P2 s P3



(34b) 403

V 5 ml 4N roztoku chlorovodíkové v dioxanu se 1 hodinu míchá 97 mg (90%, 0,155 mmol) dipeptidu **34b** při teplotě místnosti. Roztok se pak zahustí do sucha (Rotavap, vysoké vakuum) za vzniku béžové pevné látky. Tento materiál se míchá ve 2 ml bezvodého dimetylformamidu při teplotě místnosti za přítomnosti 0,4 ml DIEA, a následně se přidá 80 mg (0,35 mmol) L-Boc-Tbg a 112 mg (0,35 mmol) TBTU. Po 2 dnech míchání při teplotě místnosti se roztok vlije do etylacetátu k získání

volných bází za použití 5% vodného roztoku uhličitanu draselného. Organický podíl se zpracuje za vzniku žlutého olejovitého zbytku. Materiál se čistí rychlou chromatografií na silikagelu (230-400 Mesh) za použití směsi etylacetátu a hexanu v poměru 1:2 a 3:1. Získá se 40 mg oleje, podle HPLC homogenního.

Mícháním při teplotě místnosti se během 3 hodin saponifikuje 40 mg metylesteru ve 2 ml 1N roztoku hydroxidu draselného ve 4 ml metanolu. Reakční směs se zahustí (Rotavap, 30°C) a k pH 4 se okyselí přidáním 2N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Směs se čistí preparativní HPLC na C18 koloně při eluci gradientem koncentrací vodného roztoku acetnitrilu od 0 do 50% obsahujícího 0,1% roztok kyseliny trifluoroctové při 220 nm. Podíly obsahující požadovaný produkt se oddělí, zahustí na poloviční objem a lyofilizuje se za vzniku 10 mg sloučeniny **403** bílé pevné látky.

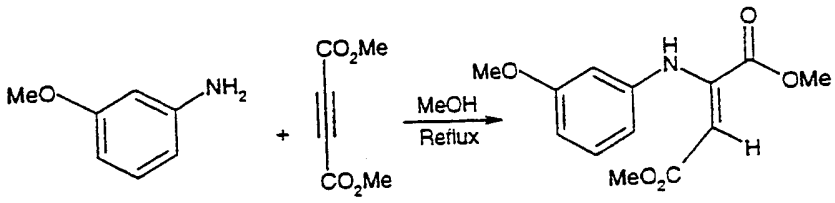
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ směs rotamerů: NH+ (1H, s, 8,6 ppm), CH (3H, m, 8,2 ppm), Ph (5H, široké s, 7,66 a 7,53 ppm), CH (1H, široké, 7,22 ppm), NH (1H, d, J = 7,6 Hz, 6,71 ppm), CHO (1H, široké s, 5,76 ppm), CH (2H, m, 4,58 - 4,49 ppm), CH (1H, m, 4,04 ppm), CH_3O (3H, s, 3,97 ppm), CH (1H, d, 3,86 ppm), CH (7H, velmi široké, 1,8 – 2,6 ppm), Boc skup. (9H, s, 1,25 ppm) a t-butyl skup. (9H, s, 0,97 ppm).

Hmotnostní spektrometrie: M+H+ při m/e 675 (100%),

HPLC vrchol 98% při teplotě 18,9 minut.

Příklad 35

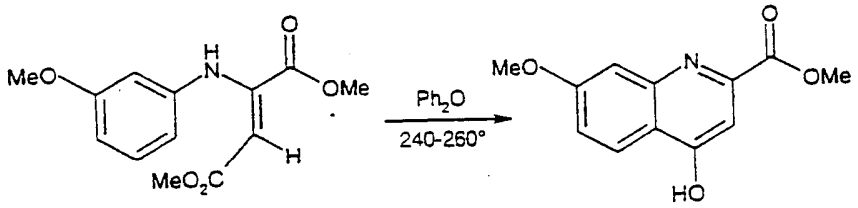
Syntéza sloučeniny **333** (tabulka 3)



(35a) (35b) (35c)

Roztok 9,15 ml (81,4 mmol) m-anisidinu **35a** a 10,0 ml (81,3 mmol) dimetyl-acetylen-dikarboxylátu **35b** ve 160 ml metanolu se 2 hodiny zahřívá pod refluxem. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a zbytek se čistí rychlou chromatografií na koloně při eluci směsí hexanů a etylacetátu v poměru 90:10. Získá se 17,0 g (79% výtěžek) sloučeniny **35c** jako oranžového oleje.

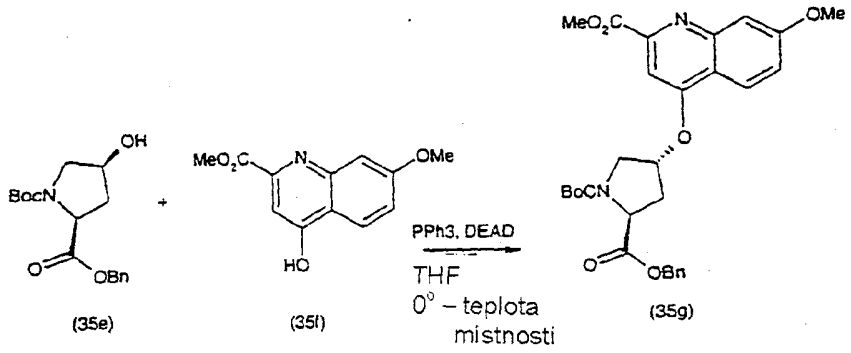
^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,62 (široké s, 1H), 7,17 (dd, J = 7 a 8,5 Hz, 1 H), 6,66 - 6,62 (m, 1H), 6,49 - 6,45 (m, 2H), 5,38 (s, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,71 (s, 3H).



(35c) (35d)

V lázni písku při vnitřní teplotě přibližně 250°C se zahřívá 50 ml difenyl-éteru. V 5 ml difenyl-éteru se rozpustí 7,5 g (28,3 mmol) sloučeniny **35c** a roztok se během 2 minut přidá do vroucího rozpouštědla. Směs se 5 minut zahřívá, a reakční směs se pak nechá zchladit na teplotu místnosti. Rychle se vytvoří béžová pevná látka jako sraženina, která se oddělí filtrací, a pak se rozetře s metanolem. Vznikne 4,1 g (62% výtěžek) požadované sloučeniny **35d**.

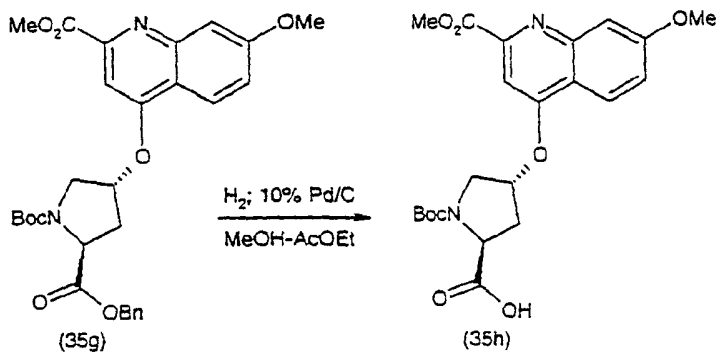
^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,97 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 2Hz, 1H), 6,96 (dd, J = 9 a 2Hz, 1H), 6,55 (s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,84 (s, 3H).



Roztok 1,71 g (5,33 mmol) derivátu cis-4-hydroxy-L-prolinu **35e**, 1,25 g (5,36 mmol) derivátu 4-hydroxy-chinolinu **35f** a 2,80 g (10,68 mmol) trifenylfosfinu v 75 ml tetrahydrofuranu se zchladí na teplotu 0°C, pomalu po kapkách se během 1 hodiny přidá 1,70 ml (10,80 mmol) DEAD. Reakční směs se pak nechá zahřát pomalu na teplotu místnosti a v míchání se pokračuje přes noc. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se čistí rychlou chromatografií při eluci směsí etylacetátu a hexanů v poměru 70:30. Vznikne 0,7 g čisté sloučeniny **35g** a 1,8 g sloučeniny **35g** kontaminované přibližně 50% trifenylfosfát-oxidem jako bílé pevné látky.

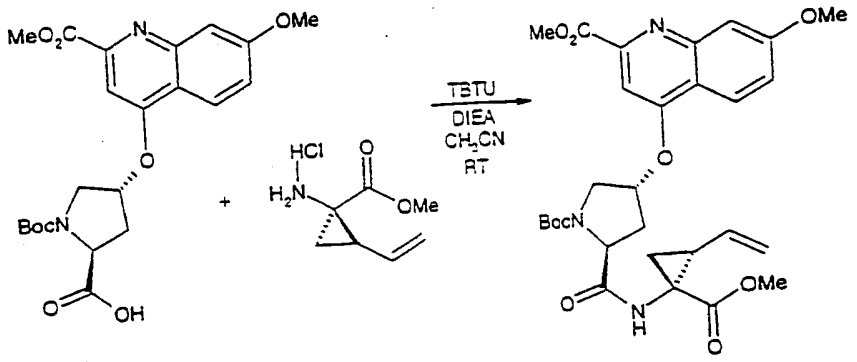
^{1}H NMR ($CDCl_3$) rotamery v poměru 4: 6: δ 8,04 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,40 - 7,32 (m, 6H), 7,23 (dd, J = 9 a 2,5 Hz, 1H),

5,33 - 5,13 (m, 3H), 4,66 (t, J = 7,5Hz, 0,4H), 4,54 (t, J = 8Hz, 0,6H) 4,07 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,04 – 3,80 (m, 2H), 2,78 - 2,65 (m, 1H), 2,47 - 2,34 (m, 1H), 1,45 (s, 3,6H), 1,37 (s, 5,4H).



Do roztoku 0,70 g (1,31 mmol) benzyl-esteru derivátu prolinu **35g** ve směsi 10 ml metanolu a 10 ml etylacetátu se přidá 100 mg 10% katalyzátoru paladia na aktivním uhlí. Vytvořená suspenze se míchá při teplotě místnosti v atmosféře vodíku 1,5 hodiny. Katalyzátor se pak filtruje na filtrační jednotce Millex-HV Millipore (0,45 μm) a rozpouštědlo se odpařuje ve vakuu. Vytvoří se kvantitativní výtěžek 0,59 g požadované kyseliny **35h**.

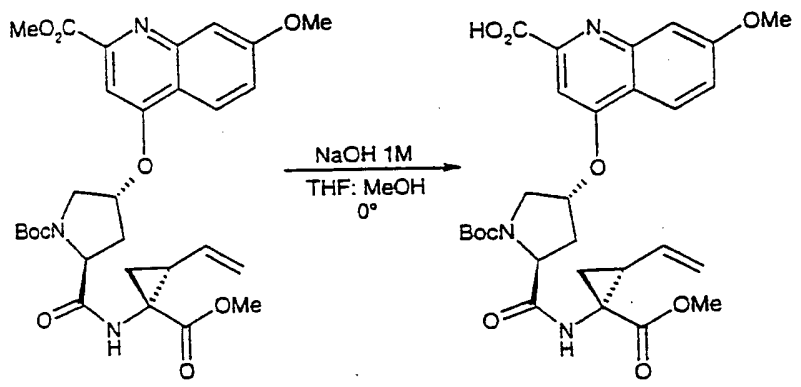
^{1}H NMR: ($CDCl_3$) rotamery v poměru 70:30: δ 8,06 (d, J = 9,5 Hz, 0,3H), 8,01 (d, J = 9 Hz, 0,7 H), 7,56 (d, J = 2Hz, 1H), 7,44 (široké s, 0,7 H), 7,41 (široké s, 0,3 H), 7,24 (dd, J = 9 H), 4,08 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 4,04 - 3,80 (m, 2H), 2,83 - 2,72 (m, 1H), 2,71 - 2,47 (m, 1H), 1,46 (s, 9H).



(35h) (35i) (35j)

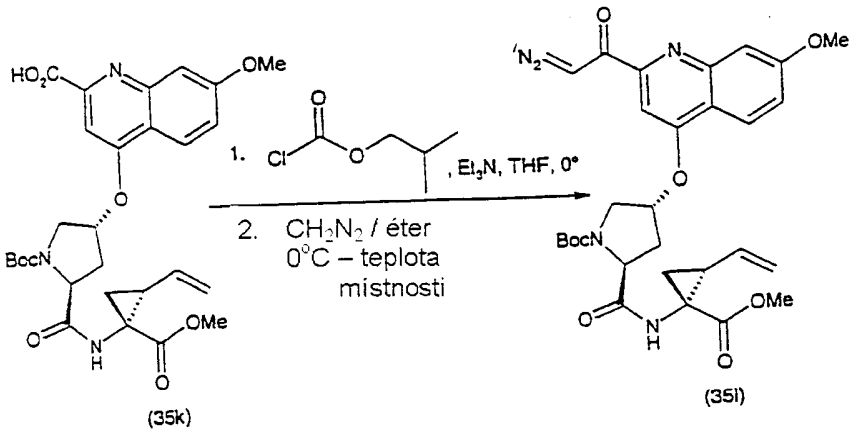
Na 215 mg (1,21 mmol) soli aminu **35i** v 7 ml acetnitrilu se působí 0,95 ml (5,45 mmol) DIEA. Tento roztok se pak přidá do roztoku 590 mg (1,32 mmol) kyseliny **35h** a 389 mg (1,21 mmol) TBTU v 5 ml metylkyanidu. Vytvořený roztok se přes noc míchá při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se zředí etylacetátem a promyje dvakrát nasyceným roztokem bikarbonátu sodného, jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného a suší se nad síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se čistí rychlou chromatografií na koloně při eluci směsí etylacetátu a hexanů v poměru 75:25 za vzniku 527 mg (70% výtěžek) požadovaného dipeptidu **35j**.

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,01 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,22 (dd, J = 9 a 2,5 Hz, 1H), 5,81 - 5,71 (m, 1H), 5,36 - 5,28 (m, 2H), 5,18 - 5,12 (m, 1H), 4,61 - 4,45 (m, 1H), 4,07 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,91- 3,74 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 2,99 - 2,84 (m, 1H), 2,49 - 2,34 (m, 1H), 2,20 - 2,08 (m, 1H), 1,97 - 1,84 (m, 1H), 1,58 - 1,52 (m, 1H), 1,44 (s, 9H).



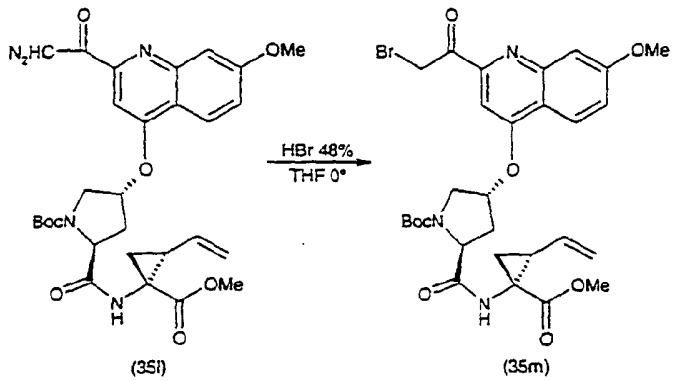
(35j) (35k)

Roztok 716 mg (1,25 mmol) diesteru **35j** ve směsi 1,5 ml tetrahydrofuranu a 1,5 ml metanolu se zchladí na teplotu 0°C, a pak se na zchlazený reakční roztok působí 1,25 ml (1,25 mmol) 1M vodného roztoku hydroxidu sodného. Po 1 hodině míchání při teplotě 0°C se směs neutralizuje přidáním 3 kapek ledové kyseliny octové. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a sloučenina se suší několikahodinovým odčerpáváním.



(35k) (35l)

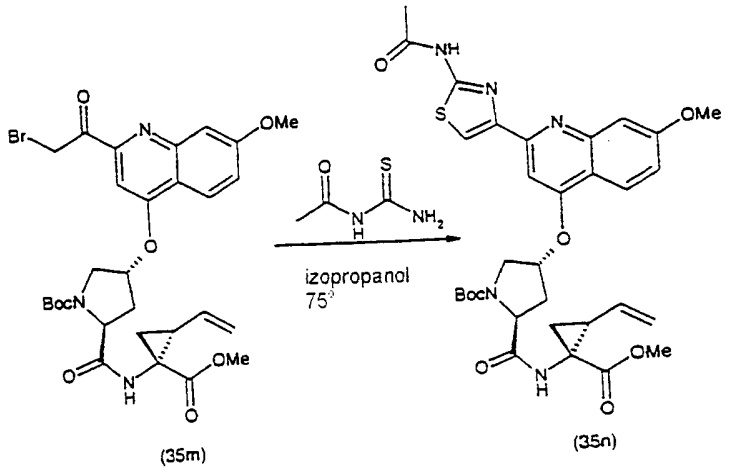
Roztok 1,25 mmol sodné soli kyseliny **35k** a 0,19 ml (1,36 mmol) trietylnitritu v 8 ml tetrahydrofuranu se zchladí na teplotu 0°C a přidá se 0,18 ml (1,39 mmol) izobutyl-chlor-mravenčanu. Po 40 minutách se přidá 9 ml (6,30 mmol) diazometanu a vytvořený roztok se 30 minut míchá při teplotě 0°C a 2 hodiny při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu. Vytvořený zbytek se zředí etylacetátem, dvakrát se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného a suší se nad síranem hořečnatým, rozpouštědlo se odpařuje ve vakuu a zbytek se čistí rychlou chromatografií na koloně při eluci směsí hexanů a etylacetátu v poměru 50:50 za vzniku 378 mg (52% výtěžek) požadovaného diazoketonu **35l**. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,20 (dd, J = 9 a 2,5 Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 5,81 - 5,71 (m, 1H), 5,35 - 5,28 (m, 3H), 5,17 - 5,13 (m, 1H), 4,61- 4,40 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96 - 3,74 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 2,94 - 2,38 (m, 2H), 2,18 - 2,06 (m, 1H), 1,98 - 1,84 (m, 1H), 1,57 - 1,52 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).



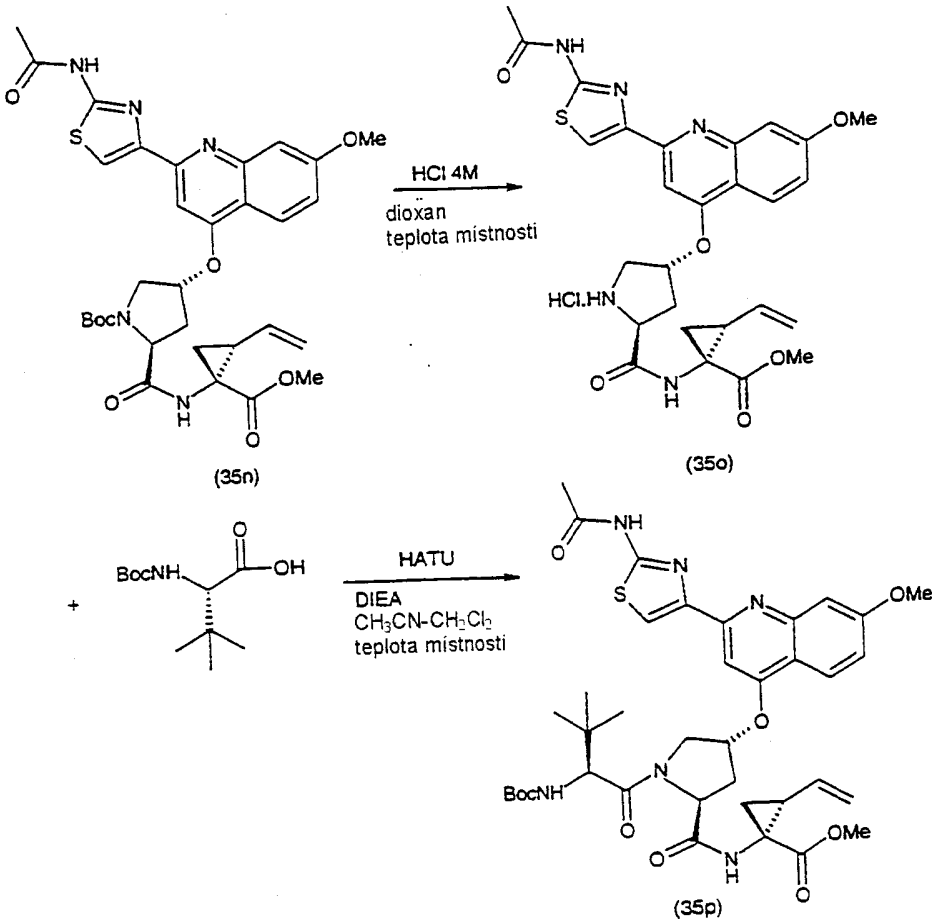
(35l) (35m)

Do zchlazeného (0°C) roztoku 0,37 g (0,642 mmol) diazoketonu **35l** v 15 ml tetrahydrofuranu se přidá 0,25 ml 48% bromovodíku. Vytvořený žlutý roztok se 1 hodinu míchá při teplotě 0°C. Reakční směs se rozdělí mezi etylacetát a nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného. Organický

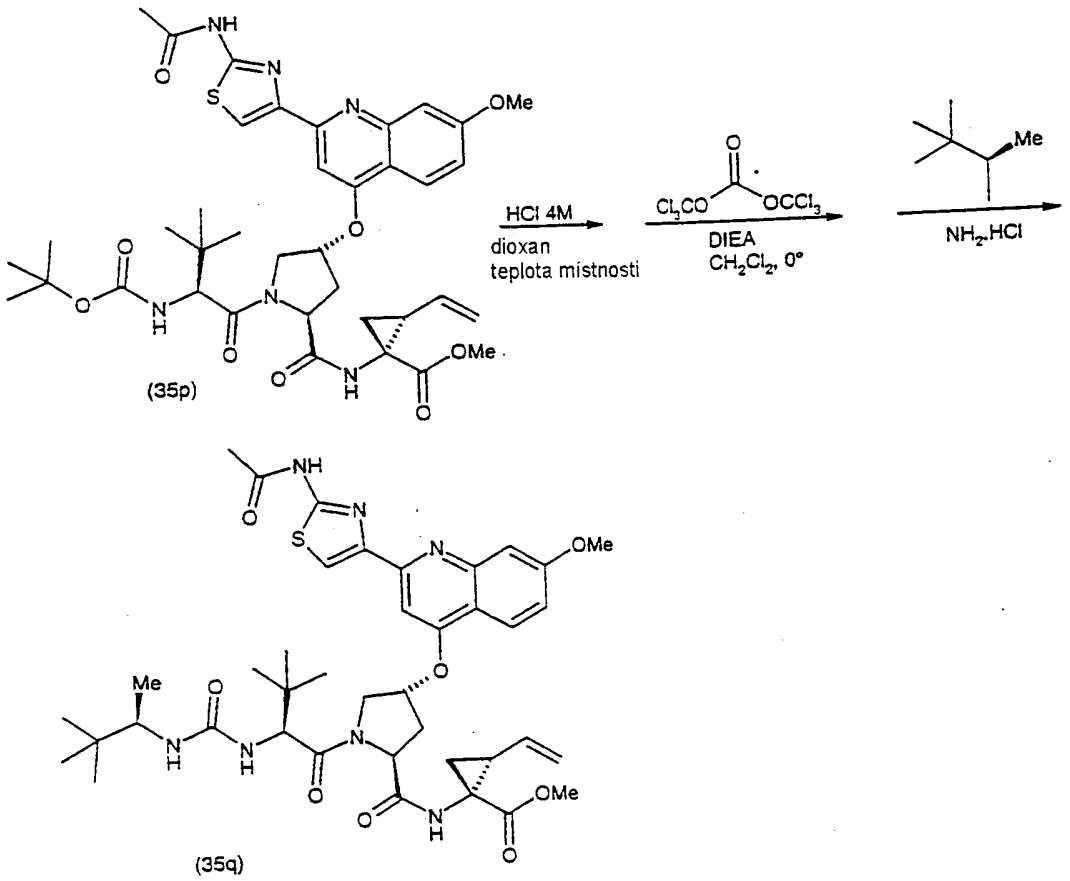
podíl se ještě jednou promyje hydrogenuhličitanem sodným a suší se nad síranem sodným. Po odpařování rozpouštědla ve vakuu vznikne 0,36 g (90% výtěžek) α-bromketonu **35m**.



Na roztok 170 mg (0,271 mmol) α-bromketonu **35m** v 10 ml izopropanolu se působí 64 mg (0,542 mmol) 1-acetyl-2-thio-močoviny. Vytvořený roztok se 1 hodinu zahřívá na teplotu 75°C. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Vytvořený zbytek se zředí etylacetátem a dvakrát se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného a suší se nad síranem hořečnatým. Odpařováním rozpouštědla ve vakuu vznikne 182 mg (výtěžek vyšší než 100%) surového produktu **35n**.



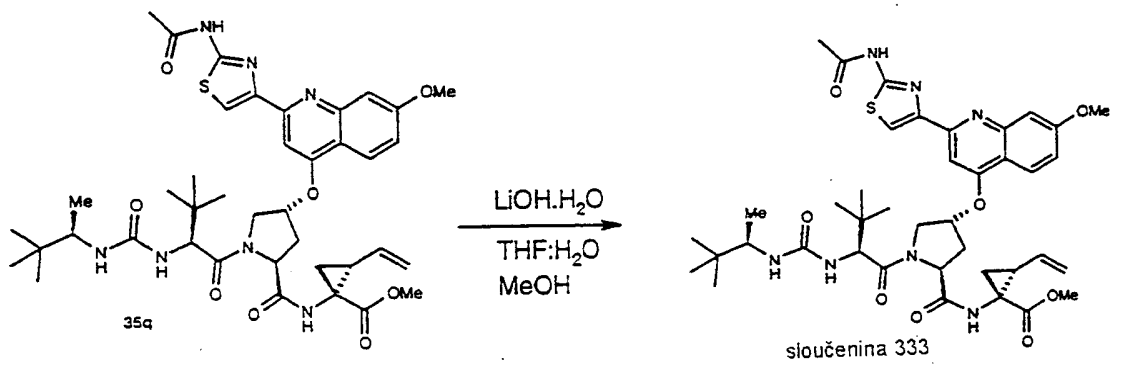
Na 145 mg (0,223 mmol) dipeptidu **35n** se působí 3 ml 4M roztoku chlorovodíku v dioxanu. Vytvořený roztok se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se suší odčerpáváním. Na sůl aminu **35o** v 5 ml metylkyanidu se působí 195 µl (1,12 mmol) DIEA. Tento roztok se pak přidá do roztoku 103 mg (0,446 mmol) Boc-terc-butylglycinu a 186 mg (0,489 mmol) HATU v 3 ml metylkyanidu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Metylkyanid se odpaří ve vakuu a vytvořený zbytek se zředí etylacetátem, dvakrát se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného a suší se nad síranem hořečnatým. Po odstranění rozpouštědla se získá 274 mg (> 100%) surového tripeptidu **35p**.



Roztok 56 mg (0,0733 mmol) tripeptidu **35p** ve 4 ml 4M roztoku chlorovodíku v dioxanu se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se suší odčerpáváním.

Získaná sůl aminu se rozpustí ve 4 ml metylenchloridu a na roztok se působí 0,13 ml (0,746 mmol) DIEA, a následně 26 mg (0,0876 mmol) trifosgenu. Po 3 hodinách inkubace se přidá 20 mg (0,146 mmol) 1,2,2-trimetyl-propylaminu (jehož syntéza je popsaná v N. Moss, J. Gauthier, J.M. Ferla, Feb. 1995, SynLett. (2), str. 142-144). Ledová lázeň se odstraní a reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Po odpaření metylenchloridu ve vakuu se vytvořený zbytek zředí etylacetátem, dvakrát se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a jedenkrát nasyceným roztokem chloridu

sodného a suší se nad síranem hořečnatým za vzniku 60 mg (výtěžek 100%) požadované močoviny **35q**.



Na roztok 57 mg (0,0721 mmol) metylesteru **35q** ve směsi 2,5 ml tetrahydrofuranu a 1 ml vody se působí 25 mg (0,595 mmol) pevného hydrátu hydroxidu lithného (LiOH · H_2O), a následně se přidá 1 ml metanolu k vytvoření čirého roztoku. Po 4 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs neutralizuje přidáním 1 M roztoku chlorovodíku. Rozpouštědlo se odstraní odpařováním ve vakuu a zbytek se čistí preparativní chromatografií. Sloučenina se rozpustí v 2,5 ml metanol, vstříkne se na ekvilibrovaný sorbent Whatman Partisil 10-ODS-3 (2,2 x 50 cm) C_{18}kolony v reverzní fázi. Postup čištění: lineární gradient rychlostí průtoku 20 ml/nm, λ 220 nm, vstříknuto při 10% A do 60% A během 60 minut. A: 0,06% roztok kyseliny trifluoroctové v metylkyanidu; B: 0,06% kyseliny trifluoroctové ve vodě. Podíly se analyzují analytickou HPLC. Produkt sebere a lyofilizuje za vzniku 15 mg sloučeniny **333** jako špinavě bílé pevné látky s 27%výtěžkem.

1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,88 (s, 0,2H), 8,84 (d, J = 4,5 Hz, 0,2H), 8,68 (d, J = 8,5 Hz, 0. H), 8,56 (s, 0,8H), 8,40 - 8,13 (m, 1,5H), 7,96 (d, J = 9,0 Hz, 0,2H), 7,72-7,44 (m, 2,4H), 7,35 - 7,09 (m, 1,2H), 6,98 (d, J = 9 Hz, 0,2H), 6,15 (d, J = 9Hz, 0,2H), 6,06 (d, J = 9Hz, 0,8H), 5,93 (d, J = 9,5 Hz, 0,24H), 5,86 (d, J = 9Hz, 0,8H), 5,79 - 5,67 (m, 1H), 5,69 - 5,44

(m, 1H), 5,24 - 5,14 (m, 1H), 5,09 - 5,01 (m, 1H), 4,50 - 4,35 (m, 2H), 4,24 (d, J = 9,0Hz, 0,2H), 4,20 (d, J = 9,0 Hz, 0,8H), 4,06 - 3,98 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,77 - 3,60 (m, 2H), 2,58 – 2,50 (m, 1H), 2,33 - 2,28 (m, 1H), 2,22 (s, 2,4H), 2,21 (s, 0,6H), 2,02 (q, J = 9Hz, 1H), 1,56 - 1,38 (m, 1H), 1,28 - 1,22 (m, 1H), 0,97 (s, 9H), 0,83 (d, J = 6 Hz, 3H), 0,72 (s, 9H).
Hmotnostní spektrum (FAB) 778,3 (m + H) +, 776,3 (M-H)-.

Příklad 36

Klonování, exprese a čištění rekombinantní proteázy NS3 viru HCV typu 1 b.

Sérum virem HCV infikovaného pacienta se získá širší spoluprácí vědeckých týmů (Bernard Willems MD, Hôpital St-Luc, Montréal, Kanada a Dr. Donald Murfy, Laboratoire de Santé Publique du Québec, Ste-Anne de Bellevue, Canada). Kopie HCV genomu, resp. cDNA v celé délce, která se získá reverzní transkripcí-polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) sérové RNA za použití specifických primerů vybraných na základě homologie mezi ostatními liniemi genotypu 1b. Tento HCV izolát byl zařazen do genotypové skupiny 1b (Simmonds a spol., J. Clin. Microbiol., (1993), 31, str. 1493-1503) na základě stanovení jeho kompletní genomické sekvence. Sekvence aminokyselin nestrukturální oblasti NS2-NS4B se ukázala z více než 93% identická s HCV genotypem 1b (BK, JK a 483 izolantů) a 88% identických s HCV genotypem 1a (HCV1 izolát). DNA fragment kódující polyproteinový prekurzor (NS3/NS4A/NS4B/NS5A/ /NS5B) se vyrobí pomocí PCR a zavede se do eukaryotního expresního vektoru. Po přechodné transfekci se zpracování polyproteinu zprostředkované proteázou NS3 viru HCV projeví při Western-blot analýze přítomností kompletního funkčního NS3 proteinu. Tento NS3 protein se neprojevil expresí polyproteinového

prekurzoru s mutací S1165A, která inaktivuje NS3 proteázu, čímž se potvrzuje funkční schopnost proteázy NS3 viru HCV.

DNA fragment kódující rekombinantní proteázu NS3 viru HCV (aminokyseliny 1027 až 1206) se klonuje v bakteriálním expresním vektoru pET11d. Exprese NS3 proteázy v E. coli BL21 (DE3) pLysS se navodí 3 hodinovou inkubací 1 mM roztokem IPTG při teplotě 22°C. Fermentací (18 l) vznikne přibližně 100 g vlhké buněčné pasty. Buňky se znovu uvedou do suspenze v 3,0 ml/g lyzátového pufru obsahujícího 25 mM roztoku fosfátu sodného o pH 7,5, 10%objemových glycerolu, 1 mM roztoku EDTA a 0,01% NP-40 a uskladní se při teplotě –80°C. Buňky se rozmrazí a homogenizují s následným přidáním 5 mM roztoku DTT. Přidá se chlorid hořečnatý a DNáza do konečné koncentrace homogenátu 20 mM a 20 µg/ml. Po 25 minutách inkubace při teplotě 4°C se homogenát zpracuje působením ultrazvuku a centrifuguje se 30 minut při 15000xg při teplotě 4°C. Hodnota pH supernatantu se pak upraví na 6,5 za použití 1M roztoku fosfátu sodného.

K postupu čištění ve dvou krocích popsanému ve zveřejněné přihlášce WO č. 95/22985 se přidá ještě gelová filtrace. Supernatant z bakteriálního extraktu vstříkne na sorbent kolony SP HiTrap (Pharmacia), který se předem ekvilibruje v pufru A o rychlosti průtoku 2 ml/min (50 mM roztoku fosfátu sodného o pH 6,5, 10% glycerol, 1 mM roztoku EDTA, 5 mM roztoku DTT, 0,01% NP-40). Kolona se promyje pufrem A obsahujícím 0,15 M roztoku chloridu sodného a proteáza se eluuje deseti objemy kolony lineárním gradientem od 0,15 do 0,3M roztoku choridu sodného. Podíly obsahující NS3 proteázu se spojí a zředí do konečné koncentrace 0,1 M chloridu sodného. Enzym se dále čistí na koloně HiTrap Heparin (Pharmacia), jejíž sorbent se ekvilibruje pufrem B (25 mM roztoku fosfátu sodného o pH 7,5, 10% glycerol, 5 mM roztoku DTT, 0,01 % NP-40). Vzorek nastřikuje při průtokové rychlosti 3 ml/min. Kolona se pak promyje pufrem B obsahujícím 0,15 M

roztoku chloridu sodného průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Promytí se provede ve dvou krocích za přítomnosti pufru B obsahujícího 0,3 nebo 1 M roztoku chloridu sodného. Proteáza se promyje 0,3M roztokem chloridu sodného, trojnásobně se zředí pufrem B, a znovu se umístí na kolonu HiTrap Heparin při eluci pufrem B obsahujícím 0,4 M roztoku chloridu sodného. Podíly obsahující NS3 proteázu se umístí na kolonu Superdex 75 HiLoad 16/60 (Pharmacia) ekvilibrované pufrem B obsahujícím 0,3 M roztoku chloridu sodného. Podle SDS-PAGE a následnou denzitometrickou analýzou je čistota proteázy NS3 viru HCV získané ze spojených podílů vyšší než 95%.

Enzym se uskladní při teplotě –80°C, a před použitím se rozmrazí na ledu a zředí.

Příklad 37

Radiometrické hodnocení působení komplexu rekombinantní proteázy NS3 viru HCV a NS4A peptidového kofaktoru

Enzym se klonuje, exprimuje a připraví podle postupu popsaného v příkladě 30. Enzym se uskladní při teplotě –80°C, rozmrazí se na ledu a před zkouškou se zředí pufrem pro zkoušku obsahujícím peptidový NS4A kofaktor.

Mezi cysteinovými a serinovými zbytky se enzymaticky štěpí substrát pro radiometrickou zkoušku DDIVPC-SMSYTW. Sekvence DDIVPC-SMSYTW odpovídá přirozenému místu štěpení NS5A/NS5B, kde cysteinový zbytek v segmentu P2 se nahradil prolinem. Peptidový substrát DDIVPC-SMSYTW a indikátor biotin-DDIVPC-SMS[^{125}I-Y]TW se inkubují s rekombinantní NS3 proteázou a NS4A peptidovým kofaktorem KKGSVVIVGRIILSGRK (molární poměr enzym : kofaktor = 1: 100) bez nebo s použitím inhibitorů. Oddělení substrátu z produktu se provede přidáním kuliček avidinem obalené agarózy, a následně filtrací.

Z množství SMS[^{125}I-Y]TW produktu ve filtrátu lze vypočítat přeměnu substrátu v procentech a procenta inhibice.

A. Činidla

Tris a Tris-HCl (UltraPure) vyrábí firma Gibco-BRL. Glycerol (UltraPure), MES a BSA vyrábí firma Sigma. TCEP lze získat od firmy Pierce, DMSO z Aldrich a hydroxid sodný z Anachemia.

Pufr pro zkoušku: 50 mM roztok Tris HCl o pH 7,5, 30% hmotnostně /objemová glycerolu, 1 mg/ml BSA, 1 mM roztoku TCEP (TCEP se přidá před použitím z 1 M zásobního roztoku ve vodě).

Substrát: DDIVPCSMSYTW, konečná koncentrace 25 µM (k zabránění oxidace se používá z 2 mM zásobního roztoku v DMSO uskladněného při teplotě –20°C).

Indikátor: redukovaný monojodovaný substrát biotin DDIVPC SMS[^{125}I Y]TW o výsledné koncetraci přibližně 1 nM.

Proteáza NS3 viru HCV typu 1b o konečné koncetraci 25 nM (ze zásobního roztoku 50 mM fosfátu sodného o pH 7,5, 10% glycerolu, 300 mM roztoku chloridu sodného, 5 mM DTT, 0,01% NP40).

Peptidový NS4A kofaktor: KKGSVVIVGRIILSGRK, konečná koncentrace roztoku 2,5 µM (ze 2 mM zásobního roztoku v DMSO uskladněného při teplotě –20°C).

B. Protokol postupu

Zkouška se provede na polypropylenové plotně s 96 prohlubněmi firmy Costar. Každá prohlubeň obsahuje:

20 µl substrátu / indikátoru v pufru pro zkoušku

10 µl ± inhibitoru v 20% roztoku DMSO / pufru pro zkoušku

10 µl NS3 proteázy typu 1b / NS4 peptidový kofaktor

(molární poměr = 1: 100).

Slepý vzorek (žádný inhibitor a žádný enzym) a kontrolní vzorek (žádný inhibitor) se také připraví na stejné plotně zkoušky.

Enzymatická reakce se zahájí přidáním roztoku komplexu enzymu a NS4A peptidu a zkoumaná směs se 40 minut inkubuje při teplotě 23°C při mírné agitaci. K ukončení enzymatické reakce se přidá 10 µl 0,5N roztoku hydroxidu sodného a 10 µl 1 M roztoku MES o pH 5,8.

Na filtrační desku Millipore MADP N65 se přidá 20 µl kuliček avidinem obalené agarózy (Pierce). Po ukončení enzymatické reakce se zkoumaná směs přenese na filtrační desku a při mírné agitaci se inkubuje 60 minut při teplotě 23°C.

Desky se filtrují za použití filtračního zařízení Millipore MultiScreen Vacuum Manifold Filtration. Na neprůhlednou desku s 96 prohlubněmi obsahující 60 µl scintilačního kokteilu v každé prohlubni se přenese 40 µl filtrátu.

Radioaktivita filtrátu se měří na zařízení TopCount firmy Packard s použitím protokolu pro ^{125}I-kapalina za 1 minutu.

Procenta inhibice se vypočítají podle následující rovnice:

$$100-[(\text{počet}_{inh}-\text{počet}_{slep})/ (\text{počet}_{kontr} -\text{počet}_{slep}) \text{ X } 100]$$

Výsledky experimentu s různými koncentracemi inhibitoru byly proloženy nelineární křivkou na základě Hillova modelu a byla určena IC_{50} (koncentrace vedoucí k 50% inhibici) za použití SAS softwarového programu (Statistical Software System, SAS Institute, Inc. Cary, N. C.).

Příklad 38

Sledování aktivity NS3-NS4A heterodimerového proteinu (o celé délce)

Nekódující segment NS2-NS5B-3' se klonuje pomocí RT-PCR ve vektoru pCR®3 (Invitrogen) za použití RNA extrahované ze séra

infikovaného jedince virem HCV genotypem 1b (poskytnutého Dr. Bernardem Willemsem, Hôpital St-Luc, Montreal, Québec, Canada). DNA oblast NS3-NS4A se nejprve klonuje pomocí PCR ve vektoru exprese baculoviru pFastBac™HTa (Gibco/BRL). Vektorová sekvence obsahuje oblast kódující 28-zbytek N-terminální sekvenci o 28 zbytcích se značkou z 6 histidinů. Systém exprese baciloviru Bac-to-Bac™ (Gibco/BRL) se použije k přípravě rekombinantního baculoviru. Heterodimerový zralý protein NS3 a NS4A o plné délce (His-NS3-NS4AFL) se exprimuje 0,1-0,2 násobnou infekcí 10^6 Sf21 buněk / ml rekombinantním bacilovirem při teplotě 27°C. Infikovaná kultura buněk se sklidí po 48 až 64 hodinách odstředěním při teplotě 4°C.

Buněčná peleta se homogenizuje v 50 mM roztoku $NaPO_4$ o pH 7,5, 40%hmotnostně objemových glycerolu a 2 mM roztoku β-merkapto-etanolu za přítomnosti směsi proteázových inhibitorů. His-NS3-NS4AFL se z buněčného lyzátu extrahuje za použití 1,5%NP-40, 0,5% TritonX100, 0,5M chloridu sodného a DNázy. Po odstředění ultracentrifugou se rozpustný extrakt čtyřnásobně zředí a absorbuje na chelatační kolonu Pharmacia Hi-Trap Ni- , kde se His-NS3-NS4AFL eluuje ve více než 90% formě (podle SDS-PAGE) gradientem 50 až 400 mM roztoku imidazolu. Tento produkt, His-NS3-NS4AFL se uskladní při teplotě –80°C v 50 mM roztoku fosfátu sodného o pH 7,5, 10% (hmotnostně/objemových) glycerolu, 0,5 M roztoku chloridu sodného, 0,25 M roztoku imidazolu, 0,1 % NP-40. Produkt se před použitím rozmrazí na ledu a zředí.

Aktivita proteázy His-NS3-NS4AFL se sleduje v 50 mM roztoku Tris-HCl o pH 8,0, 0,25 M roztoku citrátu sodného, 0,01% (hmotnostně/objemových) n-dodecyl-β-D-maltosidu a 1 mM roztoku TCEP. Roztok 1,5 nM His-NS3-NS4AFL se 45 minut inkubuje při teplotě 23°C s 5 μM roztokem vnitřně zhašeného substrátu antranilyl-DDIVPAbu[C(O)-O]-AMY(3-NO_2)TW-OH za přítomnosti různých

koncentrací inhibitoru. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 5,25%. Reakce se ukončí přidáním 1M roztoku MES o pH 5,8. Fluorescence N-terminálu produktu se odečítá florimetrem Perkin-Elmer LS-50B vybaveném čtečkou plotny s 96 prohlubněmi (vlnová délka excitačního záření: 325 nm, vlnová délka emisního záření: 423 nm). Výsledky experimentu s různými koncentracemi inhibitoru byly proloženy nelineární křivkou na základě Hillova modelu a byla určena IC_{50} (koncentrace vedoucí k 50% inhibici) za použití SAS softwarového programu (Statistical Software System, SAS Institute, Inc. Cary, N. C.).

Příklad 39

Sledování účinku NS3 proteázy v buňkách

Sledování se provede na linii lidských buněk získaných z hepatomu označovaných jako Huh-7. Do buněk byly současně transfekcí zavedeny 2 DNA systémy:

1. systém exprimující polyprotein obsahující nestrukturální proteiny viru HCV ve fúzi s tTA v následujícím pořadí: NS3-NS4A-NS4B-NS5A-tTA (označovaný jako NS3),
2. systém exprimující reporterový protein, sekreční alkalickou fosfatázu, pod kontrolou tTA (označovaný jako SEAP).

K uvolnění dokonalých proteinů se polyprotein musí štěpit NS3 proteázou. Po uvolnění zralých proteinů se předpokládá, že virové proteiny vytvoří komplex na membráně endoplazmatického retikula, zatímco tTA migruje do jádra a změní aktivitu SEAP genu. Z toho vyplývá, že by snížení NS3 proteolytické aktivity mělo vést ke snížení hladiny zralého tTA a k průvodnímu snížení SEAP aktivity.

Ke kontrole ostatních účinků sloučenin se provede paralelní transfekce, kde se systém exprimující samotný tTA (označovaný tTA)

současně transfektuje systémem SEAP tak, aby aktivita SEAP byla nezávislá na NS3 proteolytické aktivitě.

Protokol postupu zkoušky:

Buňky Huh-7 se pěstují na CHO-SFMII + 10% FCS (fetální telecí sérum), transfektují se buď NS3 a SEAP nebo tTA a SEAP za použití protokolu FuGen (Boehringer Mannheim). Po 5 hodinách při teplotě 37°C se buňky promyjí, natráví trypsinem se a umístí na plotnu s 96 prohlubněmi (80 000 buněk / prohlubeň) obsahující různé koncentrace zkoumaných sloučenin. Po 24 hodinách inkubace se podíl živného prostředí oddělí a aktivita SEAP v tomto podílu se měří pomocí kitu Phosfa-Light (Tropix).

Výpočet procent inhibice SEAP aktivity v závislosti na koncentraci sloučeniny se provede SAS softwarovým programem, kterým se vypočítá hodnota EC_{50}.

Toxický účinek sloučeniny (TC_{50}) se následně hodnotí zkouškou MTT: 20 µl MTT roztoku (5 mg/ ml živného prostředí) se přidá do každé prohlubně a 4 hodiny se inkubuje při teplotě 37°C, živné prostředí se odstraní a přidá se 50 µl 0,01 N roztoku kyseliny chlorovodíkové + 10% Triton X-100. Směs se protřepává nejméně 1 hodinu při teplotě místnosti, absorbance každé prohlubně se odečítá při vlnové délce 595 nm.

Hodnota TC_{50} se vypočítá podle stejného postupu jako při výpočtu EC_{50}.

Příklad 40

Stanovení specifity sloučenin

Specifita zkoumaných sloučenin se stanoví porovnáním jejich účinku na několik proteáz: lidskou leukocytární elastázu, prasečí pankreatickou elastázu a hovězí pankreatický α-chymotrypsin a na jednu cysteinovou proteázou: lidským jaterním katepsinem B. Ve všech případech se použije postup s plotnou s 96 prohlubněmi za použití kolorimetrického p-nitroanilinového (pNA) substrátu specifického pro každý enzym. Každá série se předem inkubuje 1 hodinu s inhibitorem enzymu při teplotě 30°C, a následně se přidá substrát. Hydrolýza se sleduje do 30% konverze čtečkou mikroploten UV Thermomax®. Koncentrace substrátu se udržuje na nejnižší možné hodnotě vzhledem k K_M k zamezení kompetice se substrátem. Koncentrace sloučenin se pohybuje od 300 do 0,06 μM v závislosti na jejich účinnosti.

Podmínky každé zkoušky:

50 mM Tris-HCl o pH 8, 0,5 M síranu sodného, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA, 3% DMSO, 0,01 % Tween-20 s,

[100 μM Succ-AAPF-pNA a 250 pM α-chymotrypsin], [133 μM Succ-AAA-pNA a 8 nM prasečí elastázy], [133 μM Succ-AAV-pNA a 8 nM leukocytární elastázy], nebo

[100 mM hydrogenfosforečnanu sodného o pH 6, 0,1 mM EDTA, 3% DMSO, 1mM TCEP, 0,01% Tween-20, 30 μM Z-FR-pNA a 5 nM katepsin B (enzym v zásobním roztoku se před použitím aktivuje v pufru obsahujícím 20 mM TCEP)].

Znázorňující příklad užití prasečí pankreatické elastázy:

Na polystyrénovou plotnu s plochým dnem a s 96 prohlubněmi se za použití pipetovacího automatu Biomek (Beckman) přidá:

* 40 µl pufru pro zkoušku (50 mM Tris-HCl o pH 8, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA),

* 20 µl roztoku enzymu (50 mM Tris-HCl o pH 8, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA, 0,02% Tween-20, 40 nM prasečí pankreatické elastázy) a

* 20 µl roztoku inhibitoru (50 mM Tris-HCl o pH 8, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA, 0,02% Tween-20, 1,5 mM - 0,3 µM inhibitoru, 15% objemových DMSO).

Po 60 minutách předběžné inkubace při teplotě 30°C se do každé prohlubně přidá 20 µl roztoku substrátu (50 mM Tris/HCl o pH 8, 0,5 M síranu sodného, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA, 665 µM Succ-AAA-pNA) a reakční směs se dále inkubuje 60 minut při teplotě 30°C. Hodnota absorbance se odečítá na čtečkou destiček UV Thermomax®. Na několik řad prohlubní se umístí kontrolní vzorky (bez inhibitoru) a slepé vzorky (bez inhibitoru a bez enzymu).

Následné dvojnásobné zředění roztoku inhibitoru se provede na separované plotně pipetovacím automatem za použití 50 mM Tris-HCl o pH 8, 50 mM chloridu sodného, 0,1 mM EDTA, 0,02% Tween-20, 15% DMSO. Všechny ostatní stanovení specifity se provedou obdobným způsobem.

Procenta inhibice se vypočítají za použití rovnice:

$$[1-((UV_{inh}-UV_{slep}) / (UV_{kontr}-UV_{slep}))] \times 100$$

Výsledky experimentu s různými koncentracemi inhibitoru byly proloženy nelineární křivkou na základě Hillova modelu a byla určena IC_{50} (koncentrace vedoucí k 50% inhibici) za použití SAS softwarového programu (Statistical Software System, SAS Institute, Inc. Cary, N. C.).

27.04.01

Tabulky sloučenin

Sloučeniny podle současného vynálezu se podrobily stanovením podle příkladů 37 a 38. Míra jejich účinku byla rozdělena do skupin podle hodnoty IC_{50}: skupina A – hodnota IC nižší než 50 μM,

skupina B – hodnota IC nižší než 5 μM,

skupina C – hodnota IC nižší než 0,5 μM,

Aktivita v buňkách a specifita zkoumaných sloučenin:

Reprezentativní sloučeniny podle současného vynálezu se sledují zkouškou podle příkladu 39 a jednou nebo více zkouškami příkladu 40. Například sloučenina 601 tabulky 6 má podle zkoušky příkladu 37 hodnotu IC_{50} = 50 nM a 30 nM podle zkoušky příkladu 38. Hodnota EC_{50} = 8,2 μM se určí zkouškou podle příkladu 39. Stanovením specifity podle v příkladu 40 se získají následující hodnoty pro uvedenou sloučeninu: HLE > 75 μM, PPE > 75 μM, α-chym. > 75 μM, kat.B > 75 μM.

Uvedené výsledky potvrzují, že tato skupina sloučenin je vysoce specifická pro NS3 proteázu.

Seznam uvedený v tabulkách znázorňuje vlastnosti sloučenin podle současného vynálezu.

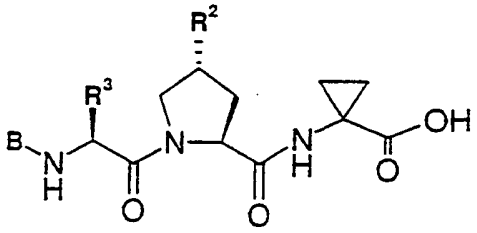
Použité zkratky:

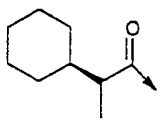
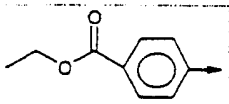
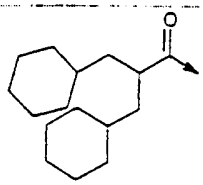
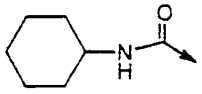
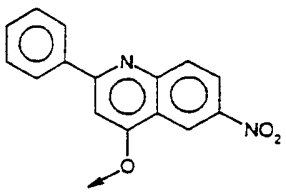
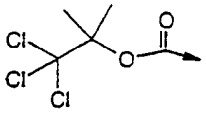
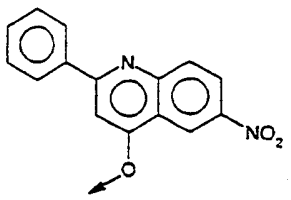
MS	výsledky hmotnostní spektrometrie,
Ac	acetyl,
Bn	benzyl,
Boc	terc-butyloxykarbonyl,
cHex	cyklohexyl,

Chg	cyklohexyl-glycin (2-amino-2-cyklohexyl-octová kyselina),
iPr	izopropyl,
O-Bn	benzyloxy,
Ph	fenyl,
t-Bu	terc.-butyl,
Tbg	terc.-butylglycin,
1- nebo 2 Np	1- nebo 2-naftyl,
1-nebo 2-NpCH_2O	1- nebo 2-naftylmetoxy.

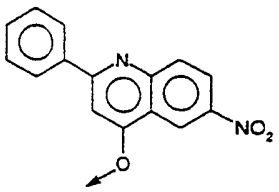
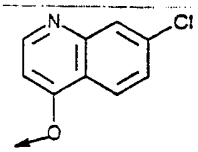
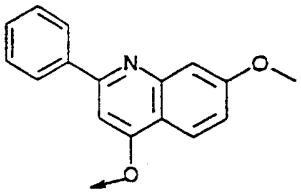
27.04.01

Tabulka 1

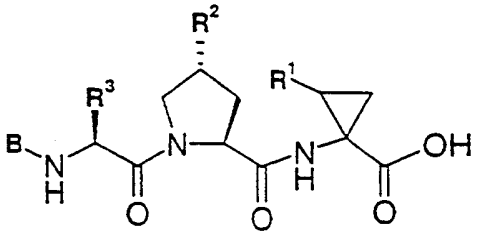


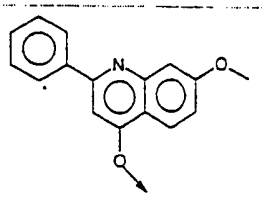
Tab 1 slouč. č.	B	R_3	R_2	MS	účinnost
101	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl	594	*A*
102		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	632	*A*
103		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	642	*A*
104		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	728	*A*
105		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	619	*A*
106	Boc	cHex		702	*B*
107		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	720 M+Na^+	*A*
108	Boc	iPr		662	*A*

27.04.01

Tab 1 slouč. č.	B	R_3	R_2	MS	účinnost
109	acetyl	cHex		644	***A***
110	Boc	*i-Pr*		575.1	***A***
111	Boc	*t*-Bu		661.3	***C***

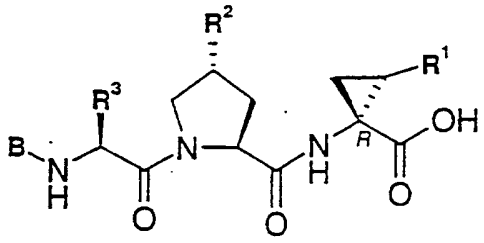
Tabulka 2

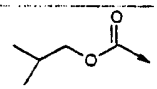
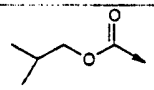
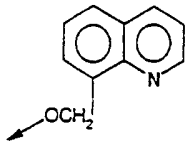
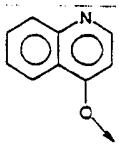
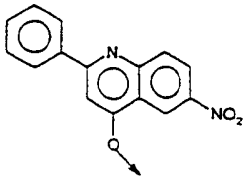
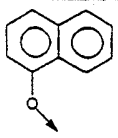
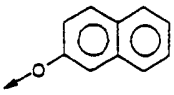
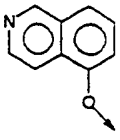


Tab 2 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *anti* ke- karboxylu	MS	účinnost
201	Boc	cyklohexyl	-O-CH_2-1-naftyl	etyl (jeden izomer)	622	***A***
202	Boc	cyklohexyl	-O-CH_2-1-naftyl	etyl (jiný izomer)	622	***A***
203	Boc	*t*-Bu		vinyl *1R, 2R*	687.5	***C***

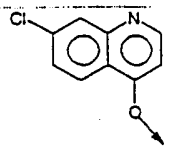
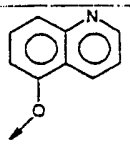
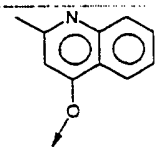
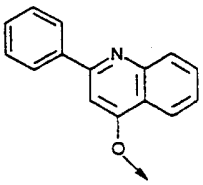
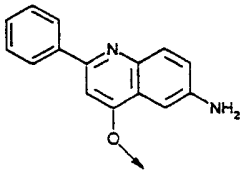
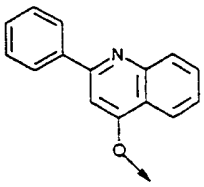
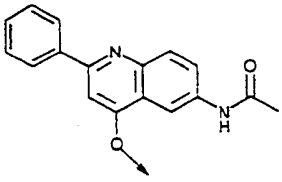
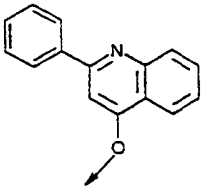
27.04.01

Tabulka 3

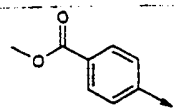
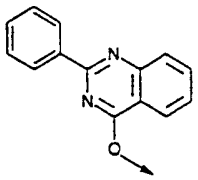
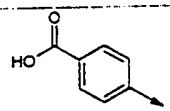
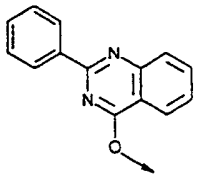
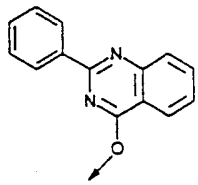
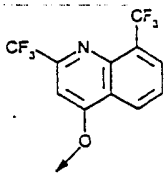
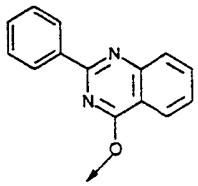
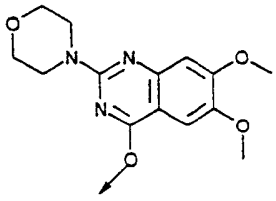
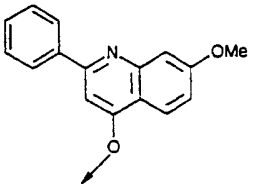
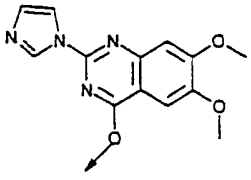


Tab 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	MS	účinnost
301	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl	622	*A*
302		iPr	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl	582	*A*
303		cHex	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl	622	*A*
304	Boc	cHex		ethyl	623	*A*
305	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl	vinyl	620	*B*
306	Boc	cHex		vinyl	607	*B*
307	Boc	cHex		vinyl	728	*C*
308	Boc	cHex		vinyl	606	*B*
309	Boc	cHex		vinyl	606	*B*
310	Boc	cHex		vinyl	607	*B*

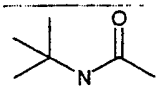
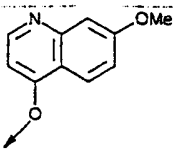
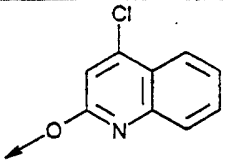
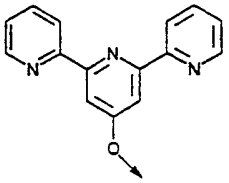
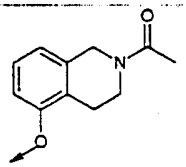
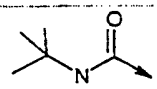
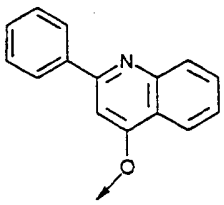
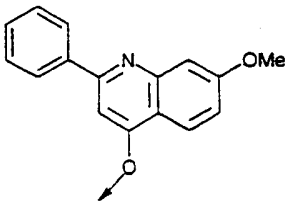
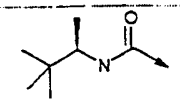
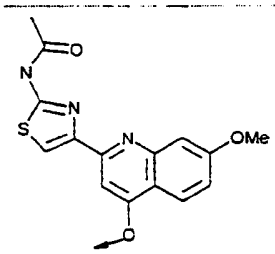
27.04.01

Tab. 3 sloučenina č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	MS	účinnost
311	Boc	cHex		vinyl	641	*B*
312	Boc	cHex		vinyl	607	*A*
313	Boc	cHex		vinyl	621	*B*
314	Boc	cHex		vinyl	683	*C*
315	Boc	cHex		vinyl	698	*B*
316	Acetyl	cHex		vinyl	625	*B*
317	Boc	cHex		vinyl	740	*C*
318	CF_3-C(O)-	*i-Pr*		vinyl	639.3	*B*

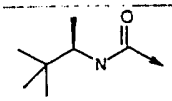
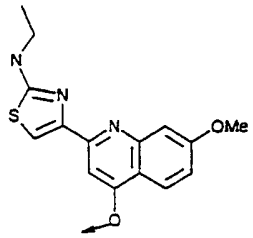
27-04-01

Table 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	MS	účinnost
319		cHex		vinyl	732.3	*C*
320		cHex		vinyl	704.3	*B*
321	Boc	*t*-Bu		vinyl	658.7	*C*
322	Boc	*t*-Bu		vinyl	717.6	*B*
323	Boc	*t*-Bu			672.4	*B*
324	Boc	*t*-Bu		vinyl	727.5	*C*
325	Boc	*t*-Bu			701.4	*C*
326	Boc	*t*-Bu		vinyl	708.3	*C*

27.04.01

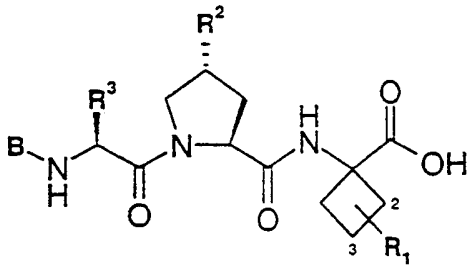
Tab 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	MS	účinnost
327		*t*-Bu		vinyl	610.3	*C*
328	Boc	*t*-Bu		vinyl	615.3	*B*
329	Boc	*t*-Bu		vinyl	685.3	*C*
330	Boc	*t*-Bu		vinyl	627.5	*A*
331		*t*-Bu		vinyl	656.5	*C*
332	Boc	*t*-Bu		ethyl	689.3	*C*
333		*t*-Bu		vinyl	778.3	*C*

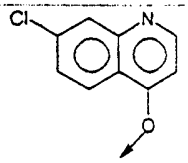
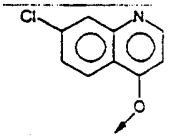
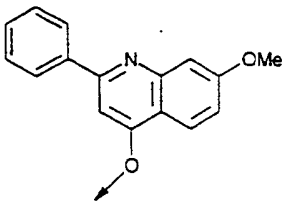
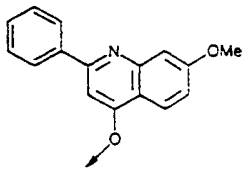
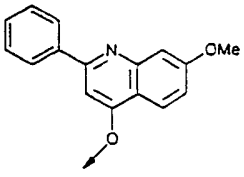
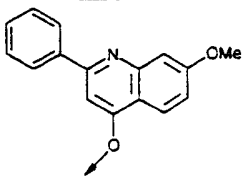
27.04.01

Tab. 3 slouč. č	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	MS	účinnost
334		*t-Bu*		vinyl	764.4	***C***

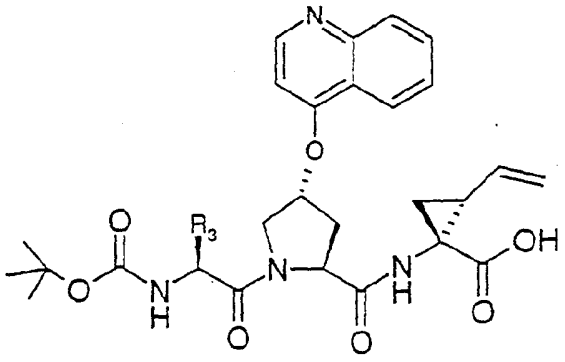
27.04.01

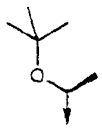
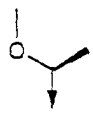
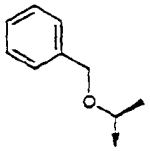
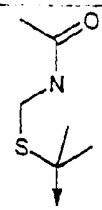
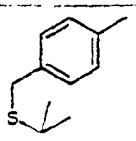
Tabulka 4



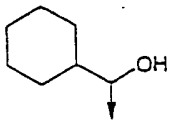
Tab 4 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1	MS	účinnost
401	Boc	*i*-Pr		H	589.1	***A***
402	Boc	*t*-Bu		H	603.6	***A***
403	Boc	*t*-Bu		H	675.4	***C***
404	Boc	*t*-Bu		3-(=CH_2)	687.1	***B***
405	Boc	*t*-Bu		2-vinyl	702.3	***C***
406	Boc	*t*-Bu		2-Et	703.3	***C***

Tabulka 5

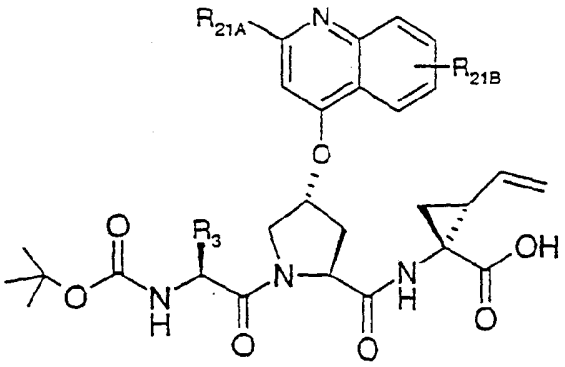


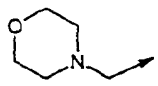
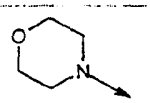
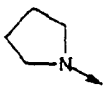
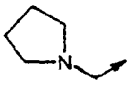
Tab 5 sloučenina č.	R_3	MS	účinnost
501	*t-Bu*	581.3	***C***
502	*H*	539.2	***A***
503		625.3	***B***
504		582.6	***B***
505		583.2	***B***
506		659.2	***B***
507		670.2	***B***
508		703.3	***B***

27.04.01

Tab 5 sloučenina č.	R_3	MS	účinnost
509		581.3	C
510		581.2	C
511		637.2	B

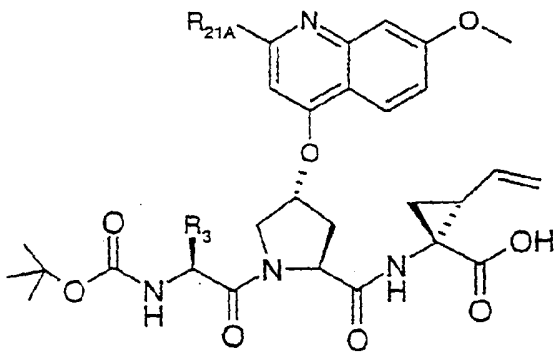
Tabulka 6

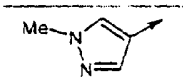
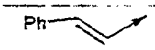
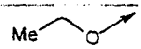
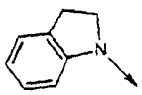
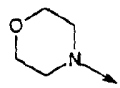
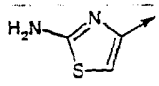
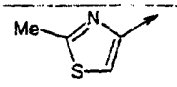


Tab 6 slouč. č.	R_3	R_{21A}	R_{21B}	MS	účinnost
601	*i*-Pr	Ph	7-OMe	673.3	***C***
602	*t-Bu*	Ph	8-OMe, 7-OMe	717.2	***C***
603	*i-Pr*	Ph	7-ethyl	671.2	***C***
604	*t-Bu*	--	7-OMe	611.2	***C***
605	*t-Bu*	Ph	7-O-*i*Pr	715.3	***C***
606	*t*-Bu	--	7-Cl	615.2	***C***
607	*i*Pr	--	7-Cl	601.2	***C***
608	CH_2-*i*Pr	--	7-Cl	615.3	***B***
609	*t*-Bu		--	680.2	***B***
610	*t*-Bu	Cl	--	613.3	***C***
611	*t*-Bu	Ph	7-$N(Me)_2$	700.5	***C***
612	*t*-Bu		--	666.4	***C***
613	*t*-Bu		--	650.4	***B***
614	*t*-Bu		--	664.5	***B***
615	*t*-Bu	--	7-$N(Me)_2$	624.5	***C***

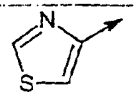
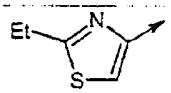
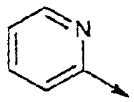
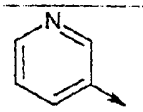
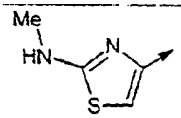
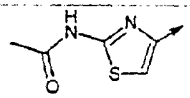
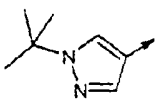
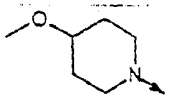
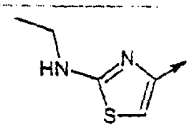
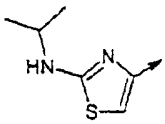
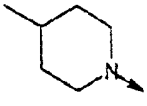
27.04.01

Tabulka 7

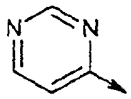
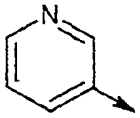
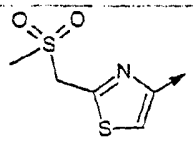
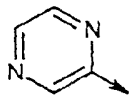
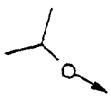
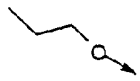
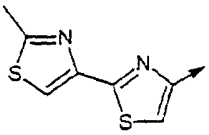
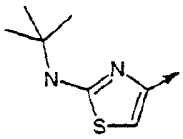
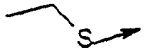
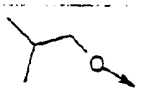


Tab 7 slouč. č.	R_3	R_{21A}	MS	účinnost
701	*t*-Bu		691.3	*C*
702	*t*-Bu		713.4	*C*
703	*t*-Bu		655.3	*C*
704	*t*-Bu		728.4	*C*
705	*t*-Bu		696.4	*C*
706	*t*-Bu		693.3	*C*
707	*t*-Bu		694.3	*C*
708	*t*-Bu	Ph-N(Me)-	716.4	*C*
709	*t*-Bu		709.2	*C*
710	*t*-Bu	HOOC-	655.3	*B*
711	*t*-Bu		708.2	*C*
712	*t*-Bu	$(Me)_2N$-	654.3	*C*

27-04-01

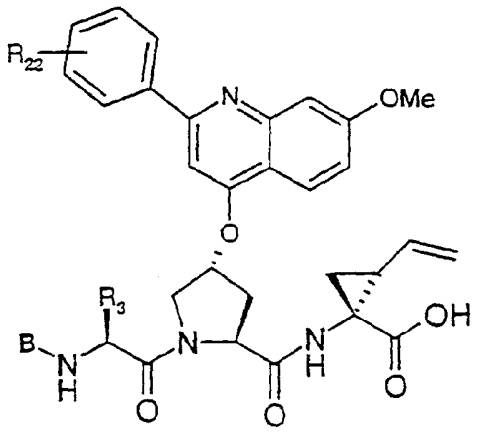
Tab 7 slouč. č.	R_3	R_{21A}	MS	účinnost
713	*t*-Bu		692.3 $(M-H)^-$	C
714	*t*-Bu		722.3	C
715	*t*-Bu		688.3	C
716	*t*-Bu		688.3	C
717	*t*-Bu		723.3	C
718	*t*-Bu	NH_2	626.3	C
719	*t*-Bu		751.2	C
720	*t*-Bu		733.4	C
721	*t*-Bu		724.1	C
722	*t*-Bu		737.3	C
723	*t*-Bu		751.4	C
724	*t*-Bu		708.4	C

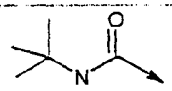
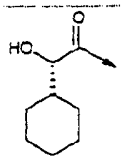
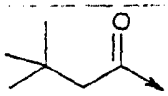
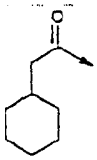
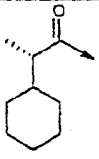
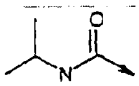
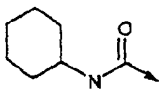
27.04.01

Tab 7 slouč. č.	R_3	R_{21A}	MS	účinnost
725	*t-Bu*		689.4	*C*
726	*t*-Bu	*i*-Pr	653.3	*C*
727	*t*-Bu		688.3	*C*
728	*t*-Bu		786.1	*C*
729	*t*-Bu		689.3	*C*
730	*t*-Bu		669.2	*C*
731	*t*-Bu		669.2	*C*
732	*t*-Bu		791.0	*C*
733	*t*-Bu		765.3	*C*
734	*t-Bu*		671.3	*C*
735	*t*-Bu		683.3	*C*
736	*t*-Bu	*t*-Bu	667.4	*C*
737	*t*-Bu	CHex	693.4	*C*

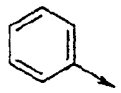
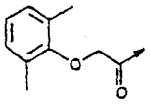
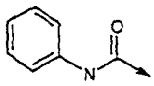
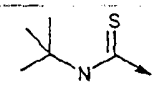
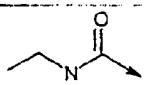
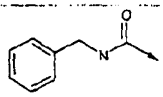
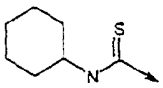
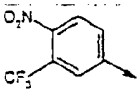
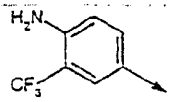
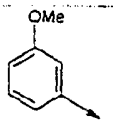
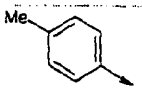
27.04.01

Tabulka 8

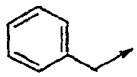
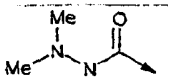
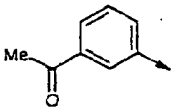
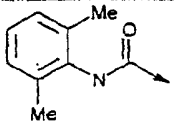
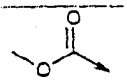
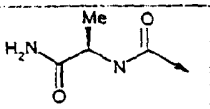
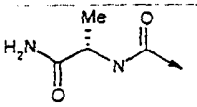
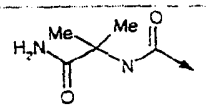
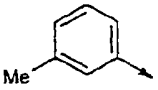
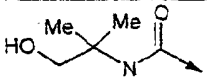
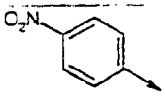
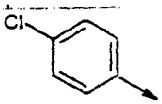
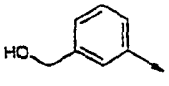


Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
801		*t*-Bu	–	686.7	*C*
802		*t*-Bu	–	727.7	*C*
803		*t*-Bu	–	685.7	*C*
804		*t*-Bu	–	711.7	*C*
805	Ac	*t*-Bu	–	629.6	*C*
806		*t*-Bu	–	725.7	*C*
807		*t*-Bu	–	672.4	*C*
808		*t*-Bu	–	712.4	*C*

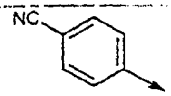
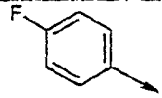
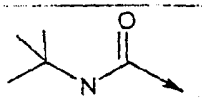
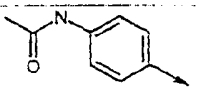
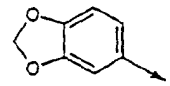
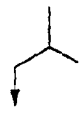
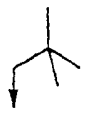
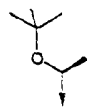
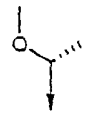
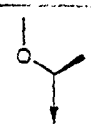
27.04.01

Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
809		*i*-Pr	--	649.3	*C*
810		*t*-Bu	--	749.3	*C*
811	Boc	*t*-Bu	4-Cl	721.3	*C*
812		*t*-Bu	--	706.2	*C*
813		*t*-Bu	--	702.2	*C*
814	Boc	*t*-Bu	2-Cl	721.3	*C*
815	Boc	*t*-Bu	3-Cl	721.3	*C*
816		*t*-Bu	--	658.3	*C*
817		*t*-Bu	--	720.2	*C*
818		*t*-Bu	--	728.3	*C*
819		*i*-Pr	--	762.3	*C*
820		*i*-Pr	--	732.2	*C*
821		*i*-Pr	--	679.1	*C*
822		*i*-Pr	--	663.3	*C*
823	Boc	*t*-Bu	2-OMe	717.2	*C*
824	Boc	*t*-Bu	3-OMe	719.2	*C*
825	Boc	*t*-Bu	4-OMe	719.2	*C*

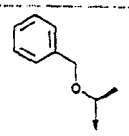
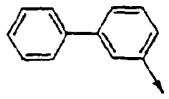
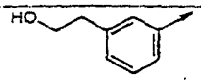
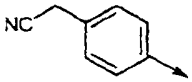
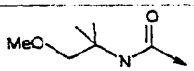
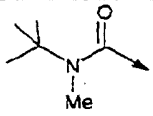
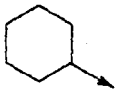
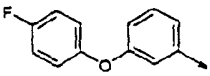
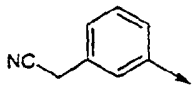
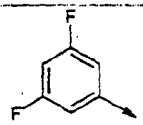
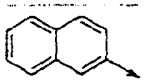
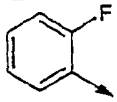
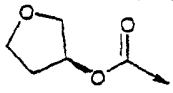
27.04.01

Tab . 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
826		*i*-Pr	–	663.3	*B*
827		*t*-Bu	–	673.2	*C*
828		*i*-Pr	–	691.3	*C*
829		*t*-Bu	–	734.3	*C*
830		*t*-Bu	–	645.3	*C*
831		*t*-Bu	–	701.3	*C*
832		*t*-Bu	–	801.3	*C*
833		*t*-Bu	–	715.2	*C*
834		*i*-Pr	–	663.3	*C*
835		*t*-Bu	–	702.5	*C*
836		*i*-Pr	–	694.4	*C*
837		*i*-Pr	–	683.3	*C*
838		*i*-Pr	–	679.1	*C*

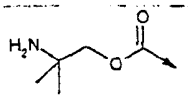
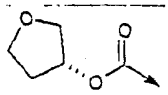
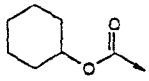
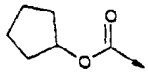
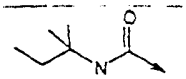
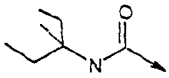
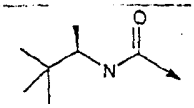
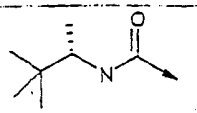
27-04-01

Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
839		*i*-Pr	--	674.5	C
840		*i*-Pr	--	667.4	C
841	Boc	*t*-Bu	2-Me	701.5	C
842	Boc	*t*-Bu	3-Me	701.5	C
843	Boc	*t*-Bu	4-Me	701.5	C
844		*t*-Bu	4-OMe	716.6	C
845		*i*-Pr	--	706.9	C
846		*i*-Pr	--	693.4	C
847	Boc	cHex	--	713.4	C
848	Boc		--	687.5	C
849	Boc		--	701.5	C
850	Boc		--	731.5	C
851	Boc		--	689.5	C
852	Boc		--	689.5	C

27.04.01

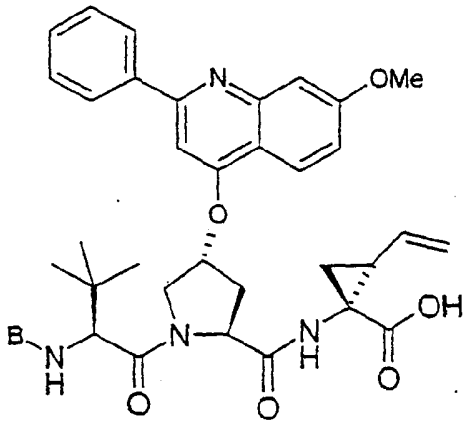
Tab. 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
853	Boc		--	765.5	C
854		*i*-Pr	--	723.4 $(M-H)^+$	C
855		*i*-Pr	--	693.3	C
856		*i*-Pr	--	688.3	C
857		*t*-Bu	--	716.4	C
858		*t*-Bu	--	700.4	C
859		*i*-Pr	--	655.4	B
860		*i*-Pr	--	759.3	C
861		*i*-Pr	--	688.3	C
862		*i*-Pr	--	685.3	C
863		*i*-Pr	--	699.4	C
864		*i*-Pr	--	667.3	C
865		*t*-Bu	--	701.4	C

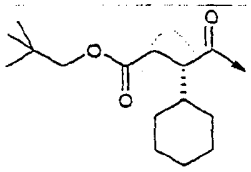
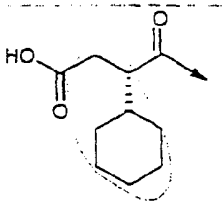
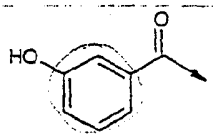
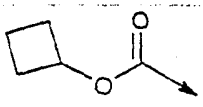
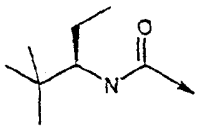
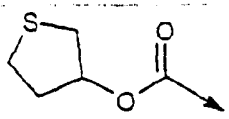
27-04-01

Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	MS	účinnost
866		t-Bu	--	702.4	C
867		t-Bu	--	701.3	C
868		t-Bu	--	713.3	C
869		t-Bu	--	699.4	C
870		t-Bu	--	700.4	C
871		t-Bu	--	714.3	C
872		t-Bu	--	714.4	C
873		t-Bu	--	714.3	C

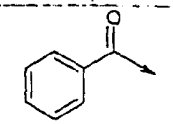
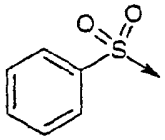
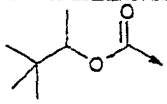
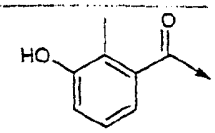
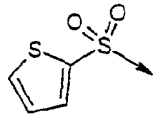
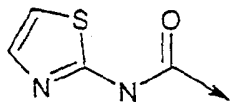
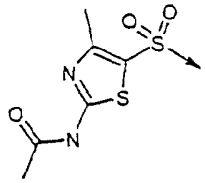
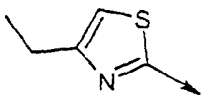
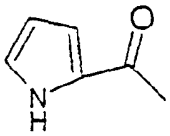
27.04.01

Tabulka 9



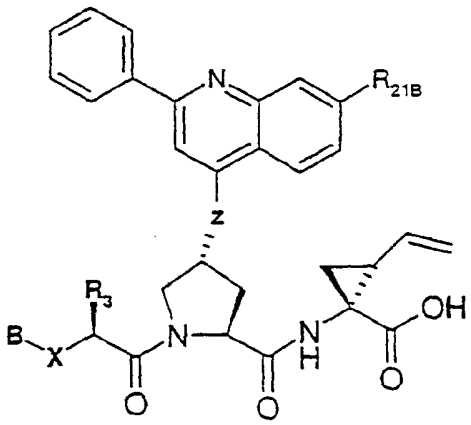
Tab 9 slouč. č.	B	MS	účinnost
901	Boc	685.3	C
902		825.4	C
903		769.3	C
904		707.3	C
905		685.2	C
906		728.2	C
907		717.2	C

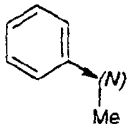
27.04.01

Tab. 9 slouč. č.	B	MS	účinnost
908		691.2	C
909		727.2	C
910		715.3	C
911		721.3	C
912		733.2	C
913		713.3	C
914		805.3	C
915		692.2	C
916		680.3	C

27.04.01

Tabulka 10

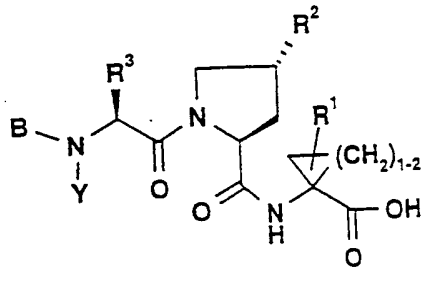


Tab. 10 slouč. č.	B-X-	R_3	Z	R_{21B}	MS	účinnost
1001	Ph-N(Me)-	*i*-Pr	O	H	663.3	***C***
1002	Boc-NH-	*t*-Bu	S	OMe	703.4	***C***
1003		*i*-Pr	O	---	663.3	***C***

27.04.01
PV 2001-541

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina obecného vzorce I, její racemáty, diastereoizomery a optické izomery:



(I)

kde **B** je atom vodíku, C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16} aralkyl; heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem; C_{1-6}alkoxy, C_{1-6} alkanoyl, hydroxyskupina, hydroxy-alkylová skupina, atom halogenu, haloalkyl, nitroskupina, kyanoskupina, kyano-alkylová skupina, aminoskupina eventuálně substituovaná C_{1-6}alkylem; amidoskupina nebo (nižší alkyl)-amidoskupina nebo

B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)-, karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-, amidoskupina vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-, thio-amidoskupina vzorce R_4-N(R_5)-C(S)- nebo sulfonyl vzorce R_4-SO_2,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

ii/ C_{3-7} cykloalkyl, C_{3-7}cykloalkoxy nebo C_{4-10}alkyl-cykloalkyl, vždy eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylovou skupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-

substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

iii/ aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupina nebo (nižší alkyl)-amidoskupina nebo

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaná C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

R_5 je atom vodíku nebo C_{1-6}alkyl;

za předpokladu, že pokud R_4 je amidoskupina nebo thioamid, pak R_4 je shora uvedený zbytek kromě ii/ cykloalkoxy;

a

Y je atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl;

R^3 je C_{1-8}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}thioalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou, C_6 nebo C_{10} arylem nebo C_{7-16} aralkylem,

R_2 je CH_2-R_{20}, NH-R_{20}, O-R_{20} nebo S-R_{20},

kde R_{20} je nasycený nebo nenasycený C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} (alkylcykloalkyl), vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituovaný R_{21} nebo

R_{20} je C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-14} aralkyl, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituované R_{21} nebo

R_{20} je heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně mono-, di-nebo tri-substituované R_{21},

kde každé R_{21} je nezávisle C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, sulfonyl, nitroskupina, hydroxyskupina, merkaptoskupina, atom halogenu, haloalkyl, aminoskupina eventuálně mono-nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-14}aralkyl, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het; amidoskupina eventuálně mono- substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-14} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het; karboxylová skupina, karboxy-(nižší alkyl), C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, sulfonylová skupina, (nižší alkyl)-sulfonylová skupina, nitroskupina, hydroxyskupina, merkaptoskupina, atom halogenu, haloalkyl, karboxylová skupina, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem,

R^1 je atom vodíku, C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{2-6}alkenyl nebo C_{2-6} alkinyl, vždy eventuálně substituovaný atomem halogenu

nebo jejich farmaceuticky vhodné soli nebo estery.

2. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

B je heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem.

3. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je R_4-SO_2 a kde R_4 je C_{1-6}alkyl, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14}aralkyl nebo heterocyklus, všechny eventuálně substituované C_{1-6} alkylem.

4. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je acylový derivát vzorce R_4-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem,

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem.

5. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je karboxyl vzorce R_4-O-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6} alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou.

6. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3} alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší

alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem

a

R_5 je atom vodíku nebo metyl.

7. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde B je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)-, kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6} alkanoylem nebo C_{1-6}alkoxy,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou nebo amidoskupinou.

8. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 2, kde B je C_6 nebo C_{10} aryl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, atomem halogenu, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem.

9. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 2, kde B je především heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, atomem halogenu, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem.

10. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 4, kde B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxy,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou nebo

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou.

11. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 5, kde **B** je karboxylový zbytek vzorce R_4-O-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy nebo amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii) C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem,

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono-substituovanou C_{1-6}alkylem.

12. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 6, kde **B** je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší

alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou

a

R_5 je atom vodíku

13. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 7, kde **B** je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10}alkyl nebo

ii/ C_{3-7}cykloalkyl.

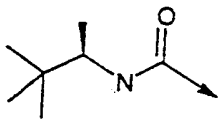
14. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 12, **B** je amid vzorce R_4-NH-C(O)- a kde R_4 je:

i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou.

15. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **B** je terc.-butoxy-karbonyl (Boc) nebo sloučeniny vzorce:

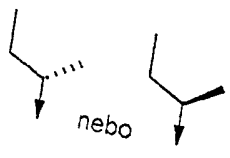


16. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde **Y** je atom vodíku nebo metyl.

17. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 16, kde **Y** je atom vodíku.

18. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde R^3 je C_{1-8}alkyl, C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}thio-alkylem, acetamidoskupinou, C_6 nebo C_{10}arylem nebo C_{7-16} aralkylem.

19. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 18, kde R^3 je vedlejší řetězec terc.-butylglycinu (Tbg) , Ile, Val, Chg nebo:



20. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku ..., kde R^3 je vedlejší řetězec Tbg, Chg nebo Val.

27.04.01

21. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde R^2 je S-R_{20} nebo O-R_{20} a

kde R_{20} je C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16} aralkyl, heterocyklus nebo -CH_2-Het, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri- substituované R_{21},

kde R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, aminoskupina nebo amidoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6} alkylem, C_6 nebo C_{10} arylem, C_{7-16} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-heterocyklem; nitroskupina, hydroxyskupina, atom halogenu, trifluormetyl, karboxylová skupina, C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16}aralkyl nebo heterocyklus, shora uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, sulfonylalkyl, nitroskupina, hydroxyskupina, atom halogenu, trifluormetyl, karboxylová skupina nebo heterocyklus.

22. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 21, kde R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl nebo heterocyklus, shora uvedený aryl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22} a

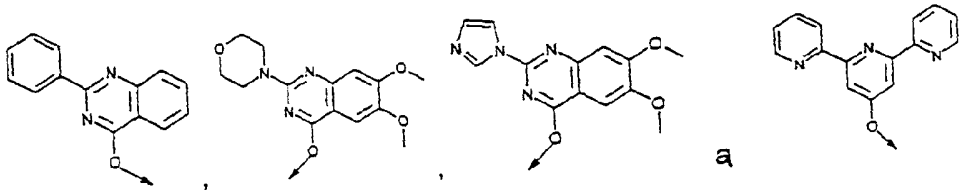
kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina, amidoskupina, (nižší alkyl)-amid, atom halogenu, trifluormetyl nebo heterocyklus.

23. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 22, kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, atom halogenu, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná nižším alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus.

27.04.01

24. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 23, kde R_{22} je metyl, etyl, izopropyl, terc.butyl, metoxy, atom chlóru, aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná nižším alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo (nižší alkyl)-2-thiazol.

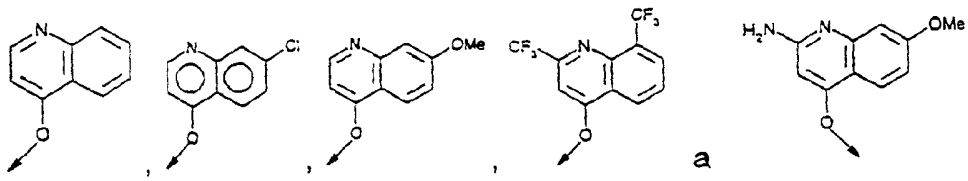
25. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 21, kde R_2 je jedna z následujících skupin:



26. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 21, kde R_2 je 1-naftylmetoxy-, 2-naftylmetoxy-, benzyloxy-, 1-naftyloxy-, 2-naftyloxy- nebo chinolinoxy- nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21}, který je definován nárokem 21.

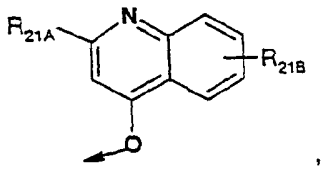
27. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 26, R_2 je 1-naftylmetoxy- nebo chinolinoxy, nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21}, který je určen nárokem 26.

28. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 27, kde R_2 je jedna z následujících skupin:



27.04.01

29. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 26, kde R_2 je:



, kde R_{21A} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, atom halogenu (chlór), aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem, dále C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16}aralkyl nebo heterocyklus, uvedený aryl, arylalkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

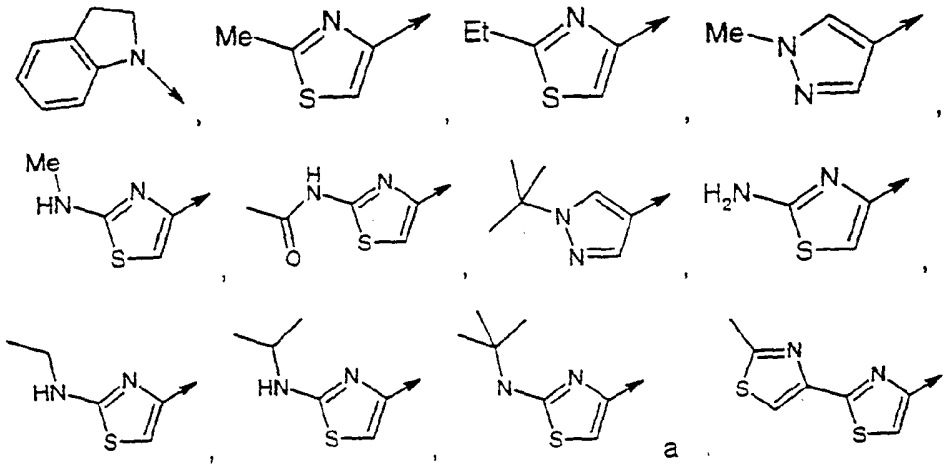
kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus,

R_{21B} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, nitroskupina, hydroxyskupina, atom halogenu, trifluormetyl nebo karboxyl.

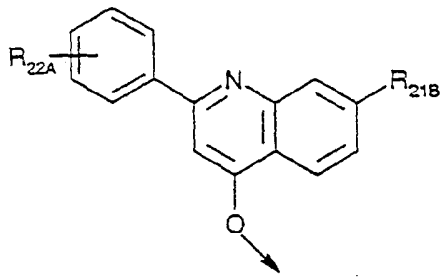
30. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 29, kde R_{21A} je C_6, C_{10}aryl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný R_{22}, které je určeno nárokem 30.

31. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 30, kde R_2 je jedna z následujících skupin:

27.04.01



32. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 29, kde R_2 je:

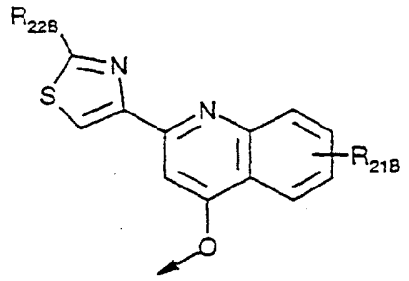


, kde R_{22A} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy nebo atom halogenu a

R_{21B} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl nebo karboxyl.

27.04.01

33. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 29, kde R_2 je:



, kde R_{22B} je C_{1-6}alkyl, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6} alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina a

R_{21B} je C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl nebo karboxyl.

34. Sloučenina obecného vzorce I podle nároků 32 nebo 33, kde R_{21B} je C_{1-6}alkoxy nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina.

35. Sloučenina obecného vzorce I podle nároků 32 nebo 33, kde R_{21B} je metoxy.

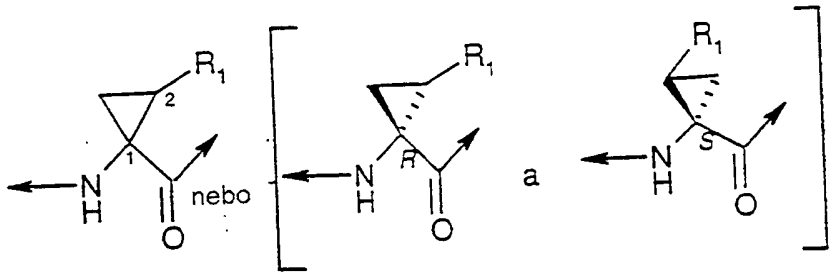
36. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde P1 je cyklopropylový nebo cyklobutylový kruh substituovaný R_1, kde
R^1 je atom vodíku, C_{1-3}alkyl, C_{3-5}cykloalkyl nebo C_{2-4}alkenyl eventuálně substituovaný halogenem.

37. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 36, kde P1 je cyklopropylový kruh a kde R^1 je etyl, vinyl, cyklopropyl, 1- nebo 2-brom-etyl nebo 1- nebo 2-brom-vinyl.

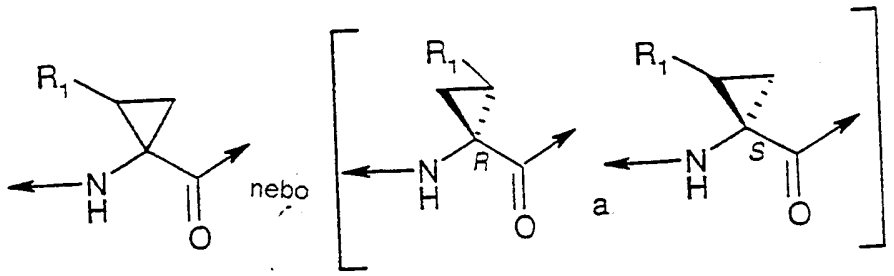
38. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 37, kde R_1 je vinyl.

27.04.01

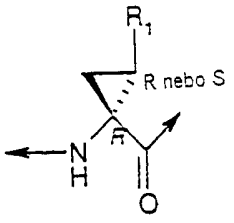
39. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 37, kde R_1 na uhlíku 2 je orientováno do *syn* vzhledem ke karbonylu na pozici 1 a zbytek je charakterizován následujícím vzorcem:



40. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 37, kde R_1 na uhlíku 2 je orientováno do *anti* vzhledem ke karbonylu na pozici 1 a zbytek je charakterizován následujícím vzorcem:

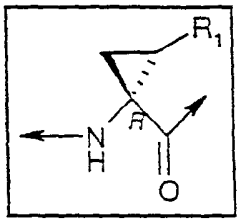


41. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 37, kde atom uhlíku 1 má R konfiguraci:



27.04.01

42. Optický izomer sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 41, kde uvedený substituent R_1 a karbonyl jsou v *syn* orientaci, charakterizovaný následující absolutní konfigurací:



43. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 42, kde R_1 je etyl a atomy uhlíku na pozici 1 a 2 mají R,R konfiguraci.

44. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 42, kde R_1 je vinyl a atomy uhlíku na pozici 1 a 2 mají R,S konfiguraci.

45. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde B je C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16} aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je R_4-SO_2,

kde R_4 je amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6} alkylem nebo

B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem,

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem;

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo

B je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkyl-cykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem;

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-3} alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem

a

R_5 je především atom vodíku nebo metyl nebo

B je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6} alkanoylem nebo C_{1-6}alkoxy,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6} alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou nebo amidoskupinou,

Y je atom vodíku nebo metyl,

R_3 je C_{1-8} alkyl, C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10} alkyl-cykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}thioalkylem, acetamidoskupinou, C_6 nebo C_{10}arylem nebo C_{7-16} aralkylem,

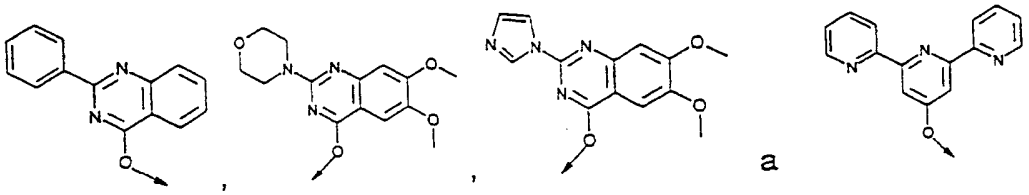
R_2 je S-R_{20} nebo O-R_{20} ,

kde R_{20} je C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16}aralkyl, Het nebo -CH_2-Het, vždy eventuálně mono-, di- nebo tri-substituované R_{21},

kde R_{21} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, aminoskupina nebo amidoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6}alkylem, C_6 nebo C_{10}arylem, C_{7-16} aralkylem, heterocyklem nebo (nižší alkyl)-Het, dále nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina, C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-16} aralkyl nebo heterocyklus, uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný pomocí R_{22}, kde

R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{3-7}cykloalkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)-amid, sulfonylalkyl, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl, karboxylová skupina nebo heterocyklus nebo

R_2 je jedna z následujících skupin:

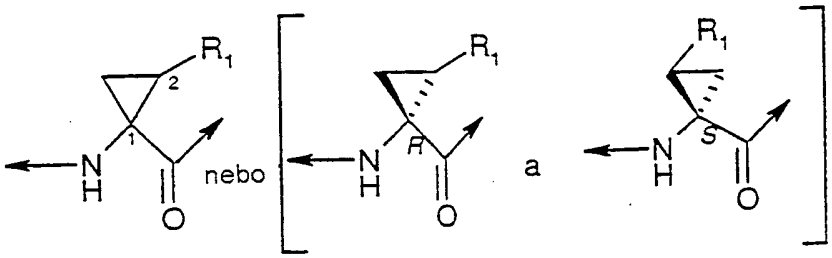


nebo R_2 je 1-naftylmetoxy-, 2-naftylmetoxy-, benzyloxy-, 1-naftyloxy-, 2-naftyloxy- nebo chinolinoxy- nesubstituovaný, mono- nebo di-substituovaný R_{21}, který je shora definovaný a

P1 segment je cyklopropylový kruh substituovaný R_1, kde

R^1 je atom vodíku, C_{1-3}alkyl, C_{3-5}cykloalkyl nebo C_{2-4}alkenyl eventuálně substituovaný halogenem

a zároveň R_1 na atomu uhlíku v pozici 2 je *syn* vzhledem ke karbonylu v pozici 1:



nebo její farmaceuticky vhodná sůl nebo ester.

46. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 45, kde **B** je C_6 nebo C_{10}aryl, eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, hydroxyalkylem, halogenem, haloalkylem, nitroskupinou, kyanoskupinou, kyanoalkylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6} alkylem nebo

B je heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, C_{1-6}alkoxy, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, halogenem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

B je R_4-SO_2,

kde R_4 je C_6 nebo C_{10}aryl, C_{7-14} aralkyl nebo heterocyklus, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6} alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)aminoskupina nebo

B je acylový derivát vzorce R_4-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10}alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, hydroxyskupinou nebo C_{1-6}alkoxyskupinou,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo C_{4-10}alkyl-cykloalkyl, oba eventuálně substituované hydroxyskupinou, karboxylovou skupinou, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem,

iv/ C_6 nebo C_{10} aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou,

v/ heterocyklus eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou

nebo

B je karboxyl vzorce R_4-O-C(O)-,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy nebo amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7}cykloalkyl, C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)-amidem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6}alkylem nebo

v/ heterocyklus nebo (nižší alkyl)-Het, oba eventuálně substituované C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou eventuálně mono-substituovanou C_{1-6}alkylem

nebo B je amid vzorce R_4-N(R_5)-C(O)-

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem,

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iii) aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-3} alkylem;

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl, vždy eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou, nebo aminoskupinou eventuálně substituovanou C_{1-6} alkylem

nebo

v/ heterocyklus substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, aminoskupinou nebo amidoskupinou

a R_5 je především atom vodíku nebo metyl

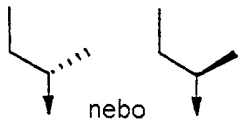
nebo **B** je thioamid vzorce R_4-NH-C(S)- ,

kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl nebo

ii/ C_{3-7}cykloalkyl nebo

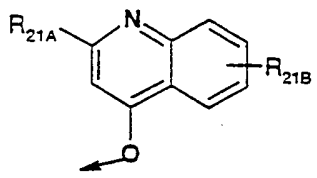
Y je atom vodíku,

R_3 je vedlejší řetězec terc-butylglycinu (Tbg), Ile, Val, Chg nebo:



R_2 je 1-naftylmetoxy nebo chinolinoxy nesubstituovaný, mono- nebo di- substituovaný R_{21} (shora uvedený) nebo

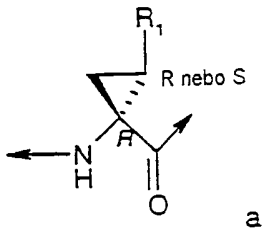
R_2 je:



, kde R_{21A} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, C_6, C_{10}aryl nebo heterocyklus, nižší thioalkyl, halogen, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem, dále C_6 nebo C_{10} aryl, C_{7-16} arylalkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

kde R_{22} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6} alkoxy, aminoskupina eventuálně mono- nebo di- substituovaná C_{1-6}alkylem, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina nebo heterocyklus,

P1 je cyklopropylový kruh, kde atom v pozici 1 má R konfiguraci,



a

a R^1 je etyl, vinyl, cyklopropyl, 1- nebo 2-brom-etyl nebo 1- nebo 2-brom-vinyl.

47. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 46, kde

B je amid vzorce R_4-NH-C(O)-,

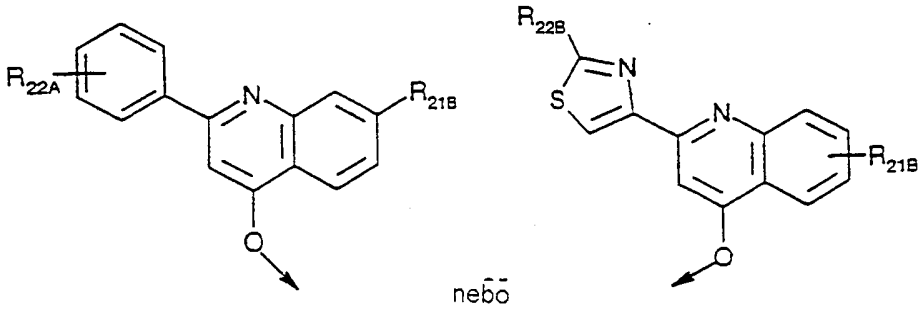
kde R_4 je i/ C_{1-10} alkyl eventuálně substituovaný karboxylem, C_{1-6}alkanoylem, hydroxyskupinou, C_{1-6}alkoxy, amidoskupinou, (nižší alkyl)-amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di-substituovanou C_{1-6}alkylem;

ii/ C_{3-7} cykloalkyl nebo C_{4-10}alkylcykloalkyl, vždy eventuálně substituovaný karboxylem, (C_{1-6}alkoxy)-karbonylem, amidoskupinou, (nižší alkyl) amidoskupinou nebo aminoskupinou eventuálně mono- nebo di- substituovanou C_{1-6}alkylem,

iv/ C_6 nebo C_{10}aryl nebo C_{7-16}aralkyl eventuálně substituovaný C_{1-6}alkylem, hydroxyskupinou, amidoskupinou nebo aminoskupinou,

R_3 je vedlejší řetězec Tbg, Chg nebo Val,

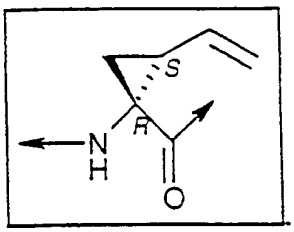
R_2 je:



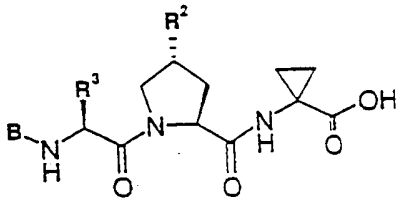
kde R_{22A} je C_{1-6} alkyl (metyl), C_{1-6} alkoxy (metoxy) nebo halogen (chlór), R_{22B} je C_{1-6} alkyl, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6} alkylem, amidoskupinou nebo (nižší alkyl)amidem a

R_{21B} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)aminoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetyl nebo karboxyl a

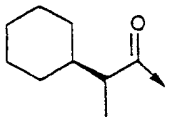
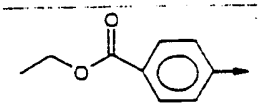
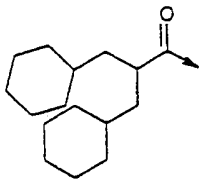
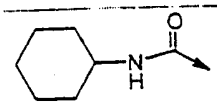
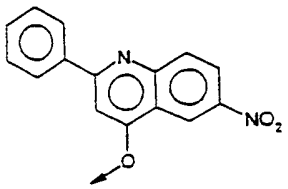
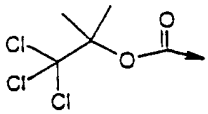
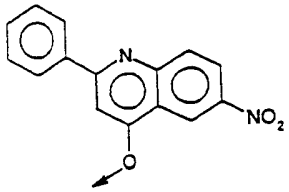
P1 je:

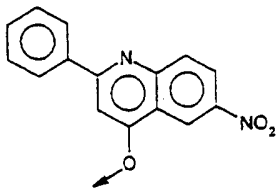
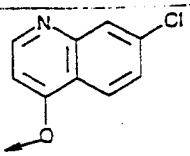
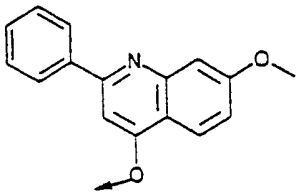


48. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:



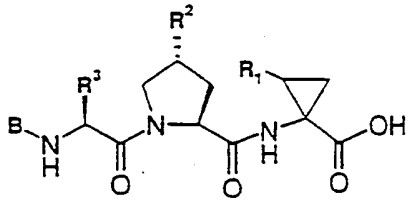
kde B, R_3, R_2 jsou následně definovány:

Tab 1 slouč. č.	B	R_3	R_2
101	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl
102		cHex	-O-CH_2-1-naftyl
103		cHex	-O-CH_2-1-naftyl
104		cHex	-O-CH_2-1-naftyl
105		cHex	-O-CH_2-1-naftyl
106	Boc	cHex	
107		cHex	-O-CH_2-1-naftyl
108	Boc	iPr	

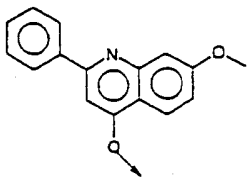
Tab 1 slouč. č.	B	R_3	R_2
109	acetyl	cHex	
110	Boc	*i-Pr*	
a 111	Boc	*t*-Bu	

49. Sloučenina **111** podle nároku 48.

50. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:

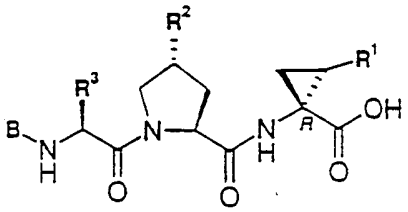


kde B, R_3, R_2 a R_1 jsou následně definovány:

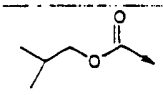
Tab. 2 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *anti* ke karboxylu
201	Boc	cyclohexyl	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl (jeden izomer)
202	Boc	cyclohexyl	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl (jiný izomer)
a 203	Boc	*t*-Bu		vinyl *1R, 2R*

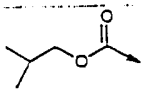
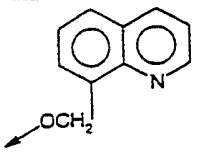
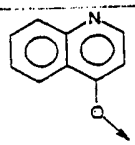
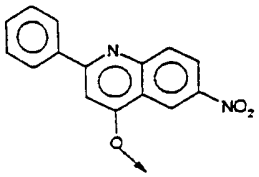
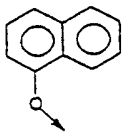
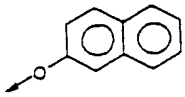
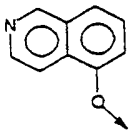
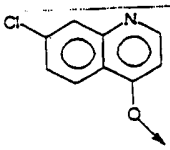
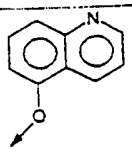
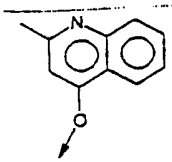
51. Sloučenina **203** podle nároku 49.

52. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:

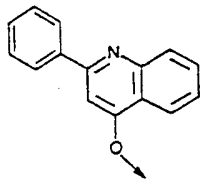
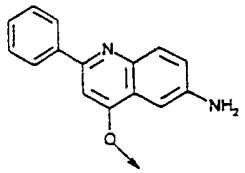
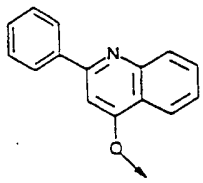
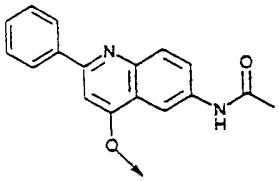
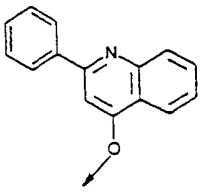
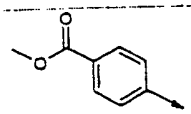
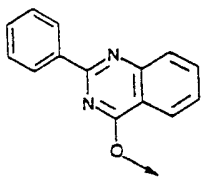
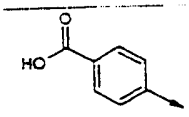
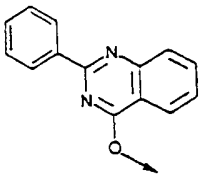
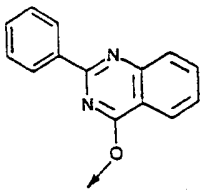


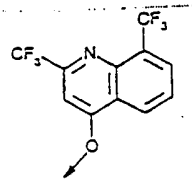
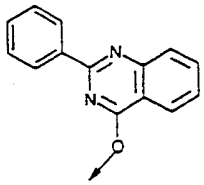
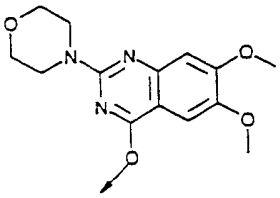
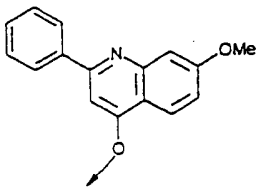
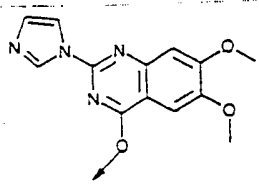
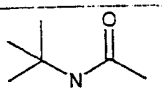
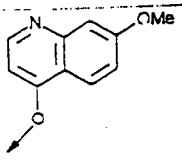
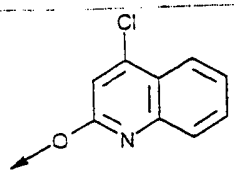
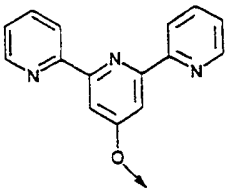
kde **B**, R_3, R_2 a R_1 jsou následně definovány:

Tab. 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu
301	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl
302		iPr	-O-CH_2-1-naftyl	ethyl

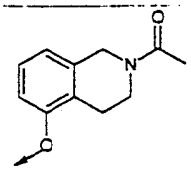
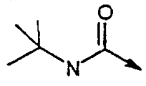
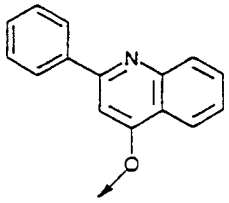
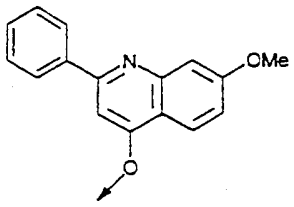
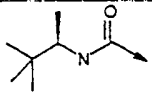
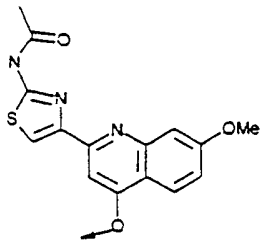
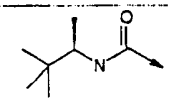
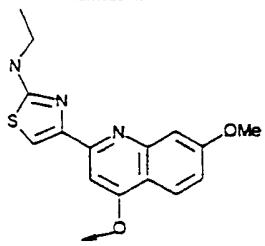
Tab. 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	
303		cHex	-O-CH_2-1-naftyl /l	ethyl	;
304	Boc	cHex		ethyl	;
305	Boc	cHex	-O-CH_2-1-naftyl /l	vinyl	;
306	Boc	cHex		vinyl	;
307	Boc	cHex		vinyl	;
308	Boc	cHex		vinyl	;
309	Boc	cHex		vinyl	;
310	Boc	cHex		vinyl	;
311	Boc	cHex		vinyl	;
312	Boc	cHex		vinyl	;
313	Boc	cHex		vinyl	;

27.04.01

Tab 3 sloučenina č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	
314	Boc	cHex		vinyl	;
315	Boc	cHex		vinyl	;
316	Acetyl	cHex		vinyl	;
317	Boc	cHex		vinyl	;
318	CF_3-C(O)-	*i-Pr*		vinyl	;
319		cHex		vinyl	;
320		cHex		vinyl	;
321	Boc	*t*-Bu		vinyl	;

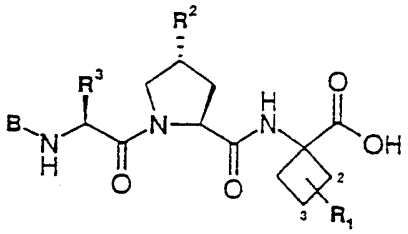
Tab 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu	
322	Boc	*t*-Bu		vinyl	;
323	Boc	*t*-Bu			;
324	Boc	*t*-Bu		vinyl	;
325	Boc	*t*-Bu			;
326	Boc	*t*-Bu		vinyl	;
327		*t*-Bu		vinyl	;
328	Boc	*t*-Bu		vinyl	;
329	Boc	*t*-Bu		vinyl	;

27.04.01

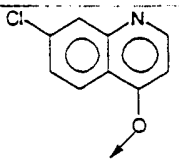
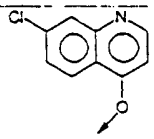
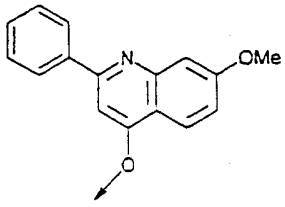
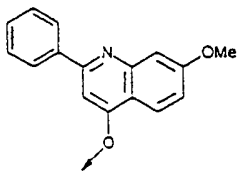
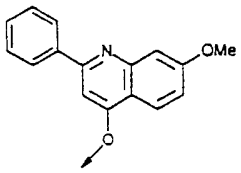
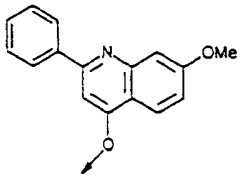
Tab 3 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1 *syn* ke karboxylu
330	Boc	*t-Bu*		vinyl
331		*t*-Bu		vinyl
332	Boc	*t*-Bu		ethyl
333		*t*-Bu		vinyl
a 334		*t-Bu*		vinyl

53. Sloučenina podle nároku 52, kterou jsou následující sloučeniny: **307, 314, 317, 319, 321, 324, 325, 326, 327, 329, 331, 332, 333 a 334.**

54. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:

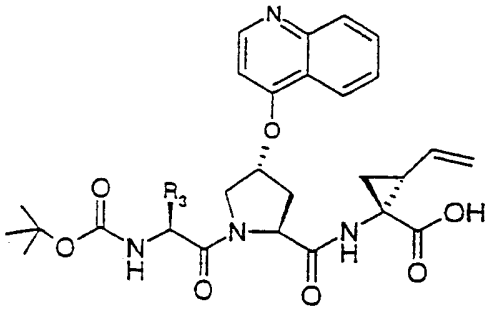


kde B, R_3, R_2 a R_1 jsou následně definovány:

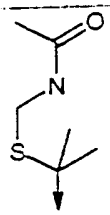
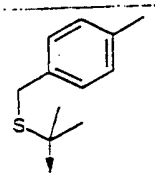
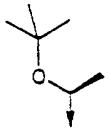
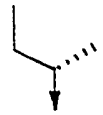
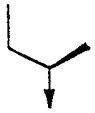
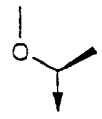
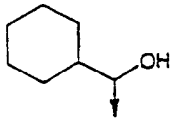
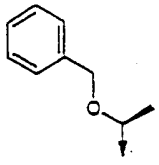
Tab 4 slouč. č.	B	R_3	R_2	R_1	
401	Boc	*i*-Pr		H	;
402	Boc	*t*-Bu		H	;
403	Boc	*t*-Bu		H	;
404	Boc	*t*-Bu		3-(=CH_2)	;
405	Boc	*t*-Bu		2-vinyl	;
a 406	Boc	*t*-Bu		2-Et	.

55. Sloučenina podle nároku 54, kterou jsou následující sloučeniny: **403**, **405** a **406**.

56. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce I:

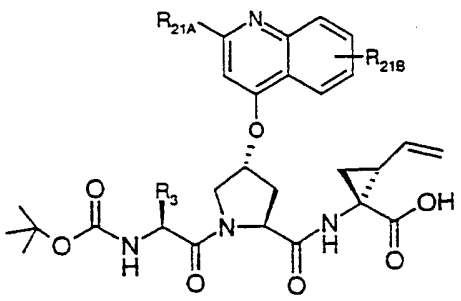


kde R_3 je:

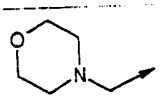
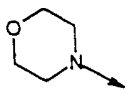
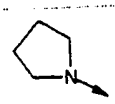
Tab 5 slouč. č.	R_3		Tab 5 slouč. č.	R_3
501	*t-Bu*	;	**507**	
502	H	;	**508**	
503		;	**509**	
504		;	**510**	
505		;	**a 511**	
506		;		

57. Sloučenina podle nároku 56, kterou je sloučenina: **501**, **509** a **510**.

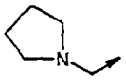
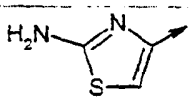
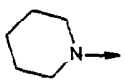
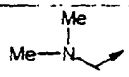
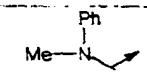
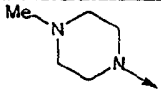
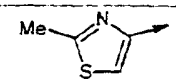
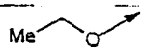
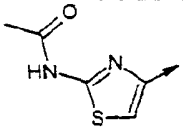
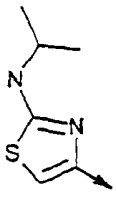
58. Sloučenina podle nároku 46 obecného vzorce I:

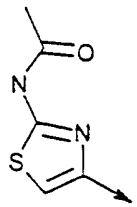


, kde R_3, R_{21A} a R_{21B} jsou:

Tab 6 slouč. č.	R_3	R_{21A}	R_{21B}
601	*i*-Pr	Ph	7-OMe
602	*t-Bu*	Ph	8-OMe, 7-OMe
603	*i-Pr*	Ph	7-ethyl
604	*t-Bu*	--	7-OMe
605	*t-Bu*	Ph	7-O-*i*Pr
606	*t*-Bu	--	7-Cl
607	*i*Pr	--	7-Cl
608	CH_2-*i*Pr	--	7-Cl
609	*t*-Bu		--
610	*t*-Bu	Cl	--
611	*t*-Bu	Ph	7-N(Me)$_2$
612	*t*-Bu		--
613	*t*-Bu		--

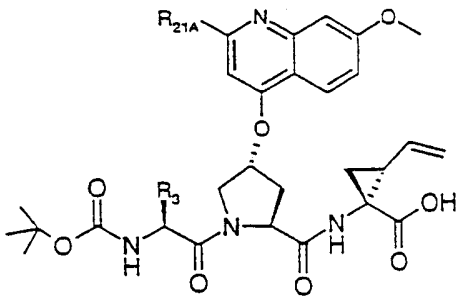
27.04.01

Tab 6 slouč. č.	R_3	R_{21A}	R_{21B}	
614	*t*-Bu		–	;
615	*t*-Bu	–	7-N(Me)$_2$	;
616	*t*-Bu		–	;
617	*t*-Bu		–	;
618	*t*-Bu		–	;
619	*t*-Bu		–	;
620	*t*-Bu		–	;
621	*t*-Bu		–	;
622	*t*-Bu		–	;
623	*t*-Bu	MeO-	–	;
624	*t*-Bu	(Me)$_2$N-	–	;
625	*t*-Bu	Ph	7-S(Me)	;
626	*t*-Bu	Ph	7-Br	;
627	*t*-Bu	Ph	7-F	;
628	*t*-Bu		7-N(Me)$_2$	;
629	*t*-Bu		7-N(Me)$_2$	;

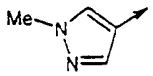
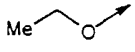
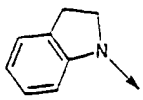
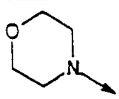
Tab 6 sloučenina č.	R_3	R_{21A}	R_{21B}
a 630	*t*-Bu		7-$N(Et)_2$

59. Sloučenina podle nároku 58, vybraná ze skupiny následujících sloučenin: **601**, **602**, **603**, **604**, **605**, **606**, **607**, **610**, **611**, **612**, **615**, **616**, **617**, **620**, **621**, **622**, **625**, **626**, **627**, **628**, **629** a **630**.

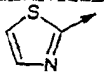
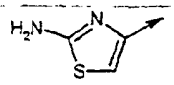
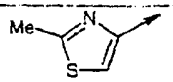
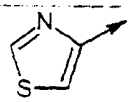
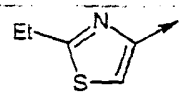
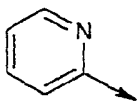
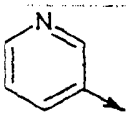
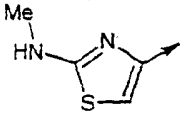
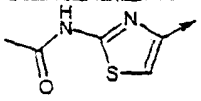
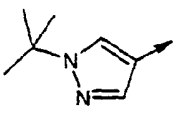
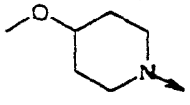
60. Sloučenina podle nároku 46 obecného vzorce:



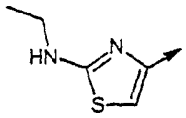
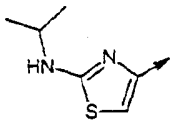
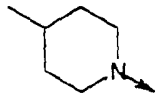
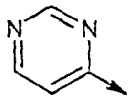
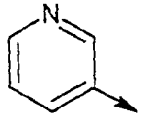
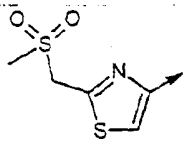
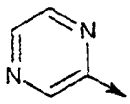
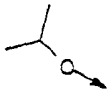
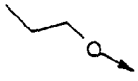
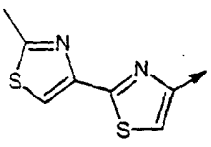
, kde R_3 a R_{21A} jsou:

Tab 7 sloučenina č.	R_3	R_{21A}	
701	*t*-Bu		;
702	*t*-Bu		;
703	*t*-Bu		;
704	*t*-Bu		;
705	*t*-Bu		;
706	*t*-Bu		;

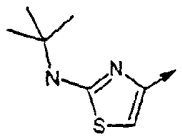
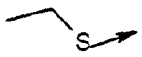
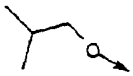
27.04.01

Tab 7 sloučenina č.	R_3	R_{21A}	
707	t-Bu		;
708	t-Bu	Ph-N(Me)-	;
709	t-Bu		;
710	t-Bu	HOOC-	;
711	t-Bu		;
712	t-Bu	$(Me)_2N$-	;
713	t-Bu		;
714	t-Bu		;
715	t-Bu		;
716	t-Bu		;
717	t-Bu		;
718	t-Bu	NH_2	;
719	t-Bu		;
720	t-Bu		;
721	t-Bu		;

27.04.01

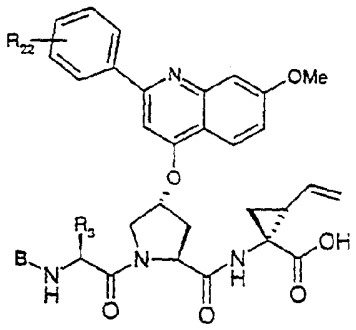
Tab 7 slouč. č.	R_3	R_{21A}	
722	*t*-Bu		;
723	*t*-Bu		;
724	*t*-Bu		;
725	*t*-Bu		;
726	*t*-Bu	*i*-Pr	;
727	*t*-Bu		;
728	*t*-Bu		;
729	*t*-Bu		;
730	*t*-Bu		;
731	*t*-Bu		;
732	*t*-Bu		;

27.04.01

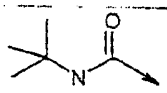
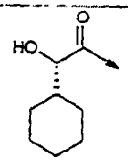
Tab 7 slouč. č.	R_3	R_{21A}	
733	*t*-Bu		;
734	*t*-Bu		;
735	*t*-Bu		;
736	*t*-Bu	*t*-Bu	;
a 737	*t*-Bu	CHex	.

61. Sloučenina podle nároku 60, vybraná ze skupiny následujících sloučenin: **701**, **702**, **703**, **704**, **705**, **706**, **707**, **708**, **709** a **711** až **737**.

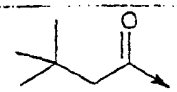
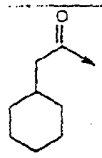
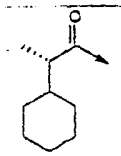
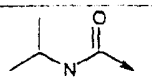
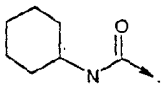
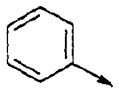
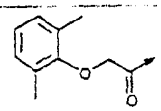
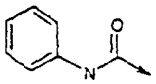
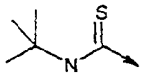
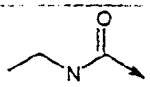
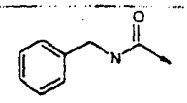
62. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:



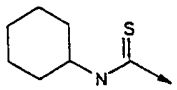
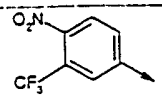
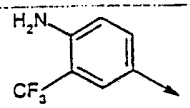
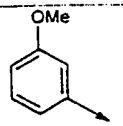
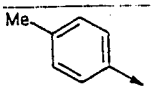
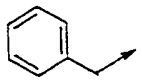
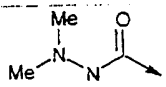
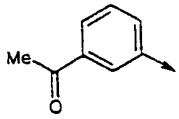
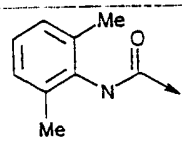
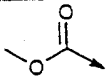
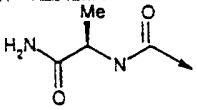
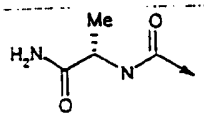
, kde **B**, R_3 a R_{22} jsou:

Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}
801		*t*-Bu	–
802		*t*-Bu	–

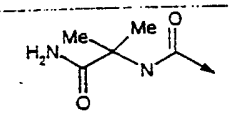
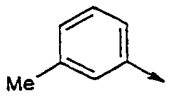
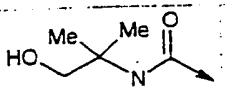
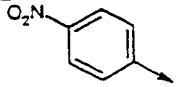
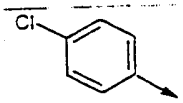
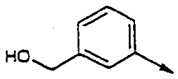
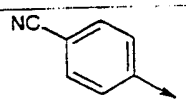
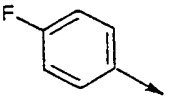
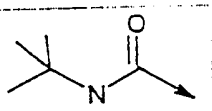
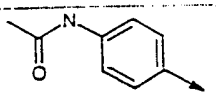
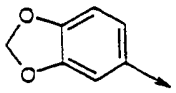
27.04.01

Tab 8 sloučenina č.	B	R_3	R_{22}	
803		*t*-Bu	–	;
804		*t*-Bu	–	;
805	Ac	*t*-Bu	–	;
806		*t*-Bu	–	;
807		*t*-Bu	–	;
808		*t*-Bu	–	;
809		*i*-Pr	–	;
810		*t*-Bu	–	;
811	Boc	*t*-Bu	4-Cl	;
812		*t*-Bu	–	;
813		*t*-Bu	–	;
814	Boc	*t*-Bu	2-Cl	;
815	Boc	*t*-Bu	3-Cl	;
816		*t*-Bu	–	;
817		*t*-Bu	–	;

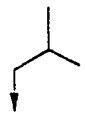
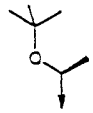
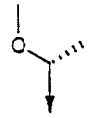
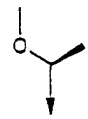
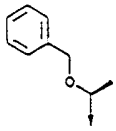
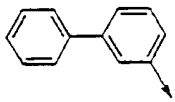
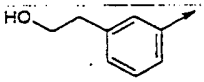
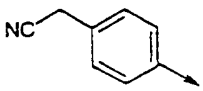
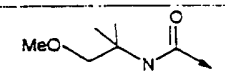
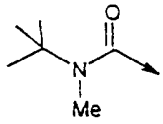
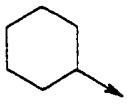
27.04.01

Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	
818		*t*-Bu	–	;
819		*i*-Pr	–	;
820		*i*-Pr	–	;
821		*i*-Pr	–	;
822		*i*-Pr	–	;
823	Boc	*t*-Bu	2-OMe	;
824	Boc	*t*-Bu	3-OMe	;
825	Boc	*t*-Bu	4-OMe	;
826		*i*-Pr	–	;
827		*t*-Bu	–	;
828		*i*-Pr	–	;
829		*t*-Bu	–	;
830		*t*-Bu	–	;
831		*t*-Bu	–	;
832		*t*-Bu	–	;

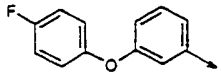
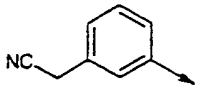
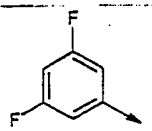
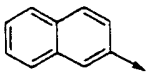
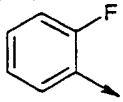
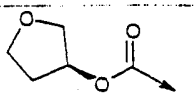
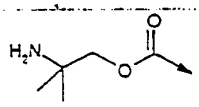
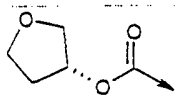
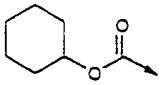
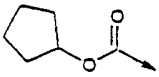
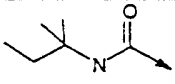
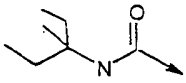
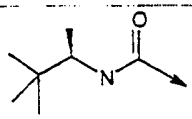
27.04.01

Tab 8 sloúč. č.	B	R_3	R_{22}	
833		*t*-Bu	--	;
834		*i*-Pr	--	;
835		*t*-Bu	--	;
836		*i*-Pr	--	;
837		*i*-Pr	--	;
838		*i*-Pr	--	;
839		*i*-Pr	--	;
840		*i*-Pr	--	;
841	Boc	*t*-Bu	2-Me	;
842	Boc	*t*-Bu	3-Me	;
843	Boc	*t*-Bu	4-Me	;
844		*t*-Bu	4-OMe	;
845		*i*-Pr	--	;
846		*i*-Pr	--	;
847	Boc	cHex	--	;

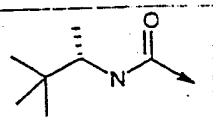
27.04.01

Tab 8 sloučenina č.	B	R_3	R_{22}	
848	Boc		–	;
849	Boc		–	;
850	Boc		–	;
851	Boc		–	;
852	Boc		–	;
853	Boc		–	;
854		i-Pr	–	;
855		i-Pr	–	;
856		i-Pr	–	;
857		t-Bu	–	;
858		t-Bu	–	;
859		i-Pr	–	;

27.04.01

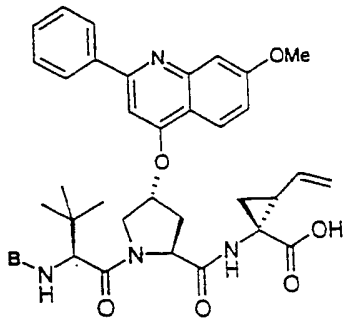
Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}	
860		*i*-Pr	–	;
861		*i*-Pr	–	;
862		*i*-Pr	–	;
863		*i*-Pr	–	;
864		*i*-Pr	–	;
865		*t*-Bu	–	;
866		*t*-Bu	–	;
867		*t*-Bu	–	;
868		*t*-Bu	–	;
869		*t*-Bu	–	;
870		*t*-Bu	–	;
871		*t*-Bu	–	;
872		*t*-Bu	–	;

27.04.01

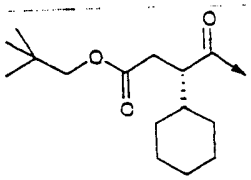
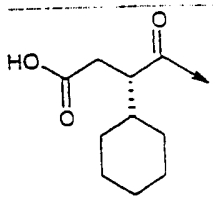
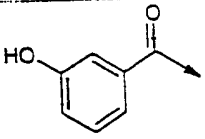
Tab 8 slouč. č.	B	R_3	R_{22}
a 873		*t*-Bu	–

63. Sloučenina podle nároku 62 vybraná ze skupiny sloučenin: **801** až **825**, **827** až **858** a **860** až **873**.

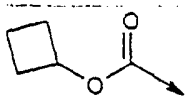
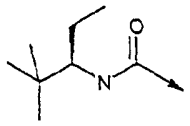
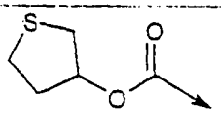
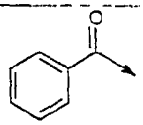
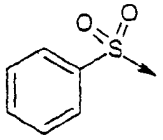
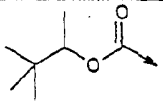
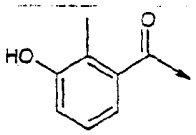
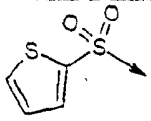
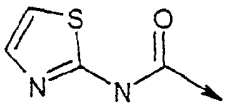
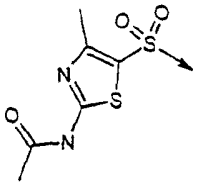
64. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:



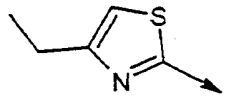
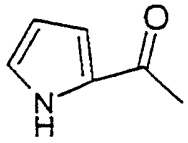
kde **B** je:

Tab 9 slouč. č.	B	
901	Boc	;
902		;
903		;
904		;

27.04.01

Tab 9 slouč. č.	B
905	
906	
907	
908	
909	
910	
911	
912	
913	
914	

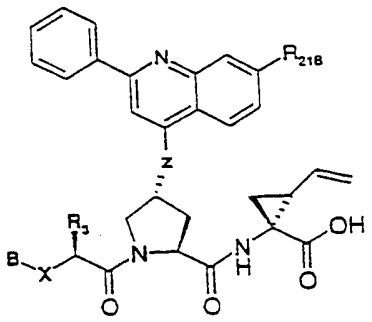
27.04.01

Tab 9 slouč. č.	B
915	
a 916	

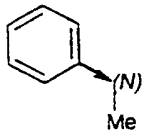
;

.

65. Sloučenina podle nároku 45 obecného vzorce:



kde **B**, **X**, R_3, z a R_{21B} jsou:

Tab 10 slouč. č.	B-X-	R_3	Z	R_{21B}
1001	Ph-N(Me)-	*i*-Pr	O	H;
1002	Boc-NH-	*t*-Bu	S	OMe;
a 1003		*i*-Pr	O	---.

66. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství sloučeniny obecného vzorce I působící proti virové hepatitidě typu C nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru ve směsi s farmaceuticky vhodným nosičem nebo pomocnou látkou.

67. Způsob terapie virové hepatitidy C savců vyznačující se tím, že se podá účinné množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 působící proti virové hepatitidě typu C nebo terapeuticky vhodné soli nebo esteru nebo shora popsaného přípravku.

68. Způsob terapie virové hepatitidy C savců vyznačující se tím, že se podá účinné množství přípravku působící proti virové hepatitidě typu C podle nároku 67.

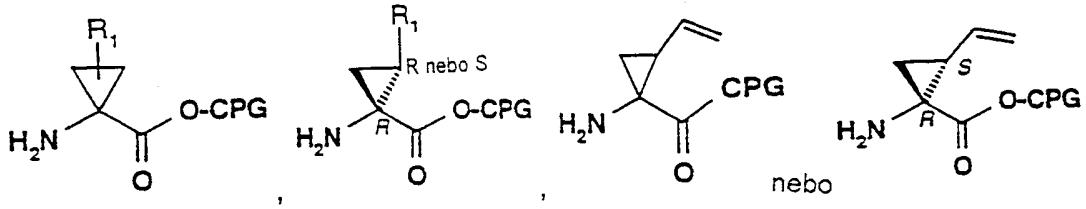
69. Způsob inhibice replikace viru způsobujícího virovou hepatitidu C vyznačující se tím, že se na virus hepatitidy C působí takovým množstvím sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, které působí inhibičně na NS3 proteázu viru způsobujícího hepatitidu C, nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru.

70. Způsob terapie virové hepatitidy C u savců vyznačující se tím, že se podá účinné množství kombinace sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 působící proti virové hepatitidě typu C nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru a jiného anti-HCV činidla.

71. Farmaceutický přípravek podle nároku 70 vyznačující se tím, že jako uvedené jiné antivirové činidlo obsahuje α- nebo β-interferon, ribavirin nebo amantadin.

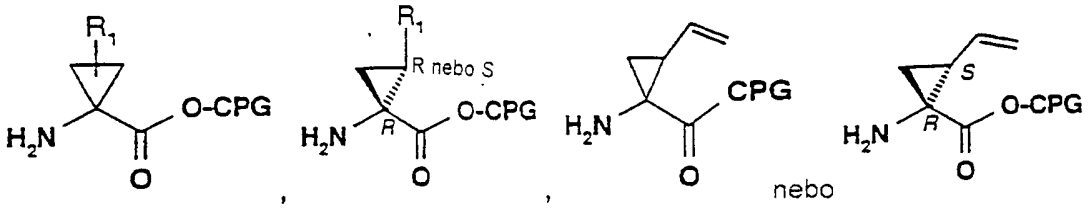
72. Farmaceutický přípravek podle nároku 70 vyznačující se tím, že jako uvedené antivirové činidlo obsahuje inhibitor ostatních životních pochodů viru HCV, především helikázy, polymerázy, metaloproteázy nebo IRES.

73. Postup přípravy peptidového analoga obecného vzorce I, kde P1 je substituovaný zbytek kyseliny aminocyklopropyl-karboxylové, vyznačující se tím, že se do vazebné reakce uvede peptid vybraný ze skupiny stávající se z: APG-P3-P2 nebo APG-P2 a meziprodukt P1 obecného vzorce:



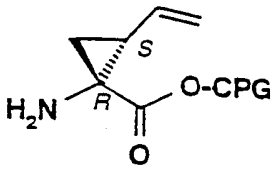
, kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl eventuálně substituovaný halogenem, CPG je ochranná skupina karboxylové skupiny a APG je ochranná skupina aminoskupiny, **P3** až **P2** jsou shora definovány.

74. Postupu přípravy: 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se uvede do vazebné reakce:
* (vhodně chráněná) aminokyselina, peptid nebo peptidový fragment a
* P1 meziprodukt vzorce:



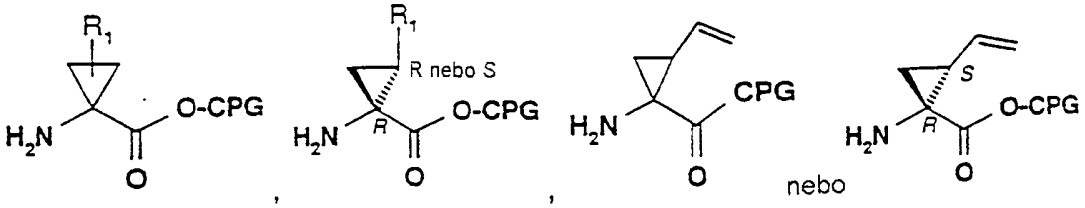
,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituované halogenem a CPG je ochranná skupina karboxylu.

75. Postup přípravy: 1) peptidového analoga inhibitoru proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se uvede do reakce:
* (vhodně chráněná) aminokyselina, peptid nebo peptidový fragment a
* meziprodukt vzorce:



,kde CPG je ochranná skupina karboxylu.

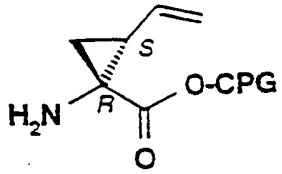
76. Použití P1 meziproduktu vzorce:



,kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituovaný halogenem, CPG je ochranná skupina karboxylu,

pro přípravu 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo 2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy.

77. Použití meziproduktu vzorce:

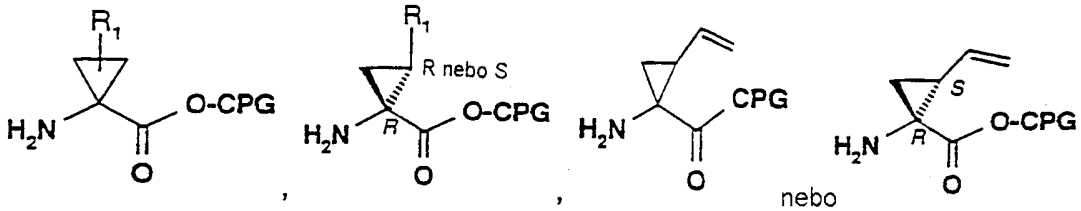


,kde CPG je ochranná skupina karboxylu,

pro přípravu: 1) peptidového analoga inhibitoru proteázy nebo

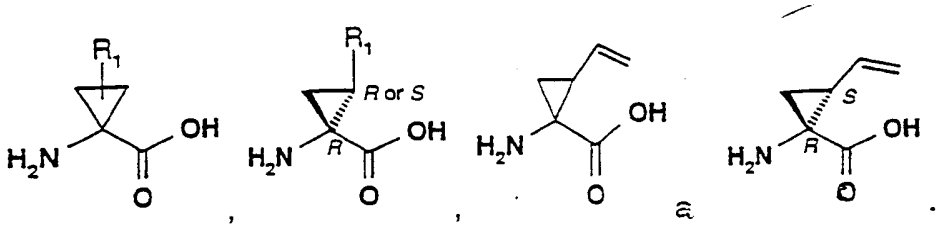
2) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy.

78. Použití P1 meziproduktu vzorce:



, kde R_1 je C_{1-6}alkyl, cykloalkyl nebo C_{2-6}alkenyl, vždy eventuálně substituovaný halogenem a CPG je ochranná skupina karboxylu, pro přípravu shora určené sloučeniny obecného vzorce I.

79. Analoga aminokyselin vybrané ze skupiny sloučenin vzorce:



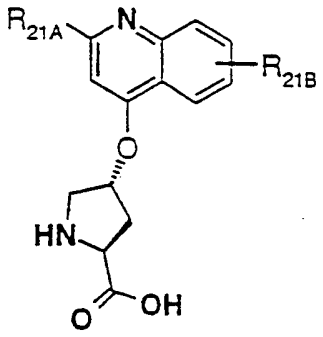
80. Postup přípravy podle nároků 73, 74 a 75 vyznačující se tím, že ochranná skupina karboxylové skupiny aminokyseliny (CPG) je vybrána z: alkylesterů, aralkylesterů a esterů odštěpitelných působením mírné zásady nebo mírného redukčního činidla.

81. Postup přípravy podle nároků 73, 74 a 75 vyznačující se tím, že ochranná skupina aminoskupiny aminokyseliny (APG) je vybrána z: acylových skupin, aromatických karbamátových skupin, alifatických karbamátových skupin, cyklických alkyl-karbamátových skupin, alkylových skupin, trialkylsilylových nebo thiol-obsahujících skupin.

82. Postup rezoluce enantiomerů ze směsi metylesteru (1R/2S)/(1S,2S)--1-amino-2-vinylcyklopropyl-karboxylové kyseliny vyznačující se tím, že se na uvedenou směs působí esterázou za vzniku odpovídajícího (1R,2S)-enantiomeru.

83. Postup rezoluce podle nároku 82 vyznačující se tím, že uvedenou esterázou je Alcalase®.

84. Použití prolinového analoga vzorce:



kde R_{21A} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, nižší thioalkyl, halogen, aminoskupina eventuálně mono-substituovaná C_{1-6}alkylem, dále C_6, C_{10} aryl, C_{7-16} aralkyl nebo heterocyklus, uvedený aryl, aralkyl nebo heterocyklus eventuálně substituovaný R_{22},

27.04.01

kde R_{22} je C_{1-6} alkyl, C_1-$_6$alkoxy, amidoskupina, (nižší alkyl)-amidoskupina, aminoskupina eventuálně mono- nebo di-substituovaná C_{1-6} alkylem nebo heterocyklus,

a kde R_{21B} je C_{1-6}alkyl, C_{1-6}alkoxy, aminoskupina, di-(nižší alkyl)-aminoskupina, (nižší alkyl)amidoskupina, nitroskupina, hydroxyskupina, halogen, trifluormetylová nebo karboxylová skupina,

pro přípravu: 1) peptidového analoga inhibitoru serinové proteázy nebo

2) peptidového analoga inhibitoru HCV NS3 proteázy nebo

3) peptidového analoga shora uvedeného obecného vzorce I.

85. Použití anti-HCV účinného množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru pro přípravu přípravku působícího terapeuticky proti virové hepatitidě typu C u savců.

86. Použití účinného množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru, které způsobí inhibici NS3 proteázy viru hepatitidy C, pro výrobu přípravku působícího inhibičně na replikaci viru hepatitidy C.

87. Použití účinného množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 působícího proti virové hepatitidě typu C nebo její terapeuticky vhodné soli nebo esteru v kombinaci s interferonem pro výrobu terapeutického přípravku k léčbě virové hepatitidy typu C u savců.