(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 973087 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 973087

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07C 237/22 (2006.01)
C07C 271/22 (2006.01)
C07C 275/28 (2006.01)
C07D 317/60 (2006.01)
C07D 213/55 (2006.01)
C07C 323/52 (2006.01)
C07D 213/75 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61K 31/36 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **18.01.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.07.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.09.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **18.01.1996 PCT/US1996/001349**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.01.1995 US 376372

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Biogen Idec MA Inc., 14 Cambridge Center, CAMBRIDGE, MA 02142, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Adams, Steven P., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Lin, Ko-Chung, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Lee, Wen-Cherng, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • Castro, Alfredo C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • Zimmerman, Craig N., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 • Hammond, Charles E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 • Liao, Yu-Sheng, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
8 • Cuervo, Julio Hernan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
9 • Singh, Juswinder, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Soluadheesion inhibiittoreita
Inhibitorer för celladhesion

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Keksintö koskee uudenlaisia yhdisteitä, jotka ovat käyttökelpoisia soluadheesion ja soluadheesiovälitteisten patologisten tilojen inhibointiin ja ehkäisyyn. Keksintö koskee myös farmaseuttisia formuloita, jotka käsittävät näitä yhdisteitä, ja menetelmiä niiden käyttämiseksi soluadheesion ja soluadheesiovälitteisten patologisten tilojen inhibointiin ja ehkäisyyn. Keksinnön mukaisia yhdisteitä ja farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää terapeuttisina tai profylaktisina aineina. Ne soveltuvat erityisen hyvin monien tulehdus- ja autoimmuunisairauksien hoitoon.
Uppfinningen avser nya föreningar, som kan användas för inhibering och prevention av celladhesion och patologiska tillstånd, som är förmedlade av celladhesion. Uppfinningen avser även farmaceutiska kompositioner, som omfattar dessa föreningar, och sätt för användning av dem för inhibering och prevention av celladhesion och patologiska tillstånd, som är förmedlade av celladhesion. Föreningarna och de farmaceutiska kompositionerna enligt uppfinningen kan användas som terapeutiska och profylaktiska medel. De är speciellt lämpliga för behandling av många inflammations- och autoimmunsjukdomar.

Soluadheesion inhibiittoreita

Ristiviittaus sukulaishakemuksiin

Tämä on osittain jatkoa US-patenttihakemukselle sarjanumero 08/376 372, joka on jätetty 23. tammikuuta 1995 ja on nyt käsiteltävänä.

Keksinnön tekniikan ala

Tämä keksintö koskee uusia yhdisteitä, jotka ovat käyttökelpoisia soluadheesion ja soluadheesiovälitteisten patologisten tilojen inhibointiin ja ehkäisyyn. Tämä keksintö koskee myös farmaseuttisia formuloita, jotka käsittävät näitä yhdisteitä, ja menetelmiä niiden käyttämiseksi soluadheesion ja soluadheesiovälitteisten patologisten tilojen inhibointiin ja ehkäisyyn. Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä ja farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää terapeuttisina tai profylaktisina aineina. Ne soveltuvat erityisen hyvin monien tulehdus- ja autoimmuunisairauksien hoitoon.

Keksinnön tausta

Soluadheesio on prosessi, jonka kautta solut liittyvät yhteen, vaeltavat kohden määrättyä kohdetta tai sijoittuvat tiettyyn kohtaan solunulkoisessa matriisissa. Soluadheesio muodostaa siten yhden lukuisten biologisten ilmiöiden taustalla olevista perusmekanisemista. Soluadheesio on esimerkiksi vastuussa hematopoieettisten solujen tarttumisesta endoteelisoluihin ja näiden hematopoieettisten solujen kulkeutumisesta sitten ulos verisuonista ja vauriokohtaan. Soluadheesiolla on siten rooli nisäkkäissä esiintyvissä patologisissa tiloissa, kuten tulehduksessa ja immuunireaktioissa.

Soluadheesion molekulaarista taustaa koskevat tutkimukset ovat paljastaneet, että erilaiset solupinnan makromolekyylit - jotka tunnetaan yhteisnimellä soluadheesiomolekyylit eli reseptorit - välittävät solut - solu ja solu - matriisi -vuorovaikutuksia. "Integriineiksi" kutsutun

suurryhmän proteiinit ovat esimerkiksi ratkaisevia välittäjiä hematopoieettisten solujen ja niiden mikroympäristön välisissä vuorovaikutuksissa [M. E. Hemler, VLA Proteins in the Integrin Family: Structure, Functions, and Their Role on Leukocytes, Ann. Rev. Immunol. 8 (1990) 365]. Integriinit ovat ei-kovalenttisia heterodimeerisiä komplekseja, jotka koostuvat kahdesta alayksiköstä, joista käytetään nimityksiä α ja ß. On olemassa vähintään 12 erilaista α-alayksikköä (α1 - α6, α-L, α-M, α-X, α-IIB, α-V ja α-E) ja vähintään 9 erilaista ß-alayksikköä (ß1 - ß9). Kukin integriinimolekyyli luokitellaan α- ja ß-alayksikkökomponenttiensa tyypin perusteella kuuluvaksi johonkin alaryhmään.

α4ß1-integriini, joka tunnetaan myös nimellä hyvin myöhäinen antigeeni-4 ("VLA4"), CD49d/CD29, on leukosyyttisolun pintareseptori, joka osallistuu moniin erilaisiin sekä solu - solu että solu - matriisi -adheesiovuorovaikutuksiin [M. E. Hemler, Ann. Rev. Immunol. 8 (1990) 365]. Se toimii reseptorina sytokiinillä indusoitavissa olevalle endoteelisolujen pintaproteiinille, verisuonisoluadheesiomolekyyli-1:lle ("VCAM-1"), samoin kuin solunulkoisen matriisin fibronektiiniproteiinille ("FN") [Ruegg *et al.*, J. Cell Biol. 177 (1991) 179; Wayner *et al.*, J. Cell Biol. 105 (1987) 1873; Kramer *et al.*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 4684; Gehlsen *et al.*, Science 24 (1988) 1228]. Monoklonaalisten anti-VLA4-vasta-aineiden ("mAb:iden") on osoitettu inhiboivan VLA4-riippuvaisia adheesiovuorovaikutuksia sekä *in vitro* että *in vivo* [Ferguson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 8072; Ferguson *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 1172]. *In vivo* -kokeiden tulokset viittaavat siihen, että tämä VLA4-riippuvaisen soluadheesion inhibitio saattaa ehkäistä tai inhiboida muutamia tulehdus- ja autoimmuunisairauksia [R. L. Lobb *et al.*, The Pathophysiologic Role of α-4 Integrins In Vivo, J. Clin. Invest. 94 (1994) 1722 - 1728].

VLA4:n sitomiseen riittävän pienimmän aktiivisen aminohapposekvenssin identifioimiseksi Komoriya *et al.* [The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site (CS1) Within the Alternatively Spliced Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine, J. Biol. Chem. 266(23) (1991) 15075 - 15079] syntetisoivat erilaisia osittain päällekkäisiä peptidejä, jotka perustuvat yhden määrätyn fibronektiinilajikkeen CS1-alueen (VLA4-sitoutumisalueen) aminohapposekvenssiin. He identifioivat 8 aminohappoa käsittävän peptidin, Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr (sekvenssi numero 1) samoin kuin kaksi sen kanssa päällekkäistä pentapeptidiä, Glu-Ile-Leu-Asp-Val (sekvenssi numero 2) ja Leu-Asp-Val-Pro-Ser (sekvenssi numero 3), joilla oli FN-riippuvaista soluadheesiota inhiboiva aktiivisuus. Nämä tulokset viittasivat siihen, että tripeptidi Leu-Asp-Val on soluadheesioaktiivisuuden vaatima minimisekvenssi. Myöhemmin osoitettiin, että Leu-Asp-Val sitoutuu vain sellaisiin lymfosyytteihin, joilla esiintyy VLA4:n aktivoitunut muoto, mikä tekee mainitunlaisen peptidin käyttökelpoisuuden *in vivo* kyseenalaiseksi [E. A. Wayner *et al.*, Activation-Dependent Recognition by Hematopoietic Cells of the LDV Sequence in the V Region of Fibronectin, J. Cell. Biol. 116(2) (1992) 489 - 497]. Tiettyjen LDV-sekvenssin sisältävien suurempien peptidien on kuitenkin myöhemmin osoitettu olevan aktiivisia *in vivo* [T. A. Ferguson *et al.*, Two Integrin Binding Peptides Abrogate T-cell-Mediated Immune Responses In Vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 8072 - 8076; S. M. Wahl *et al.*, Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment, J. Clin. Invest. 94 (1994) 655 - 662].

On myös kuvattu syklistä pentapeptidiä,

Arg-Cys-Asp-TPro-Cys

└──────┘

(jossa Tpro tarkoittaa 4-tioprolinia), joka pystyy inhiboimaan sekä VLA4:n että VLA5:n adheesiota FN:iin [D. M. Nowlin *et al.*, A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits α4ß1 and α5ß1 Integrin-mediated Cell Adhesion, J. Biol. Chem. 268(27) (1993) 20352 - 20359; PCT-julkaisu PCT/US91/04 862]. Tämä peptidi perustui FN:stä peräisin olevaan tripeptidisekvenssiin Arg-Gly-Asp, jonka oli tiedetty olevan yhtenä yhteisenä aiheena muutamien solunulkoisen matriisin proteiinien tunnistuskohdassa.

Näistä edistysaskelista huolimatta on edelleen olemassa pienten, spesifisten VLA-riippuvaisen soluadheesion inhibiittorien tarve. Mainitunlaisten inhibiittorien tulisi ihannetapauksessa olla puoliksi peptidisiä tai ei-peptidisiä, niin että niitä voidaan antaa suun kautta. Mainitunlaisilla yhdisteillä saataisiin aikaan käyttökelpoisia aineita erilaisten soluadheesion ja VLA4-sitoutumisen välittämien patologisten tilojen hoitamiseksi, ehkäisemiseksi tai tukahduttamiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö ratkaisee tämän ongelman tarjoamalla käyttöön uudenlaisia ei-peptidisiä yhdisteitä, jotka inhiboivat spesifisesti ligandien sitoutumista VLA4:ään. Nämä yhdisteet ovat käyttökelpoisia VLA4-välitteisen soluadheesion ja kyseiseen adheesioon liittyvien patologisten tilojen, kuten tulehduksen ja immuunireaktioiden, inhiboinnissa, ehkäisemisessä ja tukahduttamisessa. Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää yksinään tai yhdistettyinä muihin terapeuttisiin tai profylaktisiin aineisiin soluadheesion inhiboimiseksi, ehkäisemiseksi tai tukahduttamiseksi. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös näitä VLA4-välitteisen soluadheesion inhibiittoreita sisältäviä farmaseuttisia formuloita ja menetelmiä keksinnön mukaisten yhdisteiden ja koostumusten käyttämiseksi soluadheesion inhibointiin.

Tämän keksinnön yhden suoritusmuodon mukaisesti näitä uudenlaisia yhdisteitä, koostumuksia ja menetelmiä käytetään edullisesti tulehdus- ja immuunisairauksien hoitoon. Tämä keksintö tarjoaa myös käyttöön menetelmiä tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi ja näissä menetelmissä käyttökelpoisia välituotteita.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Määritelmiä

Tässä käytettynä termi "alkyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä suoraketjuista tai haarautunutta alkyyliryhmää, joka sisältää 1 - 10, edullisesti 1 - 6 ja edullisemmin 1 - 4, hiiliatomia. Esimerkkeihin mainitunlaisista ryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, metyyli, etyyli, n-propyyli, isopropyyli, n-butyyli, isobutyyli, s-butyyli, t-butyyli, pentyyli, isoamyyli, heksyyli, dekyyli yms.

Termi "alkenyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä suoraketjuista tai haarautunutta alkenyyliryhmää, joka sisältää 2 - 10, edullisesti 2 - 6 ja edullisemmin 2 - 4, hiiliatomia. Esimerkkeihin mainitunlaisista ryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, etenyyli, E- ja Z-propenyyli, isopropenyyli, E- ja Z-butenyyli, E- ja Z-isobutenyyli, E- ja Z-pentenyyli, dekenyyli yms.

Termi "alkynyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä suoraketjuista tai haarautunutta alkynyyliryhmää, joka sisältää 2 - 10, edullisesti 2 - 6 ja edullisemmin 2 - 4, hiiliatomia. Esimerkkeihin mainitunlaisista ryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, etynyyli (asetylenyyli), propynyyli, propargyyli, butynyyli, heksynyyli, dekynyyli yms.

Termi "sykloalkyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä syklistä alkyyliryhmää, joka sisältää 3 - 8, edullisesti 3 - 6, hiiliatomia. Esimerkkeihin mainitunlaisista sykloalkyyliryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuiten-

kaan rajoittumatta, syklopropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli yms.

Termi "sykloalkenyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä karbosyklistä ryhmää, joka sisältää 4 - 8, edullisesti 5 tai 6, hiiliatomia ja yhden tai useamman kaksoissidoksen. Esimerkkeihin mainitunlaisista sykloalkenyyliryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, syklopentenyyli, sykloheksenyyli, syklopentadienyyli yms.

Termi "aryyli" tarkoittaa karbosyklistä aromaattista ryhmää, jona tulevat kyseeseen fenyyli, naftyyli, indenyyli, indanyyli, atsulenyyli, fluorenyyli ja antrasenyyli; tai heterosyklistä aromaattista ryhmää, jona tulevat kyseeseen furyyli, tienyyli, pyridyyli, pyrrolyyli, oksatsolyyli, tiatsolyyli, imidatsolyyli, pyratsolyyli, 2-pyratsolinyyli, pyratsolidinyyli, isoksatsolyyli, isotiatsolyyli, 1,2,3-oksadiatsolyyli, 1,2,3-triatsolyyli, 1,3,4-tiadiatsolyyli, pyridatsinyyli, pyrimidinyyli, pyratsinyyli, 1,3,5-triatsinyyli, 1,3,5-tritianyyli, indolitsinyyli, indolyyli, isoindolyyli, 3H-indolyyli, indolinyyli, bentso[b]furanyyli, 2,3-dihydrobentsofuranyyli, bentso[b]tiofenyyli, 1H-indatsolyyli, bentsimidatsolyyli, kinolinyyli, isokinolinyyli, sinnolinyyli, ftalatsonyyli, kinatsolinyyli, kinoksalinyyli, 1,8-naftyridinyyli, pteridinyyli, karbatsolyyli, akridinyyli, fenatsinyyli, fenotiatsinyyli ja fenoksatsinyyli.

"Aryyliryhmät" voivat tässä hakemuksessa käytetyn määritelmänsä mukaan sisältää riippumattomasti 1 - 4 substituenttia, joina tulevat riippumattomasti kyseeseen vety- ja halogeeniatomit ja hydroksyyli-, amino-, nitro-, trifluorimetyyli-, trifluorimetoksyyli-, alkyyli-, alkenyyli-, alkynyyli-, syaani-, karboksyyli-, karboalkoksyyli-, Ar'-substituoidut alkyyli-, Ar'-substituoidut alkenyyli- tai alkynyyli-, 1,2-dioksimetyleeni-, 1,2-dioksietyleeni-, alkoksyyli-, alkenyylioksi- tai alkynyylioksi-, Ar'-subs-

tituoidut alkoksyyli-, Ar'-substituoidut alkenyylioksi- tai alkynyylioksi-, alkyyliamino-, alkenyyliamino- tai alkynyyliamino-, Ar'-substituoidut alkyyliamino-, Ar'-substituoidut alkenyyliamino- tai alkynyyliamino-, Ar'-substituoidut karbonyylioksi-, alkyylikarbonyylioksi-, alifaattiset tai aromaattiset asyyli-, Ar'-substituoidut asyyli-, Ar'-substituoidut alkyylikarbonyylioksi-, Ar'-substituoidut karbonyyliamino-, Ar'-substituoidut amino-, Ar'-substituoidut oksi-, Ar'-substituoidut karbonyyli-, alkyylikarbonyyliamino-, Ar'-substituoidut alkyylikarbonyyliamino-, alkoksikarbonyyliamino-, Ar'-substituoidut alkoksikarbonyyliamino-, Ar'-oksikarbonyyliamino-, alkyylisulfonyyliamino-, mono- tai bis(Ar'-sulfonyyli)amino-, Ar'-substituoidut alkyylisulfonyyliamino-, morfolinokarbonyyliamino-, tiomorfolinokarbonyyliamino-, N-alkyyliguanidino-, N-Ar'-guanidino-, N-Ar'-N-alkyyli)guanidino-, N,N-di-Ar'-guanidino-, N,N-dialkyyliguanidino-, N,N,N-trialkyyliguanidino-, N-alkyyliurea-, N,N-dialkyyliurea-, N-Ar'-urea-, N-Ar'-N-alkyyliurea- ja N,N-di-Ar'-urearyhmät; asyylikarbonyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut aryyliryhmät; aromaattisilla asyyliryhmillä substituoidut aromaattiset tai alifaattiset asyyliryhmät; Ar'-substituoidut heterosyklyyliryhmät; Ar'-substituoidut sykloalkyyli- tai sykloalkenyyliryhmät; heterosyklyylialkoksyyliryhmät; N-Ar'-N- hydroksyyliurearyhmät; Ar'-substituoidut sykloalkyyli- ja sykloalkenyyliryhmät; Ar'-substituoidut biaryyliryhmät; Ar'-substituoidut aminokarbonyyliaminoryhmät; Ar'-merkaptosubstituoidut alkyyliryhmät; Ar'-aminosubstituoidut aryyliryhmät; Ar'-oksisubstituoidut alkyyliryhmät; Ar'-substituoidut aminosykloalkyyli- ja -sykloalkenyyliryhmät; aryylialkyyliaminosulfonyyliryhmät; aryylialkoksyylialkyyliryhmät; N-Ar'-substituoidut tiourearyhmät; N-aryylialkoksyyliurearyhmät; N-hydroksyyliurearyhmät; N-alkenyyliurearyhmät; N-alkyyli-N-hydroksyyliurearyhmät, heterosyklyyliryhmät; tioaryylioksisubstituoidut aryyli-

ryhmät; N-aryyli-N-alkyyli-hydratsinoryhmät; Ar'-substituoidut sulfonyyliheterosyklyyliryhmät; aryylialkyylisubstituoidut heterosyklyyliryhmät; sykloalkyyli- ja sykloalkenyylisubstituoidut heterosyklyyliryhmät; sykloalkyylifuusioituneet aryyliryhmät; aryylioksisubstituoidut alkyyliryhmät; heterosyklyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut aryyliaminosulfonyyliryhmät; tioaryylisubstituoidut tioksiryhmät; Ar'-substituoidut alkenoyyliryhmät; alifaattiset tai aromaattiset asyyliaminokarbonyyliryhmät; alifaattisilla tai aromaattisilla asyyliryhmillä substituoidut alkenyyliryhmät; Ar'-substituoidut aminokarbonyylioksiryhmät; Ar',Ar'-disubstituoidut aryyliryhmät; alifaattisilla tai aromaattisilla asyyliryhmillä substituoidut asyyliryhmät; bentsofuusioituneet heterosyklyylikarbonyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut hydratsinoryhmät; Ar'-substituoidut aminosulfonyyliryhmät; Ar'-substituoidut alkyyli-iminoryhmät; Ar'-substituoidut heterosyklyyliryhmät; Ar',Ar'-disubstituoidut asyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut sykloalkenoyyliaminoryhmät; heterosyklyylialkoksyyliryhmät; N-Ar-N-hydroksyyliurearyhmät; heterosyklyylikarbonyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut aminokarbonyyliheterosyklyyliryhmät; Ar'-substituoidut aminokarbonyyliryhmät; Ar'-substituoidut karbonyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut aminosulfonyyliaminoryhmät; Ar'-substituoidut merkaptoalkyyliryhmät; Ar'-aminosubstituoidut biaryyliryhmät; aryylialkyyliaminoalkoksyyliryhmät; alkyyli- ja aryylioksisubtituoidut alkoksyyliryhmät; heterosyklyylikarbonyyliryhmät; Ar'-substituoidut sulfonyylialkyyliryhmät; Ar'-aminosubstituoidut karbosyklyyliryhmät; aryylialkyylisulfonyyliryhmät; aryylisubstituoidut alkenyyliryhmät; heterosyklyylialkyyliaminoryhmät; heterosyklyylialkyyliaminokarbonyyliryhmät; Ar'-substituoidut sulfonyyliaminoalkyyliryhmät; Ar'-substituoidut sykloalkyyliryhmät; tioaryylialkoksyyliryhmät; tioaryylioksimerkaptoryhmät; sykloalkyylikarbonyylialkyyliryhmät; sykloalkyylisubstituoidut aminoryhmät;

Ar'-substituoidut aryyliaminoryhmät; aryylioksikarbonyylialkyyliryhmät; fosforidiamidyylihappo- tai -esteriryhmät; aryylioksidimetyylisilyylioksiryhmät; 1,3-indaanidionyylikarbonyylialkyyliryhmät; 1,3-indaanidionyylikarbonyyliryhmät; oksiamidyyliryhmät; heterosyklyylialkylidenyyliryhmät; formamidinyyliryhmät; bentsalitsinyyliryhmät; bentsaalihydratsinoryhmät; aryylisulfonyyliurearyhmät; bentsilyyliaminoryhmät; 4-(N-2-karboksialkyyli-1-(1,3-bentsodioksol-5-yyli)amino-N-leusinyylialkyyliamidyyliaryyliurea)-ryhmät; Ar'-karbamoyylioksiryhmät ja alkyyli- ja aryylisubstituoidut urearyhmät, joissa "Ar'" on edellä määritelty karbosyklinen tai heterosyklinen aryyliryhmä, jossa on 1 - 3 substituenttia, joina tulevat kyseeseen vety- ja halogeeniatomit, hydroksyyli-, amino-, nitro-, trifluorimetyyli-, trifluorimetyylioksi-, alkyyli-, alkenyyli-, alkynyyli-, 1,2-dioksimetyleeni-, 1,2-dioksietyleeni-, alkoksyyli-, alkenyylioksi-, alkynyylioksi-, alkyyliamino-, alkenyyliamino- tai alkynyyliamino-, alkyylikarbonyylioksi-, alifaattiset tai aromaattiset asyyli-, alkyylikarbonyyliamino-, alkyylioksikarbonyyliamino-, alkyylisulfonyyliamino- ja N-alkyyli- ja N,N-dialkyyliurearyhmät.

Termi "alkoksyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä alkyylieetteriryhmää, jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty. Esimerkkeihin sopivista alkyylieetteriryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, metoksyyli, etoksyyli, n-propoksyyli, isopropoksyyli, n-butoksyyli, isobutoksyyli, s-butoksyyli, t-butoksyyli yms.

Termi "alkenyylioksi" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkenyyli-O-, jossa termi "alkenyyli" on edellä määritelty, sillä edellytyksellä, ettei ryhmä ole enolieetteriryhmä. Esimerkkeihin sopivista alkenyylioksiryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, allyylioksi, E- ja Z-3-metyyli-2-propeenioksi yms.

Termi "alkynyylioksi" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkynyyli-O-, jossa termi "alkynyyli" on edellä määritelty, sillä edellytyksellä, ettei ryhmä ole ynolieetteriryhmä. Esimerkkeihin sopivista alkynyylioksiryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, propargyylioksi, 2-butynyylioksi yms.

Termi "tioalkoksyyli" tarkoittaa tioeetteriryhmää, jonka kaava on alkyyli-S-, jossa alkyyli on edellä määritelty.

Termi "alkyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä mono- tai dialkyylisubstituoitua aminoryhmää [ts. ryhmää, jonka kaava on alkyyli-NH- tai $(alkyyli)_2$-N-], jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty. Esimerkkeihin sopivista alkyyliaminoryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, metyyliamino, etyyliamino, propyyliamino, isopropyyliamino, t-butyyliamino, N,N-dietyyliamino yms.

Termi "alkenyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkenyyli-NH- tai $(alkenyyli)_2$-N-, jossa termi "alkenyyli" on edellä määritelty, sillä edellytyksellä, ettei ryhmä ole enamiini. Yksi esimerkki mainitunlaisista alkenyyliaminoryhmistä on allyyliaminoryhmä.

Termi "alkynyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkynyyli-NH- tai $(alkynyyli)_2$-N-, jossa termi "alkynyyli" on edellä määritelty, sillä edellytyksellä, ettei ryhmä ole ynamiini. Yksi esimerkki mainitunlaisista alkynyyliaminoryhmistä on propargyyliaminoryhmä.

Termi "aryylioksi" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-O-, jossa aryyli on edellä määritelty. Esimerkkeihin aryylioksiryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, fenoksi, naftyylioksi, pyridyylioksi yms.

Termi "aryyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-NH-, jossa aryyli on edellä määritelty. Esimerkkeihin aryyliaminoryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, fenyyliamino (anilido), naftyyliamino, 2-, 3- ja 4-pyridyyliamino yms.

Termi "biaryyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-aryyli-, jossa aryyli on edellä määritelty.

Termi "tioaryyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-S-, jossa termi "aryyli" on edellä määritelty. Yksi esimerkki tioaryyliryhmistä on tiofenyyliryhmä.

Termi "aryylifuusioitunut sykloalkyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä sykloalkyyliryhmää, jonka kaksi rinnakkaista hiiliatomia ovat yhteiset aryyliryhmän kanssa, jolloin termi "sykloalkyyli" ja "aryyli" ovat edellä määriteltyjä. Yksi esimerkki aryylifuusioituneista sykloalkyyliryhmistä on bentsofuusioitunut syklobutyyliryhmä.

Termi "alifaattinen asyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä alkaani-, alkeeni- tai alkyynikarboksyylihaposta johdettuja ryhmiä, joiden kaavat ovat alkyyli-CO-, alkenyyli-CO- ja alkynyyli-CO-, joissa termit "alkaani", "alkeeni" ja "alkyyni" ovat edellä määriteltyjä. Esimerkkeihin mainitunlaisista alifaattisista asyyliryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, asetyyli, propionyyli, butyryyli, valeryyli, 4-metyylivaleryyli, akryloyyli, krotyyli, propiolyyli, metyylipropiolyyli yms.

Termi "aromaattinen asyyli" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-CO-, jossa termi "aryyli" on edellä määritelty. Esimerkkeihin sopivista aromaattisista asyyliryhmistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, bentsoyyli, 4-halogeenibentsoyyli, 4-karboksibentsoyyli, naftoyyli, pyridyylikarbonyyli yms.

Termit "morfolinokarbonyyli" ja "tiomorfolinokarbonyyli" tarkoittavat yksinään tai yhdistelmänä muiden termien kanssa N-karbonyloitua morfolinoryhmää ja vastaavasti N-karbonyloitua tiomorfolinoryhmää.

Termi "alkyylikarbonyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkyyli-CONH-, jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty.

Termi "alkoksikarbonyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkyyli-OCONH-, jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty.

Termi "alkyylisulfonyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkyyli-SO_2NH-, jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty.

Termi "aryylisulfonyyliamino" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-SO_2NH-, jossa termi "aryyli" on edellä määritelty.

Termi "N-alkyyliurea" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on alkyyli-NH-CO-NH-, jossa termi "alkyyli" on edellä määritelty.

Termi "N-aryyliurea" tarkoittaa yksinään tai yhdistelmässä ryhmää, jonka kaava on aryyli-NH-CO-NH-, jossa termi "aryyli" on edellä määritelty.

Termi "halogeeni" tarkoittaa fluoria, klooria, bromia ja jodia.

Termi "heterosykli" (ja ryhmää kuvaava vastaava muoto "heterosyklyyli") tarkoittaa, ellei tässä toisin määritellä, stabiilia 3 - 7-jäsenistä monosyklistä heterosyklistä rengasta tai 8 - 11-jäsenistä bisyklistä heterosyklistä rengasta, joka on tyydyttymätön ja voi mahdollisesti olla bentsofuusioitunut. Kukin heterosykli koostuu yhdestä tai useammasta hiiliatomista ja 1 - 4 heteroatomista, joina tulevat kyseeseen typpi, happi ja rikki. Tässä käytettynä termien "typpi- ja rikkiheteroatomit" piiriin kuuluvat typen ja rikin mikä tahansa hapettunut muoto ja minkä tahansa emäksisen typen kvaternoitunut muoto.

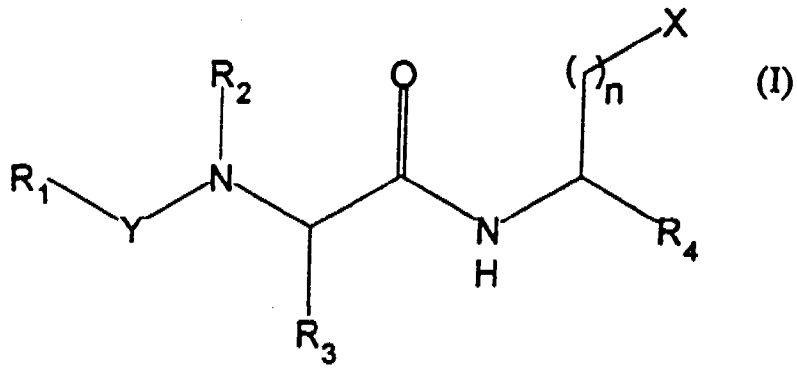
Lisäksi mikä tahansa rengastyppi voi mahdollisesti olla substituoitunut substituentilla R^4, joka määritellään tässä kaavan I mukaisten yhdisteiden yhteydessä. Heterosykli voi olla liittynyt minkä tahansa endosyklisen hiiliatomin tai heteroatomin kohdalta, joka johtaa stabiilin rakenteen muodostumiseen. Edullisiin heterosykleihin kuuluvat 5 - 7-jäseniset monosykliset heterosyklit ja 8 - 10-jäseniset bisykliset heterosyklit. Heterosyklit voivat mahdollisesti olla oksosubstituoituja renkaan 1 - 3 asemassa ja mahdollisesti riippumattomasti substituoituja 1 - 4 substituentilla, joina tulevat kyseeseen edellä kuvatut "aryyliryhmien" substituentit.

Termi "poistuva ryhmä" tarkoittaa yleisesti ryhmiä, jotka ovat helposti korvattavissa nukleofiilisella ryhmällä, kuten nukleofiilisella amiini-, alkoholi- tai tioliryhmällä. Mainitunlaiset poistuvat ryhmät ovat hyvin tunnettuja, ja niihin kuuluvat karboksylaatti-, N-hydroksisukkinimidi-, N-hydroksibentsotriatsoli-, halogeeni- (halogenidit), triflaatti-, tosylaatti-, mesylaatti-, alkoksyyli- ja tioalkoksyyliryhmät yms.

Termit "sopivasti suojatun α-aminohapon aktivoitu johdos" ja "aktivoitu substituoitu fenyylietikkahappo -johdos" tarkoittavat vastaavia asyylihalogenideja (esimerkiksi happofluoridia, happokloridia ja happobromidia), vastaavia aktivoituja estereitä (esimerkiksi nitrofenyyliesteriä, 1-hydroksibentsotriatsolin, HOBt, esteriä tai hydroksisukkinimidin, HoSu, esteriä) ja muita alalla tavanomaisia johdoksia.

Ammattimiehet pystyvat helposti ymmärtämään tässä hakemuksessa käytetyt muut kemialliset termit edellä olevien määritelmien pohjalta. Termejä voidaan käyttää yksinään tai minä tahansa yhdistelminä. Ryhmien edulliset ja edullisemmat ketjunpituudet pätevät kaikkiin mainitunlaisiin yhdistelmiin.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön yhdisteitä, joilla on kyky inhiboida VLA4-välitteistä soluadheesiota inhiboimalla ligandien sitoutumista kyseiseen reseptoriin. Näitä yhdisteitä edustaa kaava I:



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät johdokset, jossa kaavassa

ryhmänä X tulevat kyseeseen $-CO_2H$, $-PO^-_3H$, $-SO_2R_5$, $-SO_3H$, $-OPO^-_3H$, $-CO_2R_4$ ja $-C(O)N(R_4)_2$,

jolloin ryhmänä R_5 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli, aryylisubstituoitu alkyyli ja aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli;

ryhmänä Y tulevat kyseeseen -CO-, $-SO_2-$ ja $-PO_2-$;

ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, aryylifuusioitu sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli, aryylisubstituoitu alkyyli ("aryylialkyyli"), aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyylisubstituoitu alkyyli, sykloalkenyylisubstituoitu sykloalkyyli, biaryyli, alkoksyyli, alkeenioksi, alkyynioksi, aryylisubstituoitu alkoksyyli ("aryylialkoksyyli"), aryylisubstituoitu alkeenioksi tai alkyylioksi, alkyyliamino, alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylisubstituoitu alkyyliamino, aryylisubstituoitu alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylioksi, aryyliamino, N-alkyyliureasubstituoitu alkyyli, N-aryyliureasubstituoitu alkyyli, alkyylikarbonyyliaminosubstituoitu alkyyli, ami-

nokarbonyylisubstituoitu alkyyli, heterosyklyyli, heterosyklyylisubstituoitu alkyyli, heterosyklyylisubstituoitu amino, karboksialkyylisubstituoitu aryylialkyyli, oksokarbosyklyylifuusioitunut aryyli ja heterosyklyylialkyyli;

ryhmänä R_2 tulevat kyseeseen vety, aryyli, alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli ja ryhmät R_2 ja R_3 voivat yhdessä atomien kanssa, joihin ne ovat liittyneet, muodostaa heterosyklin;

ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryylialkyyli, aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, hydroksyylisubstituoitu alkyyli, alkoksyylisubstituoitu alkyyli, aryylialkoksyylisubstituoitu alkyyli, aminosubstituoitu alkyyli, (aryylisubstituoitu alkyylioksikarbonyyliamino)-substituoitu alkyyli, tiolisubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyylisubstituoitu alkyyli, (hydroksyylisubstituoitu alkyylitio)substituoitu alkyyli, tioalkoksyylisubstituoitu alkyyli, asyyliaminosubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, aryylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, morfolinoalkyyli, tiomorfolinoalkyyli, morfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, tiomorfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, [N-(alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli)- tai N,N-(dialkyyli, dialkenyyli tai dialkynyyli)- tai N-alkyyli-N-alkenyyliamino]karbonyylisubstituoitu alkyyli, karboksyylisubstituoitu alkyyli, dialkyyliaminosubstituoitu asyyliaminoalkyyli ja aminohapposivuketjut, joina tulevat kyseeseen arginiini, asparagiini, glutamiini, S-metyylikysteiini, metioniini ja vastaavat sulfoksidi- ja sulfonijohdannaiset, glysiini, leusiini, isoleusiini, alloisoleusiini, t-leusiini, norleusiini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, proliini, alaniini, ornitiini, histidiini, glutamiini, valiini, treoniini, seriini, asparagiinigappo, beeta-syaanialaniini ja allotreonii-

ni ja ryhmät R_2 ja R_3 voivat yhdessä atomien kanssa, joihin ne ovat liittyneet, muodostaa heterosyklin;

ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen aryyli, alkyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, alkenyyli, sykloalkenyyli, alkynyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli, vety, heterosyklyyli, heterosyklyylikarbonyyli, aminokarbonyyli, amido, mono- tai dialkyyliaminokarbonyyli, mono- tai diaryyliaminokarbonyyli, alkyyliaryyliaminokarbonyyli, diaryyliaminokarbonyyli, mono- tai diasyyliaminokarbonyyli, aromaattinen tai alifaattinen asyyli, alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu substituenteilla, joina tulevat kyseeseen amino, hydroksyyli, merkapto, mono- tai dialkyyliamino, mono- tai diaryyliamino, alkyyliaryyliamino, mono- tai diasyyliamino, alkoksyyli, alkeenioksi, aryylioksi, tioalkoksyyli, tioalkeenioksi, tioalkyynioksi, tioaryylioksi ja heterosyklyyli;

n on 0, 1 tai 2.

"Farmaseuttisesti hyväksyttävä johdos" tarkoittaa tämän keksinnön mukaisen yhdisteen mitä tahansa farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, esteriä tai mainitunlaisen esterin suolaa. Keksinnön piiriin kuuluu myös mikä tahansa muu yhdiste, joka annettuna potilaalle pystyy tarjoamaan käyttöön (suoraan tai epäsuorasti) tämän keksinnön mukaisen yhdisteen (ts. lääkeaineen esiaste). Keksinnön piiriin kuuluvat myös tämän keksinnön mukaisen yhdisteen muodostamat metaboliitit tai jäännökset, joille on tunnusmerkillistä kyky inhiboida, ehkäistä tai tukahduttaa soluadheesiota ja soluadheesiovälitteisiä patologisia tiloja.

Tämän keksinnön yhdessä toisessa edullisessa suoritusmuodossa ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen bentsyylioksi, syaanimetyyli, sykloheksyylimetyyli, metyyli, n-heksyyli, N-fenyyliamino, fenyyli, fenyylikarbonyyli, fenyylimetyyli, t-butoksyyli, t-butyyliamino, 1-indanyyli, 1-naftyylimetyyli, 1-fenyylisyklopropyyli, 2-(4-hydroksifenyyli)-etyyli, 2-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli,

2-[bis(fenyylisulfonyyli)amino]fenyylimetyyli, 2-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 2-aminofenyylimetyyli, 2-bentsamidofenyylimetyyli, 2-bromi-4-hydroksi-5-metoksifenyylimetyyli, 2-hydroksifenyylimetyyli, 2-naftyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, 2-pyridyylimetyyli, 2-kinolinyyli, 2-[4-(N'-fenyyliurea)fenyyli]etyyli, 3-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)propyyli, 3-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 3-asetamidofenyylimetyyli, 3-aminofenyylimetyyli, 3-bentsamidofenyylimetyyli, 3-hydroksi-4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli, 3-hydroksifenyylimetyyli, 3-indolyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyylirea)fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metyyli-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-nitrofenyylimetyyli, 3-fenyylipropyyli, 3-pyridyylimetyyli, 4-(2-aminobentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-(morfolinokarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]-fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]-3-metoksifenyylimetyyli, 4-[N'-(2-etyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-isopropyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyyli-3-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-nitrofenyyli)urea]-fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-t-butyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-tiatsolyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-kloorifenyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(4-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-bentsyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-syklo-heksyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-etyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-isopropyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-metyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-p-tolyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyy-

liamino, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-t-butyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(fenyyliaminokarbonyyliaminometyyli)fenyyli, 4-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 4-(t-butoksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-asetamidofenyylimetyyli, 4-aminofenyyliamino, 4-aminofenyylimetyyli, 4-bentsamidofenyylimetyyli, 4-kloorifenyylimetyyli, 4-hydroksi-3-nitrofenyylimetyyli, 4-hydroksifenyylimetyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, 4-nitrofenyyliamino, 4-nitrofenyylimetyyli, 4-fenasetamidofenyylimetyyli, 4-fenyylifenyylimetyyli, 4-pyridyylimetyyli, 4-trifluorimetyylifenyylimetyyli, 4-[2-(N'-metyyliurea)bentsamido]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyli-N''-metyyliguanidino)fenyylimetyyli, 5-(N'-fenyyliurea)pentyyli, 5-(N'-t-butyyliurea)pentyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, 2,2-difenyylimetyyli, 2,3-bentsosyklobutyyli, 3,4-dihydroksifenyylimetyyli, 3,5-dimetoksi-4-hydroksifenyylimetyyli, 4-(1-indolikarboksyyliamino)fenyylimetyyli, 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli, 4-(1,3-bentsoksatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli ja 4-(1,3-imidatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli, 3-karboksi-1-fenyylipropyyli; 3-hydroksi-4-(2-metyylifenyyli)ureafenyylimetyyli; 3-hydroksi-2-(2-kloorifenyyli)ureafenyylimetyyli; 6-(fenyyliurea)heptyyli, 4-(fenyyliurea)butyyli; 2-tienyylimetyyli; 4-(2,6-dimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-butoksi-4-(2-metyylifenyyli)ureafenyylimetyyli; 3-butoksi-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(N-2-pyratsinyyliurea)fenyylimetyyli; 2-fenyylietynyyli; 5-fenyyliurea-2-pyridyylimetyyli; 5-(2-metyylifenyyliurea)-2-pyridyylimetyyli; 4-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 3-nitro-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-asyyliamino-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(N-fenyyli-N-metyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-asetyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-propionyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsyylioksi-2-pyridyyli-

urea)fenyylimetyyli; 3-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(indolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 2-[4-fenyylirea)fenyyli]oksiranyyli; 4-(N-fenyyli-N'-metyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-dimetyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsimidatsolyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsoksatsolyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsotiatsolyyliamino)fenyylimetyyli;4-(tetrahydrokinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 1,3-dimetyyli-3-(fenyyliurea)butyyli; hydroksietyylitiometyyli; 4-(fenyyliurea)fenyylietenyyli; 3-amino-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(4-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-aminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-[(2-metyyliurea)fenyyliurea)fenyyli; 2-(2-hydroksifenyyliurea)-3-metoksifenyylimetyyli; 4-(2-metyylisulfonyylimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-metyylifenyyliurea)tetrahydro-2-pyrimidonyylimetyyli; 3-metoksi-4-(fenyyliurea)-3-pyridyylimetyyli; 4-(2-trifluorimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 4-[2,4(1H,3H)-kinatsoliinidionyyli)fenyylimetyyli; 4-tioureafenyylimetyyli; 4-(fenyylitiourea)fenyylimetyyli; 4-(pyrrolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsoksatsolinonyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(bentsyylioksiurea)fenyylimetyyli; 4-(tiatsolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-bentsoyyliureafenyylimetyyli; hydroksyyliureafenyylimetyyli; N'-metyyli-N'-hydroksyyliureafenyylimetyyli; 4-(N'-allyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-pyrrolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(1-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(propyyliurea)fenyylimetyyli; 4-metoksiurea)fenyylimetyyli; 4-(dimetyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-kinatsolinyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-furanoyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-hydroksi-6-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-pyridyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(3-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-fluorifenyyliurea)fenyylime-

tyyli; 4-(4-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-kinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(isokinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2,3-dimetyylifenyyliurea)-fenyylimetyyli; 4-(2,5-dimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-metyyli-4-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-metyyli-3-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-karboksi-3-fenyylipropyyli; 4-(5-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(4-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2,4-difluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-dibentsofuranyylikarbonyyli; 4-(fenoksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 3-fenyyliureapropyyli; 4-(fenyyliaminokarbonyylioksi)fenyylimetyyli; 4-sinnamoyylifenyylimetyyli; dibentsofuranyylimetyyli; 4-(2-metyylifenyyliaminokarbonyylioksi)fenyylimetyyli; (metyylifenyyliurea)fenyyliamino; 4-(3-indolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(fenyyliaminokarbonyyli)fenyylimetyyli; 4-fenyylialkynyylifenyylimetyyli; 4-(3-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 5-nitrobentsofuran-2-yyli; 5-(2-metyylifenyyliurea)bentsofuran-2-yyli; 3-karboksi-3-fenyylipropyyli; 2-(3-pyridyyli)tiatsol-4-yyli; 2-(4-pyridyyli)tiatsol-4-yyli; 2-okso-, ja 4-okso-4,5,6,7-tetrahydrobentso[b]furan-3-yyli; 3-metoksi-4-(fenyylikarbamoyylioksi)fenyylimetyyli; 5-aminobentsofuran-2-yyli; bentsilyyliaminofenyylimetyyli ja 4-[N-2-karboksietyyli-1-(1,3-bentsodioksolyl-5-yyli)amino-N-leusinyyliasetamidyylifenyyliurea]fenyylimetyyli.

Ryhmänä R^1 tulevat edullisimmin kyseeseen 4-hydroksifenyylimetyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli; 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli, 4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli ja 3-metoksi-4-(N'-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli.

Yhdessä vaihtoehtoisessa edullisessa suoritusmuodossa R_1 on aryylisubstituoitu C_{1-4}-alkyyliryhmä. R_1 on edullisemmin (N-Ar'-urea)parasubstituoitu aryylialkyyliryhmä ja edullisimmin (N-Ar'-urea)parasubstituoitu fenyylimetyyliryhmä.

Yhden toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti ryhmänä R_2 tulevat kyseeseen vety, metyyli tai fenasetyyli, R_2 on edullisimmin vety.

Yhden toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 4-(metyylisulfonyyliamino)butyyli, 4-asetyyliaminobutyyli, aminometyyli, bentsyyli, butyyli, hydroksimetyyli, isobutyyli, metyyli, metyylitiometyyli, fenyylimetyyli, propyyli, 4-(bentsyyliloksikarbonyyliamino)butyyli, N,N-(metyylipropargyyli)amino, 2-(metyylitio)etyyli, 2-(morfolino-N-karbonyyli)etyyli, 2-(N-morfolino)etyyli, 2-(N,N-dimetyyliamino)etyyli, 4-aminobutyyli, 4-bentsyylioksifenyylimetyyli, 2-bentsyylitiometyyli, t-butoksikarbonyyliaminometyyli, s-butyyli, t-butyyli, N,N-dimetyyliaminokarbonyylimetyyli, 1,1-etano,** 4-hydroksifenyylimetyyli, 1-hydroksietyyli, 1-metoksietyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, bentsyylioksimetyyli, bentsyylitiometyyli, karbonyylimetyyli, 2-metyylisulfinyylietyyli, morfolino-N-karbonyylimetyyli, tiomorfolino-N-karbonyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, aspragiinisivuketju, proliinisivuketju, 2-tiatsolyylimetyyli, 4-(fenyyliurea)-butyyli; 4-(metyyliurea)butyyli; morfolinokarbonyylimetyylitiometyyli; morfolinoetyylitiometyyli; 3-pyridyylimetyyli; 4-metyylisulfonyyliaminobutyyli; hydroksimetyylitiometyyli, 2-metyylisulfonyylietyyli, 4-propionyyliaminobutyyli; 4-etoksikarbonyyliaminobutyyli; metoksikarbonyyliaminobutyyli; karbometoksimetyylitiometyyli; 4-t-butyyliurea-

---

*aminohapposivuketju peräisin 1-aminosyklopropyylikarboksyylihaposta

butyyli; karboksimetyylitiometyyli; dimetyyliamidometyylitiometyyli; asetyyliaminopropyyli; 3-metyyliureapropyyli; 4-biotinoyyliaminobutyyli; 2-tienyylimetyyli; 3-pyridyylimetyyli; 4-trifluoriasetyyliaminobutyyli; dimetyyliaminometyylitiometyyli; dimetyyliaminoetyylitiometyyli; 4-(dimetyyliaminoasetyyliamino)butyyli, tai se muodostaa yhdessä ryhmän R_2 kanssa proliini-, atsetidiini- tai pipekoliinirenkaan.

Ryhmänä R_3 tulevat edullisimmin kyseeseen isobutyyli, 2-(metyylitio)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 4-asetyyliaminobutyyli, 4-(metyylisulfonyyliamino)butyyli ja 4-(etoksikarbonyyliamino)butyyli.

Vielä yhden muun suoritusmuodon mukaisesti ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen 4-karbometoksifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-metoksifenyyli, bentsyyli, metyyli, fenyyli, fenyylimetyyli, fenyylietyyli, 4-kloorifenyyli, 3,4-difluorifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli, 2-metoksifenyyli, 3-metoksifenyyli, 4-metoksifenyyli, 2-nitrofenyyli, 3-pyridyyli, 4-fenoksifenyyli; 4-etoksifenyyli; 4-nitrofenyyli; 4-asetyyliaminofenyyli; 4-metyyliureafenyyli; 2-fluorifenyyli; naftyyli; 3-fluorifenyyli; 3-nitrofenyyli; vety; 2-nitrofenyyli; 4-syaanifenyyli; 3-metoksifenyyli; 4-metyylisulfonyyliamino; 3-syaanifenyyli; 4-propionyyliamino; 4-aminofenyyli; 3-aminofenyyli; 4-trifluorimetoksifenyyli; 4-metyylifenyyli; 4-amino-3-nitrofenyyli; 4-hydroksi-3-metoksifenyyli; 4-heksyloksifenyyli; 4-metyyltiofenyyli; 3-furanyyli; 4-dimetyyliaminofenyyli; 3-hydroksi-4-nitrofenyyli; n-pentyyli; karboksimetyyli; 2-karboksietyyli; etynyyli; 2-tienyyli; 2-propenyyli; 2-propynyyli; metyyli ja propyyli. Ryhmänä R_4 tulevat edullisemmin kyseeseen 4-metoksifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-karbometoksifenyyli, fenyylietyyli, fenyylimetyyli, allyyli, etynyyli ja 3,4-metyleenidioksifenyyli.

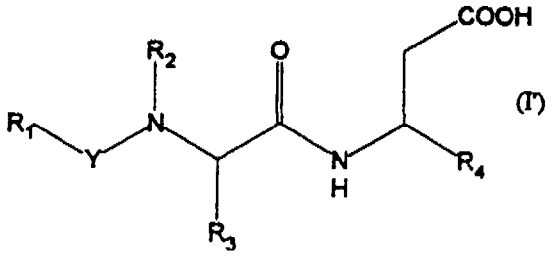
Yhdessä toisessa edullisessa suoritusmuodossa Y on CO, CH_2 tai SO_2. Y on edullisimmin CO.

Yhden toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti kaavassa I ryhmä X on COOH.

Vielä yhden toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti n on 1.

Taulukossa 1 esitetään esimerkkejä joistakin tämän keksinnön mukaisista edullisista yhdisteistä, joissa X on karboksyyliryhmä ja n on 1.

Taulukko 1



(I)

BIO #	R_1	R_2	R_3	R_4	Y
1002	syaanimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1003	sykloheksyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1004	2-pyridyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1005	3-pyridyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1006	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1007	4-pyridyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1008	fenyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1009	4-fenyylifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1010	4-kloorifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1011	4-trifluorimetyyli-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1013	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1014	3-indolyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1015	4-bentsamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1016	4-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1017	1-fenyylisyklopropyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1018	3-asetamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1020	3-bentsamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1021	1-naftyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1022	2-naftyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO

1023	4-fenasetamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1024	2-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1025	2-[bis(fenyylisulfonyyli)-amino]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1026	2-bentsamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1027	2-(bentsyylioksikarbonyyli-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1028	4-(2-aminobentsamido)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1029	4-[2-(N'-metyyliurea)-bentsamido]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1030	3-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1031	3-(bentsyylioksikarbonyyli-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1032	3-(fenyylisulfonamido)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1036	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1037	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-tiatsolyyli-metyyli	fenyyli	CO
1038	fenyylimetyyli	H	propyyli	fenyyli	CO
1039	fenyylimetyyli	H	butyyli	fenyyli	CO
1040	fenyylimetyyli	H	s-butyyli	fenyyli	CO
1041	t-butoksyyli	H	hydroksimetyyli	fenyyli	CO
1042	t-butoksyyli	H	fenyylimetyyli	fenyyli	CO
1043	t-butoksyyli	H	1,1-etano	fenyyli	CO
1044	t-butoksyyli	metyyli	isobutyyli	fenyyli	CO
1045	fenyylimetyyli	H	hydroksimetyyli	fenyyli	CO
1046	fenyylimetyyli	H	fenyylimetyyli	fenyyli	CO
1047	fenyylimetyyli	H	proliinisivuketju	fenyyli	CO
1048	fenyylimetyyli	H	1,1-etano[1]	fenyyli	CO
1049B	fenyylimetyyli	H	asparagiinisivuketju	fenyyli	CO
1050	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1051	4-(N'-fenyyliurea)fenyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1052	2-[4-(N'-fenyyliurea)-fenyyli]etyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1053	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	metyyli	isobutyyli	fenyyli	CO
1054	3-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1055	3-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	metyyli	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO

1056	3-metoksi-4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1057	3-hydroksi-4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1058	3-metyyli-4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1060	3-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1063	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	bentsyyli	CO
1064	3-(N'-metyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1065	3-(N'-isopropyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1066	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1067	4-(N'-p-tolyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1068	3-(N'-sykloheksyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1069	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	2-metoksifenyyli	CO
1070	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	2-metoksifenyyli	CO
1072	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3-metoksifenyyli	CO
1073	4-(bentsyylioksikarbonyyli-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1074	4-(fenyylisulfonamido-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1075	4-(bentsamido)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1076	4-(N'-t-butyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1077	4-(N'-etyyliurea)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1078	4-[N'-(3-metoksifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1079	4-[N'-(2-metoksifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1080	4-[N'-(3-pyridyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1081	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1082	3-fenyylipropyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1083	metyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO

1084	2-(4-hydroksifenyyli)etyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1085	bentsyylioksi	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1086	N-fenyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1087	2-(4-hydroksifenyyli)etyyli	metyyli	isobutyyli	fenyyli	CO
1088	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1089	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	4-metoksifenyyli	CO
1090	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1091	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1092	4-metoksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1093	4-nitrofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1094	m-heksyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1096	2-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1097	3-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1098	3,4-dihydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1099	2,2-difenyylietyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1100	2-bromi-4-hydroksi-5-metoksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1101	4-(bentsyylioksikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1102	2-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1103	4-aminofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1104	4-(fenyylisulfonamido)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1105	4-(bentsamido)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1106	5-(N'-fenyyliurea)fenyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1107	5-(N'-t-butyyliurea)pentyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1108	4-nitrofenyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1109	4-aminofenyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	
1110	4-(N'-fenyyliurea)fenyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	
1111	3,5-dimetoksi-4-hydroksi-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	
1112	4-hydroksi-3-nitro-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	
1113	3-nitrofenyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	
1114	fenyylimetyyli	metyyli	isobutyyli	fenyyli	CO
1115	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-kloorifenyyli	CO
1116	fenyylimetyyli	H	1-hydroksietyyli	fenyyli	CO
1117	fenyylimetyyli	H	1-metoksietyyli	fenyyli	CO
1119	fenyylimetyyli	H	metyyli	fenyyli	CO
1120	fenyylimetyyli	metyyli	metyyli	fenyyli	CO

1122	fenyylimetyyli	H	4-metoksi-fenyylimetyyli	fenyyli	CO
1123	fenyylimetyyli	H	2-fenyylietyyli	fenyyli	CO
1124	fenyylimetyyli	H	4-bentsyylioksi-fenyylimetyyli	fenyyli	CO
1125	fenyylimetyyli	H	4-hydroksi-fenyylimetyyli	fenyyli	CO
1126	fenyylimetyyli	H	bentsyylioksimetyyli	fenyyli	CO
1127	fenyylimetyyli	H	bentsyylitiometyyli	fenyyli	CO
1128	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1129	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	bentsyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1130	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	bentsyyli	fenyyli	CO
1131	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	s-butyyli	fenyyli	CO
1132	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	4-(bentsyylioksi-karbonyyliamino)-butyyli	fenyyli	CO
1133	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	s-butyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1134	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	t-butoksikarbo-nyyliaminometyyli	fenyyli	CO
1135	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	fenyyli	CO
1136	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-bentsyylitio-metyyli	fenyyli	CO
1137	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	2-nitrofenyyli	CO
1138	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	aminometyyli	fenyyli	CO
1139	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	4-aminobutyyli	fenyyli	CO
1140	fenyylikarbonyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CH_2
1141	fenyylikarbonyyli	fen-asyyli	isobutyyli	fenyyli	CH_2
1142	2,3-bentsosyklobutyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1143	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	bentsyyli	CO
1144	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1145	4-(t-butoksikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1146	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	3-metoksifenyyli	CO
1147	4-asetamidofenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1148	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	3-pyridyyli	CO

1149	3-kinolinyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1150	3-fenyylietyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1152	2,2-dimetyylipropyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1153	bentsyylioksi	H	isobutyyli	3-pyridyyli	CO
1154	t-butyyliamino	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1155	fenyylimetyyli	H	t-butyyli	fenyyli	CO
1156	metyyli	H	t-butyyli	fenyyli	CO
1157	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	bentsyyli	CO
1158	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1159	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	2-metoksifenyyli	CO
1160	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3-metoksifenyyli	CO
1162	bentsyylioksi	H	isobutyyli	metyyli	CO
1163	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1164	fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1168	4-[N'-(m-tolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1169	4-(N'-bentsyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1170	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	morfolino-N-karbonyylimetyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1173	4-hydroksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1174	4-hydroksifenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	4-metoksifenyyli	CO
1175	fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	4-metoksifenyyli	CO
1176	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	tiomorfolino-N-karbonyylimetyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1177	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	N,N-(metyylipropargyyli)aminokarbonyylimetyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1178	fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1179	4-[N'-(o-tolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1180	4-[N'-(2-tiatsolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1181	4-[N'-(3-kloorifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1182	4-[N'-(4-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1185	4-[N'-(2-kloorifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO

1186	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	isobutyyliamino-karbonyyli	CO
1187	3-(N'-fenyyliurea)propyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1188	1-fenyylisyklopropyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1189	1-indalyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1190	4-[N'-(o-tolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1191	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(N-morfolino)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1192	4-[N'-(2-metoksifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1193	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1194	4-[N'-(2-pyridyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1195	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-difluorifenyyli	CO
1196	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1197	4-[N'-(o-tolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyyli	CO
1198	4-(morfolinokarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1199	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-metyyli-sulfinyylietyyli	4-metoksifenyyli	CO
1200	4-[N'-(2-etyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1201	4-[N'-(2-nitrofenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1206	4-[N'-(2-isopropyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1207	4-[N'-(2-isopropyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1208	4-[N'-(2-etyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
1209	4-[N'-(2-t-butyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1210	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1212	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1214	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	N,N-dimetyyliamino-karbonyylimetyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO

	1215	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(N,N-dimetyyli-aminoetyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	
	1216	4-(N'-fenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	2-(morfolino-N-karbonyylietyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1217	4-[N'-(-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	4-(bentsyylioksi-karbonyyliamino-butyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
	1218	4-[N'-(2-pyridyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
	1219	4-[N'-(3-pyridyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
	1220	4-[N'-(2-metyyli-3-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-metoksifenyyli	CO
	1221	3-metoksi-4-[N'-(o-tolyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1222	4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]-3-metoksifenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1223	4-(fenyyliaminokarbonyyli-aminometyyli)fenyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1224	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
	1225	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	4-(bentsyylioksi-karbonyyliamino)-butyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1227	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	metyylitiometyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1238	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	4-metoksifenyyli	CO
	1245	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	2-(metyylisulfo-nyyli)etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1246	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	3-(hydroksipro-pyylitio)metyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1248	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-fluorifenyyli	CO
	1270	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	4-asetyyliamino-butyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1272	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	4-(metoksikarbo-nyyliamino)butyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1282	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-pyrid-5-yylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1294	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	4-(metyylisulfo-nyyliamino)butyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
	1311	4-[N'-(3-metyyli-3-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	4-(metoksikarbo-nyyliamino)butyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO

1319	4-indolyylikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1321	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-karboksifenyyli	CO
1327	4-(1-indolikarboksyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1336	6-metoksi-5-[N'-o-tolyyli)-urea]-3-pyridyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1345	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	dimetyyliamino-etyylitiometyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1347	4-[N'-(2-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1358	4-(N'-fenyylitiourea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1360	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	2,3-dihydrobentso-furan-5-yyli	CO
1361	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	metyylitioetyyli	4-karbometoksi-fenyyli	CO
1380	4-(N'-fenyyli-N''-metyyli-guanidino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1382	4-[N'-(o-tolyyli)urea]-fenyylimetyyli	H	4-(metyylisulfo-nyyliamino)butyyli	4-karbometoksi-fenyyli	CO
1388	4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	4-karbometoksi-fenyyli	CO
1390	4-(1,3-imidatsol-2-yyliamino)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1393	4-[N'-(2-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1396	4-(1,3-bentsoksatsol-3-yyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1400	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	fenyylietyyli	CO
1429	4-[N'-(3-metyyli-2-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1444	4-(2-bentsoksatsolinonyyli-karbonyyliamino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1474	4-(2-pyrrolyylikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1475	4-(N'-allyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1490	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	etynyyli	CO
1515	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	allyyli	CO

1525	4-[N'-(2-fluorifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1526	4-(4-fluorifenyyliurea)-fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1536	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	metyyli	CO
1594	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	H	CO
1648	4-(2-indolyylikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	H	CO
1648	4-(2-indolyylikarbonyyli-amino)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1721	4-[N'-(2-metyylifenyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	isobutyyli	morfolinometyyli	CO
1725	3-metoksi-4-(N'-fenyyli-urea)fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1726	3-metoksi-4-(N'-fenyyli-urea)fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1727	3-metoksi-4-(N'-fenyyli-urea)fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1728	3-metoksi-4-(N'-2-pyridyyli-urea)fenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1729	3-metoksi-4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyli)ureafenyylimetyyli	H	isobutyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1730	3-metoksi-4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyli)ureafenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO
1731	3-metoksi-4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyli)ureafenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	1,3-bentsodi-oksol-5-yyli	CO
1732	4-[N'-(3-metyyli-2-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli	H	2-(metyylitio)-etyyli	3,4-dimetoksifenyyli	CO

Edullisempia kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat BIO-1006, BIO-1056, BIO-1089, BIO-1179, BIO-1194, BIO-1221, BIO-1224, BIO-1238, BIO-1245, BIO-1246, BIO-1248, BIO-1270, BIO-1282, BIO-1294, BIO-1321, BIO-1336, BIO-1382 ja BIO-1400. Vielä edullisempia yhdisteitä ovat BIO-1218, BIO-1272, BIO-1311, BIO-1319, BIO-1345, BIO-1347, BIO-1358, BIO-1361, BIO-1388, BIO-1390, BIO-1393, BIO-1396, BIO-1429, BIO-1444, BIO-1474, BIO-1475, BIO-1490, BIO-1515, BIO-1525, BIO-1526, BIO-1536, BIO-1594, BIO-1648, BIO-1655, BIO-1721, BIO-1725, BIO-1726, BIO-1727, BIO-

1728, BIO-1729, BIO-1730, BIO-1731 ja BIO-1732. Edullisimpia ovat BIO-1218, BIO-1272, BIO-1311, BIO-1347, BIO-1393, BIO-1429, BIO-1515, BIO-1725, BIO-1726, BIO-1727, BIO-1728, BIO-1729, BIO-1730, BIO-1731 ja BIO-1732.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan syntetisoida käyttämällä mitä tahansa tavanomaista menetelmää. Näitä yhdisteitä syntetisoidaan edullisesti kemiallisesti helposti saatavissa olevista lähtöaineista, kuten α-aminohapoista. Moduuli- ja konvergenssimenetelmät näiden yhdisteiden syntetisoimiseksi ovat myös edullisia. Konvergenssiratkaisussa saatetaan esimerkiksi yhteen suuria osia lopputuotteesta synteesin viimeisissä vaiheissa, sen sijaan että lisättäisiin vähitellen pieniä paloja kasvavaan molekyyliketjuun.

Yhden suoritusmuodon mukaisesti tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan syntetisoida seuraavasti. Suojattu kiraalinen amiini lisätään α,ß-tyydyttymättömään esteriin, jolloin muodostuu suojattu ß-aminohappoesteri. Sopivan suojauksenpoiston jälkeen ß-aminohappoesteri kytketään sopivaan aktivoituun esteriryhmittymään. Kytkentätuote voidaa sopivasti funktionalisoituna saattaa reagoimaan edelleen vielä toisen aktivoidun esteriryhmittymän kanssa. Tätä materiaalia voidaan käsitellä edelleen, niin että saadaan toivottuja keksinnön mukaisia yhdisteitä. Edellä mainitun tapahtumaketjun kussakin vaiheessa esteri voidaan hydrolysoida vastaavaksi hapoksi, niin että saadaan toinen keksinnön mukainen yhdiste.

Edellä mainitut aktivoidut esteriryhmittymät voidaan vaihtoehtoisesti liittää ensin yhteen ja liittää sitten tuloksena oleva yhdiste ß-aminohappoesteriosaan. Loppukäsittelyt ja/tai tarvittavat suojauksenpoistotoimenpiteet voidaan toteuttaa tässä vaiheessa.

Toivotut funktionaaliset ryhmät voidaan vaihtoehtoisesti, sopivissa olosuhteissa, sisällyttää (suojattuina tai suojaamattomina) yhteen aktivoiduista esteriryhmitty-

mistä. Tämä pala kytketään sitten ß-aminohappoesteriin tai ryhmittymään, joka koostuu aktivoituun esteriin aiemmin kytketystä ß-aminohappoesteristä. Tuloksena olevalle tuotteelle voidaan sitten tehdä mahdollisesti tarvittavat suojauksenpoistotoimenpiteet, niin että saadaan keksinnön mukaisia yhdisteitä.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden syntetisoinnissa käytettäviä kiraalisia B-aminohappoestereitä voidaan vaihtoehtoisesti syntetisoida hyvin tunnetuin menetelmin, kuten menetelmillä, joita kuvataan US-patenttijulkaisussa 5 344 957, joka mainitaan tässä viitteenä.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan muuntaa myös liittämällä niihin sopivia funktionaalisia ryhmiä selektiivisten biologisten ominaisuuksien parantamiseksi. Mainitunlaiset muuntamiset ovat alalla tunnettuja, ja niihin kuuluvat muunnokset, jotka lisäävät biologista tunkeutumista johonkin määrättyyn biologiseen järjestelmään (esimerkiksi vereen, imukudoksiin, keskushermostoon), parantavat hyötyosuutta oraalisen annon yhteydessä, parantavat liukoisuutta annon mahdollistamiseksi injektioina, muuttavat metaboliaa ja muuttavat erittymisnopeutta.

Tässä hakemuksessa käytettynä termi "potilas" tarkoittaa nisäkästä, mukaan luettuina ihmiset. Termi "solu" tarkoittaa nisäkässoluja ihmissolut mukaan luettuina.

Kun tämän keksinnön mukaiset yhdisteet on syntetisoitu, niiden aktiivisuudet voidaan määrittää käyttämällä *in vitro*- ja *in vivo* -määrityksiä.

Näiden yhdisteiden soluadheesiota inhiboiva aktiivisuus voidaan esimerkiksi mitata määrittämällä inhibiittoripitoisuus, joka tarvitaan estämään soluja, joilla esiintyy VLA4:ää, sitoutumasta fibronektiinillä tai CS1:llä päällystettyihin maljoihin. Tässä määrityksessä mikromaljan syvennykset päällystetään joko fibronektiinillä (joka sisältää CS1-sekvenssin) tai CS1:llä. Jos käytetään CS1:ä, se täytyy kytkeä kantajaproteiiniin, kuten

naudan seerumialbumiiniin, jotta se sitoutuu syvennyksiin. Kun maljat on päällystetty, lisätään vaihtelevia pitoisuuksia testattavaa yhdistettä yhdessä sopivalla tavalla leimattujen solujen kanssa, joilla esiintyy VLA4:ää. Vaihtoehtoisesti voidaan lisätä ensin testattava yhdiste ja antaa sen inkuboitua yhdessä päällystettyjen syvennysten kanssa ennen solujen lisäämistä. Soluja inkuboidaan syvennyksissä vähintään 30 min. Inkuboinnin jälkeen syvennykset tyhjennetään ja pestään. Sitoutumisen inhibitio mitataan määrittämällä kvantitatiivisesti maljaan sitoutunut fluoresenssi tai radioaktiivisuus kullakin testattavan yhdisteen eri pitoisuuksilla samoin kuin testattavaa yhdistettä sisältämättömistä vertailunäytteistä.

Soluihin, joilla esiintyy VLA4:ää ja joita voidaan käyttää tässä määrityksessä, kuuluvat Ramos-solut, Jurkat-solut, A375-melanoomasolut samoin kuin ihmisen ääreisveren lymfosyytit (PBL:t). Tässä määrityksessä käytettävät solut voidaan leimata fluoresoiviksi tai radioaktiivisiksi.

Myös suoraa sitoutumismääritystä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden inhibointiaktiivisuuden määrittämiseen kvantitatiivisesti. Tässä määrityksessä VCAM-IgG-fuusioproteiini, joka sisältää VCAM:n kaksi ensimmäistä immunoglobiinidomeenia (D1D2) liitettyinä IgG1-molekyylin taivealueen yläpuolelle ("VCAM 2D - IgG"), kytketään markkerientsyymiin, kuten alkaliseen fosfataasiin ("AP"). Tämän VCAM-IgG-fuusioproteiinin synteesiä kuvataan PCT-julkaisussa WO 90/13 300, joka mainitaan tässä viitteenä. Kyseisen fuusioproteiinin kytkeminen markkerientsyymiin saadaan aikaan alalla hyvin tunnetuin ristisitomismenetelmin.

VCAM-IgG-entsyymikonjugaatti laitetaan sitten monisyvennyksisen suodatusmaljan syvennyksiin, kuten Millipore Multiscreen Assay Systemin (Millipore Corp., Bedford, MA) sisältämään maljaan. Syvennyksiin lisätään sitten testattavaa inhiboivaa yhdistettä vaihtelevina pitoisuuksina ja

sen jälkeen soluja, joilla esiintyy VLA4:ää. Solut, yhdiste ja VCAM-IgG-entsyymikonjugaatti sekoitetaan keskenään ja niiden annetaan inkuboitua huoneenlämpötilassa.

Inkuboinnin jälkeen syvennyksistä poistetaan neste alipaineen avulla, jolloin jäljelle jäävät solut ja mahdollinen sitoutunut VCAM. Sitoutunut VCAM määritetään kvantitatiivisesti lisäämällä sopivaa VCAM-IgG:hen kytketyn entsyymin kolorimetristä substraattia ja määrittämällä reaktiotuotteen määrä. Reaktiotuotteen väheneminen on osoitus lisääntyneestä soluadheesiota inhiboivasta aktiivisuudesta.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden VLA4-inhibitiospesifisyyden tutkimiseksi tehdään määrityksiä muiden tärkeiden integriiniryhmien, ts. ß2:n ja ß3:n, samoin kuin muiden ß1-integriinien, kuten VLA5:n, VLA6:n ja α4ß7:n suhteen. Nämä määritykset voidaan tehdä samalla tavalla kuin edellä kuvatut adheesionesto- ja suorat sitoutumismääritykset käyttämällä solua, jolla esiintyy asianomaista integriiniä, ja vastaavaa ligandia. Esimerkiksi liuskatumaisten solujen (PMN; polymorphonuclear cell) pinnalla esiintyy ß2-integriinejä, ja ne sitoutuvat ICAM:ään. ß3-integriinit osallistuvat verihiutaleiden aggregaatioon, ja inhibitio voidaan mitata tavanomaisella verihiutaleaggregaatiomäärityksellä. VLA5 sitoutuu spesifisesti Arg-Gly-Asp-sekvensseihin, kun taas VLA6 sitoutuu lamiiniiniin. α4ß7 on vähän aikaa sitten löydetty VLA4-homologi, joka myös sitoo fibronektiiniä ja VCAM:ää. α4ß7-spesifisyys määritetään sitoutumismäärityksellä, jossa käytetään edellä kuvattua VCAM-IgG-entsyymimarkkerikonjugaattia ja solulinjaa, jolla esiintyy α4ß7:ää, muttei VLA4:ää, kuten RPMI-8866-soluja.

Kun on identifioitu VLA4-spesifisiä inhibiittoreita, niitä voidaan karakterisoida tarkemmin *in vivo* -määrityksillä. Yhdessä mainitunlaisessa määrityksessä testataan kosketusyliherkkyyden inhibointia eläimessä, kuten kuva-

taan artikkelissa P. L. Chisholm *et al.*, Monoclonal Antibodies to the Integrin α-4 Subunit Inhibit the Murine Contact Hypersensitivity Response, Eur. J. Immunol. 23 (1993) 682 - 688 ja teoksessa Current Protocols in Immunology 1, toim. J. E. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, New York 1991, s. 4.2.1 - 4.2.5, jotka julkaisut mainitaan tässä viitteinä. Tässä määrityksessä eläimen iho herkistetään altistamalla se ärsyttävälle aineelle, kuten dinitrofluoribentseenille, mitä seuraa kevyt fysikaalinen ärsytys, kuten ihon raapiminen kevyesti terävällä terällä. Toipumisjakson jälkeen eläimet herkistetään uudelleen noudattamalla samaa menettelyä. Muutaman päivän kuluttua herkistyksestä eläimen toinen korva altistetaan ärsyttävälle kemikaalille, kun taas toinen korva käsitellään ärsyttämättömällä vertailuliuoksella. Pian korvien käsittelyn jälkeen eläimille annetaan vaihtelevia annoksia VLA4-inhibiittoria ihonalaisena ruiskeena. Soluadheesioon liittyvän tulehduksen inhibitiota *in vivo* tutkitaan mittaamalla eläimen korvanturvotusreaktio käsitellyssä korvassa käsittelemättömään verrattuna. Turvotus mitataan käyttämällä työntötulkkia tai muuta sopivaa välinettä korvan paksuuden mittaamiseksi. Tällä tavalla voidaan identifioida tulehduksen estoon parhaiten soveltuvia tämän keksinnön mukaisia inhibiittoreita.

Yksi toinen *in vivo* -määritys, jota voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten inhibiittorien testaamiseen, on lampaan astma -määritys. Tämä määritys toteutetaan olennaisilta osiltaan tavalla, jota kuvataan artikkelissa W. M. Abraham *et al.*, α-Integrins Mediate Antigeninduced Late Bronchial Responses and Prolonged Airway Hyperresponsiveness in Sheep, J. Clin. Invest. 93 (1994) 776 - 787, joka mainitaan tässä viitteenä. Tässä määrityksessä mitataan *Ascaris*-antigeenien indusoimien myöhäisvaiheen hengitystiereaktioiden ja hengitysteiden yliherkkyyden inhibitiota astmaattisissa lampaissa.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen muodossa, jotka on valmistettu epäorgaanisista tai orgaanisista hapoista ja emäksistä. Mainitunlaisiin happosuoloihin kuuluvat asetaatti, adipaatti, alginaatti, aspartaatti, bentsoaatti, bentseenisulfonaatti, vetysulfaatti, butyraatti, sitraatti, kamferaatti, kamferisulfonaatti, syklopentaanipropionaatti, diglukonaatti, dodekyylisulfaatti, etaanisulfonaatti, fumaraatti, glukoheptanoaatti, glyserolifosfaatti, hemisulfaatti, heptanoaatti, heksanoaatti, hydrokloridi, hydrobromidi, hydrojodidi, 2-hydroksietaanisulfonaatti, laktaatti, maleaatti, metaanisulfonaatti, 2-naftaleenisulfonaatti, nikotinaatti, oksalaatti, pamoaatti, pektinaatti, persulfaatti, 2-fenyylipropionaatti, pikraatti, pivalaatti, propionaatti, sukkinaatti, tartraatti, tiosyanaatti, tosylaatti ja undekanoaatti. Emässuoloihin kuuluvat ammoniumsuolat, alkalimetallisuolat, kuten natrium- ja kaliumsuolat, maa-alkalimetallisuolat, kuten kalsium- ja magnesiumsuolat, orgaanisten emästen, kuten disykloheksyyliamiinin ja N-metyyli-D-glukamiinin, ja aminohappojen, kuten arginiinin, lysiinin jne., kanssa muodostetut suolat. Voidaan myös kvaternisoida emäksisiä typpipitoisia ryhmiä sellaisilla aineilla kuin alemmilla alkyylihalogenideilla, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli- ja butyylikloridеilla, -bromideilla ja -jodideilla, dialkyylisulfaateilla, kuten dimetyyli-, dietyyli-, dibutyyli- ja dipentyylisulfaateilla, pitkäketjuisilla halogenideilla, kuten dekyyli-, lauryyli-, myristyyli- ja stearyylikloridеilla, -bromideilla ja -jodideilla, aryylialkyylihalogenideilla, kuten bentsyyli- ja fenyylietyylibromideilla, yms. Siten saadaan veteen tai öljyihin liukenevia tai dispergoituvia tuotteita.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan formuloida farmaseuttisiksi koostumuksiksi, joita voidaan antaa oraalisesti, parenteraalisesti, inhalaatiosuihkeena, pai-

kallisesti, rektaalisesti, nasaalisesti, bukkaalisesti, vaginaalisesti tai istutetun säiliön kautta. Termi "parenteraalinen" sisältää tässä käytettynä subkutaamiset, intravenoosiset, intramuskulaariset, intra-artikulaariset, intrasynoviaaliset, intrasternaaliset, intratekaaliset, intrahepaattiset, leesionsisäiset, ja intrakraniaaliset injektointi- tai infusointimenetelmät.

Tämän keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset käsittävät mitä tahansa keksinnön mukaisia koostumuksia tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja yhdessä minkä tahansa farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa. Termi "kantaja" sisältää tässä käytettynä hyväksyttävät apuaineet ja vehikkelit. Farmaseuttisesti hyväksyttäviin kantajiin, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa farmaseuttisissa koostumuksissa, kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, ioninvaihtimet, alumiinioksidi, alumiinistearaatti, lesitiini, seerumiproteiinit, kuten ihmisen seerumialbumiini, puskuriaineet, kuten fosfaatit, glysiini, sorbiinihappo, kaliumsorbaatti, tyydyttyneiden kasvirasvahappojen osaglyseridiseokset, vesi, suolat tai elektrolyytit, kuten protamiinisulfaatti, dinatriumvetyfosfaatti, kalsiumvetyfosfaatti, natriumkloridi, sinkkisuolat, kolloidinen piidioksidi, magnesiumtrisilikaatti, polyvinyylipyrrolidoni, selluloosapohjaiset materiaalit, polyeteeniglykoli, natriumkarboksimetyyliselluloosa, polyakrylaatit, vahat, eteeni-oksipropeenilohkopolymeerit, polyeteeniglykoli ja villarasva.

Farmaseuttiset koostumukset voivat tämän keksinnön mukaisesti olla steriilin injektiovalmisteen, esimerkiksi steriilin injektoitavissa olevan vesi- tai öljypitoisen suspension muodossa. Tämä suspensio voidaan formuloida alalla tunnetuin menetelmin käyttämällä sopivia dispergointi- tai kostutusaineita ja suspendointiaineita. Steriili injektiovalmiste voi olla myös steriili injektoitavissa oleva, myrkyttömään parenteraalisesti hyväksyttävään

laimennusaineeseen tai liuotteeseen valmistettu liuos tai suspensio, esimerkiksi 1,3-butaanidioliliuos. Hyväksyttäviin vehikkeleihin ja liuotteisiin, joita voidaan käyttää, kuuluvat vesi, Ringerin liuos ja isotoninen natriumkloridiliuos. Liuotteena tai suspendointiväliaineena käytetään perinteisesti lisäksi steriilejä rasvaöljyjä. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää mitä tahansa mietoa rasvaöljyä, mukaan luettuina synteettiset mono- tai diglyseridit. Rasvahapot, kuten öljyhappo ja sen glyseridijohdokset, ovat käyttökelpoisia injektiovalmisteiden valmistuksessa, samoin farmaseuttisesti hyväksyttävät luonnonöljyt, kuten oliiviöljy tai risiiniöljy, erityisesti polyoksietyloituina versioinaan. Nämä öljyliuokset tai -suspensiot voivat sisältää myös pitkäketjuista alkoholilaimennusainetta tai -dispergointiainetta, kuten Ph. Helv:n mukaista tai vastaavaa alkoholia.

Tämän keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa oraalisesti missä tahansa oraalisesti hyväksyttävässä annostelumuodossa mukaan luettuina, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, kapselit, tabletit, vesipitoiset suspensiot tai liuokset. Oraaliseen käyttöön tarkoitettujen tablettien ollessa kyseessä yleisesti käytettyihin kantajiin kuuluvat laktoosi ja maissitärkkelys. Voiteluaineita, kuten magnesiumstearaattia, lisätään myös tyypillisesti. Kapselien muodossa tapahtuvan oraalisen annon ollessa kyseessä käyttökelpoisiin laimennusaineisiin kuuluvat laktoosi ja kuivattu maissitärkkelys. Kun oraaliseen käyttöön tarvitaan vesipitoisia suspensioita, aktiivinen aineosa yhdistetään emulgointi- ja suspendointiaineiden kanssa. Haluttaessa voidaan lisätä myös tiettyjä makeutus-, aromi- tai väriaineita.

Tämän keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia voidaan vaihtoehtoisesti antaa rektaaliseen antoon tarkoitettujen peräpuikkojen muodossa. Niitä voidaan valmistaa sekoittamalla vaikuttava aine sopivan, ärsyttämät-

tömän jatkeaineen kanssa, joka on kiinteä huoneenlämpötilassa mutta nestemäinen peräsuolen lämpötilassa ja sulaa siksi peräsuolessa, niin että lääkeaine vapautuu. Mainitunlaisiin materiaaleihin kuuluvat kaakaovoi, mehiläisvaha ja polyeteeniglykolit.

Tämän keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa myös paikallisesti, erityisesti hoidettavan kohteen sisältäessä paikallisella annolla helposti saavutettavissa olevia alueita tai elimiä, mukaan luettuina silmät, iho tai suolikanavan alaosa. Sopivia paikallisformuloita on helppo valmistaa kullekin näistä alueista tai elimistä.

Suolikanavan alaosan ollessa kyseessä paikallinen anto voidaan toteuttaa peräpuikkoformulana (katso edellä) tai sopivana peräruiskeformulana. Paikallisesti vaikuttavia transdermaalisia lappuja voidaan myös käyttää.

Paikalliskäytön ollessa kyseessä farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida sopivaksi voiteeksi, joka sisältää aktiivista komponenttia suspendoituna tai liuotettuna yhteen tai useampaan kantajaan. Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden paikalliseen antoon sopiviin kantajiin kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, mineraaliöljy, vaseliiniöljy, valkovaseliini, propeeniglykoli, polyoksieteeni, polyoksipropeeniseos, emulgointivaha ja vesi. Farmaseuttiset koostumukset voidaan vaihtoehtoisesti formuloida sopivaksi lotioniksi tai voiteeksi, joka sisältää aktiiviset komponentit suspendoituina tai liuotettuina yhteen tai useampaan farmaseuttisesti hyväksyttävään kantajaan. Soveltuviin kantajiin kuuluvat, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, mineraaliöljy, sorbitaanimonostearaatti, polysorbaatti 60, setyyliesterivaha, stearyylialkoholi, 2-oktyylidodekanoli, bentsyylialkoholi ja vesi.

Oftalmisen käytön ollessa kyseessä farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida mikronisoiduiksi suspen-

sioiksi isotoniseen, määrättyyn pH-arvoon säädettyyn, steriiliin suolaliuokseen tai, edullisesti, liuoksiksi isotoniseen, määrättyyn pH-arvoon säädettyyn, steriiliin suolaliuokseen, joka sisältää tai on sisältämättä säilytettä, kuten bentsyylialkoniumkloridia. Oftalmisen käytön ollessa kyseessä farmaseuttiset koostumukset voidaan vaihtoehtoisesti formuloida voiteeseen, kuten vaseliiniin.

Tämän keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa myös nenäsuihkeena tai inhalaationa käyttämällä sumutinta, kuivalle jauheelle tarkoitettua inhalaattoria tai annosinhalaattoria. Mainitunlaisia koostumuksia valmistetaan lääkkeidenformulointialalla tunnetuin menetelmin ja niitä voidaan valmistaa fysiologiseen suolaliuokseen tehtyinä liuoksina, joissa käytetään bentsyylialkoholia tai muita sopivia säilytteitä, imeytymistä edistäviä aineita biologisen hyötyosuuden parantamiseksi, fluorihiilivetyjä ja/tai muita tavanomaisia liukenemista edistäviä aineita tai dispergointiaineita.

Aktiivisen aineosan määrä, joka voidaan yhdistää kantajamateriaalien kanssa yhden annostelumuodon tuottamiseksi, vaihtelee hoidettavan isännän ja kulloisenkin antotavan mukaan. Tulisi kuitenkin ymmärtää, että annostelu ja hoito-ohjelma riippuu kunkin erityisen potilaan kohdalla joukosta tekijöitä, mukaan luettuna kulloinkin käytettävän yhdisteen aktiivisuus, ikä, paino, yleinen terveydentila, sukupuoli, ruokavalio, antoaika, erittymisnopeus, lääkeyhdistelmä, hoitavan lääkärin harkinta ja kulloinkin hoidettavan sairauden vakavuus. Aktiivisen aineosa määrä voi riippua myös terapeuttisesta tai profylaktisesta aineesta, jonka ohella aineosaa mahdollisesti annetaan.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden annostelu ja antotiheys, joka vaikuttaa soluadheesiota ehkäisevästi, tukahduttavasti tai inhiboivasti, riippuu erilaisista tekijöistä, kuten inhibiittorin luonteesta, potilaan koosta, hoidon päämäärästä, hoidettavan patologisen tilan luon-

teesta, käytettävästä farmaseuttisesta koostumuksesta ja hoitavan lääkärin harkinnasta. Käyttökelpoisia ovat annostukset, jotka ovat suunnilleen alueella 0,1 - 10 mg/painokilo vuorokaudessa aktiivista aineosaa.

Yhden toisen suoritusmuodon mukaisesti tämän keksinnön mukaista yhdistettä sisältävät koostumukset voivat käsittää myös toista vaikuttavaa ainetta, jona tulevat kyseeseen kortikosteroidit, keuhkoputkia laajentavat aineet, antiastmaattiset aineet (syöttösoluja stabiloivat aineet), anti-inflammatoriset aineet, reumalääkkeet, immuunisuppressantit, antimetaboliitit, immuunimodulaattorit, psoriasislääkkeet ja diabeteslääkkeet. Erityisinä näiden ryhmien yhdisteinä tulevat kyseeseen mitkä tahansa yhdisteet, joita luetellaan asianomaisten ryhmäotsikoiden alla teoksessa Comprehensive Medicinal Chemistry, Pergamon Press, Oxford, Englanti 1990, s. 970 - 986, joka mainitaan tässä viittenä. Tähän ryhmään kuuluvat myös sellaiset yhdisteet kuin teofylliini, sulfasalatsiini ja aminosalisylaatit (anti-inflammatoriset aineet); syklosporiini, FK-506 ja rapamysiini (immuunisuppressantit); syklofosfamidi ja metotreksaatti (antimetaboliitit) ja interferonit (immuunimodulaattorit).

Muiden suoritusmuotojen mukaisesti keksintö tarjoaa käyttöön menetelmiä soluadheesioon liittyvän tulehduksen ja soluadheesioon liittyvien immuuni- tai autoimmuunireaktioiden ehkäisemiseksi, inhiboimiseksi ja tukahduttamiseksi. VLA4:ään liittyvällä soluadheesiolla on keskeinen rooli erilaisissa tulehdus-, immuuni- ja autoimmuunisairauksissa. Niinpä soluadheesion inhibointia tämän keksinnön mukaisilla yhdisteillä voidaan hyödyntää menetelmissä tulehdus-, immuuni- ja autoimmuunisairauksien hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi. Tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä hoidettavina sairauksina tulevat edullisesti kyseeseen astma, artriitti, psoriasis, siirteiden hylkiminen, multippeliskleroosi, diabetes ja suolistotulehdus.

Näissä menetelmissä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä monoterapiana tai yhdistettynä anti-inflammatoriseen tai immuunisuppressiiviseen aineeseen. Mainitunlaisten yhdistelmähoitojen piiriin kuuluu aineiden anto yhdessä annostelumuodossa tai useissa annostelumuodoissa, jotka annetaan samanaikaisesti tai eri aikoina.

Tarkemman käsityksen antamiseksi tästä keksinnöstä esitetään seuraavat esimerkit. Esimerkit on tarkoitettu pelkästään havainnollistaviksi, eikä niitä pidä käsittää keksinnön piiriä millään tavalla rajoittaviksi.

Menettely A – Sinnamaattiestereiden valmistus

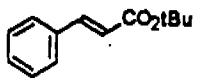
Menetelmä A

Kanelihappoon tai substituoituun kanelihappoon (1,0 mmol), joka oli sekoitettu CH_2Cl_2:iin (10 ml), lisättiin hitaasti $(COCl)_2$:a (1,5 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 4 h ja liuote poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin happokloridi. Lisättiin metanolia ja t-butyylialkoholia (5 ml), jolloin saatiin liuotteiden poistamisen jälkeen metyyli- tai t-butyyliesteriä kvantitatiivisella saannolla.

Menetelmä B

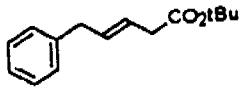
Asianmukaiseen aldehydiin (1,0 mmol), joka oli sekoitettu THF:iin (10 ml), lisättiin (t-butoksikarbonyyli)-metyleeni(trifenyylifosforaania) (1,0 mmol, Aldrich) ja tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia. Reaktioseos laimennettiin liuotebensiinillä (10 ml) ja suodatettiin piimaakerroksen läpi. Suodos kerättiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin haluttu tuote.

E-1:



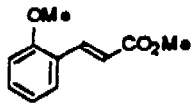
Menetelmä A, saanto 95 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,57 (d, 1 H, J = 16 Hz), 7,47 (m, 2 H), 7,34 (m, 3 H), 6,35 (d, 1 H, J = 16 Hz), 1,52 (s, 9 H).

E-2:



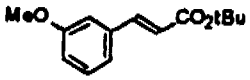
Menetelmä B, saanto 90 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,48 (d, 1 H), 7,28 - 7,18 (m, 5 H), 5,69 (d, 2 H), 3,44 (d, 2 H), 1,42 (s, 9 H).

E-3:



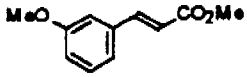
Menetelmä A, saanto 94 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,95 (d, 1 H, J = 16 Hz), 7,49 (d, 1 H), 7,42 (t, 1 H), 6,94 (dd, 2 H), 6,51 (d, 2 H, J = 16 Hz), 3,86 (s, 3 H), 3,76 (s, 3 H).

E-4:



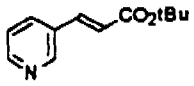
Menetelmä A, saanto 92 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,52 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,28 (t, 1 H), 7,09 (d, 1 H), 7,02 (leveä s, 1 H), 6,89 (d, 1 H), 6,34 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 3,82 (s, 3 H), 1,54 (s, 9 H).

E-5:



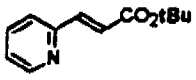
Menetelmä A, saanto 98 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,64 (d, 1 H, J = 16 Hz), 7,29 (t, 1 H), 7,10 (d, 1 H), 7,06 (leveä s, 1 H), 6,94 (d, 1 H, J = 16 Hz), 3,82 (s, 3 H), 3,80 (s, 3 H).

E-6:



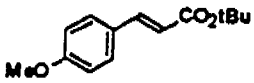
Menetelmä B, saanto 88 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,62 (leveä s, 1 H), 8,51 (m, 1 H), 7,72 (d, 1 H), 7,48 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,22 (m, 1 H), 6,36 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 1,49 (s, 9 H).

E-7:



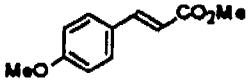
Menetelmä B, saanto 90 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,60 (leveä s, 1 H), 7,66 (t, 1 H), 7,55 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,36 (d, 1 H), 7,21 (m, 1 H), 6,78 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 1,52 (s, 9 H).

E-8:



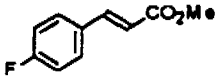
Menetelmä A, saanto 91 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,52 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,44 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 6,85 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 6,21 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 3,81 (s, 3 H), 1,52 (s, 9 H).

E-9:



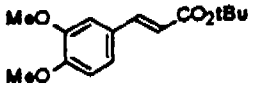
Menetelmä A, saanto 90 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,61 (d, 1 H, J = 16 Hz), 7,42 (d, 2 H, J = 7,9 Hz), 6,86 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 6,28 (d, 1 H, J = 16 Hz), 3,78 (s, 3 H), 3,74 (s, 3 H).

E-10:



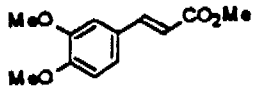
Menetelmä B, saanto 91 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,56 (d, 1 H, J = 16 Hz), 7,46 (t, 2 H), 7,02 (t, 2 H), 6,26 (d, 2 H, J = 16 Hz), 1,54 (s, 9 H).

E-11:



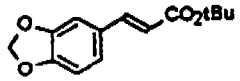
Menetelmä A, saanto 89 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,47 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,01 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 6,98 (leveä s, 1 H), 6,78 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 3,84 (s, 6 H), 1,48 (s, 9 H).

E-12:



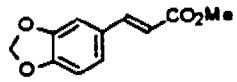
Menetelmä A, saanto 91 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,61 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,07 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,02 (leveä s, 1 H), 6,83 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 6,28 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 3,88 (s, 3 H), 3,76 (s, 3 H).

E-13:



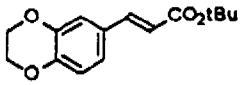
Menetelmä A, saanto 92 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,46 (d, 1 H, J = 16,1 Hz), 6,99 (s, 1 H), 6,97 (d, 1 H), 6,76 (d, 1 H), 6,18 (d, 1 H, J = 16,1 Hz), 5,96 (s, 2 H), 1,50 (s, 9 H).

E-14:



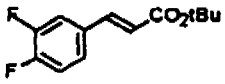
Menetelmä A, saanto 88 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,55 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 6,98 - 6,75 (m, 2 H), 6,22 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 5,96 (s, 2 H), 3,75 (s, 3 H).

E-15:



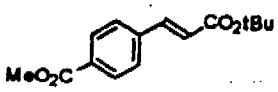
Menetelmä A, saanto 89 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,45 (d, 1 H, J = 15,8 Hz), 6,99 (s, 1 H), 6,98 (d, 1 H), 6,80 (d, 1 H), 6,18 (d, 1 H, J = 15,8 Hz), 4,21 (leveä s, 4 H), 1,49 (s, 9 H).

E-16:



Menetelmä B, saanto 88 %.

E-17:



Menetelmä B, saanto 93 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, ppm): 8,00 (d, 2 H, J = 5,5 Hz), 7,53 (d, 2 H, J = 5,5 Hz), 7,58 (d,

1 H, J = 10,7 Hz), 6,42 (d, 1 H, J = 10,7 Hz), 3,90 (s, 3 H), 1,51 (s, 9 H).

Menettely B – ß-aminohappojen valmistus

Pyöreäpohjaiseen pulloon (2 l), joka oli varustettu magneettisekoittimella, laitettiin MeOH:a (1 000 ml) ja pullo sisältöineen punnittiin. MeOH:n sisään johdettiin kaasupullosta vedetöntä HCl:a (0,11 g, 0,29 mol). Liuokseen lisättiin yhdessä erässä kanelihappoa (0,29 mol) sellaisenaan. Tulokseksi saatua seosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa, kunnes reaktion arvioitiin TLC:n perusteella menneen loppuun. Reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja pidettiin sitten jääkaapissa yön yli. Kiteinen tuote kerättiin imusuodattamalla keskikarkealle sintterille ja suodatuskakku pestiin kylmällä MeOH:lla. Kiinteä aine kuivattiin suodattimella, jolloin saatiin valkoinen tai lähes valkoinen tuote.

Yhdisteen ß-3 esiaste: Saanto 94 %. TLC (heksaani-EtOAC-seos, 3:1; UV): R_f = 0,48. Sp = 134 - 136 °C. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 7,58 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,00 - 6,97 (m, 3 H), 6,79 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 6,24 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 5,98 (s, 2 H), 3,77 (s, 3 H). MS (FAB): 206.

Yhdisteen ß-5 esiaste: Saanto 84 %. TLC (heksaani-EtOAC-seos, 3:1; UV): R_f = 0,48. Sp = 89 - 91 °C. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 7,63 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,46 (d, 2 H, J = 8,7 Hz), 6,89 (d, 2 H, J = 8,7 Hz), 6,29 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 3,82 (s, 3 H), 3,77 (s, 3 H). MS (FAB): 192.

(R)-(+)-N-bentsyyli-1-fenyylietyylietyyliamiinin Michael-additio metyyli-4-metoksisinnamaattiin

Kolmikaulaiseen pyöreäpohjaiseen pulloon (1 l), joka oli varustettu korkilla, lämpömittarilla ja tiputussuppilolla (250 ml), johon oli yhdistetty argonin tuloputki, laitettiin (R)-(+)-N-bentsyyli-1-fenyylietyylietyyliamiinihydrokloridia (32,6 g, 0,132 mol, 1,1 ekv suhteessa sinnamaatin määrään) ja laitteistoa huuhdottiin Ar:lla 30 minuuttia. Suola suspendoitiin kuivaan THF:iin (200 ml) ja

seos jäähdytettiin hiilihappojää-asetonihauteessa lämpötilaan -70 °C (sisälämpötila). Suspensioon lisättiin tiputussuppilosta n-BuLi:a (2,5 mol/l heksaanissa; 103 ml, 0,257 mol, 1,95 ekv suhteessa amiinihydrokloridin määrään) sellaisella nopeudella, että sisälämpötila ei noussut arvon -65 °C yläpuolelle. Lisäys kesti 90 min. Lisäyksen päätyttyä reaktioseosta sekoitettiin 1 tunti lämpötilassa -70 °C. Lisättiin tiputussuppilosta liuos, joka sisälsi metyyli-4-metoksisinnamaattia (23 g, 1,20 mol, 1 ekv) THF:ssa (125 ml), 90 minuutin aikana sellaisella nopeudella, että sisälämpötila ei noussut arvon -65 °C yläpuolelle. Lisäyksen päätyttyä reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia lämpötilassa -70 °C. TLC osoitti reaktio menneen loppuun. Reaktioseoksesta tuhottiin kylmänä ylimääräinen reagenssi 5-prosenttista sitruunahappoliuosta (250 ml) lisäämällä ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Kerrokset erotettiin erotussuppilossa (2 l) ja orgaaninen kerros pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (2 x 125 ml). Yhdistetyt vesifaasit uutettiin EtOAc:lla (1 x 200 ml). Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin sitten 5-prosenttisella $NaHCO_3$-liuoksella (1 x 150 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (1 x 150 ml) ja kuivattiin ($MgSO_4$). Suodatus ja haihdutus muuttumattomaan massaan antoivat tulokseksi raakatuotteen (50,04 g, 103 % teoreettisesta) viskoosina öljynä, joka jähmettyi seisoessaan. Puhdasta ainetta saatiin aikaan trituroimalla ja sekoittamalla raakatuotetta heptaanin (1,5 - 2 ml/g, kokonaismäärä 75 - 100 ml) kanssa huoneenlämpötilassa yön yli. Kiinteä aine kerättiin imusuodattamalla keskikarkealle sintterille ja suodatuskakku pestiin runsaalla kylmällä heptaanilla (2 x 50 ml). Kiinteä aine kuivattiin suodattimella, jolloin saatiin puhdas tuote (28,93 g, saanto 60 %) valkeana jauheena. TLC (heksaani-EtOAC-seos, 4:1): R_f = 0,48 (I_2, UV). Sp = 87 - 88 °C. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,20 (d, 3 H, J = 6,9 Hz), 2,51 (dd, 1 H, J = 9,4 ja 14,8 Hz), 2,66

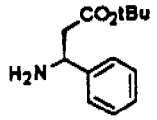
(dd, 1 H, J = 5,7 ja 14,8 Hz), 3,45 (s, 3 H), 3,67 (ABq, 2 H, J = 14,7 Hz), 3,79 (s, 3 H), 3,98 (q, 1 H, J = 6,8 Hz), 4,37 (dd, 1 H, J = 5,7 ja 9,3 Hz), 6,86 (d, 2 H, J = 8,6 Hz), 7,16 - 7,33 (m, 10 H), 7,40 (d, 2 H, J = 7,3 Hz). MS (FAB): 404.

Bentsyyliryhmien hydrogenolyysi

Edellä valmistettu additiotuote (28 g, 0,071 mol) suspendoitiin MeOH:iin (300 ml) ja suspensioon lisättiin yhdessä erässä muurahaishappoa (96 %, 8,25 g, 6,8 ml, 0,179 mol, 2,5 ekv) laimentamattomana samalla sekoittaen. Muodostuneeseen suspensioon lisättiin yhdessä erässä 10 % Pd/C-katalyyttiä (Degussa, tyyppi E101 NE/W; märkyys 50 %, 3,81 g, 0,00179 mol, 0,025 ekv). Muodostunutta seosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa, kunnes reaktion arvioitiin TLC:n perusteella menneen loppuun (1 - 2 tuntia). Seos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja suodatettiin sitten piimaakerroksen läpi, ja pullo ja piimaakerros huuhdottiin MeOH:lla (150 ml). Yhdistetyt suodokset haihdutettiin, jolloin saatiin raakatuote (15,42 g, 102 % teoreettisesta) öljynä. Raakatuote liuotettiin i-PrOH:iin (250 ml) ja liuosta palautusjäähdytettiin kevyesti. Lisättiin yhdessä erässä kiinteää D-viinihappoa (10,76 g, 0,071 mol, 1 ekv). Kuumennusta jatkettiin 15 min, jonka ajan kuluessa suola saostui hienona valkeana kiinteänä aineena. Seos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja pidettiin sitten jääkaapissa yön yli. Kiteinen suola kerättiin imusuodattamalla keskikarkealle sintterille, pestiin kylmällä i-PrOH:lla (50 - 75 ml) ja kuivattiin suodattimella, jolloin saatiin tuote (23 g, 79 %). Edellä kuvatulla tavalla aikaansaatu suola muunnettiin vapaaksi emäkseksi liuottamalla se mahdollisimman pieneen määrään vettä (125 ml) ja liuokseen lisättiin kiinteää $NaHCO_3$:a, kunnes vesiliuos oli kylläinen. Se uutettiin EtOAc:lla (3 x 100 ml). Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella (1 x 100 ml) ja kuivattiin ($MgSO_4$). Suodattamalla ja haihdutta-

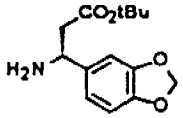
malla saatiin puhdasta tuotetta (11,75 g, 78 %) lähes värittömänä öljynä, joka jähmettyi jäähdytettäessä.
TLC ($CHCl_3$-MeOH-seos, 9:1): R_f = 0,30 (I_2, UV). HPLC (käänteisfaasi, MeCN-H_2O-TFA-gradientti): puhtaus 96 %, R_t = 17,9 min. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,83 (leveä s, 2 H), 2,62 (d, 2 H, J = 6,9 Hz), 3,64 (s, 3 H), 3,76 (s, 3 H), 4,35 (t, 1 H, J = 6,9 Hz), 6,84 (d, 2 H, J = 8,6 Hz), 7,25 (d, 2 H, J = 8,6). MS (FAB): 210.

ß-1:



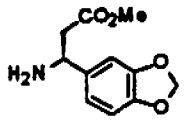
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,41 - 7,28 (m, 5 H), 4,18 (q, 2 H), 2,65 (d, 2 H), 2,12 (leveä, 2 H), 1,16 (t, 3 H).

ß-2:



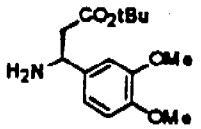
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,81 (d, 1 H, J = 1,6 Hz), 6,72 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 6,66 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 5,85 (s, 2 H), 4,22 (dd, 1 H, J = 7,5 ja 7,3 Hz), 2,47 (dd, 2 H, J = 7,5 ja 5,6 Hz), 2,21 (s, 2 H), 1,35 (s, 9 H).

ß-3:



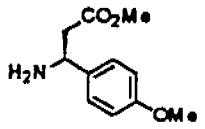
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,82 (d, 1 H, J = 1,6 Hz), 6,76 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 6,73 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 5,89 (s, 2 H), 4,29 (dd, 1 H, J = 6,9 ja 6,8 Hz), 3,63 (s, 3 H), 2,57 (d, 2 H, J = 6,9 Hz), 1,75 (s, 2 H).

ß-4:



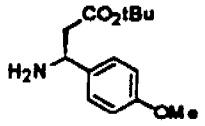
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,79 - 6,78 (m, 3 H), 4,32 (t, 1 H, J = 6,7 Hz), 3,75 (s, 3 H), 3,72 (s, 3 H), 2,52 (d, 2 H, J = 6,8 Hz), 1,82 (leveä, 2 H), 1,42 (s, 9 H).

ß-5:



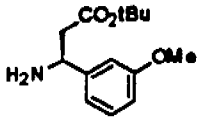
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,20 (d, J = 8,6 Hz), 6,80 (d, 2 H, J = 8,6 Hz), 4,30 (t, 1 H, J = 6,8 Hz), 3,71 (s, 3 H), 3,60 (s, 3 H), 2,57 (d, 2 H, J = 6,8 Hz), 1,91 (s, 2 H).

ß-6:



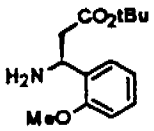
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,24 (d, J = 8,4 Hz), 6,82 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 4,26 (t, 1 H, J = 6,8 Hz), 3,66 (s, 3 H), 2,47 (d, 2 H, J = 6,6 Hz), 1,41 (s, 9 H).

ß-7:



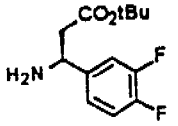
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,21 (dd, 1 H, J = 8,2 ja 8,1 Hz), 6,95 - 6,93 (m, 2 H), 6,78 (d, 1 H, J = 6,8 Hz), 4,34 (t, 1 H, J = 6,7 Hz), 3,79 (s, 3 H), 2,54 (d, 2 H, J = 6,9 Hz), 1,74 (s, 2 H), 1,40 (s, 9 H).

ß-8:



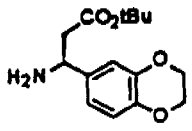
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,34 - 7,08 (m, 2 H), 6,82 - 6,68 (m, 2 H), 4,45 (m, 1 H), 3,65 (s, 3 H), 3,49 (s, 3 H), 2,58 (d, 2 H), 1,68 (leveä s, 2 H).

ß-9:



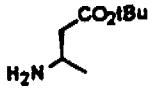
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,28 - 7,25 (m, 2 H), 7,01 (d, 1 H), 4,31 (t, 1 H), 2,50 (d, 2 H), 2,01 (leveä, 2 H), 1,41 (s, 9 H).

ß-10:



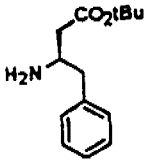
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,84 (s, 1 H), 6,79 - 6,76 (m, 1 H), 4,24 - 4,19 (m, 1 H), 4,19 (s, 4 H), 2,50 (d, 2 H), 1,63 (leveä, 2 H), 1,41 (s, 9 H).

ß-11:



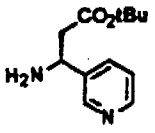
^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 3,34 - 3,05 (m, 1 H), 2,65 - 2,58 (m, 2 H), 1,65 (d, 2 H).

ß-12:



^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,34 - 7,28 (m, 3 H), 7,26 - 7,15 (m, 3 H), 3,42 - 3,15 (m, 1 H), 2,71 (dd, 1 H, J = 5,5 ja 13,3 Hz), 2,54 (dd, 1 H, J = 8,1 ja 13,3 Hz), 2,36 (dd, 1 H, J = 4,2 ja 15,7 Hz), 2,20 (dd, J = 8,6 ja 15,7 Hz), 1,42 (s, 9 H).

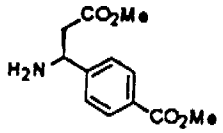
Aminohapon ß-13



valmistamiseksi seokseen, joka sisälsi (R)-α-metyylibentsyyliamiinia (3,4 g, 28 mmol) ja Et_3N:a (4 g, 40 mmol) THF:ssa (10 ml), lisättiin TMSCl:a CH_2Cl_2:ssa (1 mol/l 33 ml, 33 mmol) ja seosta sekoitettiin 1 tunti huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen kun kiinteä aine oli poistettu suodattamalla, liuos väkevöitiin, jolloin saatiin neste. Tämä

allyyliamiini (2,4 g, 12,5 mmol) liuotettiin THF:iin (35 ml) ja jäähdytettiin lämpötilaan -78 °C. Jäähdytettyyn liuokseen lisättiin hitaasti n-BuLi:a (heksaaniin tehty liuos, 1,6 mol/l; 7,8 ml, 12,5 mmol). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu mainitussa lämpötilassa 0,5 tuntia, siihen lisättiin liuos, joka sisälsi t-butyyli-trans-3-(3-pyridyyli)akrylaattia (1,56 g, 12,4 mmol) THF:ssa (10 ml). Sekoitusta jatkettiin toinen 0,5 tuntia, seoksesta tuhottiin ylimääräinen reagenssi kylläisellä NH_4Cl-liuoksella (20 ml), sen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja se uutettiin eetterillä. Yhdistetyt eetterikerrokset kuivattiin (K_2CO_3) ja väkevöitiin, jolloin saatiin öljy. Öljy (500 mg) liuotettiin etanoliin (1,5 ml) ja liuokseen lisättiin t-butanolia (15 ml), ammoniumformiaattia (1,5 g) ja 10 % Pd/C -katalyyttiä (1,2 g). Muodostunutta seosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa 3 tuntia, mitä seurasi loppukäsittely hapolla ja emäksellä, jolloin saatiin haluttu amiini ß-13 (300 mg). MS (FAB): 223.

ß-14:

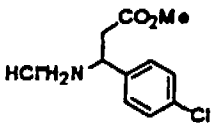


^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,97 (d, 2 H, J = 5,4 Hz), 7,41 (d, 2 H, J = 5,4 Hz), 4,40 (t, 1 H, J = 4,5 Hz), 3,88 (s, 3 H), 2,55 (d, 2 H, J = 4,5 Hz), 1,71 (leveä, 2 H), 1,39 (s, 9 H).

Yleinen menettely yhdisteiden M-1, M-2 ja M-3 valmistamiseksi

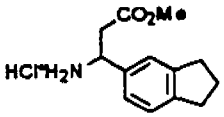
Lämpötilaan 0 °C jäähdytettyyn liuokseen, joka sisälsi kaupallisesti saatavissa olevaa aminohappoa (1,5 mmol) CH_2Cl_2:n (4 ml) ja MeOH:n (1 ml) seoksessa, lisättiin tionyylikloridia (0,125 ml, 1,65 mmol). Reaktioseos lämmitettiin 2 tunniksi lämpötilaan 40 °C ja se haihdutettiin kuiviin alipaineessa, jolloin saatiin halutun aminohappoesterin HCl-suola.

M-1:



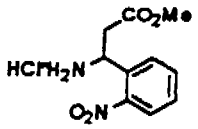
^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 9,00 - 8,75 (leveä m, 3 H), 7,71 (d, 2 H, J = 7,3 Hz), 7,58 (d, 2 H, J = 7,3 Hz), 4,71 (leveä s, 1 H), 3,64 (s, 3 H), 3,40 - 3,06 (m, 2 H).

M-2:



Kellanruskea kiinteä aine, saanto 85 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,55 - 7,05 (leveä m, 6 H), 3,66 (s, 3 H), 3,65 - 3,45 (leveä m, 2 H), 3,10 - 2,77 (leveä m, 5 H), 2,17 - 1,95 (leveä m, 2 H).

M-3:



Vaaleankellanruskea kiinteä aine, saanto 84 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,1 - 7,8 (leveä m, 4 H), 7,65 - 7,45 (leveä m, 3 H), 5,45 (leveä, 1 H), 3,80 - 3,30 (leveä m, 2 H), 3,55 (s, 3 H).

Menettely C – Kytkettyjen aminohappojen valmistus

Liuokseen, joka sisälsi etyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaattia (tai muuta menettelyllä B valmistettua ß-aminohappoesteriä) (0,50 g, 5,25 mmol) CH_2Cl_2:ssa (5 ml), lisättiin BocLeuOSu:ta (1,5 g, 4,67 mmol) (vastaavan Cbz-suojatun yhdisteen valmistamiseen käytetään CbzLeuOSu:ta) samalla jäähdyttäen sekä Et_3N:a (5 pisaraa). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti. Reaktioseos laimennettiin CH_2Cl_2:lla ja pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (2 x 5 ml), 5-prosenttisella $NaHCO_3$-liuoksella (5 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (5 ml). Orgaaninen

kerros kuivattiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta (1,26 g, 66 %).

Menettely D – Suojaamattomien aminohappojen valmistus

Liuokseen, joka sisälsi menettelyllä C aikaansaatua tuotetta (Boc-Leu-ß-aminohappoesteriä) (41,5 mg, 0,102 mmol) CH_2Cl_2:ssa (2 ml) ja jota sekoitettiin lämpötilassa 0 - 5 °C, lisättiin THF:a (4 ml). Seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan, samalla kun sekoitusta jatkettiin 1 tunti. Reaktioseos väkevöitiin alipaineessa, jäännös liuotettiin uudelleen CH_2Cl_2:iin ja väkevöitiin kahdesti ja sijoitettiin suureen alipaineeseen viimeisten TFA-jäämien poistamiseksi. HPLC osoitti konversion täydelliseksi (2 uutta piikkiä, joiden retentioaika oli lyhyempi). Jatkoreaktiota varten jäännös sekoitettiin DMF:iin ja lisättiin TEA:a samalla sekoittaen, kunnes seos oli lakmusindikaattorin mukaan emäksinen.

Cbz-ryhmä poistetaan seuraavasti:

Menettelyllä C (jossa käytettiin t-butyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaattua ja CbzLeuOSu:a) aikaansaatua tuotetta (110 mg, 0,23 mmol) sekoitettiin MeOH:ssa katalyyttisen määrän hiilikantajalla olevaa palladiumia (10 % Pd:a hiilellä) läsnä ollessa yön yli vetykaasun alla paineessa 280 kPa (40 psi). Reaktioseos suodatettiin piimaan läpi ja haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin Leu-Boc-ß-aminohappo vapaana emäksenä (87 mg, saanto kvantitatiivinen) kirkkaan öljyn muodossa. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,30 (m, 5 H), 5,33 (dd, 1 H, J = 6 ja 8,82 Hz), 4,00 (m, 1 H), 2,77 (dd, 1 H, J = 9 ja 15 Hz), 2,90 (dd, 1 H, J = 6 ja 15 Hz), 1,69 (m, 2 H), 1,45 (m, 1 H), 1,29 (s, 9 H), 0,90 (d, 6 H, J = 6 Hz).

Esimerkki 1

Yhdisteen BIO-1002 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi syaanietikkahappoa (13 mg, 0,15 mmol), EDC:tä (30 mg, 0,16 mmol) ja HOBt:a (30

mg, 0,20 mmol) DMF:ssa (0,5 ml), lisättiin huoneenlämpötilassa liuos, joka sisälsi menettelyllä D valmistettua amiinia (52 mg, 0,105 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,30 ml, 1,7 mmol) DMF:ssa (1,0 ml). Yli 18 tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseokselle tehtiin partitio etyyliasetaatin (15 ml) ja 60-prosenttisesti kyllästetyn $NaHCO_3$-liuoksen (10 ml) kesken. Orgaaninen faasi pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (2 x 10 ml), vedellä (5 ml), 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (3 x 10 ml), vedellä (5 ml) ja kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella (10 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin yhdiste BIO-1002-OEt (27 mg, 69 %) vaahtona.

^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,58 (d, 1 H), 7,45 (d, 1 H), 7,40 - 7,20 (m, 5 H), 5,28 (m, 1 H), 4,46 (m, 1 H), 4,05 (m, 2 H), 3,23 (m, 2 H), 2,79 (m, 2 H), 1,78 - 1,53 (m, 3 H), 1,23 (m, 3 H), 0,90 (m, 6 H).

B. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä BIO-1002-OEt (27 mg, 0,072 mmol) metanolissa (3 ml) ja jota sekoitettiin, käsiteltiin LiOH:n vesiliuoksella (1,0 mol/l, 0,25 ml, 0,25 mmol) huoneenlämpötilassa 22 tuntia. Reaktioseos tehtiin happamaksi trifluorietikkahapolla ja haihdutettiin sitten alipaineessa. Raakatuotteet puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin tuotteet BIO-1002A (2,5 mg, 10 %) ja BIO-1002B (4,4 mg, 18 %) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1002A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,08 (d, 1 H), 7,87 (d, 1 H), 7,30 - 7,16 (m, 5 H), 5,25 (m, 1 H), 4,37 (m, 1 H), 3,36 (s, 2 H), 2,75 (m, 2 H), 1,70 - 1,45 (m, 3 H), 0,90 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 16,7 min. MS: m/z = 346.

BIO-1002B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,00 - 7,70 (m, 2 H), 7,40 - 7,20 (m, 5 H), 5,28 (m, 1 H), 4,39 (m, 1 H), 3,45 (s, 2 H), 2,78 (m, 2 H), 1,65 - 1,40 (m, 3 H), 0,90 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 20,6 min. MS: m/z = 346.

Esimerkki 2

Yhdisteen BIO-1003 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä sykloheksyylietikkahappoa (22 mg, 0,15 mmol), EDC:tä (30 mg, 0,16 mmol) ja HOBt:a (30 mg, 0,20 mmol), menettelyllä D aikaansaatua amiinia (52 mg, 0,105 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,30 ml, 1,7 mmol) DMF:ssa (1,0 ml), jolloin saatiin yhdiste BIO-1003-OEt (32 mg, 71 %) vaahtona.

^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,42 - 7,18 (m, 6 H), 6,08 (m, 1 H), 5,36 (m, 1 H), 4,50 (m, 1 H), 4,05 (m, 2 H), 2,81 (m, 2 H), 2,11 - 0,80 (m, 25 H).

B. Toteutettiin esimerkissä 1B kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä BIO-1003-OEt (32 mg, 0,074 mmol) ja LiOH:n vesiliuosta (1,0 mol/l, 0,25 ml, 0,25 mmol) MeOH:ssa (3,0 ml), jolloin saatiin tuotteet BIO-1003A (3,5 mg, 11 %) ja BIO-1003B (5,3 mg, 18 %) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1003A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,35 - 7,16 (m, 5 H), 5,23 (m, 1 H), 4,38 (m, 1 H), 2,28 (d, 2 H), 2,03 (m, 2 H), 1,75 - 0,80 (m, 22 H). HPLC (gradientti A): 34,1 min ja 35,3 min (4:1). MS: m/z = 403.

BIO-1003B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,35 - 7,16 (m, 5 H), 5,23 (m, 1 H), 4,38 (m, 1 H), 2,28 (m, 2 H), 2,03 (m, 2 H), 1,75 - 0,80 (m, 22 H). HPLC (gradientti A): 34,1 min ja 35,3 min (1:10). MS: m/z = 403.

Esimerkki 3

Yhdisteen BIO-1014 valmistus

A. Metyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaatti kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n kanssa edellä kuvatulla menettelyllä C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu TFA-amiinisuola.

B. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä indoli-3-karboksyylihappoa (19 mg, 0,12 mmol),

EDC:tä (26 mg, 0,14 mmol), HOBt:a (26 mg, 0,17 mmol), esimerkissä 3A aikaansaatua amiinia (44 mg, 0,11 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,10 ml, 0,56 mmol) CH_2Cl_2:ssa (5,0 ml), jolloin saatiin yhdiste BIO-1014-OMe (25 mg, 52 %) vaahtona.

C. Toteutettiin esimerkissä 1B kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä BIO-1014-OMe (25 mg, 0,057 mmol) ja LiOH:n vesiliuosta (1,0 mol/l, 0,115 ml, 0,115 mmol) MeOH:ssa (5 ml), jolloin saatiin tuotteet BIO-1014A (5,1 mg, 21 %) ja BIO-1014B (4,7 mg, 20 %) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1014A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,52 (d, 1 H), 8,13 (d, 1 H), 8,10 (d, 1 H), 7,81 (d, 1 H), 7,46 - 7,03 (m, 9 H), 5,20 (m, 1 H), 4,58 (m, 1 H), 2,69 (m, 2 H), 1,75 - 1,45 (m, 3 H), 0,90 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 28,1 min. MS: m/z = 422.

BIO-1014B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,55 (d, 1 H), 8,18 (d, 1 H), 8,13 (d, 1 H), 7,79 (d, 1 H), 7,46 - 7,03 (m, 9 H), 5,20 (m, 1 H), 4,58 (m, 1 H), 2,70 (m, 2 H), 1,55 - 1,40 (m, 3 H), 0,90 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 29,5 min. MS: m/z = 422.

Esimerkki 4

Yhdisteen BIO-1017 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 1-fenyyli-1-syklopropaanikarboksyylihappoa (21 mg, 0,13 mmol), EDC:tä (26 mg, 0,14 mmol), HOBt:a (26 mg, 0,17 mmol), esimerkissä 3A aikaansaatua amiinia (44 mg, 0,11 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,10 ml, 0,56 mmol) CH_2Cl_2:ssa (5,0 ml), jolloin saatiin yhdiste BIO-1017-OMe (39 mg, 68 %) vaahtona.

B. Toteutettiin esimerkissä 1B kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä BIO-1017-OMe (39 mg, 0,089 mmol) ja LiOH:n vesiliuosta (1,0 mol/l, 0,27 ml, 0,27 mmol) MeOH:ssa (2 ml), jolloin saatiin tuotteet BIO-1017A (10,3

mg, 27 %) ja BIO-1017B (12,2 mg, 32 %) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1017A: ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 8,46 (d, 1 H), 7,40 - 7,20 (m, 10 H), 6,30 (d, 1 H), 5,09 (m, 1 H), 4,33 (m, 1 H), 2,62 (m, 2 H), 1,50 - 1,20 (m, 5 H), 0,98 (m, 2 H), 0,82 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 33,9 min. MS: m/z = 423.

BIO-1017B: ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 8,55 (d, 1 H), 7,48 - 7,15 (m, 10 H), 6,30 (d, 1 H), 5,08 (m, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 2,63 (m, 2 H), 1,48 - 1,15 (m, 5 H), 1,10 - 0,88 (m, 2 H), 0,85 - 0,64 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 33,9 min ja 34,5 min (1:9). MS: m/z = 423.

Esimerkki 5

Yhdisteen BIO-1022 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 2-naftyylietikkahappoa (20 mg, 0,11 mmol), EDC:tä (25 mg, 0,13 mmol), HOBt:a (25 mg, 0,16 mmol), esimerkissä 3A aikaansaatua amiinia (42 mg, 0,10 mmol) ja diisopropyylietyyliamiinia (0,10 ml, 0,56 mmol) DMF:ssa (2,0 ml), jolloin saatiin yhdiste BIO-1022-OMe (36 mg, 70 %) vaahtona.

B. Toteutettiin esimerkissä 1B kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä BIO-1022-OMe (36 mg, 0,078 mmol) ja LiOH:n vesiliuosta (1,0 mol/l, 0,50 ml, 0,50 mmol) MeOH:ssa (3 ml), jolloin saatiin tuotteet BIO-1022A (1,7 mg, 4,8 %) ja BIO-1022B (6,8 mg, 19 %) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1022A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,90 - 7,17 (m, 12 H), 5,30 (t, 1 H), 4,49 (m, 1 H), 2,79 (m, 2 H), 1,68 - 1,33 (m, 3 H), 0,87 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 25,7 min. MS: m/z = 447.

BIO-1022B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,90 - 7,17 (m, 12 H), 5,35 (t, 1 H), 4,49 (m, 1 H), 2,79 (m, 2 H), 1,58 - 1,33 (m, 5 H), 0,82 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 25,7 min ja 26,4 min (1:9). MS: m/z = 447.

Esimerkki 6

Yhdisteen BIO-1029 valmistus

A. Kytkettiin t-butyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaatti yhteen BocLeuOSu:n kanssa edellä kuvatulla menettelyllä C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D2 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu amiinisuola.

B. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 4-(2-aminobentsamido)fenyylietikkahappoa (18 mg, 0,067 mmol), EDC:tä (13 mg, 0,067 mmol) ja HOBt:a (13 mg, 0,085 mmol), esimerkissä 6A aikaansaatua amiinia (18 mg, 0,054 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,048 ml, 0,27 mmol) DMF:ssa (0,5 ml), jolloin saatiin yhdiste NH_2-BIO-1029-OtBu (32 mg, 100 %) öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,65 - 7,43 (m, 4 H), 7,40 - 7,10 (m, 9 H), 6,72 (m, 2 H), 6,49 (d, 1 H), 5,28 (m, 1 H), 4,45 (m, 1 H), 3,52 (s, 2 H), 2,68 (m, 2 H), 2,00 (leveä s, 2 H), 1,65 - 1,15 (m, 13 H), 0,85 (m, 6 H).

C. Liuosta, joka sisälsi yhdistettä NH_2-BIO-1029-OtBu (16 mg, 0,027 mmol) trifluorietikkahapossa (1 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 45 min ja sitten se väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste NH_2-BIO-1029 (3,4 mg, 26 %) valkeana kiinteänä aineena. MS: m/z = 531.

D. Liuosta, joka sisälsi yhdistettä NH_2-BIO-1029 (3,4 mg, 0,0064 mmol), metyyli-isosyanaattia (3 pisaraa) ja di-isopropyylietyyliamiinia (1 pisara) CH_2Cl_2:ssa (0,30 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 h ja sitten se väkevöitiin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1029 (2,6 mg, 69 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm) vastasi rakennetta. HPLC (gradientti A): 28,2 min. MS: m/z = 588.

Esimerkki 7

Yhdisteen BIO-1032 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 3-aminofenyylietikkahappoa (29 mg, 0,19 mmol), EDC:tä (44 mg, 0,23 mmol) ja HOBt:a (44 mg, 0,29 mmol), esimerkissä 6A aikaansaatua amiinia (49 mg, 0,15 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (0,17 ml, 0,95 mmol) DMF:ssa (1,0 ml), jolloin saatiin flash-kromatografiakäsittelyn (SiO_2, etyyliasetaatti-heksaaniseos, 60:40) jälkeen yhdiste NH_2-BIO-1032-OtBu (22 mg, 31 %) vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,45 - 7,05 (m, 7 H), 6,75 - 6,50 (m, 3 H), 5,97 (d, 1 H), 5,30 (m, 1 H), 4,46 (m, 1 H), 3,50 (s, 2 H), 2,71 (m, 2 H), 1,70 - 1,39 (m, 13 H), 1,33 (s, 9 H), 0,84 (m, 6 H).

B. Seosta, joka sisälsi yhdistettä NH_2-BIO-1032-OtBu (7,0 mg, 0,015 mmol), fenyylisulfonyylikloridia (1,7 µl, 0,014 mmol) ja di-isopropyylietyyliamiinia (5,4 µl, 0,030 mmol) CH_2Cl_2:ssa, sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin alipaineessa ja jäännös laimennettiin etyyliasetaatilla. Orgaaninen liuos pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti), vedellä, 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kolmesti), vedellä ja kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja väkevöitiin. Jäännöstä (9 mg) sekoitettiin trifluorietikkahapossa (1 ml) huoneenlämpötilassa 30 min ennen alipainehaihdutusta. Tulokseksi saatu raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1032 (3,9 mg, 47 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 8,52 (d, 1 H), 8,17 (d, 1 H), 7,75 (d, 2 H), 7,61 - 7,45 (m, 3 H), 7,35 - 6,85 (m, 9 H), 5,13 (m, 1 H), 4,28 (m, 1 H), 3,40 (m, 2 H), 2,65 (leveä s, 2 H), 1,50 - 1,12 (m, 3 H), 0,79 (d, 3 H), 0,71 (d, 3 H). HPLC (gradientti B): 18,7 min. MS: m/z = 552.

Esimerkki 8

Yhdisteen BIO-1093 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi menettelyllä C aikaansaatua Boc-suojattua amiinituotetta (41,5 mg, 0,102 mmol) CH_2Cl_2:ssa (2 ml) ja jota sekoitettiin lämpötilassa 0 - 5 °C, lisättiin TFA:a (4 ml). Seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan, samalla kun sekoitusta jatkettiin 1 tunti. Reaktioseos väkevöitiin alipaineessa, jäännös liuotettiin uudelleen CH_2Cl_2:iin ja väkevöitiin kahdesti ja sijoitettiin suureen alipaineeseen viimeisten TFA-jäämien poistamiseksi. HPLC osoitti konversion täydelliseksi (2 uutta piikkiä, joiden retentioaika oli lyhyempi).

B. Esimerkissä 8A aikaansaatu aine liuotettiin uudelleen DMF:iin (0,75 ml), liuos jäähdytettiin lämpötilaan 0 - 5 °C ja siihen lisättiin DIEA:a, kunnes seos oli lakmusindikaattorin mukaan emäksinen, ja jäähaude poistettiin. Tämä aine yhdistettiin 4-nitrofenyylietikkahapon (16,5 mg, 0,091 mmol), HOBt:n (20,4 mg, 0,151 mmol) ja EDC:n (19,4 mg, 0,101 mmol) kanssa esimerkissä 1A kuvatuissa olosuhteissa, jolloin saatiin yhdiste BIO-1093-OEt (21,4 mg, 50 %) kirkkaana öljynä.

C. Liuosta, joka sisälsi yhdistettä BIO-1093-OEt (21,4 mg, 0,053 mmol) MeOH:ssa (1 ml), sekoitettiin LiOH-liuoksen (1 ekv/l, 130 µl, 0,13 mmol) kanssa huoneenlämpötilassa yön yli. Seos tehtiin THF:lla happamaksi (lakmusindikaattori punainen) ja väkevöitiin alipaineessa. Puhtaat isomeerit erotettiin toisistaan preparatiivisen HPLC:n avulla ja kylmäkuivattiin sen jälkeen. Toistuva liuotus MeOH-CH_2Cl_2-seokseen (50:50) ja haihdutus alipaineessa ja sitä seurannut kuivaus alipaineessa tuottivat tulokseksi yhdisteen BIO-1093 kumpaakin isomeeria (3 mg, 13 %) valkeina amorfisina kiinteinä aineina.

Isomeeri A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,09 (d, 2 H, J = 8,2 Hz), 7,38 (d, 2 H, J = 8,21 Hz), 7,15 (s, 5 H), 5,21 (m, 1 H), 4,32 (m, 1 H), 3,28 (s, 1 H), 2,67

(m, 2 H), 1,40 (m, 3 H), 0,75 (dd, 6 H, J = 6,9 ja 7,6 Hz). MS (FAB): $(M+H)^+$ 442, $(M+Na)^+$ 464; M = 441,43. HPLC (gradientti 1): yksi huippu (>99 %), 19,5 min. TLC: R_f = 0,25 ($MeOH-CH_2Cl_2$-seos, 10:90), R_f = 0,35 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

Isomeeri B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,0 (d, 2 H, J = 9,7 Hz), 7,56 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,73 (d, 2 H, J = 9,7 Hz), 7,07 (s, 5 H), 5,15 (t, 1 H, J = 5,5 Hz), 4,29 (m, 1 H), 3,45 (s, 2 H), 2,65 (m, 2 H), 1,45 (m, 3 H), 0,78 (dd, 6 H, J = 6,9 ja 4,8 Hz). MS (FAB): $(M+H)^+$ 442, $(M+Na)^+$ 464; M = 441,43. HPLC: yksi huippu (>99 %), 19,3 min. TLC: R_f = 0,29 ($MeOH-CH_2Cl_2$-seos, 10:90), R_f = 0,55 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

Esimerkki 9

Yhdisteen BIO-1099 valmistus

A. Esimerkissä 3A aikaansaatu amiini (50,0 mg, 0,127 mmol) asetettiin alttiiksi esimerkissä 8B kuvatuille olosuhteille käyttämällä difenyylietikkahappoa (25,6 mg, 0,121 mmol), HOBt:a (26 mg, 0,19 mmol) ja EDC:tä (27 mg, 0,14 mmol) DMF:ssa, jolloin saatiin yhdiste BIO-1099-OMe (49,2 mg, 83 %) kirkkaana viskoosina öljynä.

B. BIO-1099-OMe (49 mg, 0,1 mmol) saippuoitiin ja puhdistettiin esimerkissä 8C kuvatulla tavalla, jolloin saatiin tuotteet BIO-1099A (7 mg, 15 %) ja BIO-1099B (5 mg, 11 %) valkeina amorfisina kiinteinä aineina.

Isomeeri A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,95 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,19 (m, 15 H), 6,95 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5,25 (t, 1 H, J = 3,2 Hz), 4,84 (s, 1 H), 4,41 (m, 1 H), 2,70 (dd, 2 H, J = 2,5 ja 1,3 Hz), 1,41 (m, 3 H), 0,79 (dd, 6 H, J = 6 Hz). MS (FAB): $(M+H)^+$ 474, $(M+Na)^+$ 496; M = 472,54. HPLC: yksi huippu (puhtaus 100 %), 30,074 min. TLC: R_f = 0,33 ($MeOH-CH_2Cl_2$-seos, 10:90), R_f = 0,45 [EtOAc-heksaaniseos (50:50) + 1 % HOAc:a].

Isomeeri B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,72 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,22 (m, 15 H), 5,31 (t, 1 H, J = 1,2 Hz),

6,70 (d, 1 H, J = 8 Hz), 4,93 (s, 1 H), 4,60 (m, 1 H), 2,68 (s, 1 H), 2,65 (m, 2 H), 1,35 (m, 3 H), 0,61 (dd, 6 H, J = 2,5 ja 1,3 Hz). MS (FAB): $(M+H)^+$ 473, $(M+Na)^+$ 495; M = 472,54. HPLC: yksi huippu (100 %), 30,38 min. TLC: R_f = 0,33 ($MeOH-CH_2Cl_2$-seos, 10:90), R_f = 0,38 [EtOAc-heksaaniseos (50:50) + 1 % HOAc:a].

Esimerkki 10

Yhdisteen BIO-1100 valmistus

A. Esimerkissä 6A kuvattu amiinisuola [valmistettu 40,5 mg:sta (0,093 mmol) Boc-suojattua ainetta] sekoitettiin DMF:iin (1,0 ml) ja lisättiin TEA:a samalla sekoittaen, kunnes seos oli lakmusindikaattorin mukaan emäksinen.

B. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 2-bromi-5-metoksi-4-hydroksifenyylietikkahappoa (23,1 mg, 0,089 mmol), HOBt:a (18,9 mg, 0,14 mmol) ja EDC:tä (19,6 mg, 0,10 mmol) DMF:iin (1,0 ml) liuotettuina ja esimerkissä 10A valmistettua vapaata amiinia, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta (49 mg, saanto kvantitatiivinen). Osa siitä puhdistettiin preparatiivista käänteisfaasi-HPLC:tä käyttämällä (gradientti 2), kylmäkuivattiin ja kuivattiin liuottamalla se toistuvasti $MeOH-CH_2Cl_2$-seokseen (50:50) ja haihduttamalla alipaineessa, jolloin saatiin yhdiste BIO-1100 (1,8 mg) valkeana amorfisena kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,25 (s, 5 H), 7,05 (s, 1 H), 6,30 (s, 1 H), 5,28 (m, 1 H), 3,81 (s, 3 H), 3,59 (s, 2 H), 2,77 (m, 2 H), 1,45 (m, 3 H), 0,82 (dd, 6 H, J = 2,5 ja 1,2 Hz). MS (FAB): $(M+H)^+$ 521, 523; $(M+Na)^+$ 543, 545; M = 521,44. HPLC: päähuippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 29,1 min (puhtaus yli 97 %). TLC: R_f = 0,16 ($MeOH-CH_2Cl_2$-seos, 10:90), R_f = 0,28 [EtOAc-heksaaniseos (50:50) + 1 % HOAc:a].

Esimerkki 11

Yhdisteen BIO-1106 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi 6-aminoheksaanihappoa (1,0 g, 7,6 mmol) dioksaanin (6 ml) ja veden (6 ml) seok-

sessa sekä TEA:a (1,7 ml, 11,25 mmol), lisättiin Boc-ON:ää (2,1 g, 8,4 mmol; Aldrich). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu 3 tuntia huoneenlämpötilassa, se laimennettiin vedellä (20 ml) ja pestiin kahdesti etyyliasetaatilla (10 ml). Vesikerroksen pH säädettiin sitten HCl-liuoksella (1 ekv/l) alueelle 1 - 2 ja se uutettiin viidesti etyyliasetaatilla, etyyliasetaattifaasi kuivattiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste 1106-1 (842 mg, 51 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 4,61 (leveä s, 1 H), 3,15 - 2,95 (leveä m, 4 H), 2,55 - 2,23 (m, 4 H), 1,65 - 1,50 (4 H), 1,46 (9 H), 1,45 - 1,30 (m, 3 H).

B. Kytkettiin t-butyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaatti yhteen CbzLeuOSu:n kanssa edellä kuvatulla menettelyllä C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D2 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu vapaa amiini.

C. N-Boc-6-aminoheksaanihappoa (valmistettiin esimerkissä 11A; 17,3 mg, 0,075 mmol), HOBt:a (15,2 mg, 0,11 mmol) ja EDC:tä (17,3 mg, 0,09 mmol) sekoitettiin DMF:ssa (0,5 ml) huoneenlämpötilassa 1,5 h. Aktivoidun esterin liuokseen, jota sekoitettiin, lisättiin esimerkissä 11B aikaansaatua vapaata amiinia (25 mg, 0,075 mmol) sekä TEA:a (2 pisaraa), niin että reaktioseos oli lakmusindikaattorin mukaan emäksinen. Usean tunnin kuluttua reaktio todettiin HPLC:n perusteella epätäydelliseksi. Silloin lisättiin pieni määrä N-Boc-6-aminoheksaanihappoa, HOBt:a ja EDC:tä reaktion saattamiseksi loppuun. Puhdistus esimerkissä 8C yksityiskohtaisesti kuvatulla tavalla tuotti tulokseksi BIO-1106:n Boc-t-butyyliesteriä (26 mg, 63 %) kirkkaana viskoosina öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,40 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,32 - 7,25 (m, 5 H), 6,30 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5,30 (q, 1 H, J = 7 Hz), 4,49 (m, 1 H), 3,09 (leveä s, 2 H), 2,79 (dd, 1 H, J = 8 ja 15 Hz), 2,69 (dd, 1 H, J = 7 ja 15 Hz), 2,20 (t, 2 H, J = 8 Hz), 1,69 - 1,39 (m, 9 H), 1,42 (s, 9 H), 1,29 (s, 9 H), 0,88

(m, 6 H). HPLC: yksi huippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 28,3 min (puhtaus 100 %).

BIO-1106:n Boc-t-butyyliesterin molemmat t-butyylisuojausryhmät poistettiin esimerkissä 10A kuvatulla tavalla. Tulokseksi saatua jäännöstä sekoitettiin DMF:ssa (0,5 ml), seos tehtiin emäksiseksi (lakmus) lisäämällä TEA:a (2 pisaraa), sen jälkeen lisättiin fenyyli-isosyanaattia (13,6 mg, 0,3 mmol) ja seosta sekoitettiin yön yli. Reaktioseos puhdistettiin esimerkissä 10B yksityiskohtaisesti kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1106 (3,5 mg, 29 %) beigevärisenä amorfisena kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,97 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,22 (m, 11 H), 6,91 (t, 1 H, J = 8 Hz), 5,30 (m, 1 H), 4,33 (m, 1 H), 3,12 (m, 6 H), 2,63 (m, 2 H), 2,13 (t, 2 H, J = 6 Hz), 1,41 (leveä m, 9 H), 0,80 (m, 6 H). MS (FAB): $(M+H)^+$ 511, $(M+Na)^+$ 533; M = 510,59. HPLC: yksi huippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 19,4 min (100 %). TLC: R_f = 0,32 (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 15:85), R_f = 0,31 [MeOH-EtOAc-seos (10:90) + 1 % HOAc:a].

Esimerkki 12

Yhdisteen BIO-1142 valmistus

(±)-1-bentsosyklobuteenikarboksyylihappoa (16,3 mg, 0,11 mmol), HOBt:a (22,4 mg, 0,165 mmol) ja EDC:tä (23,7 mg, 0,121 mmol) sekoitettiin DMF:ssa (0,5 ml) huoneenlämpötilassa 45 min, jolloin saatiin aktivoitu esteri. Aktiiviseen esteriin lisättiin esimerkissä 10A aikaansaatua tuotetta (15,3 mg, 0,055 mmol) ja seosta sekoitettiin 2 tuntia. Suodatus ja puhdistus preparatiivista HPLC:tä käyttämällä esimerkissä 10B kuvatulla tavalla tuottivat tulokseksi BIO-1142:n isomeeria A (4,4 mg, 70 %) ja isomeeria B (4,9 mg, 22 %) valkeina amorfisina kiinteinä aineina.

BIO-1142:n isomeeri A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,79 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,31 - 7,05 (m, 9 H), 6,81 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5,24 (m, 1 H), 4,36 (m, 1 H), 4,15 (m,

1 H), 3,00 - 3,50 (leveä m, 11 H), 2,70 (m, 6 H), 1,43 (m, 3 H), 0,70 (m, 6 H). MS (FAB): $(M+H)^+$ 409, $(M+Na)^+$ 431; M = 408,46. HPLC: päähuippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 20,2 min (puhtaus yli 99 %). TLC: R_f = 0,46 (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90), R_f = 0,53 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

BIO-1142:n isomeeri B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,92 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,31 - 7,05 (m, 9 H), 6,91 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5,25 (m, 1 H), 4,38 (m, 1 H), 4,14 (m, 1 H), 3,28 (m, 2 H), 2,72 (m, 2 H), 1,42 (m, 3 H), 0,77 (m, 6 H). MS (FAB): $(M+H)^+$ 409, $(M+Na)^+$ 431; M = 408,46. HPLC: päähuippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 20,62 min (puhtaus yli 96 %). TLC: R_f = 0,52 (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90), R_f = 0,54 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

Esimerkki 13

Yhdisteen BIO-1189 valmistus

(±)-1-indaanikarboksyylihappoa (6,2 mg, 0,038 mmol), HOBt:a (7,7 mg, 0,057 mmol) ja EDC:tä (8,0 mg, 0,042 mmol) sekoitettiin DMF:ssa (0,5 ml) huoneenlämpötilassa 2 h. Esimerkissä 11B aikaansaatu vapaa amiini käsiteltiin TFA:lla, ja sitten lisättiin tämä aine (10 mg, 0,038 mmol) ja seosta sekoitettiin yön yli. Suodatus ja puhdistus preparatiivista HPLC:tä käyttämällä esimerkissä 10B kuvatulla tavalla tuottivat tulokseksi BIO-1189:n isomeeria A (alle 1 mg) ja isomeeria B (2 mg, 12 %) valkeina amorfisina kiinteinä aineina.

BIO-1189:n isomeeri A: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,3 - 7,1 (m, 12 H), 5,32 (m, 1 H), 4,48 (m, 1 H), 3,91 (t, 1 H, J = 6,6 Hz), 3,1 - 2,7 (m, 3 H), 2,5 - 2,2 (m, 1 H), 1,6 - 1,4 (m, 3 H), 0,85 (m, 6 H). MS (FAB): $(M+H)^+$ 423, $(M+Na)^+$ 445; M = 422,5. HPLC: päähuippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 21,2 min (puhtaus yli 97 %). TLC: R_f = 0,19 (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 5:95), R_f = 0,73 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

BIO-1189:n isomeeri B: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,7 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,45 - 7,1 (m, 9 H), 6,65

(d, 1 H, J = 8 Hz), 5,33 (m, 1 H), 4,48 (m, 1 H), 3,90 (t, 1 H, J = 6,6 Hz), 3,1 - 2,8 (m, 3 H), 2,45 - 2,3 (m, 2 H), 1,48 (m, 3 H), 0,80 (m, 6 H). MS (FAB): $(M+H)^+$ 423, $(M+Na)^+$ 445; M = 422,5. HPLC: päähuippu kohdassa, joka vastasi retentioaikaa 21,5 min (puhtaus yli 94 %). TLC: R_f = 0,12 (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 5:95), R_f = 0,60 (EtOAc + 1 % HOAc:a).

Esimerkki 14

Yhdisteen BIO-1006 valmistus

A. Amiini ß-3 kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n kanssa noudattamalla menettelytapaa C (tuote kiteytettiin uudelleen dietyylieetteristä) ja suojaus poistettiin noudattamalla menettelytapaa D, jolloin saatiin haluttu TFA-amiinisuola.

Boc-amiinin ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 0,90 (m, 6 H), 1,42 (9 H), 1,55 - 1,75 (m, 3 H), 2,8 (m, 2 H), 3,61 (s, 3 H), 4,05 (m, 1 H), 4,83 (m, 1 H), 5,26 (m, 1 H), 5,92 (s, 2 H), 6,68 - 6,78 (m, 3 H), 7,06 (d, 1 H).

TFA-amiinin ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 0,83 (d, 3 H), 0,87 (d, 3 H), 1,50 (m, 1 H), 1,63 (leveä t, 2 H), 2,73 - 2,92 (m, 2 H), 3,63 (s, 3 H), 4,27 (leveä s, 1 H), 5,26 (m, 1 H), 5,95 (s, 2 H), 6,66 - 6,78 (m, 3 H), 7,58 (leveä s, 3 H), 8,02 (d, 1 H).

B. Liuos, joka sisälsi esimerkissä 14A aikaansaatua amiini-TFA-suolaa (24 mg) CH_2Cl_2:ssa, lisättiin 4-hydroksifenyylietikkahapon suksiini-imidyyliesteriin (14 mg, 1,1 ekv) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 2 tuntia. Reaktioseos pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin puhdistamatonta BIO-1006:n metyyliesteriä (28 mg). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 0,82 (6 H), 1,35 - 1,58 (3 H), 2,62 - 2,92 (2 H), 3,48 (2 H), 3,57 (3 H), 4,41 (1 H), 5,70 (1 H), 5,89 (2 H), 6,08 (1 H), 6,65 - 6,75 (5 H), 7,04 (2 H), 7,22 (1 H).

C. Puhdistamaton BIO-1006:n metyyliesteri lisättiin MeOH:ssa LiOH-liuokseen (1 ekv/l) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1 h. Reaktioseos neutraloitiin trifluorietikkahapolla ja puhdistettiin HPLC:n avulla. Kirkas jae kerättiin talteen ja puhdistettiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1006. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz): 0,73 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0,80 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1,35 (leveä t, 2 H), 1,45 (m, 1 H), 2,40 (m, 2 H), 3,22 - 3,38 (m, 2 H), 4,23 (leveä q, 1 H), 5,02 (m, 1 H), 5,93 (s, 2 H), 6,65 (d, 2 H, J = 8 Hz), 6,68 - 6,80 (m, 2 H), 6,83 (s, 1 H), 7,03 (d, 2 H, J = Hz), 8,11 (leveä d, 1 H). Massaspektri: m/z = 457.

Esimerkki 15

Yhdisteen BIO-1050 valmistus

A. Suspensioon, joka sisälsi 4-aminofenyylietikkahappoa (9 g, 60 mmol) ja N-(bentsyylioksikarbonyylioksi)-suksiini-imidiä (15 g, 60 mmol) CH_2Cl_2:ssa, lisättiin riittävästi trietyyliamiinia homogeenisen liuoksen muodostamiseksi. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 min ja sen jälkeen CH_2Cl_2 poistettiin haihduttimella. Jäännös liuotettiin veteen ja liuos tehtiin happamaksi 5-prosenttisella HCl-liuoksella. Tällä tavalla muodostettu kiinteä aine erotettiin suodattamalla ja pestiin 5-prosenttisella HCl-liuoksella, vedellä ja dietyylieetterillä, jolloin saatiin Cbz-aminofenyylietikkahappoa (12 g, 70 %) ruskehtavana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 3,48 (s, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 7,14 (d, 2 H), 7,29 - 7,45 (m, 7 H), 9,73 (s, 1 H).

B. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä esimerkissä 15A aikaansaatua Cbz-aminofenyylietikkahappoa (342 mg, 1,2 mmol), joka liuotettiin DMF:iin, HOBt:a (275 mg, 1,8 mmol), EDC:tä (276 mg, 1,44 mmol) ja liuosta, joka sisälsi esimerkissä 14A valmistettua vapaata amiinia DMF:ssa, jolloin saatiin kytketty tuote, joka käytettiin puhdistamatta sitä tarkemmin.

C. Esimerkissä 15B aikaansaatu tuote hydrattiin [H_2, 340 kPa (50 psi), 10 % Pd/C -katalyytti, MeOH-H_2O-seos, yön yli]. Reaktioseos suodatettiin piimaakerroksen läpi ja haihdutettiin, jolloin saatiin vapaa amiini (0,4 g, 90 %) ruskeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, $CDCl_3$): 0,82 (m, 6 H), 1,30 - 1,62 (m, 3 H), 2,62 - 2,82 (m, 2 H), 3,45 (s, 2 H), 4,37 (m, 1 H), 5,18 (s, 2 H), 5,91 (s, 2 H), 6,65 - 6,80 (m, 5 H), 7,02 (d, 2 H).

D. Liuokseen, joka sisälsi esimerkissä 15C aikaansaatua vapaata amiinia (22 mg) CH_2Cl_2:ssa, lisättiin fenyyli-isosyanaattia (8 mg, 1,5 ekv) ja trietyyliamiinia (1 pisara). Liuosta sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa 2 tuntia. Etyyliasetaatilla (15 ml) laimennuksen jälkeen seos pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin puhdistamatonta fenyyliureametyyliesteriä.

E. Puhdistamaton fenyyliureametyyliesteri liuotettiin MeOH:iin, lisättiin lämpötilassa 0 °C LiOH-liuosta (1 ekv/l) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tuntia. Trifluorietikkahapolla neutraloinnin jälkeen reaktioseos puhdistettiin HPLC:n avulla. Puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1050. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,76 (d, 3 H), 0,80 (d, 3 H), 1,30 - 1,50 (m, 3 H), 2,52 - 2,72 (m, 2 H), 3,28 - 3,50 (kompl., 2 H), 4,30 (m, 1 H), 5,06 (m, 1 H), 5,97 (s, 2 H), 6,70 (d, 1 H), 6,79 - 6,87 (m, 2 H), 6,95 (t, 1 H), 7,13 (d, 2 H), 7,25 (t, 2 H), 7,85 (d, 2 H), 7,43 (d, 2 H), 8,12 (d, 1 H), 8,40 (d, 1 H), 8,60 (s, 1 H), 8,66 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 575.

Esimerkki 16

Yhdisteen BIO-1068 valmistus

Noudatettiin esimerkin 15D mukaista menettelytapaa ja käytettiin fenyyli-isosyanaatin sijasta sykloheksyyli-

isosyanaattia. Tulokseksi saatu tuote hydrolysoitiin esimerkissä 15E kuvatulla tavalla ja HPLC-puhdistuksella aikaansaatu puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1068. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,73 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0,80 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1,05 - 1,85 (m, 13 H), 2,50 - 2,75 (m, 2 H), 3,23 - 3,50 (m, 2 H), 4,28 (leveä q, 1 H), 5,05 (leveä q, 1 H), 5,95 (leveä s, 2 H), 6,02 (d, 1 H, J = 8 Hz), 6,72 (leveä d, 1 H), 6,71 (d, 1 H, J = 8 Hz), 6,84 (leveä s, 1 H), 7,08 (d, 8 H, J = 2 Hz), 7,25 ((d, 2 H, J = 8 Hz), 8,07 (d, 1 H, J = 8 Hz), 8,20 (s, 1 H), 8,40 (d, 1 H, J = 8 Hz). Massaspektri: m/z = 581.

Esimerkki 17

Yhdisteen BIO-1079 valmistus

Noudatettiin esimerkin 15D mukaista menettelytapaa ja käytettiin fenyyli-isosyanaatin sijasta 2-metoksifenyyli-isosyanaattia. Tulokseksi saatu tuote hydrolysoitiin esimerkissä 15E kuvatulla tavalla ja HPLC-puhdistuksella aikaansaatu puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1079. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,75 (d, 3 H), 0,80 (d, 3 H), 1,30 - 1,50 (m, 3 H), 2,50 - 2,72 (m, 2 H), 3,30 - 3,45 (m, 2 H), 3,85 (s, 3 H), 4,28 (m, 1 H), 5,06 (m, 1 H), 5,96 (leveä s, 2 H), 6,69 - 7,02 (m, 8 H), 7,13 (d, 2 H), 7,34 (d, 2 H), 8,05 - 8,15 (m, 3 H), 8,42 (leveä d, 1 H), 8,87 (s, 1 H), 9,13 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 605.

Esimerkki 18

Yhdisteen BIO-1082 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi menettelytavalla D valmistettua TFA-amiinisuolaa (43 mg) CH_2Cl_2:ssa, lisättiin lämpötilassa 0 °C trietyyliamiinia, kunnes saavutettiin pH-arvo 9,0, minkä jälkeen lisättiin 4-fenyylivoihappokloridia (26 mg). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu huoneenlämpötilassa 2 tuntia, se laimennettiin etyyliasetaatilla (20 ml) ja pestiin sitten 5-prosenttisella

sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin haluttu tuote etyyliesterinä.

B. Puhdistamaton etyyliesteri liuotettiin MeOH:iin, lisättiin lämpötilassa 0 °C LiOH-liuosta (1 ekv/l) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tuntia. Trifluorietikkahapolla neutraloinnin jälkeen reaktioseos puhdistettiin HPLC:n avulla. Kaksi diastereomeeria erotettiin ja puhtaat jakeet kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin tuotteet BIO-1082A ja BIO-1082B.

BIO-1082B:n ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,79 (d, 3 H), 0,83 (d, 3 H), 1,29 - 1,37 (m, 2 H), 1,47 (m, 1 H), 1,70 - 1,83 (m, 2 H), 2,08 - 2,17 (m, 2 H), 2,48 - 2,58 (m, 2 H), 2,67 (leveä t, 2 H), 4,31 (m, 1 H), 5,03 (m, 1 H), 7,12 - 7,32 (m, 10 H), 7,90 (d, 1 H), 8,45 (d, 1 H). Massaspektri: m/z = 425.

Esimerkki 19

Yhdisteen BIO-1148 valmistus

A. Amiini ß-13 kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n kanssa käyttämällä edellä kuvattua menettelytapaa C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu amiinisuola 1148-1.

B. Liuokseen, joka sisälsi 4-hydroksifenyylietikkahappoa (3,0 g, 20 mmol) DMF:ssa, lisättiin HOBt:a (3,7 g, 24 mmol) ja sen jälkeen EDC:tä (4,2 g, 22 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 min. Lisättiin N-hydroksisuksiini-imidiä (2,3 mmol, 20 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Tulokseksi saatu seos laimennettiin etyyliasetaatilla (150 ml) ja uutettiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Sen jälkeen kun liuote oli poistettu alipaineessa, tuote liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja saostettiin heksaanilla, jolloin saatiin

4-hydroksifenyylietikkahaponsuksiini-imidyyliesteriä (3,9 grammaa, 78 %). ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 2,79 (s, 4 H), 3,93 (s, 2 H), 6,72 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 7,12 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 9,41 (s, 1 H).

C. Amiinisuola 1148-1 hydrolysoitiin MeOH:ssa LiOH:n vesiliuoksella, jolloin saatiin happo. Liuosta, joka sisälsi saatua happoa, trietyyliamiinia ja 4-hydroksifenyylietikkahappo-OSu:ta (valmistettiin esimerkissä 19B) CH_2Cl_2:ssa, sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:n avulla ja puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1148 kahden diastereomeerien seoksena. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,70 - 0,90 (m, 6 H), 1,29 - 1,63 (m, 3 H), 2,73 - 2,85 (m, 2 H), 3,17 - 3,40 (m, 2 H), 4,15 - 4,30 (m, 1 H), 5,12 - 5,28 (m, 1 H), 6,58 - 6,68 (m, 2 H), 6,94 - 7,60 (m, 2 H), 7,54 - 7,67 (m, 1 H), 7,93 - 8,16 (m, 2 H), 8,53 - 8,75 (m, 3 H). Massaspektri: m/z = 414.

Esimerkki 20

Yhdisteen BIO-1168 valmistus

Noudatettiin esimerkissä 15D käytettyä menettelytapaa ja käytettiin fenyyli-isosyanaatin sijasta 3-metyylifenyyli-isosyanaattia. Tulokseksi saatu tuote hydrolysoitiin esimerkissä 15E kuvatulla tavalla ja HPLC-puhdistuksella aikaansaatu puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1168. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,76 (d, 3 H), 0,82 (d, 3 H), 1,30 - 1,52 (m, 3 H), 2,28 (s, 3 H), 2,54 - 2,70 (m, 2 H), 3,35 - 3,48 (m, 2 H), 4,28 (m, 1 H), 5,07 (m, 1 H), 5,96 (m, 2 H), 6,68 - 6,86 (m, 4 H), 7,10 - 7,25 (m, 4 H), 7,30 (s, 1 H), 7,35 (d, 2 H), 8,11 (d, 1 H), 8,44 (d, 1 H), 8,63 (s, 1 H), 8,67 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 589.

Esimerkki 21

Yhdisteen BIO-1179 valmistus

Noudatettiin esimerkissä 15D käytettyä menettelytapaa ja käytettiin fenyyli-isosyanaatin sijasta 2-metyyli-

fenyyli-isosyanaattia. Tulokseksi saatu tuote hydrolysoitiin esimerkissä 15E kuvatulla tavalla ja HPLC-puhdistuksella aikaansaatu puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1179. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,75 (d, 3 H), 0,80 (d, 3 H), 1,27 - 1,51 (m, 3 H), 2,23 (s, 3 H), 2,62 (m, 2 H), 3,40 (m, 2 H), 4,28 (m, 1 H), 5,06 (m, 1 H), 5,98 (leveä s, 2 H), 6,71 (leveä d, 1 H), 6,80 (d, 1 H), 6,83 (leveä s, 1 H), 6,92 (leveä t, 1 H), 7,05 - 7,20 (m, 4 H), 7,38 (d, 2 H), 7,82 (d, 1 H), 7,87 (s, 1 H), 8,10 (d, 1 H), 8,42 (d, 1 H), 8,93 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 589.

Esimerkki 22

Yhdisteen BIO-1195 valmistus

A. Amiini ß-13 kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n kanssa noudattamalla menettelytapaa C, jolloin saatiin haluttu tuote. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, $CDCl_3$): 0,90 (m, 6 H), 1,32 (s, 9 H), 1,42 (s, 9 H), 1,58 - 1,90 (m, 3 H), 2,61 - 2,80 (m, 2 H), 4,08 (m, 1 H), 4,89 (leveä d, 1 H), 5,37 (leveä q, 1 H), 6,95 - 7,15 (m, 3 H), 7,45 (leveä d, 1 H).

B. Esimerkissä 22A aikaansaatu tuote käsiteltiin TFA:lla edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin vastaava TFA-amiinisuola 1195-2.

C. Seosta, joka sisälsi 4-aminofenyylietikkahappoa (10,0 g, 66,1 mmol) ja 98-prosenttista fenyyli-isosyanaattia (8,27 g, 68,0 mmol) etyyliasetaatissa (100 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti ja kuumennettiin sitten palautusjäähdytysolosuhteissa 1,5 tuntia. Seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja tuote erotettiin suodattamalla ja pestiin etyyliasetaatilla, metanolilla ja sitten dietyylieetterillä, jolloin saatiin fenyyliureafenyylietikkahappo 1195-3 (17,5 g, 98 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,72 - 8,64 (m, 2 H), 7,44 (d, 2 H), 7,36 (d, 2 H), 7,28 (d, 2 H), 7,16 (d, 2 H), 6,96 (t, 1 H), 3,52 (s, 2 H). MS (FAB): 272.

D. Liuosta, joka sisälsi fenyyliureafenyylietikkahappoa 1195-3, HOBt:a ja EDC:tä DMF:ssa, sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 min ja sen jälkeen lisättiin esimerkissä 22B aikaansaadusta tuotteesta TEA:lla käsittelemällä valmistettu vapaa amiini. Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu huoneenlämpötilassa yön yli, suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla ja puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1195. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,71 (d, 3 H), 0,78 (d, 3 H), 1,25 - 1,46 (m, 3 H), 2,56 - 2,72 (m, 2 H), 3,26 - 3,41 (m, 2 H), 4,21 (leveä q, 1 H), 5,07 (leveä q, 1 H), 6,90 (leveä t, 1 H), 7,02 - 7,14 (m, 3 H), 7,17 - 7,42 (m, 8 H), 8,10 (d, 1 H), 8,47 (d, 1 H), 8,53 (s, 1 H), 8,63 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 567.

Esimerkki 23

Yhdisteen BIO-1198 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi fosgeenia CH_2Cl_2:ssa, lisättiin lämpötilassa 0 °C pisaroittain liuos, joka sisälsi morfoliinia ja trietyyliamiinia CH_2Cl_2:ssa. Sitten reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 min ja se haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta. Tämä raakatuote liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja liuokseen lisättiin 4-aminofenyylietikkahapon t-butyyliesteriä. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja se laimennettiin etyyliasetaatilla (20 ml) ja pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin morfoliiniurea-t-butyyliesteriä 1198-1.

t-butyyliesterin A ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, $CDCl_3$): 1,40 (s, 9 H), 3,38 - 3,46 (m, 4 H), 3,60 - 3,70 (m, 6 H), 6,67 (s, 1 H), 7,13 (d, 2 H), 7,27 (d, 2 H).

B. Morfoliiniurea-t-butyyliesteri 1198-1 liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja liuokseen lisättiin trifluorietikkahap-

poa. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3 tuntia ja se väkevöitiin, jolloin saatiin vastaava karboksyylihappo 1198-2 (26 mg).

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä karboksyylihappoa 1198-2 (26 mg), joka liuotettiin DMF:iin, HOBt:a, EDC:tä ja esimerkissä 14A valmistettua amiinia, jolloin saatiin puhdistamaton metyyliesteri 1198-3 (27 mg).

D. Puhdistamattoman metyyliesterin 1198-3 liuos käsiteltiin esimerkissä 14C kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1198. BIO-1198:n ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): 0,75 (d, 3 H), 0,82 (d, 3 H), 1,27 - 1,50 (m, 3 H), 2,53 - 2,70 (m, 2 H), 3,28 - 3,45 (m, 6 H), 4,27 (m, 1 H), 5,07 (leveä q, 1 H), 5,96 (leveä s, 2 H), 6,72 (leveä d, 1 H), 6,82 (d, 1 H), 6,85 (leveä s, 1 H), 7,09 (d, 2 H), 7,35 (d, 2 H), 8,08 (d, 1 H), 8,42 (d, 1 H), 8,47 (s, 1 H). Massaspektri: m/z = 569.

Esimerkki 24

Yhdisteen BIO-1190 valmistus

A. Amiini ß-5 kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n kanssa edellä kuvatulla menettelytavalla C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu amiinisuola.

B. Noudatettiin esimerkissä 1A kuvattua menettelytapaa ja käytettiin 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (135 mg, 0,47 mmol), joka liuotettiin DMF:iin (2,5 ml), HOBt:a (135 mg, 0,88 mmol), EDC:tä (0,71 mmol) ja esimerkissä 29A aikaansaatua amiinisuolaa (200 mg, 0,46 mmol) (joka käsiteltiin Et_3N:lla niin, että saavutettiin pH-arvo 10), jolloin saatiin yhdiste 1190-1 (235 mg, 89 %) valkeana kiinteänä aineena.

C. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1190-1 (20 mg, 0,034 mmol) MeOH:ssa (3 ml), lisättiin LiOH:n vesiliuosta (2 ekv/l, 3 ml). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu huoneenlämpötilassa yön yli, se jäähdytettiin

lämpötilaan 0 °C ja siihen lisättiin TFA:a, kunnes saavutettiin pH-arvo 3 - 4 (pH-paperi). Haluttu tuote eristettiin ja puhdistettiin LC:n avulla (Vydac C18 -pylväs, gradientti 8), jolloin saatiin yhdiste BIO-1190 (10 mg, 0,017 mmol, 50 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,95 (s, 1 H, NH), 8,39 (d, 1 H, J = 9 Hz, NH), 8,11 (d, 1 H, J = 9 Hz, NH), 7,88 (s, 1 H, NH), 7,83 (d, 1 H, J = 8 Hz, Ar), 7,36 (d, 2 H, J = 8,4 Hz, Ar), 7,2 - 7,1 (kompl., 6 H, Ar), 6,92 (m, 1 H, Ar), 6,83 (d, 2 H, J = 9 Hz, Ar), 5,08 (m, 1 H), 4,28 (m, 1 H), 3,70 (s, 3 H, OMe), 3,39 (d, 1 H, J = 8 Hz), 3,31 (d, 1 H, J = 7 Hz), 2,63 (m, 1 H), 2,23 (s, 3 H, Me), 1,50 - 1,25 (kompl., 3 H), 0,81 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0,75 (d, 3 H, J = 6 Hz). MS (FAB): m/z = 575 [$(M^+ +1)$:n $C_{32}H_{38}N_4O_6$ edellyttää arvoa 575].

Esimerkki 25

Yhdisteen BIO-1197 valmistus

A. Amiini ß-1 (0,884 g, 4,0 mmol) kytkettiin yhteen BocLeuOSu:n (1,32 g, 4,0 mmol) kanssa edellä kuvatulla menettelytavalla C. Tämä aine asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin haluttu amiinisuola (1,42 g, 85 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,31 - 7,22 (m, 5 H), 7,14 (d, 1 H), 5,37 - 5,30 (m, 1 H), 4,84 (m, 1 H), 4,10 (m, 1 H), 2,85 - 2,66 (m, 2 H), 1,72 - 1,58 (m, 2 H), 1,51 - 1,49 (m, 1 H), 1,48 (s, 9 H), 1,29 (s, 9 H), 0,91 (m, 9 H).

B. Toteutettiin esimerkin 1A mukainen proseduuri käyttämällä 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (34 mg, 0,12 mmol), HOBt:a (20 mg, 0,14 mmol), EDC:tä (26 mg, 0,14 mmol) ja esimerkissä 25A aikaansaatua amiinisuolaa (30 mg, 0,079 mmol) Et_3N:n ollessa läsnä, jolloin saatiin yhdiste BIO-1197 (15 mg, 0,028 mmol, 35 %) valkeana vaahtona. MS (FAB): m/z = 545 [$(M^+ +1)$:n $C_{31}H_{36}N_4O_5$ edellyttää arvoa 545].

Esimerkki 26

Yhdisteen BIO-1201 valmistus

A. Toteutettiin esimerkin 15D mukainen proseduuri käyttämällä esimerkissä 15C aikaansaatua vapaata amiinia (40 mg, 0,086 mmol) ja 2-nitrofenyyli-isosyanaattia (28 mg, 0,172 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1201-1 (50 mg, 92 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,55 (d, 1 H, NH), 8,50 (d, 1 H, NH), 8,15 (d, 1 H, NH), 8,05 (d, 1 H, NH), 7,6 - 6,7 (11 H, Ar), 5,85 (leveä s, 2 H), 5,25 (m, 1 H), 4,6 (m, 1 H), 3,8 - 3,55 (kompl.), 3,5 (s, 3 H, OMe), 2,75 (m, 2 H), 1,7 - 1,4 (kompl., 3 H), 0,85 (m, 6 H).

B. Toteutettiin esimerkin 24C mukainen proseduuri käyttämällä yhdistettä 1201-1 (50 mg, 0,079 mmol), jolloin saatiin yhdiste BIO-1201 (17 mg, 0,027 mmol, 35 %) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena. MS (FAB): m/z = 620 [(M^++1):n $C_{31}H_{35}N_5O_9$ edellyttää arvoa 620].

Esimerkki 27

Yhdisteen BIO-1217 valmistus

A. Amiini ß-4 (30 mg, 0,1 mmol) kytkettiin Nα-t-Boc-Nε-Cbz-L-lysiini-N-hydroksisuksiini-imidiin (50 mg, 0,1 mmol) esimerkissä 25A kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste 1217-1 (60 mg, 93 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,35 - 7,25 (kompl., 5 H, Ar), 6,8 - 6,7 (kompl., 3 H, Ar), 5,31 - 5,1 (kompl., 2 H), 4,95 (m, 1 H), 4,05 (m, 1 H), 3,8 (s, 3 H, OMe), 3,78 (s, 3 H, OMe), 3,1 (m, 2 H), 2,7 (m, 2 H), 1,9 - 1,4 (kompl.), 1,35 (s, 9 H, tBu), 1,3 (s, 9 H, tBu).

B. Yhdisteestä 1217-1 (60 mg, 0,09 mmol) poistettiin CH_2Cl_2:ssa (5 ml) suojaus trifluorietikkahapolla (0,5 ml) edellä kuvatulla menettelyllä D1, jolloin saatiin yhdiste 1217-2 (56 mg, 100 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,75 (leveä s), 7,35 - 7,15 (kompl., Ar), 6,85 - 6,65 (kompl., Ar), 5,4 (m), 5,2 - 4,9

(leveä s, Bn), 4,15 (m), 3,75 (leveä s), 3,15 - 2,6 (kompl.), 1,8 (m), 1,4 - 1,0 (kompl.).

C. Toteutettiin esimerkin 1A mukainen proseduuri käyttämällä 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (40 mg, 0,14 mmol), HOBt:a (23 mg, 0,167 mmol), EDC:tä (30 mg, 0,158 mmol) ja amiinia 1217-2 (56 mg, 0,079 mmol) Et_3N:n ollessa läsnä, jolloin saatiin yhdiste BIO-1217 (21 mg, 30 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 9,05 (m, 1 H, NH), 8,4 (m, 1 H, NH), 8,1 (m, 1 H, NH), 8,0 (m, 1 H, NH), 7,4 - 6,7 (kompl., Ar), 5,1 (m, 1 H), 5,0 (leveä s, 2 H), 4,2 (m, 1 H), 3,7 (leveä s, 6 H, OMe), 2,9 - 2,6 (kompl.), 2,2 (s, 3 H, OMe), 1,6 - 1,1 (kompl.). MS (FAB): m/z = 754 [(M^++1):n $C_{41}H_{47}N_5O_9$ edellyttää arvoa 754].

Esimerkki 28

Yhdisteen BIO-1225 valmistus

A. Amiini ß-3 (90 mg, 0,4 mmol) kytkettiin Nα-t-Boc-Nε-Cbz-L-lysiini-N-hydroksisuksiini-imidiin (193 mg, 0,4 mmol) esimerkissä 25A kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste 1225-1 (220 mg, 94 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,4 - 7,25 (5 H, Ar), 7,1 (m, 1 H, NH), 6,8 - 6,65 (3 H, Ar), 5,9 (s, 2 H), 5,25 (m, 2 H), 5,15 (m, NH), 5,05 (s, 2 H), 4,85 (m, 1 H), 4,0 (m, 1 H), 3,6 (s, 3 H, OMe), 3,15 (m, 2 H), 2,80 (m, 2 H), 1,90 - 1,20 (6 H), 1,4 (s, 9 H).

B. Yhdisteestä 1225-1 (170 mg, 0,29 mmol) poistettiin suojaus edellä kuvatulla menettelyllä D1, jolloin saatiin vapaa amiini 1225-2 (100 mg, 71 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,07 (d, 1 H, J = 9 Hz), 7,4 - 7,2 (kompl., 5 H), 6,80 - 6,65 (kompl., 3 H), 5,90 (s, 2 H), 5,25 (m, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 4,98 (leveä s, 1 H), 3,58 (s, 3 H, OMe), 3,32 (m, 1 H), 3,16 (m, 2 H), 2,27 (m, 2 H), 1,90 - 1,70 (kompl. 3 H), 1,6 - 1,25 (kompl., 5 H).

C. Toteutettiin esimerkin 1A mukainen proseduuri käyttämällä 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (44 mg, 0,155 mmol), HOBt:a (36 mg, 0,264 mmol), EDC:tä (47 mg, 0,248 mmol) ja vapaata amiinia 1225-2 (50 mg, 0,103 mmol), jolloin saatiin yhdiste BIO-1225-3 (46 mg, 80 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 9,0 - 6,7 (21 H, Ar & NH), 5,96 (s, 2 H), 5,1 (m, 2 H), 4,98 (s, 2 H), 4,2 (m, 1 H), 3,50 (s, 3 H, OMe), 3,48 - 3,4 (kompl., 2 H), 2,88 (m, 2 H), 2,71 (m, 2 H), 2,24 (s, 3 H, OMe), 1,6 - 1,0 (kompl., 6 H). MS (FAB): m/z = 752 [(M^++1):n $C_{41}H_{45}N_5O_9$ edellyttää arvoa 752].

D. Yhdiste BIO-1225-3 (25 mg, 0,033 mmol) käsiteltiin esimerkissä 24C kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1225 (15 mg, 62 %) valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): m/z = 738 [(M^++1):n $C_{40}H_{43}N_5O_9$ edellyttää arvoa 738].

Esimerkki 29

Yhdisteen BIO-1036 valmistus

A. Noudatettiin edellä kuvattua menettelytapaa C ja käytettiin metyyli-3-amino-5-indanyyli-1-propanoaattia (esteri M-1, valmistus edellä kuvatulla menettelyllä B) (85 mg, 0,33 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1036-1 keltaisena vaahtona (96 mg, 0,22 mmol, 67 %), joka käytettiin ilman tarkempaa puhdistusta seuraavassa vaiheessa. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,15 (3 H), 6,95 (1 H), 5,30 (1 H), 4,95 (1 H), 4,15 (1 H), 3,55 (3 H), 2,90 - 2,80 (6 H), 2,05 (3 H), 1,70 (2 H), 1,35 (9 H), 0,85 (6 H).

B. Yhdiste 1036-1 (98 mg, 0,22 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D vastaavan amiinisuolan aikaansaamiseksi. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä fenyylietikkahappoa ja syntynyttä amiinisuolaa (TEA:n ollessa läsnä), jolloin saatiin yhdiste 1036-2 kellertävä kiinteänä aineena (75 mg, 0,17 mmol, 77 %), joka käytettiin ilman tarkempaa puhdistusta seuraavassa vaiheessa. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,35 - 6,8 (9

H), 6,25 (1 H), 5,25 (1 H), 4,45 (1 H), 3,6 (m, 1,5 H), 3,5 (1,5 H), 2,80 - 2,60 (6 H), 2,00 (2 H), 1,70 - 1,30 (5 H), 0,85 (6 H).

C. Käyttämällä edellä kuvattua yleistä menettelytapaa hydrolysoitiin pieni erä yhdistettä 1036-2 esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla ja kerättiin talteen kirkkaat jakeet, jolloin saatiin tuotteet BIO-1036A (n. 2 mg, m/z = 437, puhtaus 98 % HPLC:n perusteella) ja BIO-1036B (n. 2 mg, m/z = 437, puhtaus 98 % HPLC:n perusteella) valkeina kiinteinä aineina.
BIO-1036A: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,45 (d, 1 H, J = 7,3 Hz), 8,21 (d, 1 H, J = 7,3 Hz), 7,37 - 7,05 (m, 8 H), 5,20 (m, 1 H), 4,37 (m, 1 H), 3,57 - 3,43 (m, 2 H), 2,86 (m, 4 H), 2,69 (m, 2 H), 2,03 (m, 2 H), 1,60 (m, 1 H), 1,49 (m, 2 H), 0,91 (d, 3 H, J = 6,3 Hz), 0,84 (d, 3 H, J = 6,3 Hz).
BIO-1036B: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,45 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 8,22 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 7,40 - 7,00 (m, 8 H), 5,18 (m, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 3,55 (m, 2 H), 2,85 (m, 4 H), 2,57 (m, 2 H), 2,05 (m, 2 H), 1,55 (m, 1 H), 1,40 (m, 2 H), 0,90 (d, 3 H, J = 6,3 Hz), 0,75 (d, 3 H, J = 6,3 Hz).

Esimerkki 30

Yhdisteen BIO-1137 valmistus

A. Noudatettiin edellä kuvattua menettelytapaa C ja käytettiin metyyli-3-amino-3-(2-nitrofenyyli)-1-propanoaattia (esteri M-3, valmistus edellä kuvatulla menettelyllä B) (58 mg, 0,22 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1137-1 (106 mg, 0,22 mmol, 100 %) paksuna vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,95 (1 H), 7,85 - 7,35 (5 H), 5,85 (1 H), 4,95 (1 H), 4,15 (1 H), 3,55 (1,5 H), 3,50 (1,5 H), 2,90 (2 H), 1,70 - 1,60 (2 H), 1,45 (9 H), 0,90 (6 H).

B. Yhdiste 1137-1 (106 mg, 0,22 mmol) käsiteltiin esimerkissä 29B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste

1137-2 (69 mg, 0,16 mmol, 73 %) keltaisena puolikiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,90 - 7,15 (10 H), 6,35 (0,5 H), 6,20 (0,5 H), 5,75 (1 H), 4,45 (1 H), 3,55 (1,5 H), 3,50 (1,5 H), 2,85 (4 H), 1,70 - 1,30 (3 H), 0,70 (6 H).

C. Pieni erä yhdistettä 1137-1 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla ja eristettiin kirkkaat jakeet, jolloin saatiin tuotteet BIO-1037A (n. 1 mg, m/z = 442, puhtaus 97 % HPLC:n perusteella) ja BIO-1037B (n. 2 mg, m/z = 442, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella).

Esimerkki 31

Yhdisteen BIO-1043 valmistus

A. Kaupan oleva N-Boc-1-aminosyklopropaanikarboksyylihappo (80 mg, 0,4 mmol) aktivoitiin DMF:ssa (3 ml) huoneenlämpötilassa BOP:llä (221 mg, 0,5 mmol). 15 minuutin kuluttua lisättiin metyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaatin HCl-suolaa (86 mg, 0,4 mmol) [joka neutraloitiin ylimäärällä Hunigin emästä (0,15 ml, 0,8 mmol)] DMF:ssa (1 ml). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu yön yli huoneenlämpötilassa, se laimennettiin etyyliasetaatilla (10 ml), pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä vetykarbonaattiliuoksella (2 x 10 ml), 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (2 x 5 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (10 ml), kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste 1043-1 valkeana vaahtona (143 mg, 0,4 mmol, 100 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,6 (1 H), 7,2 (5 H), 5,4 - 5,3 (2 H), 3,55 (3 H), 2,85 - 2,70 (2 H), 1,55 (2 H), 1,40 (9 H), 0,9 (2 H).

B. Pieni erä yhdistettä 1043-1 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla ja suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla. Puhtaat jakeet kerättiin talteen, jolloin saatiin yhdiste BIO-1043 (n. 3 mg, m/z = 349, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena, jolla tehtiin biologinen testi. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-

d_6): δ = 8,55 - 8,05 (leveä m, 2 H), 7,5 - 7,15 (m, 5 H), 5,40 (leveä m, 2 H), 3,0 - 2,65 (m, 2 H), 1,45 (s, 9 H), 1,43 - 1,10 (m, 2 H), 0,97 (leveä m, 1 H), 0,85 (leveä m, 1 H).

Esimerkki 32

Yhdisteen BIO-1115 valmistus

A. Noudatettiin edellä kuvattua menettelytapaa C ja käytettiin metyyli-3-amino-3-(4-kloorifenyyli)-1-propanoaatin HCl-suolaa (esteri M-1, valmistus edellä kuvatulla menettelyllä B) (68 mg, 0,27 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1115-1 (94 mg, 0,22 mmol, 82 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,35 (1 H), 7,25 - 7,10 (4 H), 5,35 (1 H), 4,95 (1 H), 4,05 (1 H), 3,60 (1,5 H), 3,55 (1,5 H), 2,80 - 2,65 (2 H), 1,65 (2 H), 1,40 (10 H), 0,80 (6 H).

B. Yhdiste 1115-1 (106 mg, 0,22 mmol) käsiteltiin esimerkissä 29B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin raakatuote 1115-2 (67 mg, 0,15 mmol, 68 %) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri: δ = 7,50 (1 H), 7,40 - 7,00 (9 H), 6,20 (1 H), 5,25 (1 H), 4,45 (1 H), 3,60 (1,5 H), 3,55 (1,5 H), 2,7 - 2,55 (4 H), 1,65 - 1,40 (3 H), 0,80 (6 H).

C. Pieni erä raakatuotetta 1115-1 hydrolysoitiin, suoritettiin puhdistus LC:n avulla ja eristettiin puhtaat jakeet, jolloin saatiin tuotteet BIO-1115A (n. 1 mg, m/z = 431, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) ja BIO-1115B (n. 2 mg, m/z = 431, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeina kiinteinä aineina.

BIO-1115A: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,46 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 8,27 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 7,46 - 7,18 (m, 9 H), 5,20 (m, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 3,60 - 3,45 (m, 2 H), 2,71 (d, 2 H, J = 7,3 Hz), 1,63 (m, 1 H), 1,48 (m, 2 H), 0,91 (d, 3 H, J = 6,4 Hz), 0,84 (d, 3 H, J = 6,4 Hz).

BIO-1115B: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,60 (d, 1 H, J = 8 Hz), 8,26 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,45 - 7,15 (m, 9 H), 5,18 (m, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 3,50 (m, 2 H), 2,70 (m, 2 H), 1,50 (m, 1 H), 1,42 (m, 2 H), 0,85 (d, 3 H, J = 6,3 Hz), 0,75 (d, 3 H, J = 6,3 Hz).

Esimerkki 33

Yhdisteen BIO-1129 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi 4-(fenyyliurea)fenyylietikkahappoa (540 mg, 2,0 mmol; valmistettiin esimerkissä 22C) DMF:ssa (5 ml), lisättiin EDC:tä (460 mg, 2,4 mmol). Sen jälkeen kun seosta oli pidetty huoneenlämpötilassa 15 min, siihen lisättiin fenyylialaniinin t-butyyliesterin HCl-suolaa (515 mg, 2,0 mmol), joka neutraloitiin ylimäärällä Hunigin emästä (0,7 ml, 4,0 mmol), DMF:ssa (3 ml). Yön yli sekoituksen jälkeen reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (20 ml), pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä vetykarbonaattiliuoksella (2 x 10 ml), sitruunahapolla (2 x 10 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (2 x 10 ml), kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin raakatuote 1129-1 (662 mg, 1,40 mmol, 70 %) paksuna vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,45 - 6,90 (16 H), 6,45 (1 H), 4,70 (1 H), 3,4 (2 H), 3,15 - 2,90 (2 H), 1,35 (9 H).

B. Raakatuotteeseen 1129-1 (662 mg, 1,40 mmol) lisättiin dikloorimetaania (5 ml) ja sen jälkeen TFA:a (1 ml). Yön yli sekoituksen jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja kuivattiin alipainepumpun avulla. Pieni erä tuotetta (21 mg, 0,05 mmol) liuotettiin DMF:iin (1 ml), ja liuokseen lisättiin HOBt:a (11 mg, 0,07 mmol) ja sen jälkeen EDC:tä (14 mg, 0,06 mmol). Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu 15 min huoneenlämpötilassa, siihen lisättiin amiinia ß-3 (13 mg, 0,05 mmol) DMF:ssa (0,5 ml). Yön yli sekoituksen jälkeen reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (20 ml), pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä vetykarbonaattiliuoksella (2 x 10 ml), sit-

ruunahapolla (10 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (10 ml), kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin raakatuote 1129-2 (26 mg, 0,04 mmol, 80 %) vaaleankellanruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 8,4 (1 H), 7,45 - 6,5 (19 H), 5,95 (2 H), 5,7 (1 H), 4,70 (1 H), 3,65 - 3,50 (5 H), 3,10 - 2,65 (4 H).

C. Pieni erä raakatuotetta 1129-2 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla ja suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla, jolloin saatiin tuotteet BIO-1129A [n. 1,5 mg, m/z = 609 (80:20 ds), puhtaus 100 % HPLC:n perusteella] ja BIO-1129B [n. 2 mg, m/z = 609 (9:91 ds), puhtaus 100 % HPLC:n perusteella] valkeina kiinteinä aineina.
BIO-1129A: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,18 (s, 1 H), 8,14 (s, 1 H), 8,50 (leveä d, 1 H), 8,23 (leveä d, 1 H), 7,50 (d, 2 H, J = 8,1 Hz), 7,40 - 7,10 (m, 9 H), 7,08 - 6,72 (m, 6 H), 6,04 (s, 2 H), 5,15 (m, 1 H), 4,07 (m, 1 H), 3,38 (m, 2 H), 3,05 - 2,70 (m, 2 H), 2,62 (s, 2 H).

Esimerkki 34

Yhdisteen BIO-1131 valmistus

A. Toteutettiin esimerkin 1A mukainen proseduuri käyttämällä fenyyliureafenyylietikkahappoa (valmistettiin esimerkissä 22C) ja isoleusiinin metyyliesterin HCl-suolaa (362 mg, 2,0 mmol) (joka käsiteltiin TEA:lla), jolloin saatiin raakatuote 1131-1 (344 mg, 1,0 mmol, 51 %) kirkkaana paksuna öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,7 (1 H), 7,35 - 6,95 (10 H), 6,60 (1 H), 4,55 (1 H), 3,65 (3 H), 3,45 (2 H), 1,90 (1 H), 1,45 - 1,20 (3 H), 0,85 (5 H).

B. Liuokseen, joka sisälsi raakatuotetta 1131-1 (344 mg, 0,95 mmol) metanolissa (5 ml), lisättiin LiOH-liuosta (2 ekv/l, 2 ml). Yön yli sekoituksen jälkeen metanoli poistettiin, lisättiin vettä (5 ml) ja pH säädettiin alueelle 1 - 2. Vesikerros uutettiin etyyliasetaatilla (5 x 20 ml) ja etyyliasetaattifaasi kuivattiin natriumsul-

faatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste 1131-2 (365 mg, 0,95 mmol, 100 %) kellanruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 8,70 (2 H), 8,30 (1 H), 7,60 - 7,20 (8 H), 7,00 (1 H), 4,25 (1 H), 3,55 (2 H), 1,90 (1 H), 1,55 (1 H), 1,30 (2 H), 0,85 (5 H).

C. Yhdisteestä 1131-2 (27 mg, 0,07 mmol) ja amiinista ß-3 (11 mg, 0,07 mmol) valmistettiin esimerkissä 1A kuvatulla tavalla raakatuote 1131-3 (34 mg, 89 %) vaaleana ruskehtavana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 8,3 (2 H), 7,45 - 6,65 (16 H), 5,45 (1 H), 4,45 - 4,30 (1 H), 3,55 (2 H), 3,2 - 2,90 (2 H), 2,00 - 0,70 (9 H).

D. Pieni erä raakatuotetta 1131-3 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla ja suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla, jolloin saatiin tuotteet BIO-1131A [n. 2 mg, m/z = 531 (100:0 ds), puhtaus 100 % HPLC:n perusteella] ja BIO-1131B [n. 3 mg, m/z = 531 (0:100 ds), puhtaus 100 % HPLC:n perusteella] valkeina kiinteinä aineina.
BIO-1131A: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,69 (s, 1 H), 8,63 (s, 1 H), 8,50 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 7,50 (d, 2 H, J = 7,8 Hz), 7,44 - 7,22 (m, 8 H), 7,19 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,00 (m, 1 H), 5,27 (m, 1 H), 4,36 (m, 1 H), 3,52 (m, 2 H), 3,00 (leveä m, 2 H), 2,71 (d, 2 H, J = 7,3 Hz), 1,70 (leveä m, 1 H), 1,44 - 1,26 (m, 1 H), 1,22 - 1,00 (m, 3 H), 0,95 - 0,78 (m, 5 H).
BIO-1131B: ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,73 (s, 1 H), 8,68 (s, 1 H), 8,60 (d, 1 H, J = 8 Hz), 8,15 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,50 (d, 2 H, J = 7,9 Hz), 7,42 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,37 - 7,23 (m, 5 H), 7,20 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,00 (m, 1 H), 5,35 (m, 1 H), 4,23 (m, 1 H), 3,50 (m, 2 H), 3,05 (leveä m, 2 H), 2,71 (m, 2 H), 1,72 (leveä m, 1 H), 1,20 (m, 3 H), 0,72 - 0,60 (m, 5 H).

Esimerkki 35

Yhdisteen BIO-1136 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä kaupan olevaa N-Boc-S-bentsyylikysteiiniä (25

mg, 0,08 mmol) ja metyyli-3-amino-3-fenyyli-1-propanoaattia (17 mg, 0,09 mmol), jolloin saatiin puhdistamaton suojattu amiini 1136-1 (42 mg, 0,08 mmol, 100 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,35 (10 H), 5,40 - 5,20 (2 H), 4,20 (1 H), 3,65 (1,5 H), 3,55 (1,5 H), 3,54 (1,5 H), 3,25 - 2,65 (6 H), 1,45 - 1,30 (9 H).

B. Suojattu amiini 1136-1 käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1136-2.

C. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1136-2 (42 mg, 0,08 mmol) (TEA-käsittely), jolloin saatiin raakatuote 1136-3, joka käytettiin hydrolyysivaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin.

D. Pieni erä raakatuotetta 1136-3 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla ja suoritettiin puhdistus HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1136 (n. 4 mg, m/z = 611, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9,05 (leveä m, 2 H), 8,90 (leveä, 1 H), 8,37 (leveä, 1 H), 7,50 (d, 1 H, J = 7,7 Hz), 7,45 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,4 - 7,2 (m, 9 H), 7,00 (m, 1 H), 5,25 (leveä, 1 H), 4,65 (leveä, 1 H), 3,5 - 3,2 (m, 4 H), 2,70 (leveä m, 2 H).

Esimerkki 36

Yhdisteen BIO-1176 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi kaupan olevaa N-Boc-asparagiinihapon α-bentsyyliesteriä (500 mg, 1,55 mmol) DMF:ssa (5 ml), lisättiin HOBt:a (283 mg, 2,10 mmol) ja sen jälkeen EDC:tä (343 mg, 1,80 mmol). Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu 15 min huoneenlämpötilassa, siihen lisättiin tiomorfoliinia (500 mg, 1,54 mmol) ja sitten Hunigin emästä (0,7 ml, 92 mmol) ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseos loppukäsiteltiin laimentamalla se etyyliasetaatilla (25 ml) ja pesemällä 60-prosenttisesti kyllästetyllä vetykarbonaatti-

liuoksella (5 ml), 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (5 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (5 ml). Orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin esteri 1176-1 paksuna oranssina öljynä (421 mg, 1,03 mmol, 69 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,13 (m, 5 H), 5,69 (leveä d, 1 H, J = 9,4 Hz), 5,03 (d, 1 H, J = 12,6 Hz), 4,42 (m, 1 H), 3,61 (m, 1 H), 3,60 - 3,40 (m, 4 H), 2,96 (leveä m, 1 H), 2,58 (leveä m, 1 H), 2,35 (m, 4 H), 1,22 (s, 9 H).

B. Esteri 1176-1 (100 mg, 0,25 mmol) käsiteltiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin happo 1176-2 (76 mg, 0,24 mmol, 96 %) kirkkaana paksuna öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,39 - 7,28 (m, 5 H), 7,15 - 6,70 (leveä, 1 H), 5,70 (leveä s, 1 H, J = 6,3 Hz), 4,55 (leveä, 1 H), 4,40 - 3,40 (m, 4 H), 3,15 (m, 2 H), 2,80 - 2,52 (m, 5 H), 1,43 (s, 9 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä happoa 1176-2 (32 mg, 0,10 mmol), joka liuotettiin DMF:iin, HOBt:a, EDC:tä ja amiinia ß-3, jolloin saatiin yhdiste 1176-3 (36 mg, 0,07 mmol, 70 %) paksuna vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,71 (leveä, 1 H), 6,61 (m, 3 H), 6,00 (leveä, 0,5 H), 5,90 (s, 1 H), 5,77 (leveä, 0,5 H), 5,21 (1 H), 4,51 (leveä m, 1 H), 3,90 - 3,40 (m, 4 H), 3,39 (s, 3 H), 3,12 - 3,00 (m, 1 H), 2,85 - 2,65 (m, 3 H), 2,63 - 2,45 (m, 4 H), 1,43 (s, 4,5 H), 1,43 (s, 4,5 H).

D. Suojattu amiini 1176-3 (36 mg, 0,07 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1176-4 (51 mg, 0,07 mmol, 100 %) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena.

E. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1176-4 (42 mg, 0,08 mmol) (TEA-käsittelyn jälkeen), jolloin saatiin raakatuote 1176-5, joka käytettiin hydrolyysivaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,95 - 6,9 (m,

13 H), 6,61 (s, 3 H), 5,85 (s, 2 H), 5,23 (m, 1 H), 4,88 (m, 1 H), 3,89 - 3,60 (s, 4 H), 3,55 (s, 3 H), 3,43 (leveä, 2 H), 3,11 - 2,96 (m, 2 H), 2,71 (m, 2 H), 2,46 (m, 4 H).

F. Raakatuote 1176-5 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla ja ruiskuttamalla pieni erä tuotetta HPLC-kolonniin saatiin yhdiste BIO-1176 (n. 4 mg, m/z = 662, puhtaus yli 99 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 8,69 (d, 2 H, J = 9,8 Hz), 8,33 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 8,26 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,61 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,43 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,34 (m, 2 H), 7,21 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,10 - 6,95 (m, 4 H), 6,11 (m, 2 H), 5,13 (m, 1 H), 4,68 (m, 1 H), 3,71 (leveä, 4 H), 3,56 - 3,18 (m, 2 H), 2,73 - 2,46 (m, 8 H).

Esimerkki 37

Yhdisteen BIO-1177 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 36A kuvattu proseduuri käyttämällä tiomorfoliinin sijasta metyylipropargyyliamiinia, jolloin saatiin raakatuote 1177-1 (374 mg, 0,99 mmol, 66 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,20 (5 H), 5,25 (1 H), 5,10 (1 H), 4,45 (1 H), 4,15 - 3,8 (2 H), 3,15 - 2,65 (5 H), 2,2 - 2,15 (1 H), 1,30 (9 H).

B. Raakatuote 1177-1 käsiteltiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin happo 1177-2 (76 mg, 0,26 mmol, 96 %) kirkkaana öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 5,35 (1 H), 4,55 (1 H), 4,35 - 3,8 (2 H), 3,30 - 2,65 (5 H), 2,4 - 2,25 (1 H), 1,45 (9 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä happoa 1177-2 (76 mg, 0,26 mmol), joka liuotettiin DMF:iin, HOBt:a, EDC:tä ja amiinia ß-3, jolloin saatiin raakatuote 1177-3 (78 mg, 0,15 mmol) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,70 (1 H), 7,35 (3 H), 6,65 (2 H), 5,80 (2 H), 5,30 - 5,00 (2 H), 4,60

(1 H), 4,45 - 3,80 (2 H), 3,60 (3 H), 3,30 - 2,70 (5 H), 2,30 (1 H), 1,45 (4,5 H), 1,40 (4,5 H).

D. Suojattu amiini 1177-3 (78 mg, 0,15 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1177-4.

E. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1177-4, jolloin saatiin yhdiste 1177-5 (52 mg, 0,08 mmol, 77 %) kellanruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,5 - 6,9 (14 H), 6,65 (3 H), 5,85 (2 H), 5,25 - 5,00 (2 H), 4,85 (1 H), 4,25 - 3,70 (2 H), 3,60 (3 H), 3,55 (2 H), 3,30 - 2,65 (5 H), 2,22 (1 H).

F. Pieni erä yhdistettä 1177-5 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1177 (n. 2 mg, m/z = 628, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 8,64 (leveä d, 2 H), 8,27 (leveä d, 3 H), 7,55 - 7,13 (m, 7 H), 7,11 - 6,75 (m, 3 H), 6,15 (s, 2 H), 5,12 (leveä m, 1 H), 4,65 (leveä m, 1 H), 3,25 (m, 2 H), 3,05 (leveä, 2 H), 2,88 (leveä m, 1 H), 2,62 (m, 2 H).

Esimerkki 38

Yhdisteen BIO-1214 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 36A kuvattu proseduuri käyttämällä N-Boc-asparagiinihapon α-bentsyyliesteriä (1,60 g, 4,9 mmol) ja tiomorfoliinin sijasta dimetyyliamiinia, jolloin saatiin esteri 1214-1 (1,43 g, 4,1 mmol, 83 %) värittömänä öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,32 (m, 5 H), 5,85 (leveä, 1 H), 5,15 (m, 2 H), 5,10 (1 H), 4,55 (leveä, 1 H), 3,12 (m, 1 H), 2,94 (s, 3 H), 2,88 (s, 3 H), 2,73 (m, 1 H), 1,40 (s, 9 H).

B. Esteri 1214-1 (124 mg, 0,33 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (2 ml), liuokseen lisättiin 10 % Pd/C-katalyyttiä (n. 50 mg) ja seosta hydrattiin paineessa 280 kPa (40 psi) 2 tuntia. Reaktioseos suodatettiin piimaan läpi ja väkevöitiin, jolloin saatiin happo 1214-2 (95

mg, 0,33 mmol, 100 %) värittömänä öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 5,81 (leveä m, 1 H), 4,48 (leveä s, 1 H), 3,15 (m, 1 H), 3,00 (s, 3 H), 2,93 (s, 3 H), 2,59 (m, 1 H), 1,39 (s, 9 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä happoa 1214-2 (28 mg, 0,10 mmol) ja amiinia ß-3 (17 mg, 0,80 mmol), jolloin saatiin suojattu amiini 1214-3 (55 mg, 0,10 mmol, 100 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,77 (leveä d, 1 H), 6,71 (m, 3 H), 6,11 (leveä d, 1 H), 5,91 (s, 2 H), 5,25 (m, 1 H), 4,51 (leveä, 1 H), 3,60 (s, 3 H), 3,21 (m, 1 H), 2,94 (s, 3 H), 2,90 (s, 3 H), 2,88 - 2,68 (m, 2 H), 2,48 (m, 1 H), 1,43 (s, 9 H).

D. Suojattu amiini 1214-3 (55 mg, 0,10 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1214-4.

E. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1214-4, jolloin saatiin yhdiste 1214-5 (31 mg, 0,05 mmol, 50 %) kellanruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,45 - 6,90 (m, 13 H), 6,61 (m, 3 H), 5,85 (s, 2 H), 5,24 (m, 1 H), 4,82 (m, 1 H), 3,55 (s, 3 H), 3,47 (m, 2 H), 3,08 - 2,94 (m, 1 H), 2,92 (s, 3 H), 2,84 (s, 3 H), 2,77 - 2,50 (m, 2 H), 2,45 (m, 1 H).

F. Pieni erä yhdistettä 1214-5 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1214 (n. 2 mg, m/z = 604, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena.

Esimerkki 39

Yhdisteen BIO-1215 valmistus

A. Lämpötilaan 0 °C jäähdytettyyn liuokseen, joka sisälsi amidia 1214-1 (valmistettiin esimerkissä 38A; 671 mg, 1,9 mmol) kuivassa tetrahydrofuraanissa (5 ml), lisättiin pisaroittain THF:iin tehtyä BH_3-liuosta (1 ekv/l, 4,1 ml, 3,8 mmol). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitet-

tu 2 tuntia huoneenlämpötilassa, siitä tuhottiin reagoimaton boraani metanolilla (2 ml) ja se haihdutettiin kuiviin. Lisättiin metanolia (5 ml) ja poistettiin se kolmesti kaiken muodostuneen $(MeO)_3B$:n poistamiseksi. Kuivaus alipaineessa tuotti tulokseksi amiinin 1215-1 (623 mg, 1,7 mmol, 90 %) paksuna värittömänä öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,38 (m, 5 H), 5,48 (leveä m, 1 H), 2,65 - 2,35 (m, 8 H), 1,95 (m, 2 H), 1,42 (s, 9 H).

B. Amiini 1215-1 (124 mg, 0,34 mmol) hydrattiin katalyyttisesti käyttämällä liuotteena metanoli-etyyliasetaatti-etikkahapposeosta ja 10 % Pd/C-katalyyttiä (n. 50 mg. 2 tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin ja väkevöitiin, jolloin saatiin happo 1215-2 (90 mg, 0,33 mmol, 97 %) paksuna värittömänä öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 5,91 (leveä, 1 H), 2,95 (leveä, 1 H), 3,54 (leveä m, 1 H), 2,71 - 2,42 (m, 8 H), 2,15 (leveä, 2 H), 1,33 (s, 9 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä happoa 1215-2 (55 mg, 0,12 mmol) ja amiinia ß-3 (22 mg, 0,10 mmol), jolloin saatiin suojattu amiini 1215-3 (44 mg, 0,09 mmol, 90 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 6,75 (m, 3 H), 6,51 (leveä d, 1 H), 5,91 (s, 2 H), 5,30 (m, 1 H), 4,37 - 4,12 (m, 2 H), 3,61 (s, 3 H), 2,90 - 2,65 (m, 2 H), 2,55 - 2,00 (m, 10 H), 1,42 (s, 9 H).

D. Suojattu amiini 1215-3 (44 mg, 0,09 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1215-4.

E. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1215-4, jolloin saatiin yhdiste 1215-5 (38 mg, 0,06 mmol, 70 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,41 - 6,90 (m, 13 H), 6,71 (m, 3 H), 5,91 (s, 2 H), 5,29 (m, 1 H), 4,21 (m, 1 H), 3,61 (s, 3 H), 3,45 (m, 2 H), 2,90 - 2,70 (m, 2 H), 2,40 - 1,95 (m, 10 H).

F. Pieni erä yhdistettä 1214-5 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1215 (n. 3 mg, m/z = 590, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena.

Esimerkki 40

Yhdisteen BIO-1227 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 1B kuvattu proseduuri käyttämällä kaupan olevaa Boc-S-metyylikysteiiniä (28 mg, 0,12 mmol) ja amiinia ß-3 (21 mg, 0,10 mmol), jolloin saatiin suojattu amiini 1227-1 (32 mg, 0,07 mmol, 70 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,38 (leveä d, 1 H), 6,81 - 6,67 (m, 3 H), 5,90 (s, 2 H), 5,40 (leveä d, 1 H), 5,37 (m, 1 H), 4,20 (m, 1 H), 3,59 (s, 3 H), 2,95 - 2,68 (m, 4 H), 2,10 (s, 3 H), 1,43 (s, 9 H).

B. Suojattu amiini 1227-1 (32 mg, 0,07 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1227-2.

C. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä vapaata amiinia 1227-2 ja 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (28 mg, 0,10 mmol), jolloin saatiin puhdistamaton esteri 1227-3 (29 mg, 0,047 mmol, 67 %) vaaleankellanruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,62 (leveä d, 1 H), 7,4 - 6,9 (m, 12 H), 6,80 (m, 3 H), 5,90 (s, 2 H), 5,15 (m, 1 H), 4,45 (m, 1 H), 3,63 - 3,45 (m, 5 H), 3,15 - 2,61 (m, 4 H), 2,21 (s, 3 H), 2,10 (s, 3 H).

D. Pieni erä puhdistamatonta esteriä 1227-3 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1227 (n. 4 mg, m/z = 593, puhtaus yli 99 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 9,01 (s, 1 H), 8,67 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 8,11 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,97 (s, 1 H), 7,90 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7,44 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 7,23 (m, 4 H), 6,99 (m, 2 H), 6,85 (m, 2 H), 6,03 (s, 2 H),

5,16 (m, 1 H), 4,54 (m, 1 H), 3,39 (m, 2 H), 2,81 - 2,58 (m, 4 H), 2,30 (s, 3 H), 2,05 (s, 3 H).

Esimerkki 41

Yhdisteen BIO-1149 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi menettelyllä C aikaansaatua tuotetta (272 mg, 0,67 mmol) CH_2Cl_2:ssa (2,5 ml), lisättiin hitaasti TFA:a (2,5 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti. Liuotteet poistettiin, jolloin jäi jäljelle öljy. Öljy liuotettiin CH_2Cl_2:iin (2,5 ml). Muodostuneeseen liuokseen lisättiin Et_3N:a, kunnes saavutettiin pH-arvo 9, ja sen jälkeen suksiini-imidyyli-2-kinoliinikarboksyylihappoa (170 mg, 0,63 mmol). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti, minkä jäljeen tehtiin tavanomainen loppukäsittely (5-prosenttinen sitruunahappoliuos, 5-prosenttinen $NaHCO_3$-liuos ja kylläinen NaCl-liuos), jolloin saatiin esteri 1149-1 (200 mg, 76 %) valkeana kiinteänä aineena.

B. Happo 1149-1 (200 mg, 0,43 mmol) liuotettiin metanoliin (1,5 ml) ja liuokseen lisättiin LiOH:n vesiliuosta (1 mol/l, 0,5 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3 tuntia ja se neutraloitiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella pH-arvoon 3 ja uutettiin EtOAc:lla (3 x 5 ml). Yhdistetyt uuttoliuokset kuivattiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin, jolloin saatiin raakatuote 1149 (155 mg, 82,5 %). Pieni määrä raakatuotetta (30 mg) puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1149, ja diastereomeerit erotettiin. HPLC (huoneenlämpötila): A: 36 min. B: 38 min. MS (FAB): 434. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,72 (m, 1 H), 8,30 - 7,98 (m, 3 H), 7,82 - 7,64 (m, 2 H), 7,60 - 7,51 (m, 1 H), 7,30 - 7,09 (m, 5 H), 5,46 - 5,38 (m, 1 H), 4,86 - 4,72 (m, 1 H), 2,92 - 2,74 (m, 2 H), 1,88 - 1,61 (m, 3 H), 0,96 - 0,83 (m, 6 H).

Esimerkki 42

Yhdisteen BIO-1152 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi menettelyllä D2 aikaansaatua tuotetta (33 mg, 0,1 mmol) CH_2Cl_2:ssa (0,5 ml), li-

sättiin 2,2-dimetyyliboihappokloridia (14 mg, 0,1 mmol) ja Et_3N:a (50 µl). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia. Tavanomaisesti loppukäsittelemällä (5-prosenttinen $NaHCO_3$-liuos, 5-prosenttinen sitruunahappoliuos ja kylläinen NaCl-liuos) saatiin yhdiste 1152-2 (37 mg, 76 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,32 - 7,19 (m, 5 H), 6,08 (s, 1 H), 5,36 - 5,27 (m, 1 H), 4,53 - 4,44 (m, 1 H), 2,86 - 2,61 (m, 2 H), 2,05 (s, 2 H), 1,26 (s, 9 H), 1,01 (s, 9 H), 0,99 - 0,84 (s, 9 H).

B. Esteri 1152-2 liuotettiin CH_2Cl_2:n (2,5 ml) ja TFA:n (2,5 ml) seokseen ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3 tuntia, jolloin saatiin öljy. Öljy puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin puhdasta yhdistettä BIO-1152. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,29 (d, 1 H), 7,44 (d, 1 H), 7,34 - 7,18 (m, 5 H), 5,44 - 5,32 (m, 1 H), 4,78 - 4,69 (m, 1 H), 3,21 - 3,14 (m, 2 H), 2,98 - 2,77 (dd, 2 H), 1,59 - 1,38 (m, 3 H), 0,96 (s, 9 H), 0,84 (d, 3 H), 0,73 (d, 3 H).

Esimerkki 43

Yhdisteen BIO-1089 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi amiinia ß-6 (2,2 g, 8,76 mmol) CH_2Cl_2:ssa (25 ml), lisättiin N-Boc-metioniinin sukkiini-imidyyliesteriä (2,77 g, 8,0 mmol) ja Et_3N:a (5 pisaraa) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 tuntia. Seos pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (2 x 10 ml), 5-prosenttisella $NaHCO_3$-liuoksella (2 x 10 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (15 ml), kuivattiin (Na_2SO_4) ja väkevöitiin, jolloin saatiin yhdiste 1089-1 (3,2 g, 83 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,27 (d, 2 H), 6,81 (d, 2 H), 5,31 - 5,20 (m, 2 H), 4,38 - 4,28 (m, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 2,82 - 2,64 (m, 2 H), 2,12 (s, 3 H), 1,44 (s, 9 H), 1,30 (s, 9 H).

B. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1089-1 (3,2 g, 6,64 mmol) EtOAc:ssa (15 ml), lisättiin EtOAC:iin tehtyä HCl-liuosta (1 mol/l, 40 ml) ja seosta sekoitettiin

huoneenlämpötilassa 4,5 tuntia. Reaktioseokseen lisättiin vettä (60 ml) ja vesikerros kerättiin talteen. Se neutraloitiin kiinteällä $NaHCO_3$:lla pH-arvoon 8 ja uutettiin EtOAc:lla (2 x 45 ml). Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella (20 ml), kuivattiin (Na_2SO_4) ja väkevöitiin, jolloin saatiin yhdiste 1089-2 (1,7 g, 67 %) öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,98 (d, 1 H), 7,19 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 6,81 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 5,32 - 5,18 (m, 1 H), 3,74 (s, 3 H), 3,48 - 3,44 (m, 1 H), 2,82 - 2,62 (m, 2 H), 2,53 (t, 2 H), 2,18 - 2,06 (m, 1 H), 2,04 (s, 3 H), 1,8 - 1,66 (m, 1 H), 1,31 (s, 9 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä 1089-2 (1,7 g, 4,45 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1089-3 (2,3 g, 81,6 %) kiinteänä aineena. Tämä aine käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,60 (d, 2 H), 8,41 (d, 1 H), 8,24 (d, 1 H), 7,44 (d, 2 H), 7,31 (d, 2 H), 7,26 (t, 2 H), 7,13 (t, 2 H), 6,91 (t, 1 H), 6,79 (d, 2 H), 5,10 - 5,01 (m, 1 H), 4,36 - 4,33 (m, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,29 (s, 2 H), 2,61 - 2,58 (m, 2 H), 1,89 (s, 3 H), 1,26 (s, 9 H).

D. Yhdiste 1089-3 (2,3 g, 3,63 mmol) liuotettiin dioksaaniin tehtyyn HCl-liuokseen (4 ekv/l, 8 ml) ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia. Dioksaanin poistamisen jälkeen lisättiin eetteriä (15 ml) ja seosta sekoitettiin 10 min. Sakka kerättiin talteen ja kiteytettiin uudelleen metanolista, jolloin saatiin puhdas yhdiste BIO-1089 vaaleanruskeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 579. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,76 (d, 2 H), 8,52 (d, 1 H), 7,54 (d, 2 H), 7,46 (d, 2 H), 7,36 (t, 1 H), 7,34 - 7,24 (m, 4 H), 7,04 (t, 1 H), 6,95 (d, 2 H), 5,22 - 5,20 (m, 1 H), 4,46 - 4,35 (m, 1 H), 3,81 (s, 3 H), 3,50 (s, 2 H), 3,20 (m, 2 H), 2,79 - 2,73 (m, 2 H), 2,35 (t, 2 H), 2,03 (s, 3 H), 1,87 - 1,80 (m, 2 H).

Esimerkki 44

Yhdisteen BIO-1090 valmistus

A. Noudatettiin edellä kuvattua menettelytapaa C ja käytettiin amiinia ß-10 (28 mg, 1,0 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1090-1 (38 mg, 84 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,08 (m, 1 H), 6,82 (s, 1 H), 6,74 - 6,70 (m, 2 H), 5,45 - 5,15 (m, 1 H), 4,98 - 4,93 (m, 1 H), 4,16 - 4,13 (m, 4 H), 2,74 - 2,53 (m, 2 H), 1,62 - 1,42 (m, 3 H), 1,44 (s, 9 H), 1,40 (s, 9 H), 0,89 (m, 6 H).

B. Valkea kiinteä aine 1090-1 (38 mg, 0,77 mmol) käsiteltiin edellä kuvatulla menettelytavalla D1, jolloin saatiin yhdiste 1090-2 öljynä. Tämä yhdiste käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,24 - 7,15 (m, 2 H), 6,84 - 6,61 (m, 3 H), 5,81 - 5,78 (m, 1 H), 4,23 (s, 4 H), 4,19 - 4,08 (m, 1 H), 2,88 - 2,62 (m, 2 H), 1,70 - 1,46 (m, 3 H), 0,90 - 0,81 (m, 6 H).

C. Toteutettiin esimerkin 22D mukainen proseduuri käyttämällä amiinia 1090-2, jolloin saatiin raakatuote 1090-3 (27 mg, 59 %). Puhdistamalla raakatuote HPLC:n avulla saatiin puhdas yhdiste BIO-1090 valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 603.

Esimerkki 45

Yhdisteen BIO-1194 valmistus

A. Hyvin sekoitettuun kylmään liuokseen, joka sisälsi metyyli-p-aminofenyyliasetaattia (9,8 g, 59,4 mmol) CH_2Cl_2:n (200 ml) ja Et_3N:n (25 ml, 18 g, 178,2 mmol) seoksessa, lisättiin tiputussuppilon kautta 1 h:n aikana $COCl_2$-liuosta (1,9 mol/l tolueenissa, 96 ml). Reaktioseosta sekoitettiin vielä 1 tunti lämpötilassa 0 °C. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännökseen lisättiin eetteri-liuotebensiiniseosta (3:1, 125 ml). Kiinteä aine poistettiin suodattamalla ja suodos kerättiin talteen. Poistamalla liuotteet saatiin raakatuote 1194-1 ruskeana nesteenä. Raakatuote

puhdistettiin tislaamalla [118 - 120 °C, 1,3 kPa (10 mmHg)], jolloin saatiin puhdas yhdiste 1194-1 (8,5 g, 75 %) värittömänä nesteenä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,20 (d, J = 8,4 Hz), 7,02 (d, J = 8,4 Hz), 3,69 (s, 3 H), 3,48 (s, 2 H).

B. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1194-1 (5,73 grammaa, 30,0 mmol) CH_2Cl_2:ssa (60 ml), lisättiin vähitellen 2-aminopyridiiniä (2,82 g, 30 mmol). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tuntia ja sen jälkeen lämpötilassa 35 °C 0,5 tuntia. Tulokseksi saatu seos laimennettiin liuotebensiinillä (60 ml), jolloin muodostui valkeaa kiinteää ainetta. Erottamalla kiinteä aine suodattamalla saatiin puhdas yhdiste 1194-2 (8,35 g, 98 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,20 (s, 2 H), 7,62 - 7,51 (m, 3 H), 7,33 (d, 2 H), 7,01 (d, 2 H), 6,89 - 6,85 (m, 1 H), 3,70 (s, 3 H), 3,59 (s, 2 H).

C. Yhdiste 1194-2 (5,7 g, 20,0 mmol) liuotettiin metanoliin (20 ml) ja liuokseen lisättiin NaOH-liuosta (1 ekv/l, 40 ml). Seosta kuumennettiin, kunnes muodostui kirkas liuos, ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia, minkä jälkeen se neutraloitiin varovasti HCl-liuoksella (1 ekv/l) pH-arvoon 7 ja sitten etikkahapolla pH-arvoon 3. Muodostunut valkea kiinteä aine erotettiin suodattamalla ja pestiin metanolilla (15 ml) ja eetterillä (2 x 30 ml), jolloin saatiin yhdiste 1194-3 (4,7 g, 87 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 10,62 (leveä s, 1 H), 9,53 (leveä s, 1 H), 8,39 (d, 1 H), 7,82 (t, 1 H), 7,63 - 7,55 (m, 1 H), 7,33 - 7,27 (d, 2 H), 7,14 - 7,08 (m, 1 H), 3,62 (s, 3 H).

D. Noudatettiin yleistä menettelytapaa C yhdisteen 1194-4 valmistamiseksi kytkemällä amiini ß-6 (2,65 g, 10,56 mmol) yhteen BocLeuOSu:n (3,28 g, 10 mmol) kanssa CH_2Cl_2:n (25 ml) ja Et_3N:n (5 pisaraa) seoksessa, mitä seu-

rasi suojauksen poisto (TFA, CH_2Cl_2), jolloin saatiin yhdiste 1994-4 (4,5 g, 83,6 %) kahdessa vaiheessa.
1194-4-Boc: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,18 (d, 2 H), 6,36 (d, 2 H), 5,13 - 5,10 (m, 1 H), 4,12 - 4,01 (m, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 2,79 - 2,60 (m, 2 H), 1,62 - 1,40 (3 H), 1,38 (s, 9 H), 1,26 (s, 9 H), 0,85 - 0,80 (m, 6 H).
1194-4: ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,10 (d, 2 H), 6,78 (d, 2 H), 5,43 - 5,27 (m, 1 H), 4,21 - 4,06 (m, 1 H), 3,71 (s, 3 H), 2,95 - 2,76 (m, 1 H), 2,75 - 2,56 (m, 1 H), 1,62 - 1,32 (m, 6 H).

E. Noudatettiin esimerkin 1A mukaista menetelmää ja käytettiin happoa 1194-3 (1,36 g, 5,0 mmol) ja amiinia 1194-4, jolloin saatiin raakatuote BIO-1194 (2,1 g, 78 %) valkeana kiinteänä aineena. Puhdas tuote (puhtaus yli 97,5 %) saatiin aikaan metanolista kiteyttämällä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,03 - 7,97 (m, 2 H), 7,59 (m, 1 H), 7,51 (d, 2 H), 7,18 - 7,07 (m, 4 H), 6,27 (d, 2 H), 5,24 (m, 1 H), 4,39 - 4,36 (m, 1 H), 3,61 (s, 3 H), 3,43 (s, 2 H), 2,69 - 2,66 (m, 2 H), 1,54 - 1,33 (m, 2 H), 0,86 - 0,75 (m, 6 H).

Esimerkki 46

Yhdisteen BIO-1180 valmistus

A. Noudatettiin esimerkissä 45A kuvattua menetelmää ja käytettiin t-butyyli-p-aminofenyyliasetaattia, jolloin saatiin yhdistettä 1180-1 saannolla 94 %. MS (FAB): 234. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,18 (d, 2 H, J = 8,2 Hz), 6,98 (d, 2 H, J = 8,2 Hz), 3,49 (s, 3 H), 1,45 (s, 9 H).

B. Liuokseen, joka sisälsi isosyanaattia 1180-1 (233 mg, 1,0 mmol) CH_2Cl_2:ssa (5 ml), lisättiin 2-aminotiatsolia (100 mg, 1,0 mmol) ja seosta kuumennettiin, kunnes muodostui kirkas liuos, ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti. Poistamalla liuotteet saatiin yhdiste 1180-2 (335 mg) ruskeankeltaisena kiinteänä aineena. Tämä kiinteä aine liuotettiin CH_2Cl_2:iin (2,5 ml) ja liuokseen

lisättiin TFA:a (2,5 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 tuntia ja se haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste 1180-3 (300 mg) keltaisena kiinteänä aineena. MS (FAB): 278.

C. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1180-3 (28 mg, 0,1 mmol) DMF:ssa (0,25 ml), lisättiin EDC:tä (60 mg, 0,31 mmol) ja DMAP:tä (55 mg). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 min ja siihen lisättiin amiino-TFA-suolaa ß-3 (23 mg, 0,051 mmol). Syntynyttä reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia. Tavanomainen loppukäsittely (5-prosenttinen sitruunahappoliuos, 5-prosenttinen $NaHCO_3$-liuos ja kylläinen NaCl-liuos) ja haihdutus antoivat tulokseksi raakatuotteen 1180-4 (22 mg, 72 %). MS (FAB): 596.

D. Puhdistamaton tuote 1180-4 hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin raakatuote BIO-1180. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin puhdasta yhdistettä BIO-1180. HPLC (huoneenlämpötila): 26,3 min (puhtaus yli 99 %). MS (FAB): 582. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 9,00 (leveä s, 1 H), 8,52 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 8,24 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 7,50 - 7,47 (m, 3 H), 7,28 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 7,20 (d, 1 H, J = 3,5 Hz), 6,95 - 6,81 (m, 3 H), 6,08 (d, 1 H, J = 1,4 Hz), 5,19 - 5,16 (m, 1 H), 4,4 - 4,2 (m, 1 H), 3,51 (dd, J = 14,1 ja 23,8 Hz), 2,76 - 2,65 (m, 2 H), 1,57 - 1,50 (m, 1 H), 1,50 - 1,44 (m, 2 H), 0,92 (d, 2 H, J = 6,3 Hz), 0,86 (d, J = 6,3 Hz).

Esimerkki 47

Yhdisteen BIO-1199 valmistus

Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä BIO-1089 (15 mg) DMSO:n (1,0 ml) ja veden (2 ml) seoksessa, lisättiin Oxonea^R (20 mg) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa. HPLC-seuranta osoitti, että BIO-1089 (20 min, huoneenlämpötilassa) hävisi ja muodostui uusi huippu (retentioaika = 16,9 min). Kun sekoitusta oli jatkettu huoneenlämpötilassa

16 tuntia, lähtöaine BIO-1089 oli kulunut lähes kokonaan. Yhdiste BIO-1199 (16,9 min, huoneenlämpötilassa) eristettiin HPLC:n avulla ja sen puhtaus oli yli 99 %. MS (FAB): 595 min.

Esimerkki 48

Yhdisteen BIO-1207 valmistus

A. Toteutettiin proseduuri C käyttämällä amiinia ß-5 (220 mg, 1,053 mmol), ja aikaansaatu tuote asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin yhdiste 1207-1 (383 mg, kahden vaiheen kokonaissaanto 88 %).

B. Noudatettiin esimerkin 1A mukaista menetelmää ja käytettiin p-Cbz-aminofenyylietikkahappoa (260 mg, 0,91 mmol) ja amiinia 1207-1 (375 mg, 0,86 mmol) (joka käsiteltiin Et_3N:lla), jolloin saatiin yhdiste 1207-2 (415 mg, 82 %) vaaleanruskeana kiinteänä aineena.

C. Yhdisteestä 1207-2 (390 mg, 0,66 mmol) poistettiin suojaus edellä kuvatulla menettelyllä D2, jolloin saatiin yhdiste 1207-3 (140 mg, 47 %) vaaleanruskeana kiinteänä aineena.

D. Liuokseen, joka sisälsi 2-isopropyylianiliinia (135 mg, 1,0 mmol) CH_2Cl_2:n (2 ml) ja Et_3N:n (0,5 ml) seoksessa, lisättiin lämpötilassa 0 °C hitaasti $COCl_2$-liuosta (1,9 mol/l tolueenissa, 1,6 ml, 3,0 mmol), tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti ja se laimennettiin eetterillä (15 ml). Poistamalla tällöin muodostunut kiinteä aine ja liuotteet saatiin yhdiste 1207-4 (165 mg) ruskeana nesteenä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,87 - 7,64 (m, 4 H), 3,83 - 3,74 (m, 1 H), 1,81 (d, 6 H).

E. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1207-4 (12 mg, 0,074 mmol) DMF:ssa (0,12 ml), lisättiin Et_3N:a (1 pisara) ja yhdistettä 1207-3 (28 mg, 0,062 mmol). Tulokseksi saatua seosta sekoitettiin 1 tunti [MS (FAB): 617] ja se lisättiin metanolin (2 ml) ja LiOH-liuoksen (2 mol/l, 0,25

ml) seokseen. Tätä seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tuntia ja sille tehtiin HPLC-käsittely. Puhtaat jakeet kerättiin talteen ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste BIO-1207 valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 603. HPLC (huoneenlämpötila): 31,2 min (puhtaus yli 98,5 %).

Esimerkki 49

Yhdisteen BIO-1210 valmistus

Noudatettiin esimerkissä 22D kuvattua menettelytapaa ja käytettiin 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa ja esimerkissä 44B valmistetusta TFA-amiinisuolasta saatua vapaata amiinia (65 mg). Muodostuneelle tuotteelle tehtiin HPLC-käsittely. Puhtaat jakeet kerättiin talteen ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste BIO-1210 valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 603. HPLC (huoneenlämpötila): 28,6 min (puhtaus yli 99 %).

Esimerkki 50

Yhdisteen BIO-1224 valmistus

A. Toteutettiin proseduuri C käyttämällä amiinia ß-4 (48 mg, 0,2 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1224-1 (82 mg, 91 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,49 - 7,39 (1 H), 6,73 - 6,62 (m, 3 H), 5,35 - 5,28 (m, 1 H), 5,19 - 5,06 (m, 1 H), 4,16 - 4,08 (m, 1 H), 3,74 (s, 3 H), 3,69 (s, 3 H), 2,72 - 2,51 (m, 2 H), 2,40 - 2,36 (m, 2 H), 1,98 - 1,75 (m, 2 H), 1,90 (s, 3 H), 1,28 (s, 9 H), 1,19 (s, 9 H).

B. Esteri 1224-1 (60 mg, 0,13 mmol) liuotettiin CH_2Cl_2:n (1,5 ml) ja TFA:n (1,5 ml) seokseen. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 5 tuntia ja liuotteet poistettiin, jolloin saatiin yhdiste 1224-2 TFA-suolana. Tämä yhdiste käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,92 (leveä, 1 H), 6,82 - 6,78 (m, 3 H), 5,44 - 5,26 (m, 1 H), 4,40 - 4,28 (m, 1 H), 3,84 - 3,72 (m, 6 H), 2,92 - 2,70 (m, 4 H), 2,60 - 2,25 (m, 2 H), 1,92 (s, 3 H).

C. Noudatettiin esimerkissä 22D kuvattua menetelmää ja käytettiin 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (37 mg, 0,13 mmol) ja amiinia 1224-2 (60 mg, 0,13 mmol). Muodostuneelle tuotteelle tehtiin HPLC-käsittely. Puhtaat jakeet kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdiste BIO-1224 (22 mg, 22 %) valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 623. HPLC (huoneenlämpötila): 23,8 min (puhtaus yli 99 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,38 (d, 1 H), 6,98 (d, 2 H), 6,74 (d, 2 H), 6,72 (m, 2 H), 6,51 (t, 1 H), 6,43 - 6,40 (m, 1 H), 6,35 - 6,31 (m, 1 H), 4,84 - 4,76 (m, 1 H), 4,04 - 3,97 (m, 1 H), 3,39 (s, 6 H), 3,33 (s, 2 H), 2,36 - 2,18 (m, 2 H), 1,91 - 1,75 (m, 2 H), 1,72 (s, 3 H), 1,19 - 0,99 (m, 2 H).

Esimerkki 51

Yhdisteen BIO-1056 valmistus

A. 3-metoksi-4-nitrobentsoehapon (2,01 g, 10,2 mmol) ja tionyylikloridin (2,3 ml, 31,5 mmol) seosta sekoitettiin 1,5 tuntia lämpötilassa 80 - 90 °C. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännös laimennettiin eetterillä. Orgaaninen liuos pestiin kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti), vedellä ja sitten kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 3-metoksi-4-nitrobentsoyylikloridia (1,92 g, 87 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,95 - 7,70 (m, 3 H), 4,06 (s, 3 H).

B. Kylmään (0 °C) liuokseen, joka sisälsi $TMSCHN_2$:ta (2 mol/l heksaanissa, 1,5 ml, 3,0 mmol) ja trietyyliamiinia (420 µl, 3,0 mmol), lisättiin liuos, joka sisälsi 3-metoksi-4-nitrobentsoyylikloridia (0,52 g, 2,4 mmol) asetonitriilissä (8,5 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 24 tuntia lämpötilassa 0 °C ja sitten se väkevöitiin. Jäännös lietettiin kylläiseen $NaHCO_3$:n vesiliuokseen ja seos uutettiin kolmesti eetterillä. Yhdistetyt eetteriuuttoliuokset pestiin vedellä ja sitten kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin

saatiin omega-diatso-3-metoksi-4-nitrobentsofenonia (0,53 grammaa, 100 %) keltaisena vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,88 (d, 1 H, J = 10 Hz), 7,61 (s, 1 H), 7,27 (d, 1 H, J = 10 Hz), 5,97 (s, 1 H), 4,02 (s, 3 H).

C. Liuokseen, joka sisälsi omega-diatso-3-metoksi-4-nitrobentsofenonia (7,95 g, 35,9 mmol) tBuOH:ssa (100 ml) ja jota kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa, lisättiin 1 tunnin aikana pisaroittain suodatettu liuos, joka sisälsi hopeabentsoaattia (2,50 g, 10,9 mmol) trietyyliamiinissa (15 ml). 45 minuutin palautusjäähdytyksen jälkeen lisättiin värinpoistohiiltä ja kuuma seos suodatettiin piimaakerroksen läpi. Suodos väkevöitiin ja jäännös laimennettiin etyyliasetaatilla. Orgaaninen liuos pestiin 5-prosenttisella $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti), vedellä, 5-prosenttisella sitruunahapon vesiliuoksella, vedellä ja sitten kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin t-butyyli-3-metoksi-4-nitrofenyyliasetaattia (8,92 g, 93 %) ruskeana öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,83 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,03 (s, 1 H), 6,93 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 3,97 (s, 3 H), 3,58 (s, 2 H), 1,45 (s, 9 H).

D. Seosta, joka sisälsi t-butyyli-3-metoksi-4-nitrofenyyliasetaattia (0,144 g, 0,539 mmol) ja katalyyttiä (0,155 g), joka sisälsi 10 % Pd:a hiilikantajalla, etyyliasetaatin (8 ml) ja metanolin (2 ml) seoksessa, sekoitettiin H_2-kaasun alla [280 - 410 kPa (40 - 60 psi)] 2 tuntia. Seos suodatettiin piimaan läpi ja suodos väkevöitiin, jolloin saatiin t-butyyli-4-amino-3-metoksifenyyliasetaattia (0,123 g, 96 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,70 (m, 3 H), 4,04 (leveä s, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 3,42 (s, 2 H), 1,43 (s, 9 H).

E. Liuokseen, joka sisälsi t-butyyli-4-amino-3-metoksifenyyliasetaattia (0,123 g, 0,52 mmol) dikloorimetaanissa (2,0 ml), lisättiin fenyyli-isosyanaattia (60 µl, 0,55 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 45 min ja sitten se

haihdutettiin, jolloin saatiin t-butyyli-3-metoksi-4-metoksifenyyliureidofenyyliasetaattia (0,190 g, 100 %) vaaleankeltaisena vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,00 (d, 1 H, J = 11 Hz), 7,65 - 6,94 (m, 7 H), 6,80 (d, 1 H, J = 9,0 Hz), 6,74 (s, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,45 (s, 2 H), 1,44 (s, 9 H).

F. Liuosta, joka sisälsi t-butyyli-3-metoksi-4-metoksifenyyliureidofenyyliasetaattia (0,108 g, 0,303 mmol) trifluorietikkahapossa (5,0 ml), sekoitettiin 30 min. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännökselle tehtiin yhteishaihdutus dikloorimetaanin (kahdesti) ja sitten eetterin kanssa, jolloin saatiin 3-metoksi-4-metoksifenyyliureidofenyylietikkahappoa (0,090 g, 99 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 9,28 (s, 1 H), 8,18 (s, 1 H), 8,02 (d, 1 H, J = 7,5 Hz), 7,58 - 7,15 (m, 5 H), 6,91 (leveä m, 2 H), 6,77 (d, 1 H, J = 7,5 Hz), 3,85 (s, 3 H), 3,49 (s, 2 H).

G. Liuosta, joka sisälsi 3-metoksi-4-metoksifenyyliureidofenyylietikkahappoa (0,33 g, 0,88 mmol), Leu-ß-2:ta (valmistettiin käyttämällä menettelytapoja C ja D; 0,27 g, 0,90 mmol), BOP:tä (0,39 g, 0,90 mmol) ja DIPEA:a (0,77 ml, 4,4 mmol) DMF:ssa (5 ml), sekoitettiin 18 tuntia. Reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kolmesti), vedellä, 5-prosenttisella sitruunahapon vesiliuoksella (kolmesti), vedellä ja sitten kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja väkevöitiin, jolloin saatiin raakatuote (0,49 g). Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti (silikageeli, heksaani-etyyliasetaattiseos, 1:4), jolloin saatiin BIO-1056:n t-butyyliesteri (0,35 g, 60 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,00 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 7,55 - 7,20 (m, 8 H), 7,05 (m, 1 H), 6,70 (m, 5 H), 5,89 (s, 2 H), 5,18 (m, 1 H), 4,50 (s, 1 H), 3,63 (s, 3 H), 3,47

(s, 2 H), 2,67 (m, 2 H), 1,68 - 1,40 (leveä m, 3 H), 1,33 (s, 9 H).

H. Kylmään (0 °C) liuokseen, joka sisälsi BIO-1056:n t-butyyliesteriä (0,35 g, 0,53 mmol) dikloorimetaanissa (5,0 ml), lisättiin trifluorietikkahappoa. Reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan, sitä sekoitettiin 1 tunti ja sitten se väkevöitiin, jolloin saatiin raakatuote BIO-1056 (0,315 g). Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla kahdessa erässä, jolloin saatiin yhdiste BIO-1056 (0,16 g, 50 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 9,25 (s, 1 H), 8,43 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 8,15 (m, 2 H), 8,01 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 7,50 - 6,55 (m, 10 H), 5,97 (s, 2 H), 5,08 (m, 1 H), 4,31 (m, 1 H), 3,85 (s, 3 H), 3,41 (m, 2 H), 2,64 (m, 2 H), 1,55 - 1,22 (leveä m, 3 H), 0,80 (m, 6 H). HPLC: 35,2 min (gradientti A), 19,4 (gradientti B). MS: m/z = 605.

Esimerkki 52

Yhdisteen BIO-1221 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi t-butyyli-4-amino-3-metoksifenyyliasetaattia (0,024 g, 0,10 mmol) dikloorimetaanissa (2,0 ml), lisättiin o-tolyyli-isosyanaattia (15 µl, 0,12 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 2 h ja sitten se haihdutettiin, jolloin saatiin t-butyyli-3-metoksi-4-o-tolyyliureidofenyyliasetaattia (0,036 g, 97 %) kellanruskeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,05 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,55 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,45 - 7,05 (m, 5 H), 6,78 (m, 2 H), 3,73 (s, 3 H), 3,48 (s, 2 H), 2,23 (s, 3 H), 1,44 (s, 9 H).

B. Liuosta, joka sisälsi t-butyyli-3-metoksi-4-o-tolyyliureidofenyyliasetaattia (0,016 g, 0,0,43 mmol) trifluorietikkahapossa (1,0 ml), sekoitettiin 1 tunti. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännökselle tehtiin yhteishaihdutus dikloorimetaanin (kahdesti) ja sitten eetterin kanssa,

jolloin saatiin 3-metoksi-4-o-tolyyliureidofenyylietikkahappoa (0,0135 g, 100 %) valkeana jäännöksenä.

C. Toteutettiin esimerkissä 51G kuvattu proseduuri käyttämällä 3-metoksi-4-o-tolyyliureidofenyylietikkahappoa (0,0135 g, 0,043 mmol) ja amiinista ß-3 menettelytapoja C ja D käyttäen valmistettua amiinisuolaa (0,0185 g, 0,041 mmol), jolloin saatiin BIO-1221:n metyyliesteri (0,016 g, 60 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,10 (d, 1 H), 7,61 (d, 1 H), 7,45 - 7,00 (m, 7 H), 6,85 - 6,65 (m, 5 H), 5,93 (s, 2 H), 5,20 (m, 1 H), 4,37 (m, 1 H), 3,85 (s, 3 H), 3,61 (s, 3 H), 3,52 (s, 2 H), 2,75 (m, 2 H), 2,30 (s, 3 H), 1,65 - 1,10 (leveä m, 3 H), 0,86 (m, 6 H).

D. BIO-1221:n metyyliesteri (0,016 g, 0,025 mmol) hydrolysoitiin käyttämällä esimerkissä 1B kuvattua menetelmää, jolloin saatiin yhdiste BIO-1221 (0,0087 g, 56 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): ,93 (d, 1 H), 7,70 (d, 1 H), 7,49 (d, 1 H), 7,37 - 6,92 (m, 6 H), 6,78 - 6,55 (m, 5 H), 5,81 (s, 2 H), 5,09 (m, 1 H), 4,27 (m, 1 H), 3,73 (s, 3 H), 3,40 (s, 2 H), 2,58 (m, 2 H), 2,19 (s, 3 H), 1,48 - 1,25 (leveä m, 3 H), 0,76 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 35,2 min. MS: m/z = 619.

Esimerkki 53

Yhdisteen BIO-1238 valmistus

A. Toteutettiin esimerkissä 43A kuvattu proseduuri käyttämällä amiinia ß-5, jolloin saatiin yhdiste 1238-1. Saanto: 92 %. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,19 (d, 2 H, J = 8,6 Hz), 6,82 (d, 2 H, J = 8,6 Hz), 5,36 - 5,28 (m, 2 H), 4,25 - 4,22 (m, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 3,56 (s, 3 H), 2,72 - 2,66 (m, 2 H), 2,49 - 2,41 (m, 2 H), 2,1 (s, 3 H), 1,92 - 1,78 (m, 1 H), 1,48 (s, 9 H). Boc-ryhmä poistettiin TFA:lla CH_2Cl_2:ssa, jolloin saatiin TFA-suola 1238-1. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,12 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 6,74 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 5,32 (m, 1 H), 4,38 (m, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,51 (s, 3 H), 2,77 - 2,69

(m, 2 H), 2,55 - 2,38 (m, 1 H), 2,36 - 2,31 (m, 1 H), 2,16 - 2,02 (m, 2 H), 1,91 (s, 3 H).

B. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (20 mg, 0,7 mmol) ja TFA-suolaa 1238-1 (30 mg, 0,7 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1238-2 (35 mg, 83 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 7,91 (d, 1 H), 7,52 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 7,35 - 7,30 (m, 4 H), 7,02 (d, 1 H), 6,80 (d, 2 H, J = 8,5 Hz), 5,79 - 5,68 (m, 1 H), 4,40 - 4,28 (m, 1 H), 3,71 (s, 3 H), 3,63 (s, 3 H), 3,35 - 3,38 (m, 2 H), 2,49 (leveä s, 2 H), 2,00 (s, 3 H).

C. Liuosta, joka sisälsi yhdistettä 1238-2 (20 mg, 0,033 mmol) MeOH:ssa (3 ml), ja LiOH:n vesiliuosta (2 ekv/litra, 3 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan 0 °C ja tehtiin happamaksi lisäämällä siihen TFA:a, kunnes saavutettiin pH-arvo 3 - 4 (pH-paperi). Haluttu tuote eristettiin ja puhdistettiin LC:n avulla (Vydac C18 -pylväs, gradientti 8), jolloin saatiin yhdiste BIO-1238 (12 mg, 0,017 mmol, 61 %) valkeana kiinteänä aineena. MS (FAB): 595.

Esimerkki 54

Yhdisteen BIO-1245 valmistus

A. Yhdiste 1245-1 valmistettiin kaupan olevasta N-Boc-metioniinisulfonista (562 mg, 2,0 mmol) ja amiinista ß-3 (470 mg, 2,10 mmol) käyttämällä esimerkissä 1A kuvattua menetelmää, jolloin saatiin raakatuote 1245-1 (962 mg, 1,90 mmol, 95 %) valkeana vaahtona, joka käytettiin puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 7,31 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 6,77 - 6,7 (m, 3 H), 5,91 (s, 2 H), 5,04 (d, 1 H, J = 7,6 Hz), 5,27 (m, 1 H), 4,30 (leveä, 1 H), 3,61 (s, 3 H), 3,15 (m, 1 H), 2,93 (m, 1 H), 2,89 (s, 3 H), 2,85 (m, 2 H), 2,22 (m, 2 H), 1,42 (s, 9 H).

B. Yhdiste 1245-1 (962 mg, 1,90 mmol) käsiteltiin käyttämällä reagenssina dioksaaniin tehtyä HCl-liuosta (4 ekv/l). Haihdutus tuotti tulokseksi hydrokloridisuolan

1245-2 valkeana kiinteänä aineena (800 mg, 1,89 mmol, 99 %), joka käytettiin puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 8,75 (leveä, 1 H), 8,20 (leveä, 2 H), 6,91 - 6,55 (m, 3 H), 5,90 (leveä s, 2 H), 5,42 (leveä, 1 H), 4,55 (leveä, 1 H), 3,60 (s, 3 H), 3,45 - 3,0 (levä m, 2 H), 2,90 (s, 3 H), 2,85 - 2,40 (leveä m, 4 H).

C. Toteutettiin esimerkissä 22D kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä 1245-2 (800 mg, 1,89 mmol) ja o-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa (543 mg, 1,89 mmol), jolloin saatiin raakatuote 1245-3 (1,15 g, 1,76 mmol, 93 %) valkeana kiinteänä aineena, joka käytettiin puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 7,95 (s, 1 H), 7,89 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,43 (d, 2 H, J = 7,9 Hz), 7,20 (m, 4 H), 7,00 - 6,78 (m, 4 H), 6,03 (s, 2 H), 5,18 (m, 1 H), 4,40 (m, 1 H), 3,58 (s, 3 H), 3,49 (s, 3 H), 3,39 (leveä, 2 H), 2,90 - 2,49 (m, 2 H), 2,29 (s, 3 H), 2,00 (m, 2 H).

D. Yhdiste 1245-3 (1,1 g, 1,7 mmol) hydrolysoitiin esimerkissä 1B kuvatulla tavalla, jolloin saatiin raakatuote BIO-1245 (490 mg, 0,77 mmol, 45 %) valkeana kiinteänä aineena (puhtaus yli 90 % HPLC:n perusteella). Pieni määrä sitä (n. 150 mg) puhdistetettiin preparatiivista HPLC:tä käyttämällä, jolloin saatiin puhdas yhdiste BIO-1245 (81 mg, talteensaanti 54 %) valkeana kiinteänä aineena (m/z = 639, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 8,60 (leveä s, 0,5 H), 8,57 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 8,37 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 8,18 (s, 1 H), 8,05 (s, 0,5 H), 7,89 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,43 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,21 (m, 4 H), 6,97 - 6,81 (m, 4 H), 6,03 (s, 2 H), 5,13 (m, 1 H), 4,43 (m, 1 H), 3,80 (leveä, 1 H), 3,49 (s, 3 H), 2,93 (m, 2 H), 2,45 (m, 2 H), 2,30 (s, 3 H), 2,01 (m, 2 H).

Esimerkki 55

Yhdisteen BIO-1246 valmistus

A. Suspensioon, joka sisälsi L-kysteiiniä (1,5 g, 12,4 mmol) metanolissa (8 ml), lisättiin ylimäärin nat-

riummetoksidia (2,0 g, 37,2 mmol) ja sen jälkeeen katalyyttinen määrä natriumjodidia (n. 100 mg). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli sekoitettu huoneenlämpötilassa 30 min, siihen lisättiin 1-bromi-2-propanolia (1,7 g, 12,4 mmol) ja seosta sekoitettiin yön yli. Sen jälkeen reaktioseos neutraloitiin noin pH-arvoon 7, laimennettiin vedellä (20 ml) ja väkevöitiin metanolin poistamiseksi. Liuos laimennettiin sitten dioksaanilla (20 ml), siihen lisättiin trietyyliamiinia (7,0 ml, 50 mmol) ja sen jälkeen BOCON:ää (3,1 g, 12,4 mmol) ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3 tuntia. Reaktioseos loppukäsiteltiin laimentamalla se vedellä (20 ml) ja uuttamalla etyyliasetaatilla (3 x 25 ml). Orgaaniset uuttoliuokset heitettiin pois ja vesiliuoksen pH säädettiin HCl-liuoksella (1 ekv/litra) arvoon 1. Vesifaasi uutettiin etyyliasetaatilla (4 x 30 ml) ja etyyliasetaattifaasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdiste 1246-1 (2,87 g, 10,4 mmol, 83 %, 2 vaihetta) paksuna vaaleankeltaisena siirappina. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 5,60 - 5,50 (leveä, 1 H), 4,60 - 4,50 (leveä, 1 H), 4,44 (t, 2 H, J = 6,3 Hz), 3,02 (leveä m, 2 H), 2,65 (leveä, 2 H), 2,03 (m, 2 H), 1,45 (s, 9 H).

B. Toteutettiin esimerkin 1A mukainen proseduuri käyttämällä yhdistettä 1246-1 (33 mg, 0,11 mmol) ja amiinia ß-3 (22 mg, 0,10 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1246-2 (39 mg, 0,08 mmol, 80 %) vaaleankeltaisena vaahtona, joka käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamatta sitä tarkemmin. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$): δ = 6,80 - 6,60 (m, 3 H), 5,91 (s, 2 H), 5,50 (leveä m, 1 H), 4,35 (leveä m, 1 H), 3,71 (leveä t, 2 H), 3,61 (s, 3 H), 3,15 - 2,65 (m, 6 H), 1,85 (m, 2 H), 1,46 (s, 9 H).

C. Yhdiste 1246-2 (39 mg, 0,08 mmol) käsiteltiin TFA:lla, jolloin saatiin vastaava amiinin 1246-2 TFA-suola, joka asetettiin alttiiksi esimerkissä 54C kuvatuille olosuhteille, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta,

joka hydrolysoitiin suoraan esimerkissä 1B kuvatulla tavalla vapaaksi hapoksi. Pieni erä happoa puhdistettiin HPLC:n avulla. Puhtaat jakeet kerättiin talteen, jolloin saatiin yhdiste BIO-1246 (n. 3 mg, m/z = 637, puhtaus 100 % HPLC:n perusteella) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6): δ = 9,01 (s, 1 H), 8,66 (d, 1 H, J = 5,3 Hz), 8,30 (d, 1 H, J = 5,5 Hz), 7,94 (s, 1 H), 7,88 (d, 1 H, J = 5,3 Hz), 7,42 (d, 2 H, J = 5,5 Hz), 7,20 - 7,15 (m, 4 H), 7,00 - 6,94 (m, 2 H), 6,88 - 6,79 (m, 2 H), 6,02 (s, 2 H), 5,12 (m, 1 H), 4,48 (m, 1 H), 3,65 (m, 2 H), 2,90 - 2,45 (m, 6 H), 2,28 (s, 3 H), 1,65 (m, 2 H).

Esimerkki 56

Yhdisteen BIO-1248 valmistus

A. Seosta, joka sisälsi 4-fluoribentsaldehydiä (2,48 g, 20 mmol), malonihappoa (2,5 g, 24 mmol) ja ammoniumasetaattia (2,16 g, 28 mmol) etanolissa (100 ml), kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa argonin alla yön yli. Huoneenlämpötilaan jäähdytyksen jälkeen kiinteä sakka kerättiin suodattamalla, pestiin etanolilla (3 x 30 ml) ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta (1,0 g, 27 %), joka käytettiin tarkemmin puhdistamattomana.

Suspensioon, joka sisälsi saatua valkeaa kiinteää ainetta (1,0 g, 9,4 mmol) metanolissa, lisättiin $SOCl_2$:a (2 mol/l CH_2Cl_2::ssa, 5,2 ml, 6,01 mmol). Muodostunutta liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Ylimääräisen liuotteen poiston jälkeen jäännös liuotettiin EtOAc:iin, tehtiin emäksiseksi kylläisellä $NaHCO_3$-liuoksella ja kuivattiin (Na_2SO_4). Orgaaninen liuos väkevöitiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin amiini 1248-1 (900 mg, 84 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,28 (m, 2 H, Ar), 6,96 (m, 2 H, Ar), 4,46 (t, 1 H, J = 6,8 Hz), 3,62 (s, 3 H, OMe), 2,58 (d, 2 H,

J = 6,8 Hz), 1,69 (s, 2 H, NH). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,5.

B. Amiini 1248-1 (300 mg, 1,52 mmol) kytkettiin Nα-t-Boc-Nε-Leu-N-hydroksisuksiini-imidiin (300 mg, 1,52 mmol) käyttämällä edellä kuvattua menettelytapaa C. Muodostuneesta additiotuotteesta poistettiin suojaus trifluorietikkahapolla ja sitten se tehtiin emäksiseksi Et_3N:llä edellä kuvatulla menettelyllä D1, jolloin saatiin amiini 1248-2 (saanto 84 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,20 (d, 1 H, J = 7,1 Hz), 7,24 (m, 2 H, Ar), 6,97 (m, 2 H, Ar), 5,33 (m, 1 H), 3,58 (s, 3 H, OMe), 3,38 (m, 1 H), 2,82 (m, 2 H), 1,66 (m, 2 H), 1,30 (m, 1 H), 1,22 (s, 2 H), 0,91 (m, 6 H). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,47 ja 0,38.

C. 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappo (77 mg, 0,27 mmol) kytkettiin amiiniin 1248-2 (70 mg, 0,23 mmol) käyttämällä esimerkissä 22D kuvattua menetelmää, jolloin saatiin yhdiste 1248-3 (saanto 61 %). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 9,15 (d, 1 H, J = 5,9 Hz), 8,53 (t, 1 H, J = 7,5 Hz), 8,17 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 8,0 (s, 1 H), 7,84 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,35 (m, 4 H), 7,13 (m, 6 H), 6,92 (t, 1 H, J = 8,2 Hz), 5,20 (m, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 3,52 (s, 2 piikkiä, 3 H, OMe), 3,45 - 3,24 (m, 2 H), 2,75 (m, 2 H), 2,24 (s, 3 H, Me), 1,57 - 1,33 (m, 3 H), 0,82 (m, 6 H). HPLC (gradientti 1**): 21,2 min ja 21,5 min (1:24). MS (FAB): m/z = 577 [(M^++1):n $C_{33}H_{37}N_4O_5F$ edellyttää arvoa 577].

D. Yhdiste 1248-3 (22 mg, 0,038 mmol), joka oli liuotettuna DMSO:n (1 ml) ja MeOH:n (2 ml) seokseen, hydrolysoitiin LiOH:n vesiliuoksella esimerkissä 1B kuvatulla tavalla. Tuote puhdistettiin Vydac C18 -käänteisfaasipylväässä (22 mm x 25 cm) käyttämällä lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (15:85 → 40:60), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a, ja virtausnopeutta 10 ml/min, jolloin saatiin yhdiste BIO-1248 (saanto eristettynä 29 %). ^{1}H-NMR-spektri

(DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 8,93 (s, 1 H), 8,46 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 8,25 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 7,87 (s, 1 H), 7,82 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,33 (m, 5 H), 7,12 (m, 5 H), 6,93 (m, 1 H), 5,15 (m, 1 H), 4,28 (m, 1 H), 3,35 (m, 2 H), 2,65 (d, 2 H, J = 7,2 Hz), 2,22 (s, 3 H, Me), 1,55 (m, 1 H), 1,43 (m, 2 H), 0,83 (m, 6 H). HPLC (gradientti 1): 18,7 min ja 19,3 min (1:24). MS (FAB): m/z = 563 [(M^++1):n $C_{31}H_{35}N_4O_5F$ edellyttää arvoa 563].

Esimerkki 57

Yhdisteen BIO-1270 valmistus

A. Amiini ß-3 (500 mg, 2,24 mmol) kytkettiin Nα-Cbz-Nε-t-Boc-L-Lys-N-hydroksisuksiini-imidiin (1,0 g, 2,1 mmol) käyttämällä menettelytapaa C, jolloin saatiin kytketty additiotuote 1270-1 (1,1 g, 82 %). Additiotuotteesta poistettiin suojaus trifluorietikkahapolla ja se tehtiin emäksiseksi Et_3N:llä kuten edellä kuvatussa menettelyssä D, jolloin saatiin yhdiste 1270-2 (saanto 54 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 7,31 (m, 6 H), 6,72 (m, 3 H), 5,90 (s, 2 H), 5,58 (d, 1 H, J = 9 Hz), 5,26 (m, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 4,15 (m, 1 H), 3,58 (s, 3 H, OMe), 2,77 (m, 2 H), 2,61 (m, 2 H), 1,79 (m, 1 H), 1,59 (m, 1 H), 1,41 - 1,30 (m, 6 H). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,11.

B. Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 1270-2 (15,5 mg, 0,032 mmol) ja pyridiiniä (10,1 mg, 0,128 mmol) CH_2Cl_2:ssa ja jota sekoitettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin asetyylikloridia (7,5 mg, 0,096 mmol). 3 tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseos väkevöitiin ja käänteisfaasikromatografiakäsittely tuotti tulokseksi yhdistettä 1270-3 (16,3 mg, 95 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,32 (s, 5 H), 6,70 (m, 3 H), 5,91 (s, 2 H), 5,82 (m, 1 H), 5,55 (m, 1 H), 5,25 (m, 1 H), 5,09 (s, 1 H), 4,13 (m, 1 H), 3,60 (s, 3 H), 3,28 (m, 2 H), 2,9 - 2,4 (m, 3 H), 1,94 (s, 3 H), 1,9 - 1,76 (m, 1 H), 1,70 - 1,58 (m, 1 H), 1,52 - 1,42 (m, 2 H), 1,36 - 1,22 (m, 2 H).

C. Toteutettiin proseduuri D2 käyttämällä yhdistettä 1270-3 (reaktion etenemistä seurattiin HPLC:n avulla), jolloin saatiin yhdiste 1270-4 (14,1 mg, saanto kvantitatiivinen) kirkkaana öljynä, joka käytettiin puhdistamattomana.

D. Toteutettiin esimerkin 54C mukainen proseduuri käyttämällä yhdistettä 1270-4 (14,1 mg, 0,036 mmol). Puhdistus tehtiin preparatiivista HPLC:ää käyttämällä ja saatiin yhdiste BIO-1270-Ome (9,1 mg, 38 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,13 (d, 1 H, J = 10,35 Hz), 8,03 (s, 1 H), 7,93 (d, 1 H, J = 10,35 Hz), 7,83 (m, 1 H), 7,49 (d, 2 H, J = 10,35 Hz), 7,28 (m, 5 H), 7,10 - 6,81 (m, 5 H), 6,08 (s, 2 H), 5,20 (dd, 1 H, J = 9,66 ja 17,25 Hz), 4,33 (dd, 1 H, J = 8,97 ja 15,18 Hz), 3,63 (s, 3 H), 3,5 (s, 2 H), 3,1 - 2,95 (m, 2 H), 2,85 - 2,74 (m, 2 H), 2,33 (s, 3 H), 1,86 (s, 3 H), 1,72 - 1,49 (m, 2 H), 1,5 - 1,32 (m, 3 H), 1,31 - 1,09 (m, 2 H).

E. Yhdisteeseen NIO1270-OMe (9,1 mg, 0,016 mmol), joka oli DMSO-d_6:ssa (1 ml) (NMR-näyte), lisättiin LiOH-liuosta (2 ekv/l, 20 μl) ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseos tehtiin happamaksi (lakmusindikaattori punainen) TFA:lla (3 pisaraa) ja puhdistettiin preparatiivista HPLC:ää käyttämällä. Siten saatiin yhdiste BIO-1270 (6,2 mg, 60 %) valkeana kiinteänä aineena.

^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,5 (d, 12 H, J = 10,35 Hz), 8,19 (d, 1 H, J = 10,35 Hz), 7,99 (s, 1 H), 7,93 (d, 1 H, J = 10,35 Hz), 7,82 (m, 1 H), 7,45 (d, 2 H, J = 10,35 Hz), 7,28 (m, 45 H), 7,05 (m, 1 H), 6,98 - 6,89 (m, 2 H), 6,86 (m, 1 H), 6,09 (s, 2 H), 5,66 (dd, 1 H, J = 8,28 ja 16,56 Hz), 4,32 (dd, 1 H, J = 7,59 ja 13,8 Hz), 3,27 (s, 2 H), 2,98 (m, 2 H), 2,75 (m, 2 H), 2,33 (s, 3 H), 1,87 (s, 3 H), 1,69 - 1,48 (m, 2 H), 1,46 - 1,32 (m, 3 H), 1,28 - 1,12 (m, 2 H).

MS: m/z = 646.

HPLC (gradientti 1): 19,73 min (100 %)

Gradientti 3: 15 % B → 65 % B, 50 min

Gradientti 1: 20 % B → 70 % B, 50 min

Esimerkki 58

Yhdisteen BIO-1282 valmistus

A. Liuosta, joka sisälsi etyyli-3-pyridyyliasetaattia (1,65 g, 9,90 mmol) 32-prosenttisessa peretikkahapossa (10 ml), sekoitettiin 2 h lämpötilassa 80 - 90 °C. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännökselle tehtiin yhteishaihdutus metanolin (kahdesti) ja sitten dikloorimetaanin kanssa, jolloin saatiin etyyli-3-pyridyyliasetaatti-N-oksidia (1,80 g, 100 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,38 (s, 1 H), 8,22 (d, 1 H), 7,39 (d, 1 H), 4,20 (q, 2 H), 3,62 (s, 2 H), 1,26 (t, 3 H).

B. Liuosta, joka sisälsi salisyyliamidia (4,14 g, 30,2 mmol) ja väkevää rikkihappoa (3 pisaraa) asetonissa (40 ml), kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa 5 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin. Orgaaninen liuos pestiin NaOH-liuoksella (1 ekv/l, kahdesti), HCl-liuoksella (1 ekv/l, kahdesti), vedellä ja sitten kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 2,2-dimetyyli-4-keto-1,3-bentsoksatsiinia (2,50 g, 47 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,92 (d, 1 H), 7,60 (leveä s, 1 H), 7,47 (m, 1 H), 7,06 (m, 1 H), 6,92 (d, 1 H), 1,65 (s, 6 H).

C. Liuosta, joka sisälsi 2,2-dimetyyli-4-keto-1,3-bentsoksatsiinia (1,77 g, 10,0 mmol) ja PCl_5:a (2,09 g, 10,0 mmol) $POCl_3$:ssa (3,0 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti ja sen jälkeen lämpötilassa 50 - 60 °C 2 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja tuote tislattiin [90 - 95 °C, 270 - 400 Pa (2 - 3 mmHg)], jolloin saatiin 4-kloori-2,2-dimetyyli-3H-1,3-bentsoksatsiinia (0,496 g, 25 %) kirkkaana öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm):

7,58 (d, 1 H), 7,48 (m, 1 H), 6,97 (m, 1 H), 6,94 (d, 1 H), 1,63 (s, 6 H).

D. Seosta, joka sisälsi 4-kloori-2,2-dimetyyli-3H-1,3-bentsoksatsiinia (1,45 g, 0,741 mmol) ja etyyli-3-pyridyyliasetaatti-N-oksidia (0,270 g, 1,49 mmol) dikloorimetaanissa (5,0 ml), kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa 20 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännös sekoitettiin etyyliasetaattiin. Orgaaninen seos pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti), vedellä ja kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin jäi öljymäinen jäännös (0,148 g).

Puhdistamatonta öljymäistä jäännöstä (0,148 g) kuumennettiin väkevässä HCl:ssa (10 ml) palautusjäähdytysolosuhteissa 18 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännökselle tehtiin partitio veden ja dikloorimetaanin kesken. Vesiliuos pestiin kahdesti dikloorimetaanilla ja haihdutettiin sen jälkeen, jolloin saatiin valkeaa kiinteää ainetta (0,105 g).

Liuokseen, joka sisälsi saatua valkeaa kiinteää ainetta (0,105 g) metanolissa (5,0 ml), lisättiin 30 minuutin aikana pisaroittain tionyylikloridia (0,5 ml, 7 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia ja sitten se väkevöitiin. Jäännös sekoitettiin 5-prosenttiseen NH_4OH:n vesiliuokseen ja uutettiin kolmesti dikloorimetaanilla. Orgaaniset uuttoliuokset kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin metyyli-5-(2-aminopyridyyli)asetaattia (0,012 g, kolmen vaiheen kokonaissaanto 10 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,93 (s, 1 H), 7,40 (d, 1 H), 6,50 (d, 1 H), 4,52 (leveä s, 2 H), 3,70 (s, 3 H), 3,49 (s, 2 H). MS: m/z = 167.

E. Liuokseen, joka sisälsi metyyli-5-(2-aminopyridyyli)asetaattia (0,012 g, 0,072 mmol) dikloorimetaanissa (1,0 ml), lisättiin o-tolyyli-isosyanaattia (10 µl, 0,081 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 1 tunti ja sitten se

väkevöitiin, jolloin jäi valkea jäännös (0,020 g), joka sisälsi metyyli-5-(2-o-tolyyliureido)pyridyyliasetaattia.

F. Liuokseen, joka sisälsi puhdistamatonta metyyli-5-(2-o-tolyyliureido)pyridyyliasetaattia (0,020 g) metanolissa (1,0 ml), lisättiin LiOH-liuosta (2 mol/l, 100 µl, 0,20 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 18 tuntia ja sitten se väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin 5-(2-o-tolyyliureido)pyridyylietikkahappoa (0,013 g, 65 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,10 (s, 1 H), 7,87 (leveä d, 1 H), 7,75 (leveä d, 1 H), 7,21 (m, 1 H), 7,08 (m, 1 H), 3,62 (s, 2 H), 2,38 (s, 3 H). MS: m/z = 286.

G. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 5-(2-o-tolyyliureido)pyridyylietikkahappoa (0,013 g, 0,045 mmol) ja esimerkissä 14A valmistettua amiinia (0,022 g, 0,049 mmol), jolloin saatiin BIO-1282:n metyyliesteri (0,020 g, 60 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,18 - 7,73 (m, 4 H), 7,55 (d, 1 H), 7,35 - 6,65 (m, 10 H), 5,93 (s, 1 H), 5,28 (m, 1 H), 4,45 (m, 1 H), 3,69 - 3,45 (m, 5 H), 2,81 (leveä m, 1 H), 2,20 (s, 3 H), 1,54 (leveä m, 3 H), 0,92 (m, 6 H).

H. Seokseen, joka sisälsi BIO-1282:n metyyliesteriä (0,020 g, 0,033 mmol) metanolissa (2,0 ml), lisättiin LiOH-liuosta (2,0 mol/l, 200 µl, 0,40 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 20 tuntia ja sitten se väkevöitiin. Jäännös (joka sisälsi yhdisteen BIO-1282 ja lähtöesterin seoksen suhteessa 4:5) liuotettiin DMF:n (0,5 ml) ja metanolin (0,5 ml) seokseen ja liuosta sekoitettiin sitten vielä 28 tuntia. Reaktioseos tehtiin happamaksi trifluorietikkahapolla ja väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1282 (0,0056 g, 24 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,44 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 8,26 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 8,15 (s, 1 H), 8,04 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,66 (d, 1 H, J = 8,7 Hz), 7,32 - 7,13 (m, 3 H), 7,05 - 6,94 (m, 1 H), 6,85 -

6,65 (m, 3 H), 5,96 (s, 2 H), 5,06 (m, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 3,45 (m, 2 H), 2,63 (m, 2 H), 2,31 (s, 3 H), 1,57 - 1,20 (m, 3 H), 0,78 (m, 6 H). HPLC (gradientti A): 27,0 min. MS: m/z = 590.

Esimerkki 59

Yhdisteen BIO-1294 valmistus

A. Liukseen, joka sisälsi esimerkissä 57A valmistettua amiinia (102 mg, 0,21 mmol) CH_2Cl_2:ssa (20 ml) ja jota sekoitettiin, lisättiin CH_3SO_2Cl:a (48 mg, 32 µl, 0,42 mmol) ja Et_3N:a (50 µl). Muodostunutta reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 h. Reaktioseos laimennettiin CH_2Cl_2:lla (40 ml), pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (20 ml), vedellä (10 ml), kylläisellä $NaHCO_3$-liuoksella (20 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (20 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Orgaaninen liuos haihdutettiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin yhdiste 1294-1 (110 mg, 92 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 7,30 (m, 6 H), 6,74 (m, 3 H), 5,90 (s, 2 H), 5,70 (m, 1 H), 5,25 (m, 1 H), 5,07 (s, 3 H), 4,16 (m, 1 H), 3,58 (s, 3 H, OMe), 3,02 (m, 2 H), 2,88 (s, 3 H), 2,75 (m, 2 H), 1,76 (m, 1 H), 1,60 (m, 1 H), 1,50 (m, 2 H), 1,32 (m, 2 H). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,67.

B. Liukseen, joka sisälsi yhdistettä 1294-1 (110 mg, 0,195 mmol) liuotettuna metanoliin (10 ml), lisättiin etikkahappoa (0,2 ml) ja $Pd(OH)_2$:a (110 mg). Tulokseksi saatua seosta hydrattiin [H_2, 340 kPa (50 psi)] huoneenlämpötilassa 48 tuntia. Tavanomaisen loppukäsittelyn jälkeen saatiin yhdiste 1294-2 (35 mg, 42 %) värittömänä öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 8,06 (m, 1 H), 6,75 (m, 3 H), 5,92 (s, 2 H), 5,25 (m, 1 H), 5,02 (m, 1 H), 3,61 (s, 3 H), 3,35 (m, 1 H), 3,10 (m, 2 H), 2,94 (s, 3 H), 2,80 (m, 2 H), 1,87 - 1,30 (m, 8 H). HPLC (gradientti 8): 12 min.

C. 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappo (35 mg, 0,12 mmol) kytkettiin amiiniin 1294-2 (35 mg, 0,08 mmol) esimerkissä 1A kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste 1294-3 (saanto 88 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 8,50 (m, 1 H), 8,30 (s, 1 H), 8,16 (m, 1 H), 7,82 (m, 1 H), 7,40 (m, 2 H), 7,22 - 7,05 (m, 5 H), 7,00 - 6,70 (m, 5 H), 5,98 (s, 2 H), 5,11 (m, 1 H), 4,22 (m, 1 H), 3,52 (s, 3 H), 3,36 (m, 2 H), 2,91 - 2,62 (m, 7 H), 2,25 (s, 3 H), 1,60 - 1,05 (m, 6 H). HPLC (gradientti 8): 31 min. MS (FAB): 696 [(M^++1):n $C_{34}H_{41}N_5O_9S$ edellyttää arvoa 696].

D. Yhdiste 1294-3 (50 mg, 0,07 mmol), joka oli liuotettuna MeOH:iin (3 ml), hydrolysoitiin LiOH:n vesiliuoksella edellä kuvatulla tavalla. Tuote puhdistettiin Vydac C18 -käänteisfaasipylväässä (22 mm x 25 cm) käyttämällä lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (15:85 → 40:60), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a, ja virtausnopeutta 10 ml/min, jolloin saatiin yhdiste BIO-1294 (saanto eristettynä 41 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 8,95 (m, 1 H), 8,42 (d, 1 H, J = 8,2 Hz), 8,08 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 7,88 (s, 1 H), 7,83 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,36 (d, 2 H, J = 8,2 Hz), 7,15 (m, 4 H), 7,10 - 6,71 (m, 5 H), 5,97 (s, 2 H), 5,04 (m, 1 H), 4,22 (m, 1 H), 3,41 - 3,25 (m, 2 H), 2,83 - 2,80 (m, 6 H), 2,23 (s, 3 H), 1,70 - 1,04 (m, 6 H). HPLC (gradientti 8): 27 min. MS (FAB): m/z = 682 [(M^++1):n $C_{33}H_{39}N_5O_9S$ edellyttää arvoa 682].

Esimerkki 60

Yhdisteen BIO-1321 valmistus

A. Seosta, joka sisälsi 4-formyylibentsoaattia (3,48 g, 20 mmol), malonihappoa (2,5 g, 24 mmol) ja ammoniumasetaattia (2,16 g, 28 mmol) etanolissa (100 ml), kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa argonin alla yön yli. Huoneenlämpötilaan jäähdytyksen jälkeen kiinteä sakka kerättiin suodattamalla ja pestiin etanolilla (3 x 30 ml). Valkeaa kiinteää ainetta kuivattiin alipaineessa yön yli, jolloin saatiin yhdiste 1321-1 (2,8 g, 63 %).

B. Suspensioon, joka sisälsi yhdistettä 1321-1 (1,0 grammaa, 4,48 mmol) metanolissa (50 ml), lisättiin $SOCl_2$:a (2 mol/litra CH_2Cl_2::ssa, 2,7 ml, 5,4 mmol). Muodostunutta liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Ylimääräisen liuotteen poiston jälkeen jäännös liuotettiin EtOAc:iin, tehtiin emäksiseksi kylläisellä $NaHCO_3$-liuoksella ja kuivattiin (Na_2SO_4). Orgaaninen liuos väkevöitiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin amiini 1321-2 (780 mg, 53 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,99 (m, 2 H, Ar), 7,56 (d, 1 H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,42 (d, 1 H, J = 8,0 Hz, Ar), 4,46 (t, 1 H, J = 6,7 Hz), 3,85 (s, 3 H, OMe), 3,65 (s, 3 H, OMe), 2,65 (d, 2 H, J = 6,8 Hz), 1,88 (s, 2 H, NH).

C. Amiini 1321-2 (500 mg, 1,11 mmol) kytkettiin Nα-t-Boc-Nε-leusiini-N-hydroksisuksiini-imidiin (380 mg, 1,0 mmol) edellä kuvatulla menettelyllä C, ja aikaansaadusta aineesta poistettiin suojaus trifluorietikkahapolla ja sitten se tehtiin emäksiseksi Et_3N:llä edellä kuvatulla menettelyllä D1, jolloin saatiin amiini 1321-3 (saanto 70 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,32 (t, 1 H, J = 9,1 Hz), 8,20 (d, 2 H, J = 8,3 Hz), 7,34 (m, 2 H, Ar), 5,40 (m, 1 H), 3,86 (s, 3 H, OMe), 3,41 (m, 1 H), 2,85 (m, 2 H), 1,67 (m, 2 H), 1,53 (s, 2 H), 1,30 (m, 1 H), 0,90 (m, 6 H).

D. 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappo (54 mg, 0,19 mmol) kytkettiin amiiniin 1321-3 (70 mg, 0,23 mmol) käyttämällä esimerkissä 22D kuvattua menetelmää, jolloin saatiin yhdiste 1321-4 (saanto 87 %). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 8,62 (m, 1 H), 8,18 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 8,10 (m, 1 H), 7,94 - 7,82 (m, 4 H), 7,48 - 7,34 (m, 4 H), 7,17 - 7,13 (m, 4 H), 6,91 (t, 1 H, J = 7,3 Hz), 5,24 (m, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 3,53 (s, 2 piikkiä, 3 H, OMe), 3,39 - 3,34 (m, 2 H), 3,05 (m, 2 H), 2,24 (s, 3 H, Me), 1,60 - 1,36 (m, 3 H), 0,83 (m, 6 H). HPLC (gradientti

8): 40 min (1:1). MS (FAB): m/z = 617 [(M^++1):n $C_{33}H_{40}N_4O_7$ edellyttää arvoa 617].

E. Yhdiste 1321-4 (70 mg, 0,11 mmol), joka oli liuotettuna DMSO:n (1 ml) ja MeOH:n (2 ml) seokseen, hydrolysoitiin LiOH:n vesiliuoksella esimerkissä 1B kuvatulla tavalla. Tuote puhdistettiin Vydac C18 -käänteisfaasipylväässä (22 mm x 25 cm) käyttämällä lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (15:85 → 40:60), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a, ja virtausnopeutta 10 ml/min, jolloin saatiin yhdiste BIO-1321 (22 mg, saanto eristettynä 34 %). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 8,95 (d, 1 H, J = 4,6 Hz), 8,57 (m, 1 H), 8,13 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,88 - 7,81 (m, 4 H), 7,44 - 7,32 (m, 4 H), 7,17 - 7,10 (m, 4 H), 6,92 (t, 1 H, J = 7,4 Hz), 5,20 (m, 1 H), 4,31 (m, 1 H), 3,46 - 3,27 (m, 2 H), 2,70 (m, 2 H), 2,22 (s, 3 H, Me), 1,59 - 1,32 (m, 3 H), 0,81 (m, 6 H). HPLC (gradientti 8): 37,8 min ja 28,1 min (1:1). MS (FAB): m/z = 589 [(M^++1):n $C_{31}H_{36}N_4O_7$ edellyttää arvoa 589].

Esimerkki 61

Yhdisteen 1336 valmistus

A. Lietettä, joka sisälsi 2,4-dikloori-3-nitropyridiiniä (92 %, 9,9 g, 47 mmol) ja K_2CO_3-jauhetta (6,5 g, 47 mmol) metanolissa (100 ml), sekoitettiin viikon ajan huoneenlämpötilassa. Reaktioseos suodatettiin ja väkevöitiin. Jäännökselle tehtiin partitio etyyliasetaatin ja 60-prosenttisesti kyllästetyn $NaHCO_3$:n vesiliuoksen kesken. Orgaaninen liuos pestiin 60-prosenttisesti kyllästetyllä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti), vedellä ja sitten kyllläisellä NaCl:n vesiliuoksella, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 2-kloori-6-metoksi-5-nitropyridiiniä ja 2-kloori-6-metoksi-3-nitropyridiiniä (8,9 g, 100 %) vaaleankeltaisena kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,31 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 8,28 (d, 1 H, J = 8,9 Hz), 7,10 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 6,82 (d, 1 H, J = 8,9 Hz), 4,15 (d, 3 H), 4,06 (s, 3 H).

B. Seosta, joka sisälsi 2-kloori-6-metoksi-5-nitropyridiiniä ja 2-kloori-6-metoksi-3-nitropyridiiniä (8,9 g, 47 mmol), t-butyylimetyylimalonaattia (10 ml, 60 mmol) ja NaH:a (95 %, 3,1 g, 120 mmol) THF:ssa (250 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja jäännöstä käsiteltiin trifluorietikkahapolla (200 ml) 2 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin ja tuote erotettiin flash-kromatografisesti (silikageeli, heksaani-etyyliasetaattiseos, 95:5), jolloin saatiin metyyli-6-(2-metoksi-3-nitro)pyridyyliasetaattia (3,3 g, 62 %) keltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,27 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,04 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 4,09 (s, 3 H), 3,85 (s, 2 H), 3,75 (s, 3 H).

C. Seosta, joka sisälsi metyyli-6-(2-metoksi-3-nitro)pyridyyliasetaattia (0,047 g, 0,21 mmol) ja katalyyttiä (0,063 g), joka sisälsi 10 % Pd:a hiilikantajalla, etyyliasetaatin (2 ml) ja etanolin (1 ml) seoksessa, sekoitettiin 6 tuntia H_2-kaasun alla [280 - 340 kPa (40 - 50 psi)]. Seos suodatettiin piimaan läpi ja suodos väkevöitiin, jolloin saatiin metyyli-6-(3-amino-2-metoksi)pyridyyliasetaattia (0,041 g, 100 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 6,82 (d, 1 H, J = 7,6 Hz), 6,65 (d, 1 H, J = 7,6 Hz), 3,94 (s, 3 H), 3,70 (s, 3 H), 3,65 (s, 2 H).

D. Liuokseen, joka sisälsi metyyli-6-(3-amino-2-metoksi)pyridyyliasetaattia (0,078 g, 0,33 mmol) ja trietyyliamiinia (50 ml, 0,36 mmol) dikloorimetaanissa (1,0 ml), lisättiin o-tolyyli-isosyanaattia (41 µl, 0,36 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 4 tuntia ja sitten se väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti (silikageeli, heksaani-etyyliasetaattiseos, 3:2), jolloin saatiin metyyli-6-(2-metoksi-3-o-tolyyliureido)pyridyyliasetaattia (0,060 g, 55 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,33 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,51 (d, 1 H, J = 7,8 Hz), 7,41 (s, 1 H), 7,17 (m, 2 H), 7,08

(m, 2 H), 6,77 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 3,81 (s, 3 H), 3,71 (s, 3 H), 3,67 (s, 2 H), 2,20 (s, 3 H).

E. Liuokseen, joka sisälsi metyyli-6-(2-metoksi-3-o-tolyyliureido)pyridyyliasetaattia (0,023 g, 0,070 mmol) metanolissa (1,0 ml), lisättiin LiOH-liuosta (2 mol/l, 90 µl, 0,18 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 18 tuntia ja se laimennettiin vedellä (5,0 ml) ja pestiin kahdesti eetterillä. Vesiliuos tehtiin sitten happamaksi 5-prosenttisella sitruunahapon vesiliuoksella. Tuote erotettiin suodattamalla ja pestiin vedellä ja sitten eetterillä, jolloin saatiin 6-(2-metoksi-3-o-tolyyliureido)pyridyylietikkahappoa (0,014 g, 64 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (CD_3OD, 300 MHz, ppm): 8,50 - 8,25 (m, 3 H), 7,60 (leveä d, 1 H), 7,28 - 7,00 (m, 3 H), 4,01 (s, 3 H), 3,69 (s, 2 H), 2,30 (s, 3 H). MS: m/z = 316.

F. Toteutettiin proseduuri C käyttämällä amiinia ß-2. Muodostunut tuote asetettiin alttiiksi menettelyssä D1 käytetyille olosuhteille, jolloin saatiin TFA-amiinisuola 1336-1.

G. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä 6-(2-metoksi-3-o-tolyyliureido)pyridyylietikkahappoa (0,014 g, 0,044 mmol) ja amiini-TFa-suolaa 1336-1 (0,017 g, 0,045 mmol), jolloin saatiin BIO-1336:n t-butyyliesteri (0,024 g, 79 %) valkeana vaahtona. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,40 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,63 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,50 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,43 - 7,06 (m, 6 H), 6,80 - 6,67 (m, 4 H), 5,92 (s, 2 H), 5,19 (m, 1 H), 4,47 (m, 1 H), 3,91 (s, 3 H), 3,61 (s, 3 H), 2,65 (m, 2 H), 2,31 (s, 3 H), 1,58 (m, 3 H), 1,31 (s, 9 H).

H. Liuokseen, joka sisälsi BIO-1336:n t-butyyliesteriä (0,024 g, 0,035 mmol) dikloorimetaanissa (3,0 ml), lisättiin trifluorietikkahappoa (3,0 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia ja sitten se väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1336 (0,011 g, 50 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri

(CD_3SOCD_3, 300 MHz, ppm): 8,73 (s, 1 H), 8,52 (s, 1 H), 8,47 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 8,31 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 8,11 (d, 1 H, J = 8,3 Hz), 7,81 (d, 1 H, J = 7,9 Hz), 7,21 - 7,09 (m, 2 H), 7,00 - 6,70 (m, 5 H), 5,98 (s, 2 H), 5,08 (m, 1 H), 4,36 (m, 1 H), 3,97 (s, 3 H), 3,52 (m, 2 H), 2,64 (m, 2 H), 2,25 (s, 3 H), 1,55 - 1,25 (m, 3 H), 0,81 (m, 6 H). HPLC (gradientti B): 20,0 min. MS: m/z = 620.

Esimerkki 62

Yhdisteen BIO-1382 valmistus

A. Seokseen, joka sisälsi 6-amino-2(S)-N-Boc-aminoheksanoaatin hydrokloridisuolaa (200 mg, 0,60 mmol) CH_2Cl_2:ssa (5 ml) ja lisäksi TEA:a (lakmusindikaattorin mukaan emäksinen), lisättiin huoneenlämpötilassa pisaroittain 2 minuutin aikana metaanisulfonyylikloridia (76,2 mg, 0,67 mmol). 1 tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseos laimennettiin CH_2Cl_2:lla (10 ml), pestiin 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (3 x 0,5 ml), vedellä (1 x 1 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (1 x 1 ml) ja kuivattiin ($MgSO_4$). Orgaaninen faasi väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin yhdiste 1382-1 (230 mg, 100 %) kirkkaana öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,26 (s, 5 H), 5,58 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5,02 (s, 2 H), 4,27 (m, 1 H), 3,64 (s, 3 H), 3,02 (m, 2 H), 2,78 (s, 3 H), 1,85 - 1,20 (m, 6 H). HPLC (gradientti 3): 24,26 min (98 %). MS: m/z = 373.

B. Yhdisteeseen 1382-1 (225 mg, 0,60 mmol), jota sekoitettiin MeOH:ssa (10 ml) huoneenlämpötilassa, lisättiin 2 minuutin aikana pisaroittain LiOH-liuosta (2 ekv/l, 0,91 ml, 1,8 mmol). Sekoitusta jatkettiin yön yli. Reaktioseos tehtiin happamaksi TFA:lla (lakmusindikaattori punainen) ja väkevöitiin alipaineessa. Kirkas kumimainen raakatuote sekoitettiin EtOAc:iin (20 ml) ja loppukäsiteltiin esimerkissä 62A kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste 1382-2 (122 mg, 57 %) kirkkaana kumimaisena aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,33 (s, 4 H), 5,54 (d, 1 H, J = 7,89 Hz), 4,39 (m, 1 H), 3,47 (s, 3 H),

3,09 (m, 2 H), 3,09 (m, 2 H), 1,92 - 1,28 (m, 6 H). HPLC (gradientti 3): 19,23 min (100 %). MS: m/z = 359.

C. Toteutettiin esimerkissä 1A kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä 1382-2 (48 mg, 0,13 mmol) ja amiinia ß-14 (25 mg, 0,09 mmol), jolloin saatiin yhdiste 1382-3. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,97 (d, 2 H, J = 7,38 Hz), 7,35 (m, 7 H), 5,51 (m, 1 H), 5,35 (dd, 1 H, J = 5,77 ja 13,50 Hz), 5,09 (s, 2 H), 4,75 (m, 1 H), 4,14 (m, 1 H), 3,88 (s, 3 H), 3,62 (s, 3 H), 3,09 (m, 2 H), 2,73 (m, 2 H), 1,92 - 1,77 (m, 1 H), 1,70 - 1,55 (m, 1 H), 1,55 - 1,49 (m, 2 H), 1,49 - 1,15 (m, 13 H).

D. Yhdisteestä 1382-3 poistettiin Cbz-suojausryhmä katalyyttisen hydrauksen olosuhteissa, joita kuvattiin edellä menettelyn D2 yhteydessä, jolloin saatiin tuote 1382-4 (13,2 g, 35 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,23 - 8,12 (m, 2 H), 8,02 - 7,82 (m, 2 H), 7,49 - 7,38 (m, 2 H), 5,50 - 5,31 (m, 1 H), 3,86 (s, 3 H), 3,57 (s, 3 H), 3,20 - 2,65 (m, 4 H), 1,89 - 1,72 (m, 1 H), 1,50 - 1,10 (m, 14 H).

E. Toteutettiin esimerkissä 49 kuvattu proseduuri käyttämällä yhdistettä 1382-4 (15,5 mg, 0,05 mmol), jolloin saatiin BIO-1382:n t-butyyliesteri (22,6 mg, 111 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,02 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 7,87 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,59 (d, 1 H, J = 8,1 Hz), 7,29 - 7,19 (m, 5 H), 7,11 - 7,02 (m, 4 H), 6,92 (t, 1 H, J = 7,19 Hz), 5,25 - 5,16 (m, 1 H), 4,20 - 4,30 (m, 1 H), 3,8 (s, 3 H), 3,39 (s, 2 H), 2,86 - 2,73 (m, 5 H), 2,68 - 2,58 (m, 2 H), 2,17 (s, 3 H), 1,65 - 1,18 (s, 15 H). MS: m/z = 752.

F. BIO-1382:n t-butyyliesteriä (27,6 mg, 0,027 mmol) sekoitettiin CH_2Cl_2:ssa (1 ml) lämpötilassa 5 °C. Lisättiin yhdessä erässä TFA (1,0 ml), jäähaude poistettiin ja sekoitusta jatkettiin 2 tuntia. Reaktioseos väkevöitiin alipaineessa ja jäännös puhdistettiin preparatiivista HPLC:tä käyttämällä, jolloin saatiin yhdiste BIO-

1382 (14 mg, 75 %) valkeana kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): 8,71 (d, 1 H, J = 7,82 Hz), 8,21 (d, 1 H, J = 8,01 Hz), 8,04 - 7,91 (m, 3 H), 7,59 - 7,44 (m, 3 H), 7,32 - 7,20 (m, 2 H), 7,01 - 6,98 (m, 2 H), 5,30 (dd, 1 H, J = 7,50 ja 14,93 Hz), 4,35 (m, 1 H), 3,93 (s, 3 H), 3,84 - 3,62 (m, 2 H), 3,09 - 3,45 (m, 2 H), 2,99 - 2,78 (m, 6 H), 2,32 (s, 3 H), 1,75 - 1,15 (m, 6 H). HPLC (gradientti 3): 27,8 min (95 %). MS: m/z = 696.

Esimerkki 63

Yhdisteen BIO-1400 valmistus

A. 4-fenyyli-1-buteeniin (3,47 g, 3,94 ml, 26 mmol) lisättiin huoneenlämpötilassa kloorisulfonyyli-isosyanaattia (3,54 g, 2,17 ml, 25 mmol) argonkaasukehän alla. Muodostunutta seosta sekoitettiin yön yli. Reaktioseos lisättiin pisaroittain liuokseen, joka sisälsi $NaHCO_3$:a (5 g) ja $NaHSO_3$:a (1,5 g) veden (15 ml) ja CH_2Cl_2:n (10 ml) seoksessa ja jota sekoitettiin kiivaasti lämpötilassa 0 °C. 1 tunnin kuluttua liuos väkevöitiin alennetussa paineessa ja jäännös uutettiin EtOAc:lla (2 x 50 ml). Erotuksen jälkeen orgaaninen kerros pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella (30 ml), kuivattiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin beeta-laktaami 1400-1 (600 mg, 14 %) vaaleankeltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 7,30 - 7,13 (m, 5 H, Ar), 6,45 (s, 1 H, NH), 3,0 (ddd, 1 H, J = 14,8, 4,7 ja 1,7 Hz), 2,64 (t, 2 H, J = 7,6 Hz), 2,52 (d, 1 H, J = 14,8 Hz), 1,92 (m, 2 H). TLC (heksaani-EtOAc-seos, 50:50): R_f = 0,27.

B. Liuosta, jota sisälsi beeta-laktaamia 1400-1 (500 mg, 2,86 mmol), MeOH:a (25 ml) ja 33-prosenttista HCl-liuosta (1 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 tuntia. Reaktioseos laimennettiin EtOAc:lla (100 ml) ja siihen lisättiin Et_3N:a, kunnes saavutettiin pH 9 - 10 (pH-paperi). Tulokseksi saatu liuos pestiin vedellä (10 ml), kylläisellä $NaHCO_3$-liuoksella (30 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (30 ml), kuivattiin (Na_2SO_4) ja väkevöitiin

alennetussa paineessa, jolloin saatiin amiini 1400-2 (270 mg, 52 %) keltaisena öljynä. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): δ = 7,28 - 7,15 (m, 5 H, Ar), 3,66 (s, 3 H, OMe), 2,66 (m, 2 H), 2,48 (dd, 1 H, J = 15,7 ja 4,0 Hz), 2,29 (dd, 1 H, J = 15,7 ja 8,8 Hz), 1,70 (m, 2 H), 1,54 (s, 2 H, NH). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,35. MS (FAB): m/z = 207 [(M^++1):n $C_{12}H_{17}NO_2$ edellyttää arvoa 207].

C. Vapaa amiini 1400-2 (100 mg, 0,55 mmol) kytkettiin Nα-t-Boc-Nϵ-Leu-N-hydroksisuksiini-imidiin (163 mg, 1,52 mmol) edellä kuvatulla menettelyllä C, ja aikaansaadusta aineesta poistettiin suojaus trifluorietikkahapolla (0,5 ml) ja sitten se tehtiin emäksiseksi Et_3N:llä edellä kuvatulla menettelyllä D1, jolloin saatiin amiini 1400-3 (saanto 95 %). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 9,02 (d, 1 H, J = 9,0 Hz), 7,27 - 7,14 (m, 5 H, Ar), 4,26 (m, 1 H), 3,64 (s, 2 piikkiä, 3 H, OMe), 3,44 (m, 1 H), 2,79 (s, 2 H), 2,62 (t, 1 H, J = 7,8 Hz), 2,54 (d, 1 H, J = 4,9 Hz), 1,87 (m, 2 H), 1,68 (m, 2 H), 1,36 (m, 1 H), 0,92 (m, 6 H). TLC (MeOH-CH_2Cl_2-seos, 10:90): R_f = 0,47 ja 0,18. HPLC (gradientti 1): 12,2 min ja 13,6 min (1:1). MS (FAB): m/z = 321 [(M^++1):n $C_{18}H_{28}N_2O_3$ edellyttää arvoa 321].

D. 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappo (64 mg, 0,24 mmol) kytkettiin vapaaseen amiiniin 1400-3 (64 mg, 0,20 mmol) esimerkissä 49 kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdiste 1400-4 (saanto 60 %). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 9,50 (d, 1 H, J = 6,8 Hz), 8,26 - 8,17 (m, 2 H), 7,97 (d, 1 H, J = 6,1 Hz), 7,84 (d, 1 H, J = 8,0 Hz), 7,38 (m, 4 H), 7,27 - 7,09 (m, 9 H), 6,91 (t, 1 H, J = 7,3 Hz), 4,26 (m, 1 H), 4,03 (m, 1 H), 3,52 (s, 2 piikkiä, 3 H, OMe), 3,38 (m, 2 H), 2,57 - 2,40 (m, 4 H), 2,25 (s, 3 H), 1,70 - 1,41 (m, 5 H), 0,86 (m, 6 H). MS (FAB): m/z = 587 [(M^++1):n $C_{34}H_{42}N_4O_5$ edellyttää arvoa 587].

E. Yhdiste 1400-4 (70 mg, 0,119 mmol), joka oli liuotettuna DMSO:n (1 ml) ja MeOH:n (2 ml) seokseen, hydrolysoitiin LiOH:n vesiliuoksella esimerkissä 1B kuvatulla

tavalla. Tuote puhdistettiin Vydac C18 -käänteisfaasipylväässä (22 mm x 25 cm) käyttämällä lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (20:80 → 50:50), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a, ja virtausnopeutta 10 ml/min, jolloin saatiin yhdiste BIO-1400 (saanto eristettynä 22 %). ^{1}H-NMR-spektri (DMSO-d_6, 300 MHz, ppm): δ = 8,93 (m, 1 H), 8,14 (m, 1 H), 7,91 - 7,81 (m, 3 H), 7,34 (m, 2 H), 7,27 - 7,09 (m, 9 H), 6,92 (t, 1 H, J = 7,4 Hz), 4,27 (m, 1 H), 4,00 (m, 1 H), 3,43 (d, 1 H, J = 14,2 Hz), 3,36 (d, 1 H, J = 14,2 Hz), 2,60 - 2,30 (m, 4 H), 2,22 (s, 3 H), 1,68 - 1,55 (m, 3 H), 1,45 (t, 2 H, J = 6,9 Hz), 0,86 (m, 6 H). HPLC (gradientti 1): 20 min ja 20,5 min (1:2,45). MS (FAB): m/z = 573 [$(M^+$+1):n $C_{33}H_{40}N_4O_5$ edellyttää arvoa 573].

HPLC-analyysissä käytetyt olosuhteet:

Gradientti 1: lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (20:80 → 70:30), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a.

Gradientti 8: lineaarisesti muuttuvia CH_3CN-H_2O-seoksia (15:85 → 40:60), jotka sisälsivät 0,1 % TFA:a.

Esimerkki 64

Yhdisteen BIO-1051 valmistus

A. 4-aminobentsoehappo (420 mg, 3,1 mmol) käsiteltiin CH_2Cl_2:ssa fenyyli-isosyanaatilla (340 µl, 3,1 ml) huoneenlämpötilassa. Reaktioseosta sekoitettiin 20 min ja sitten se väkevöitiin. Jäännös pestiin HCl-liuoksella (1 ekv/l) ja sitten eetterillä, jota käytettiin ylimäärin, jolloin saatiin tuote (98 mg, 12 %) valkeana jauheena. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 9,08 (s, 1 H), 8,80 (s, 1 H), 7,90 (d, 2 H), 7,58 (d, 2 H), 7,45 (d, 2 H), 7,30 (m, 2 H), 7,00 (m, 1 H). MS (FAB): 257 $(M+H)^+$; M = 256,26.

B. Liuokseen, joka sisälsi esimerkissä 6A aikaansaatua amiinia (15 mg, 0,045 mmol) ja esimerkissä 64A aikaansaatua tuotetta (12 mg, 0,047 mmol) DMF:ssa, lisättiin huoneenlämpötilassa DIPEA:a (40 µl, 0,22 mmol) ja BOP:tä (20 mg, 0,045 mmol). Sen jälkeen kun reaktioseosta oli se-

koitettu yön yli, se loppukäsiteltiin kuten esimerkissä 1A, jolloin saatiin BIO-1051-OtBu (18 mg, 69 %) vaahtona.

C. BIO-1051-OtBu:ta (19 mg, 0,031 mmol) käsiteltiin TFA:lla (2 ml) huoneenlämpötilassa 30 min ja sitten seos väkevöitiin. Raakatuote puhdistettiin HPLC:n avulla, jolloin saatiin yhdiste BIO-1051 (6,3 g, 39 %) valkeana jauheena. HPLC (gradientti A): 19,2 min. MS (FAB): 517 $(M+H)^+$; M = 516,3.

Esimerkki 65

Yhdisteen BIO-1110 valmistus

Esimerkissä 6A aikaansaatu amiini (49 mg, 0,15 mmol) käsiteltiin CH_2Cl_2:ssa TFA:lla (10 ml) huoneenlämpötilassa. Reaktioseosta sekoitettiin 3 tuntia ja se väkevöitiin. Jäännös liuotettiin DMF:iin ja neutraloitiin trietyyliamiinilla huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen lisättiin 4-nitrofenyylifenyyli-isosyanaattia (26,5 mg, 0,16 mmol) ja seosta sekoitettiin 1 tunti huoneenlämpötilassa. HPLC-puhdistus tuotti tulokseksi beigeväristä kiinteää ainetta (62 mg). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 8,05 (d, 1 H), 7,25 (m, 5 H), 5,35 (m, 1 H), 4,34 (m, 1 H), 2,22 (m, 2 H), 1,59 (m, 3 H), 0,84 (m, 6 H). MS (FAB): 442,9 $(M+H)^+$; M = 442,41. HPLC (gradientti A): 21,05 min.

B. Esimerkin 65A tuote (55 mg, 0,12 mmol) pelkistettiin MeOH:ssa 10 % Pd/C -katalyytin avulla, samalla kun seosta sekoitettiin vetykaasun alla paineessa 280 kPa (40 psi). Reaktioseos suodatettiin Celite 545:n läpi ja haihdutettiin, jolloin saatiin beigeväristä kiinteää ainetta (49 mg). ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,19 (m, 5 H), 7,03 (d, 2 H), 6,94 (d, 2 H), 5,27 (m, 1 H), 4,23 (m, 2 H), 2,72 (m, 2 H), 1,52 (m, 3 H), 0,78 (m, 6 H). MS (FAB): 413,3 $(M+H)^+$; M = 412,45. HPLC (gradientti A): 11,93 min.

C. Esimerkin 65B tuote (5 mg, 0,012 mmol) käsiteltiin DMF:n ja trietyyliamiinin seoksessa fenyyli-isosyanaatilla (1,4 mg, 0,12 mmol). Yön yli sekoituksen jälkeen

aine puhdistettiin HPLC:n avulla. ^{1}H-NMR-spektri ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 7,55 (d, 2 H), 7,36 (m, 12 H), 7,04 (m, 1 H), 6,34 (d, 1 H), 5,36 (m, 1 H), 4,41 (m, 1 H), 2,78 (m, 2 H), 1,39 (m, 3 H), 0,91 (m, 6 H). MS (FAB): 532 $(M+H)^+$; M = 531,36. HPLC (gradientti A): 20,31 min.

Esimerkki 66

Yhdisteen BIO-1527 valmistus

A. Liuokseen, joka sisälsi amiinia ß-3 (1 ekv) CH_2Cl_2:ssa, lisättiin Boc-Pro-OSu:ta (1 ekv) ja seosta sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa yön yli. Tulokseksi saatu seos laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin sitten 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja väkevöitiin, jolloin saatiin raakatuote valkeana vaahtona. Edellä saatu raakatuote liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja liuokseen lisättiin lämpötilassa 0 °C TFA:a. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti ja se väkevöitiin, jolloin saatiin amiini TFA-suolana.

B. Liuokseen, joka sisälsi 2-metyylifenyyliureafenyylietikkahappoa DMF:ssa, lisättiin HOBt:a (1,5 ekv) ja EDC:tä (1,2 ekv) ja sen jälkeen esimerkissä 66A aikaansaatua vapaata amiinia ja seosta sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa yön yli. Tulokseksi saatu seos laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin sitten 5-prosenttisella sitruunahappoliuoksella (kahdesti), kylläisellä $NaHCO_3$:n vesiliuoksella (kahdesti) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (kerran), kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja väkevöitiin, jolloin saatiin metyyliesteri. Tulokseksi saatu metyyliesteri liuotettiin metanoliin ja käsiteltiin sitten LiOH:n vesiliuoksella (1 ekv/l). Lopputuote (karboksyylihappo) puhdistettiin HPLC:n avulla. HPLC-puhdistuksella aikaansaatu puhdas jae kerättiin talteen ja kuivattiin, jolloin saatiin yhdistettä BIO-1527.

Massaspektri: 573 (M+1), 595 (M+Na).

Esimerkki 67

BSA-CS1:een tapahtuvan, VLA4-riippuvaisen adheesion inhibointi

Tätä määritystä käytettiin tämän keksinnön mukaisten VLA4:n ohjauksessa olevien inhiboivien yhdisteiden tehokkuuden tutkimiseen.

1. CS1:n kytkeminen BSA:iin

BSA-SMCC (Pierce Chemical, Rockford, IL, luettelonumero 77115) liuotettiin veteen pitoisuudeksi 10 mg/ml. Sekvenssi numero 4, Cys-Tyr-Asp-Glu-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr ("Cys-Tyr-CS1-peptidi"), joka syntetisoitiin tavanomaisin kiinteäfaasireaktioin ja puhdistettiin HPLC:llä, liuotettiin Hepes-puskuriin (10 mmol/l, pH 5), joka sisälsi 50 nmol/l NaCl:a ja 0,1 mmol/l EDTAa, samoin pitoisuudeksi 10 mg/ml. Sitten sekoitettiin 500 µl BSA-SMCC-liuosta, 250 µl Cys-Tyr-CS1-peptidiliuosta ja 75 µl Hepes-puskuria (1 mmol/l, pH 7,5) ja annettiin konjugaatioreaktion edetä 30 min. Reaktio keskeytettiin lisäämällä 1 µl beeta-merkaptoetanolia. Näytteistä analysoitiin ristisitoutuminen SDS-PAGE:lla. Tämä reaktio tuotti useita Cys-Tyr-CS1-peptidikonjugaattimolekyylejä kutakin BSA-molekyyliä kohden.

2. Maljojen preparointi adheesiomääritystä varten

Polystyreenisen 96-kuoppaisen tasapohjaisen Linbro Titertek -maljan (Flow Laboratories, Maclean, VA; luettelonumero 97-231-05) kuopat päällystettiin 100 µl:lla edellä luvattua BSA-CS1-liuosta, joka oli laimennettu pitoisuuteen 1 µg/ml $NaHCO_3$-puskurilla (0,05 mol/l, pH 9,2) (15 mmol/l $NaHCO_3$:a, 35 mmol/l Na_2CO_3:a). Jotkut kuopat jätettiin päällystämättä CS1:llä epäspesifisen solusitoutumisen tutkimiseksi (NSB). Maljaa inkuboitiin sitten yön yli lämpötilassa 4 °C.

Tämän inkuboinnin jälkeen kuoppien sisältö poistettiin kääntämällä malja ylösalaisin ja kuivaamalla se inmu-

paperilla. Kaikki kuopat suojattiin sitten käsittelemällä vähintään 1 tunti huoneenlämpötilassa 100 µl:lla liuosta, joka sisälsi 1 %:n BSA:a PBS:ssa.

3. Fluoresoiviksi leimattujen Ramos-solujen valmistus

Ramos-solut kasvatetaan, pidetään yllä ja leimataan RPMI 1640 -kasvualustassa, joka sisältää 1 %:n BSA:a. Juuri ennen määritystä lisättiin 2',7'-bis(2-karboksietyyli)-5 (ja -6) -karboksifluoreseiiniasetoksimetyyliesteriä ("BCECF-AM"; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon; luettelonumero B-1150) loppupitoisuudeksi 2 µmol/l Ramos-soluviljelmään ($4 \cdot 10^6$ solua/ml). Soluja inkuboitiin 20 min lämpötilassa 37 °C.

Leimauksen jälkeen solut pestiin kahdesti määrityspuskurilla (24 mmol/l Trisiä, 137 mmol/l NaCl:a, 2,7 mmol/l KCl:a, pH 7,4, 0,1 % BSA:a ja 2 mmol/l glukoosia) kasvualustasta mahdollisesti peräisin olevien kationien poistamiseksi. Solut suspendoitiin sitten uudelleen määrityspuskuriin ($4 \cdot 10^6$ solua/ml) ja lisättiin $MnCl_2$:a (2 mmol/l) solujen pinnalla olevan VLA4:n toiminnan tehostamiseksi.

4. Määrityksen teko

BSA-suojausliuos poistettiin välittömästi ennen määrityksen tekemistä 96-kuoppaisista maljoista ja syvennykset pestiin 100 ml:lla määrityspuskuria. Kuhunkin kuoppaan lisättiin sitten 25 µl seosta, joka sisälsi testattavaa yhdistettä kaksinkertaisena pitoisuutena lopulliseen nähden, ja 25 µl leimattujen Ramos-solujen suspensiota. Loppupitoisuudet valittiin siten, että ne kattoivat odotetun IC_{50}-alueen, tavallisesti 0,01 nmol/l - 10 µmol/l. Kullakin yhdistepitoisuudella tehtiin kolme rinnakkaismääritystä. Yhdisteen ja solujen annettiin inkuboitua 30 min huoneenlämpötilassa.

Sitten malja tyhjennettiin ja kuopat pestiin 4 kertaa määrityspuskurilla. NSB-kuopat tutkittiin käyttämällä

valomikroskooppia. Jos mainittuihin kuoppiin oli sitoutunut useampia kuin muutamia soluja, malja pestiin vielä kerran ylimääräisten epäspesifisesti sitoutuneiden solujen poistamiseksi.

Ramos-solujen sitoutuminen CS1-peptidipäällystettyihin kuoppiin mitattiin lisäämällä 100 µl määrityspuskuria kuhunkin kuoppaan ja määrittämällä fluoresenssi kvantitatiivisesti ottamalla lukemat Millipore Cytofluor 2300 System -laitteella, jossa eksitaatioaallonpituus oli säädetty arvoon 485 nm ja emissioaallonpituus arvoon 530 nm. Sitoutuminen ilmaistiin IC_{50}-arvona - inhibiittoripitoisuutena, jolla sitoutuminen on 50 % vertailuarvosta. Prosentuaalinen sitoutuminen lasketaan seuraavasta yhtälöstä:

$$[(F_{TB} - F_{NS}) - (F_I - F_{NS})]/(F_{TB} - F_{NS}) \cdot 100 = \text{sitoutuminen (\%)},$$

jossa F_{TB} on CS1:ä sisältäviin kuoppiin ilman lisättyä inhibiittoria sitoutunut kokonaisfluoresenssi; F_{NS} on CS1:ä sisältämättömiin syvennyksiin sitoutunut fluoresenssi; F_I on tämän keksinnön mukaista inhibiittoria sisältäviin kuoppiin syvennyksiin sitoutunut fluoresenssi.

Muita tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä tutkittiin samalla tavalla. Kunkin yhdisteen IC_{50}-arvo esitetään alla olevassa taulukossa:

BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}
1002	nd	1064	B	1122	C	1185	A
1003	nd	1065	B	1123	C	1186	B
1004	C	1066	nd	1124	nd	1187	C
1005	C	1067	B	1125	nd	1188	C
1006	B	1068	B	1126	C	1189	C
1007	C	1069	A	1127	B	1190	A
1008	C	1070	B	1128	B	1191	B
1009	C	1072	A	1129	C	1191	A

BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}
1010	B	1073	B	1130	B	1193	B
1011	C	1074	B	1131	B	1194	A
1013	nd	1075	B	1132	B	1195	A
1014	C	1076	B	1133	B	1196	A
1015	B	1077	B	1134	B	1197	A
1016	C	1078	B	1135	A	1198	C
1017	C	1079	A	1136	B	1199	B
1018	C	1080	B	1137	nd	1200	B
1020	C	1081	B	1138	B	1201	B
1021	B	1082	C	1139	B	1206	A
1022	C	1083	nd	1140	nd	1207	C
1023	B	1084	nd	1141	nd	1208	B
1024	C	1085	C	1142	nd	1209	C
1025	nd	1086	B	1143	C	1210	A
1026	C	1087	C	1144	B	1212	A
1027	C	1088	A	1145	B	1214	B
1028	B	1089	A	1146	B	1215	C
1029	C	1090	A	1147	B	1216	B
1030	C	1091	B	1148	C	1217	A
1031	C	1092	C	1149	C	1218	B
1032	C	1093	C	1150	C	1219	B
1036	B	1094	C	1152	nd	1220	B
1037	B	1096	C	1153	C	1221	A
1038	C	1097	B	1154	nd	1222	A
1039	B	1098	C	1155	nd	1223	nd
1040	B	1099	C	1156	nd	1224	A
1041	nd	1100	B	1157	C	1225	nd
1042	nd	1101	C	1158	B	1227	nd
1043	nd	1102	nd	1159	C	1238	A
1044	nd	1103	C	1160	B	1245	A
1045	nd	1104	B	1162	nd	1246	A
1046	C	1105	B	1163	B	1248	A
1047	nd	1106	C	1164	B	1270	A
1048	nd	1107	C	1168	B	1282	A

BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}	BIO#	IC_{50}
1049B	nd	1108	C	1169	B	1294	A
1050	A	1109	C	1170	B	1321	A
1051	nd	1110	B	1173	B	1327	B
1052	B	1111	C	1174	B	1336	A
1053	B	1112	C	1175	B	1360	A
1054	B	1113	C	1176	B	1380	B
1055	A	1114	C	1177	B	1382	A
1056	A	1115	B	1178	B	1390	B
1057	nd	1116	nd	1179	A	1396	B
1058	nd	1117	C	1180	B	1400	A
1060	B	1119	nd	1181	B	1272	A
1063	B	1120	nd	1182	B	1311	B
1319	B	1345	A	1347	A	1358	B
1361	A	1388	A	1393	A	1429	B
1444	B	1474	B	1475	B	1490	A
1515	A	1525	B	1526	B	1536	A
1594	B	1648	B	1655	B	1721	B
1725	nd	1726	nd	1727	nd	1728	nd
1729	nd	1730	nd	1731	nd	1732	nd

Taulukon lyhenteet: A = <50 nmol/l; B = 50 nmol/l - 10 µmol/l; C = >10 µmol/l; nd = ei määritetty. Kaikilla tässä taulukossa esitetyillä testatuilla yhdisteillä IC_{50} oli < 1 mmol/l.

Esimerkki 68

VLA4:ää pinnallaan sisältävien solujen suora sitominen VCAM-IgG:hen

Seuraavaksi tutkittiin tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden kykyä inhiboida VCAM-VLA4-sitoutumista käyttämällä VCAM-IgG:n ja alkalisen fosfataasin konjugaattia. Tämän määrityksen tekemiseen käytettiin Millipore Multiscreen Assay Systemiä (Millipore Corp., Bedford, MA) solujen pesemiseksi tehokkaasti.

1. VACM-IgG-AP-konjugaattien valmistus

VCAM 2D - IgG -ilmentämisvektoreiden konstruointia, CHO-solujen transfektointia mainituilla konstruktioilla ja tuloksena olevan ilmentämistuotteen puhdistusta kuvataan PCT-julkaisussa WO 90/13 300, joka mainitaan tässä viitteenä.

Puhdistetun VCAM 2D - IgG:n [1,2 ml, 5 mg/ml Hepes-puskurissa (10 mmol/l, pH 7,5)] annettiin reagoida 44 µl:n kanssa Trautin reagenssia (2-iminotiolaani, 20 mg/ml vedessä; Pierce Chemical, Rockford, IL) 30 min huoneenlämpötilassa. Näytteelle tehtiin suolanpoisto 15 ml:n Sephadex G-25 -kolonnissa, joka oli tasapainotettu liuoksella, joka sisälsi 100 mmol/l NaCl:a ja 10 mmol/l MES:ää, pH 5,0. Kerättiin 1 ml:n fraktioita ja määritettiin absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Yhdistettiin eluoitumishuipun sisältävät kaksi fraktiota.

Annettiin vasikan suoliston alkalisen fosfataasin (1 ml, 19 mg/ml; Pierce Chemical, Rockford, IL) reagoida sulfo-SMCC:n kanssa (100 µl, 30 mg/ml vedessä) Hepes-puskurissa (1 mol/l, pH 7,5) 35 min huoneenlämpötilassa. Reaktioseokselle tehtiin suolanpoisto 12 ml:n Sephadex G-25 -kolonnissa, joka oli tasapainotettu liuoksella, joka sisälsi 150 mmol/l NaCl:a ja 10 mmol/l Hepesiä, pH 6,0. Kerättiin 1 ml:n fraktioita ja määritettiin absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Yhdistettiin eluoitumishuipun sisältävät kaksi fraktiota ja säilytettiin ne jäähauteessa.

Alkalinen fosfataasi - SMCC ja VCAM 2D - IgG - iminotilaani -additiotuotteet ristisidottiin moolisuhteessa 2:1 Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5) inkuboimalla 30 min huoneenlämpötilassa. Ristisitoutumisaste määritettiin SDS-PAGE:lla. Ristisidotut tuotteet stabiloitiin lisäämällä $MgCl_2$:a (2 mmol/l) ja $ZnCl_2$:a (0,25 nmol/l) ja säilytettiin lämpötilassa 4 °C.

2. Sitoutumismääritys

96-syvennyksinen suodatusmalja suojattiin ensin lisäämällä kuhunkin syvennykseen 275 µl PBS:a, joka sisälsi

0,1 %:n Tween 20:ä ja 2 % BSA:a ("suojauspuskuri"), ja inkuboimalla 1 tunti huoneenlämpötilassa. Malja asetettiin sitten alipaineimusarjalle ja suojauspuskuri johdettiin suodatussyvennysten pohjan läpi jätteenkeräyskaukaloon. Syvennykset pestiin sitten kolmesti 200 - 250 µl:lla Tris-puskuroitua fysiologista suolaliuosta, joka sisälsi 0,1 % BSA:a, 2 mmol/l glukoosia ja 1 mmol/l Hepesiä, pH 7,5 ("määrityspuskuri") mahdollisesti jäljellä olevan suojaus-puskurin pesemiseksi pois. Sitten maljat valutettiin tyh-jiksi ja kuivattiin paperipyyhkeillä maljan alapuolella olevan puskurin poistamiseksi.

Sitten valmistettiin VACM-IgG-AP-varastoliuos (4 µg/ml määrityspuskurissa) ja suodatettiin se heikosti pro-teiineja sitovan 0,2 µm:n ruiskusuodattimen läpi (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, numero 4454). Tämä liuos laimen-nettiin sitten suhteessa 1:10 määrityspuskurilla ja lisät-tiin 25 µl laimennosta pestyn maljan kuhunkin kuoppaan.

Testattava soluadheesioinhibiittori laimennettiin määrityspuskurilla kaksinkertaiseen pitoisuuteen lopulli-seen nähden ja lisättiin 25 µl kutakin laimennosta maljan kolmeen rinnakkaiskuoppaan. Käytettävät loppupitoisuudet olivat alueella 0,01 nmol/l - 10 µmol/l. Vertailukuoppiin kokonaissitoutumisen ja epäspesifisen sitoutumisen mittaa-miseksi laitettiin 25 µl määrityspuskuria inhibiittorin sijasta. Kokonaissitoutumisen mittaukseen käytetyt kuopat sisälsivät soluja ja VCAM-IgG-AP:a määrityspuskurissa. Epäspesifisen sitoutumisen mittaukseen käytetyt kuopat si-sälsivät vain VCAM-IgG-AP:a määrityspuskurissa.

Jurkat-solut pestiin kerran määrityspuskurilla kas-vualustan poistamiseksi ja suspendoitiin uudelleen tihey-deksi $8 \cdot 10^6$ solua/ml määrityspuskuriin, joka sisälsi 2 mmol/l $MnCl_2$:a. Kuhunkin kuoppaan lisättiin 50 µl Jurkat-solususpensiota lukuun ottamatta epäspesifisen sitoutu-misen mittaukseen käytettyjä kuoppia, joihin laitettiin 50 µl määrityspuskuria, niin että määrityksessä käytetty

lopputilavuus pysyi arvossa 100 µl/kuoppa. Kuoppien sisältöä sekoitettiin varovasti naputtelemalla maljan reunoja. Maljan annettiin sitten inkuboitua sitä liikuttelematta 60 min huoneenlämpötilassa.

Inkuboinnin (60 min) lopussa malja asetettiin alipaineimusarjalle nesteen poistamiseksi kuopista. Lisättiin varovasti 100 µl määrityspuskuria, joka sisälsi 1 mmol/l $MnCl_2$:a (pesupuskuri), kuhunkin kuoppaan häiritsemättä pohjalla olevia soluja. Pesupuskuri poistettiin alipaineen avulla ja malja pestiin uudelleen 150 µl:lla pesupuskuria. Kun pesupuskuri oli poistettu uudelleen, maljan pohja kuivattiin paperipyyhkeillä.

Seuraavaksi valmistettiin liuos, joka sisälsi 10 mg/ml 4-nitrofenyylifosfaattia puskurissa (0,1 mol/l glysiiniä, 1 mmol/l $ZnCl_2$:a, pH 10,5; substraattipuskuri), ja lisättiin 100 µl liuosta välittömästi kuhunkin kuoppaan. Maljaa inkuboitiin 30 min huoneenlämpötilassa, jotta värireaktio pääsi etenemään. Reaktio keskeytettiin lisäämällä kuhunkin kuoppaan 100 µl NaOH-liuosta (3 ekv/l).

96-kuoppaisen suodatusmaljan sisältö siirrettiin sitten suoraan 96-kuoppaiseen tasapohjaiseen maljaan käyttämällä alipaineimusarjaa. Maljasta otettiin lukemat aallonpituudella 405 nm soluihin sitoutuneen VCAM-konjugaatin määrittämiseksi kvantitatiivisesti. Prosentuaalinen sitoutuminen määritetään seuraavasta yhtälöstä:

$$[(A_{TB} - A_{NS}) - (A_I - A_{NS})]/(A_{TB} - A_{NS}) \cdot 100 = \text{sitoutuminen (\%)},$$

jossa A_{TB} on CS1:ä sisältävien, lisättyä inhibiittoria sisältämättömien kuoppien absorbanssi aallonpituudella 405 nm; A_{NS} on CS1:ä sisältämättömien kuoppien absorbanssi aallonpituudella 405 nm; A_I on tämän keksinnön mukaista inhibiittoria sisältävien kuoppien absorbanssi aallonpituudella 405 nm.

Muita tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä tutkittiin samalla määrityksellä. IC_{50}-arvot ovat vertailukelpoisia edellisessä esimerkissä kuvatussa CS1-sitoutumismäärityksessä saatujen kanssa; tietyillä yhdisteillä sitoutuminen oli tässä määrityksessä tosin jopa 10-kertaista edelliseen määritykseen nähden.

Esimerkki 69

Hiiren kosketusyliherkkyyden inhibointi

Balb/C-naarashiiret (20 g, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) nukutettiin natriumpentobarbitaalilla (90 mg/kg i.p.). Sitten paljastettiin 3 cm^2:n alue vatsan ihoa ajamalla karvat tarkasti pois. Iho puhdistettiin sitten 70-prosenttisella etanolilla, minkä jälkeen paljaalle vatsan iholle levitettiin 25 µl seosta, joka sisälsi 0,5 % DNBF:ää asetoni-oliiviöljyseoksessa (tilavuussuhde 4:1). Iho naarmutettiin kevyesti pipetinkärjellä lievän tulehduksen edistämiseksi. 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä herkistyksestä hiiri herkistettiin uudelleen levittämällä 25 µl DNBF-seosta (0,5 %) vatsan ihon samaan kohtaan, minkä jälkeen tehtiin taas kevyt naarmutus pipetinkärjellä. Toinen herkistys tehtiin pitäen nukuttamaton hiiri liikkumattomana.

Päivänä 5 (120 tunnin kuluttua ensimmäisestä herkistyksestä) hiiret nukutettiin ketamiini-ksylatsiiniseoksella (90 ja 10 mg/kg, i.p.) ja levitettiin ärsytysannoksen alapuolella oleva määrä, 10 µl, 0,2-prosenttista DNBF-seosta, vasemman korvan selänpuoleiselle pinnalle. Oikealle korvalle levitettiin samalla tavalla vehikkeliä, joka sisälsi asetonia ja oliiviöljyä tilavuussuhteessa 4:1.

Neljän tunnin kuluttua immuunireaktioon tähtäävän ärsykkeen annosta hiirille annettiin tämän keksinnön mukaisia inhibiittoreita erilaisina pitoisuuksina 100 µl:ssa 0,5-prosenttista natriumfosfaattipuskuria, pH 8,8, joka sisälsi 3 til-% DMSO:a, ihonalaisena injektiona (s.c.). Niukkaliukoisemmat inhibiittorit vaativat joskus DMSO:n

lisäämistä jopa pitoisuudeksi 30 % suurimpien testattujen pitoisuuksien ollessa kyseessä. Kunkin testatun hoidon yhteydessä käytettiin 8 hiiren ryhmiä. Positiiviset (anti-hiiri-VLA4-vasta-aine PS2, 8 mg/kg i.v.) ja negatiiviset (fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos, PBS, 100 µl i.v.; DMSO PBS:ssa, 100 µl s.c.) vertailuryhmät testattiin aina osana testattavia yhdisteitä koskevaa määritystä.

Hiiret nukutettiin uudelleen 24 tunnin kuluttua ärsykkeen annosta ketamiinin ja ksylatsiinin seoksella ja mitattiin kummankin korvan paksuus mikrometrillä 10^{-4} tuuman tarkkuudella. Korvan turvotusreaktion esto saatiin vertaamalla hoitoa saanutta ryhmää negatiiviseen vertailuryhmäänsä. Prosentuaalinen esto laskettiin seuraavasti:

$$\left[\frac{\text{(negatiivisen vertailuryhmän korvan turvotuksen keskiarvo)} - \text{(testiryhmän korvan turvotuksen keskiarvo)}}{\text{negatiivisen vertailuryhmän korvan turvotuksen keskiarvo}}\right] \cdot 100$$

Hoitoryhmien välisen eron tilastollinen merkitsevyys arvioitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä, jota seurasi Tukey-Kramer Honestly Significant Differencen (JMP, SAS Institute) laskeminen ($p < 0,5$).

Tämän keksinnön mukaiset inhibiittorit aiheuttavat tilastollisesti merkitsevän vähenemisen DNFB:llä käsiteltyjen hiirten korvan turvotusreaktiossa verrattuna inhibiittoria saamattomiin vertailueläimiin.

Esimerkki 70

***Ascaris*-antigeenilla indusoidun myöhäisvaiheen hengitystieherkkyyden esto allergisissa lampaissa**

Tässä tutkimuksessa käytettiin lampaita, joilla oli aiemmin osoitettu kehittyvän sekä varhaisia että myöhäisiä keuhkoputkireaktioita *Ascaris suum* -antigeeniin. Kokeessa käytetty menettely oli muuten W. M. Abrahamin *et al.* [J. Clin. Invest. 93 (1994) 776 - 787] kuvaama, paitsi että

eläimille annettiin aerosolisuihkeena tämän keksinnön mukaisia VLA4-inhibiittoreita liuotettuina 3 - 4 ml:aan vesipitoista 50-prosenttista etanolia.

Tulokset osoittivat, että kaikki tämän keksinnön mukaiset VLA4-inhibiittorit estivät *Ascaris suum* -antigeenin antoon liittyvät hengitystiereaktiot.

Vaikka edellä on esitetty joukko tämän keksinnön suoritusmuotoja, on selvää, että tätä peruskonstruktiota voidaan muuntaa, niin että saadaan muita yhdisteitä ja menetelmiä, joissa käytetään tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä. Niinpä ymmärrettäneen, että tämän keksinnön suoja-ala määräytyy oheisten patenttivaatimusten eikä edellä esimerkkeinä esitettyjen erityissuoritusmuotojen mukaan.

Sekvenssilistaus

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJAT:

(A) NIMI: BIOGEN, INC. (paitsi US)
(B) KATU: 14 Cambridge Center
(C) KAUPUNKI: Cambridge
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02142
(G) PUHELIN: (617) 679-2817
(H) TELEFAX: (617) 679-2838

(A) NIMI: LIN, Ko-Chung (vain US)
(B) KATU: 253 Lincoln Street
(C) KAUPUNKI: Lexington
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02173

(A) NIMI: ADAMS, Steven P (vain US)
(B) KATU: 12 Berkeley Lane
(C) KAUPUNKI: Andover
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 01810

(A) NIMI: CASTRO, Alfredo C (vain US)
(B) KATU: 31 Glenwood Avenue
(C) KAUPUNKI: Woburn
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 01801

(A) NIMI: ZIMMERMAN, Craig N (vain US)
(B) KATU: 134 Highland Avenue #6
(C) KAUPUNKI: Somerville
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02143

(A) NIMI: CUERVO, Julio H (vain US)
(B) KATU: 16 Elmer Street #303
(C) KAUPUNKI: Cambridge
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02138

(A) NIMI: LEE, Wen-Cherng (vain US)
(B) KATU: 192 Spring Street
(C) KAUPUNKI: Lexington
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02173

(A) NIMI: HAMMOND, Charles E (vain US)
(B) KATU: 4 Chester Avenue
(C) KAUPUNKI: Burlington
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 01803

(A) NIMI: LIAO, Yu-Sheng (vain US)
(B) KATU: 4401 Starns Hill Road
(C) KAUPUNKI: Waltham
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 02154

(A) NIMI: SINGH, Juswinder (vain US)
(B) KATU: 485 Charles Street
(C) KAUPUNKI: Malden
(D) OSAVALTIO: Massachusetts
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 021489

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Soluadheesion inhibiitto-reita

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 4

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
(A) VASTAANOTTAJA: Fish & Neave
(B) KATU: 1251 Avenue of the Americas
(C) KAUPUNKI: New York
(D) OSAVALTIO: New York
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 10020

(v) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Levyke
(B) TIETOKONE: IBM PC -yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio # 1.30

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 08/376 372
(B) JÄTTÖPÄIVÄMÄÄRÄ: 23.1.1995

(2) SEKVENSSIN NRO 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1:

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 2:

Glu Ile Leu Asp Val
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 3:

Leu Asp Val Pro Ser
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 27 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

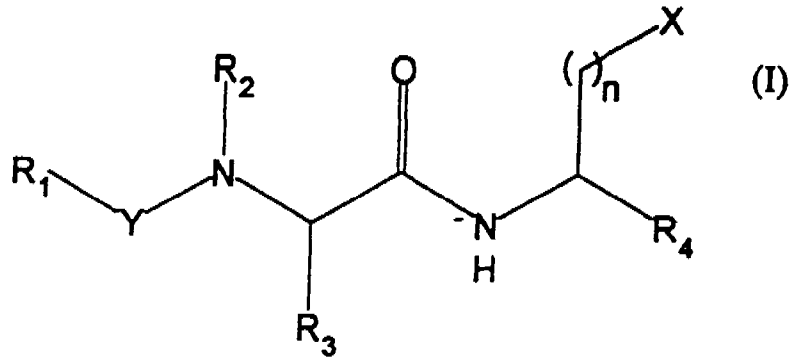
(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 4:

Cys Tyr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu
1 5 10 15

His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
20 25

Patenttivaatimukset

1. Soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t - t u siitä, että sinä tulevat kyseeseen yhdisteet, joilla on kaava (I),



ja (I):n farmaseuttisesti hyväksyttävät johdokset, jossa kaavassa

ryhmänä X tulevat kyseeseen $-CO_2H$, $-PO^-_3H$, $-SO_2R_5$, $-SO_3H$, $-OPO^-_3H$, $-CO_2R_4$ ja $-C(O)N(R_4)_2$,

jolloin ryhmänä R_5 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli, aryylisubstituoitu alkyyli ja aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli;

ryhmänä Y tulevat kyseeseen -CO-, $-SO_2-$ ja $-PO_2-$;

ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, aryylifuusioitu sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli, aryylialkyyli, aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyylisubstituoitu alkyyli, sykloalkenyylisubstituoitu sykloalkyyli, biaryyli, alkoksyyli, alkeenioksi, alkyynioksi, aryylialkoksyyli, aryylisubstituoitu alkeenioksi tai alkyylioksi, alkyyliamino, alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylisubstituoitu alkyyliamino, aryylisubstituoitu alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylioksi, aryyliamino, N-alkyyliureasubstituoitu alkyyli, N-aryyliureasubstituoitu alkyyli, alkyylikarbonyyliaminosubstituoitu alkyyli, aminokarbonyylisubsti-

tuoitu alkyyli, heterosyklyyli, heterosyklyylisubstituoitu alkyyli, heterosyklyylisubstituoitu amino, karboksialkyylisubstituoitu aryylialkyyli, oksokarbosyklyylifuusioitunut aryyli ja heterosyklyylialkyyli;

ryhmänä R_2 tulevat kyseeseen vety, aryyli, alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli ja ryhmät R_2 ja R_3 voivat yhdessä atomien kanssa, joihin ne ovat liittyneet, muodostaa heterosyklin;

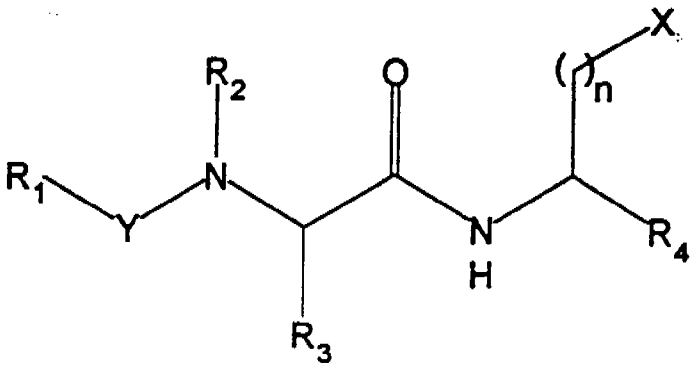
ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryylialkyyli, aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, hydroksyylisubstituoitu alkyyli, alkoksyylisubstituoitu alkyyli, aryylialkoksyylisubstituoitu alkyyli, aminosubstituoitu alkyyli, (aryylisubstituoitu alkyylioksikarbonyyliamino)-substituoitu alkyyli, tiolisubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyylisubstituoitu alkyyli, (hydroksyylisubstituoitu alkyylitio)substituoitu alkyyli, tioalkoksyylisubstituoitu alkyyli, asyyliaminosubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, aryylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, morfolinoalkyyli, tiomorfolinoalkyyli, morfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, tiomorfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, [N-(alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli)- tai N,N-(dialkyyli, dialkenyyli tai dialkynyyli)- tai N-alkyyli-N-alkenyyliamino]karbonyylisubstituoitu alkyyli, karboksyylisubstituoitu alkyyli, dialkyyliaminosubstituoitu asyyliaminoalkyyli ja aminohapposivuketjut, joina tulevat kyseeseen arginiini, asparagiini, glutamiini, S-metyylikysteiini, metioniini ja vastaavat sulfoksidi- ja sulfonijohdannaiset, glysiini, leusiini, isoleusiini, alloisoleusiini, t-leusiini, norleusiini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, proliini, alaniini, ornitiini, histidiini, glutamiini, valiini, treoniini, seriini, asparagiinigappo, beeta-syaanialaniini ja allotreonii-

ni ja ryhmät R_2 ja R_3 voivat yhdessä atomien kanssa, joihin ne ovat liittyneet, muodostaa heterosyklin;

ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen aryyli, alkyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, alkenyyli, sykloalkenyyli, alkynyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli, vety, heterosyklyyli, heterosyklyylikarbonyyli, aminokarbonyyli, amido, mono- tai dialkyyliaminokarbonyyli, mono- tai diaryyliaminokarbonyyli, alkyyliaryyliaminokarbonyyli, diaryyliaminokarbonyyli, mono- tai diasyyliaminokarbonyyli, aromaattinen tai alifaattinen asyyli, alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu substituenteilla, joina tulevat kyseeseen amino, hydroksyyli, merkapto, mono- tai dialkyyliamino, mono- tai diaryyliamino, alkyyliaryyliamino, mono- tai diasyyliamino, alkoksyyli, alkeenioksi, aryylioksi, tioalkoksyyli, tioalkeenioksi, tioalkyynioksi, tioaryylioksi ja heterosyklyyli;

n on 0, 1 tai 2.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sinä tulevat kyseeseen yhdisteet, joilla on kaava (I),



(I)

ja (I):n farmaseuttisesti hyväksyttävät johdokset, jossa kaavassa

ryhmänä X tulevat kyseeseen $-CO_2H$, $-PO^-_3H$, $-SO_2R_5$, $-SO_3H$ ja $-OPO^-_3H$;

jolloin ryhmänä R_5 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli,

aryylisubstituoitu alkyyli ja aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli;

ryhmänä Y tulevat kyseeseen -CO-, -SO_2- ja -PO_2-;

ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, aryylifuusioitu sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryyli, aryylisubstituoitu alkyyli ("aryylialkyyli"), aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyylisubstituoitu alkyyli, sykloalkenyylisubstituoitu sykloalkyyli, biaryyli, alkoksyyli, alkeenioksi, alkyynioksi, aryylisubstituoitu alkoksyyli ("aryylialkoksyyli"), aryylisubstituoitu alkeenioksi tai alkyylioksi, alkyyliamino, alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylisubstituoitu alkyyliamino, aryylisubstituoitu alkenyyliamino tai alkynyyliamino, aryylioksi, aryyliamino, N-alkyyliureasubstituoitu alkyyli, N-aryyliureasubstituoitu alkyyli, alkyylikarbonyyliaminosubstituoitu alkyyli ja aminokarbonyylisubstituoitu alkyyli;

ryhmänä R_2 tulevat kyseeseen vety, aryyli, alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli;

ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen alkyyli, alkenyyli, alkynyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, aryylialkyyli, aryylisubstituoitu alkenyyli tai alkynyyli, hydroksyylisubstituoitu alkyyli, alkoksyylisubstituoitu alkyyli, aryylialkoksyylisubstituoitu alkyyli, aminosubstituoitu alkyyli, (aryylisubstituoitu alkyylioksikarbonyyliamino)-substituoitu alkyyli, tiolisubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyylisubstituoitu alkyyli, (hydroksyylisubstituoitu alkyylitio)substituoitu alkyyli, tioalkoksyylisubstituoitu alkyyli, asyyliaminosubstituoitu alkyyli, alkyylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, aryylisulfonyyliaminosubstituoitu alkyyli, morfolinoalkyyli, tiomorfolinoalkyyli, morfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, tiomorfolinokarbonyylisubstituoitu alkyyli, [N-(alkyyli, alkenyyli tai alkynyyli)- tai N,N-(dialkyyli, dialkenyyli tai dialkynyy-

li)- tai N-alkyyli-N-alkenyyliamino]karbonyylisubstituoitu alkyyli, karboksyylisubstituoitu alkyyli, dialkyyliamino-substituoitu asyyliaminoalkyyli ja aminohapposivuketjut, joina tulevat kyseeseen arginiini, asparagiini, glutamiini, S-metyylikysteiini, metioniini ja vastaavat sulfoksidi- ja sulfonijohdannaiset, glysiini, leusiini, isoleusiini, alloisoleusiini, t-leusiini, norleusiini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, proliini, alaniini, ornitiini, histidiini, glutamiini, valiini, treoniini, seriini, asparagiinigappo, beeta-syaanialaniini ja allotreoniini;

ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen aryyli, alkyyli, sykloalkyyli, sykloalkenyyli, alkenyyli, sykloalkenyyli, alkynyyli ja aryylisubstituoitu alkyyli;

n on 0, 1 tai 2.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että X on $-CO_2H$.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 on aryylisubstituoitu C_{1-4}-alkyyliryhmä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 on (N-Ar'-urea)parasubstituoitu aryylialkyyliryhmä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 on (N-Ar'-urea)parasubstituoitu fenyylimetyyliryhmä.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen bentsyylioksi, syaanimetyyli, sykloheksyylimetyyli, metyyli, n-heksyyli, N-fenyyliamino, fenyyli, fenyylikarbonyyli, fenyylimetyyli, t-butoksyyli, t-butyyliamino, 1-indanyyli, 1-naftyylimetyyli, 1-fenyylisyklopropyyli, 2-(4-hydroksifenyyli)etyyli, 2-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 2-[bis(fenyylisulfo-

nyyli)amino]fenyylimetyyli, 2-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 2-aminofenyylimetyyli, 2-bentsamidofenyylimetyyli, 2-bromi-4-hydroksi-5-metoksifenyylimetyyli, 2-hydroksifenyylimetyyli, 2-naftyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, 2-pyridyylimetyyli, 2-kinolinyyli, 2-[4-(N'-fenyyliurea)fenyyli]etyyli, 3-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)propyyli, 3-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 3-asetamidofenyylimetyyli, 3-aminofenyylimetyyli, 3-bentsamidofenyylimetyyli, 3-hydroksi-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-hydroksifenyylimetyyli, 3-indolyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyylirea)fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metyyli-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-nitrofenyylimetyyli, 3-fenyylipropyyli, 3-pyridyylimetyyli, 4-(2-aminobentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-(morfolinokarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]-3-metoksifenyylimetyyli, 4-[N'-(2-etyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-isopropyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyyli-3-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-nitrofenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-t-butyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-tiatsolyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-kloorifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(4-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-bentsyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-sykloheksyyli-urea)fenyylimetyyli, 4-(N'-etyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-isopropyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-metyyliurea)-fenyylimetyyli, 4-(N'-p-tolyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyyliami-

no, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-t-butyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(fenyyliaminokarbonyyliaminometyyli)fenyyli, 4-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 4-(t-butoksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-asetamidofenyylimetyyli, 4-aminofenyyliamino, 4-aminofenyylimetyyli, 4-bentsamidofenyylimetyyli, 4-kloorifenyylimetyyli, 4-hydroksi-3-nitrofenyylimetyyli, 4-hydroksifenyylimetyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, 4-nitrofenyyliamino, 4-nitrofenyylimetyyli, 4-fenasetamidofenyylimetyyli, 4-fenyylifenyylimetyyli, 4-pyridyylimetyyli, 4-trifluorimetyylifenyylimetyyli, 4-[2-(N'-metyyliurea)bentsamido]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyli-N''-metyyliguanidino)fenyylimetyyli, 5-(N'-fenyyliurea)pentyyli, 5-(N'-t-butyyliurea)pentyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, 2,2-difenyylimetyyli, 2,3-bentsosyklobutyyli, 3,4-dihydroksifenyylimetyyli, 3,5-dimetoksi-4-hydroksifenyylimetyyli, 4-(1-indolikarboksyyliamino)fenyylimetyyli, 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli, 4-(1,3-bentsoksatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli, 4-(1,3-imidatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli, 3-karboksi-1-fenyylipropyyli; 3-hydroksi-4-(2-metyylifenyyli)ureafenyylimetyyli; 3-hydroksi-2-(2-kloorifenyyli)ureafenyylimetyyli; 6-(fenyyliurea)heptyyli, 4-(fenyyliurea)butyyli; 2-tienyylimetyyli; 4-(2,6-dimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-butoksi-4-(2-metyylifenyyli)ureafenyylimetyyli; 3-butoksi-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(N-2-pyratsinyyliurea)fenyylimetyyli; 2-fenyylietynyyli; 5-fenyyliurea-2-pyridyylimetyyli; 5-(2-metyylifenyyliurea)-2-pyridyylimetyyli; 4-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 3-nitro-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-asyyliamino-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(N-fenyyli-N-metyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-asetyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-propionyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsyylioksi-2-pyridyyli-

urea)fenyylimetyyli; 3-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(indolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 2-[4-fenyylirea)fenyyli]oksiranyyli; 4-(N-fenyyli-N'-metyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-dimetyyliaminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsimidatsolyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsoksatsolyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsotiatsolyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(tetrahydrokinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 1,3-dimetyyli-3-(fenyyliurea)butyyli; hydroksietyylitiometyyli; 4-(fenyyliurea)-fenyylietenyyli; 3-amino-4-(fenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(4-hydroksifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-aminofenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-[(2-metyyliurea)fenyyliurea)fenyyli; 2-(2-hydroksifenyyliurea)-3-metoksifenyylimetyyli; 4-(2-metyylisulfonyylimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-metyylifenyyliurea)tetrahydro-2-pyrimidonyylimetyyli; 3-metoksi-4-(fenyyliurea)-3-pyridyylimetyyli; 4-(2-trifluorimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli; 4-[2,4(1H,3H)-kinatsoliinidionyyli)fenyylimetyyli; 4-tioureafenyylimetyyli; 4-(fenyylitiourea)fenyylimetyyli; 4-(pyrrolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-bentsoksatsolinonyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(bentsyylioksiurea)fenyylimetyyli; 4-(tiatsolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-bentsoyyliureafenyylimetyyli; hydroksyyliureafenyylimetyyli; N'-metyyli-N'-hydroksyyliureafenyylimetyyli; 4-(N'-allyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-pyrrolidinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(1-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(propyyliurea)fenyylimetyyli; 4-metoksiurea)fenyylimetyyli; 4-(dimetyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-kinatsolinyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-furanoyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2-hydroksi-6-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-pyridyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(3-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(3-fluorifenyyliurea)fenyylime-

tyyli; 4-(4-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-kinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(isokinolinyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(2,3-dimetyylifenyyliurea)-fenyylimetyyli; 4-(2,5-dimetyylifenyyliurea)fenyylimetyyli;4-(2-metyyli-4-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2-metyyli-3-fluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-karboksi-3-fenyylipropyyli; 4-(5-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(4-hydroksi-2-metyylifenyyliurea)fenyylimetyyli; 4-(2,4-difluorifenyyliurea)fenyylimetyyli; 3-dibentsofuranyylikarbonyyli; 4-(fenoksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 3-fenyyliureapropyyli; 4-(fenyyliaminokarbonyylioksi)fenyylimetyyli; 4-sinnamoyylifenyylimetyyli; dibentsofuranyylimetyyli; 4-(2-metyylifenyyliaminokarbonyylioksi)fenyylimetyyli; (metyylifenyyliurea)fenyyliamino; 4-(3-indolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 4-(fenyyliaminokarbonyyli)fenyylimetyyli; 4-fenyylialkynyylifenyylimetyyli; 4-(3-pyrrolyylikarbonyyliamino)fenyylimetyyli; 5-nitrobentsofuran-2-yyli; 5-(2-metyylifenyyliurea)bentsofuran-2-yyli; 3-karboksi-3-fenyylipropyyli; 2-(3-pyridyyli)tiatsol-4-yyli; 2-(4-pyridyyli)tiatsol-4-yyli; 2-okso-, ja 4-okso-4,5,6,7-tetrahydrobentso[b]furan-3-yyli; 3-metoksi-4-(fenyylikarbamoyylioksi)fenyylimetyyli; 5-aminobentsofuran-2-yyli; bentsilyyliaminofenyylimetyyli ja 4-[N-2-karboksietyyli-1-(1,3-bentsodioksolyl-5-yyli)amino-N-leusinyyliasetamidyylifenyyliurea]fenyylimetyyli.

8. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen bentsyylioksi, syaanimetyyli, sykloheksyylimetyyli, metyyli, n-heksyyli, N-fenyyliamino, fenyyli, fenyylikarbonyyli, fenyylimetyyli, t-butoksyyli, t-butyyliamino, 1-indanyyli, 1-naftyylimetyyli, 1-fenyylisyklopropyyli, 2-(4-hydroksifenyyli)etyyli, 2-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 2-[bis(fenyylisulfonyyli)amino]fenyylimetyyli, 2-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 2-aminofenyylimetyyli, 2-bentsamidofenyylimetyyli,

2-bromi-4-hydroksi-5-metoksifenyylimetyyli, 2-hydroksifenyylimetyyli, 2-naftyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, 2-pyridyylimetyyli, 2-kinolinyyli, 2-[4-(N'-fenyyliurea)fenyyli]etyyli, 3-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-(N'-fenyyliurea)propyyli, 3-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 3-asetamidofenyylimetyyli, 3-aminofenyylimetyyli, 3-bentsamidofenyylimetyyli, 3-hydroksi-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-hydroksifenyylimetyyli, 3-indolyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyylirea)fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metyyli-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 3-nitrofenyylimetyyli, 3-fenyylipropyyli, 3-pyridyylimetyyli, 4-(2-aminobentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsamido)fenyylimetyyli, 4-(bentsyylioksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-(morfolinokarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-kloorifenyyli)urea]-3-metoksifenyylimetyyli, 4-[N'-(2-etyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-isopropyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyyli-3-pyridyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-nitrofenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-t-butyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-tiatsolyyli)-urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-kloorifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metoksifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(4-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(3-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-bentsyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-sykloheksyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-etyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-isopropyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-metyyliurea)-fenyylimetyyli, 4-(N'-p-tolyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyyliamino, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-t-butyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(fenyyliaminokarbonyyliaminometyy-

li)fenyyli, 4-(fenyylisulfonamido)fenyylimetyyli, 4-(t-butoksikarbonyyliamino)fenyylimetyyli, 4-asetamidofenyylimetyyli, 4-aminofenyyliamino, 4-aminofenyylimetyyli, 4-bentsamidofenyylimetyyli, 4-kloorifenyylimetyyli, 4-hydroksi-3-nitrofenyylimetyyli, 4-hydroksifenyylimetyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, 4-nitrofenyyliamino, 4-nitrofenyylimetyyli, 4-fenasetamidofenyylimetyyli, 4-fenyylifenyylimetyyli, 4-pyridyylimetyyli, 4-trifluorimetyylifenyylimetyyli, 4-[2-(N'-metyyliurea)bentsamido]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyli-N''-metyyliguanidino)fenyylimetyyli, 5-(N'-fenyyliurea)pentyyli, 5-(N'-t-butyyliurea)pentyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, 2,2-difenyylimetyyli, 2,3-bentsosyklobutyyli, 3,4-dihydroksifenyylimetyyli, 3,5-dimetoksi-4-hydroksifenyylimetyyli, 4-(1-indolikarboksyyliamino)fenyylimetyyli, 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli, 4-(1,3-bentsoksatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli ja 4-(1,3-imidatsol-2-yyliamino)fenyylimetyyli.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen 4-hydroksifenyylimetyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli, 4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-(N'-3-metyyli-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli ja 3-metoksi-4-(N'-2-pyridyyliurea)fenyylimetyyli.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_1 tulevat kyseeseen 4-hydroksifenyylimetyyli, 3-metoksi-4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-(N'-fenyyliurea)fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli, 4-[N'-(2-pyridyyli)urea]fenyylimetyyli, 3-metoksi-4-[N'-

(2-metyylifenyyli)urea]fenyylimetyyli ja 6-metoksi-5-[N'-(2-metyylifenyyli)urea]-2-pyridyylimetyyli.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että Y on karbonyyliryhmä.

12. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_2 on vety, metyyli tai fenyyliasyyli.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_2 on vety.

14. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 4-(metyylisulfonyyliamino)butyyli, 4-asetyyliaminobutyyli, aminometyyli, bentsyyli, butyyli, hydroksimetyyli, isobutyyli, metyyli, metyylitiometyyli, fenyylimetyyli, propyyli, 4-(bentsyyliloksikarbonyyliamino)butyyli, N,N-(metyylipropargyyli)amino, 2-(metyylitio)etyyli, 2-(morfolino-N-karbonyyli)etyyli, 2-(N-morfolino)etyyli, 2-(N,N-dimetyyliamino)etyyli, 4-aminobutyyli, 4-bentsyylioksifenyylimetyyli, 2-bentsyylitiometyyli, t-butoksikarbonyyliaminometyyli, s-butyyli, t-butyyli, N,N-dimetyyliaminokarbonyylimetyyli, 1,1-etano, 4-hydroksifenyylimetyyli, 1-hydroksietyyli, 1-metoksietyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, bentsyylioksimetyyli, bentsyylitiometyyli, karbonyylimetyyli, 2-metyylisulfinyylietyyli, morfolino-N-karbonyylimetyyli, tiomorfolino-N-karbonyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, aspragiinisivuketju, proliinisivuketju, 2-tiatsolyylimetyyli, 4-(fenyyliurea)butyyli; 4-(metyyliurea)butyyli; morfolinokarbonyylimetyylitiometyyli; morfolinoetyylitiometyyli; 3-pyridyylimetyyli; 4-metyylisulfonyyliaminobutyyli; hydroksimetyylitiometyyli, 2-metyylisulfonyylietyyli, 4-propionyyliaminobutyyli; 4-etoksikarbonyyliaminobutyyli; metoksikarbonyyliaminobu-

tyyli; karbometoksimetyylitiometyyli; 4-t-butyyliureabutyyli; karboksimetyylitiometyyli; dimetyyliamidometyylitiometyyli; asetyyliaminopropyyli; 3-metyyliureapropyyli; 4-biotinoyyliaminobutyyli; 2-tienyylimetyyli; 3-pyridyylimetyyli; 4-trifluoriasetyyliaminobutyyli; dimetyyliaminometyylitiometyyli; dimetyyliaminoetyylitiometyyli; 4-(dimetyyliaminoasetyyliamino)butyyli tai se muodostaa yhdessä ryhmän R_2 kanssa proliini-, atsetidiini- tai pipekoliinirenkaan.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 4-(metyylisulfonyyliamino)butyyli, 4-asetyyliaminobutyyli, aminometyyli, bentsyyli, butyyli, hydroksimetyyli, isobutyyli, metyyli, metyylitiometyyli, fenyylimetyyli, propyyli, 4-(bentsyyliloksikarbonyyliamino)butyyli, N,N-(metyylipropargyyli)amino, 2-(metyylitio)-etyyli, 2-(morfolino-N-karbonyyli)etyyli, 2-(N-morfolino)-etyyli, 2-(N,N-dimetyyliamino)etyyli, 4-aminobutyyli, 4-bentsyylioksifenyylimetyyli, 2-bentsyylitiometyyli, t-butoksikarbonyyliaminometyyli, s-butyyli, t-butyyli, N,N-dimetyyliaminokarbonyylimetyyli, 1,1-etano, 4-hydroksifenyylimetyyli, 1-hydroksietyyli, 1-metoksietyyli, 4-metoksifenyylimetyyli, bentsyylioksimetyyli, bentsyylitiometyyli, karbonyylimetyyli, 2-metyylisulfinyylietyyli, morfolino-N-karbonyylimetyyli, tiomorfolino-N-karbonyylimetyyli, 2-fenyylietyyli, aspragiinisivuketju, proliinisivuketju ja 2-tiatsolyylimetyyli.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen isobutyyli, 2-(metyylitio)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 4-asetyyliaminobutyyli, 4-(metyylisulfonyyliamino)butyyli ja 4-(etoksikarbonyyliamino)butyyli.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_3 tulevat kyseeseen isobutyyli, 2-(metyylitio)etyyli, 3-(hydroksipropyylitio)metyyli, 2-(metyylisulfonyyli)etyyli, 4-asetyyliaminobutyyli ja 4-(metyylisulfonyyliamino)-butyyli.

18. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen 4-karbometoksifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-metoksifenyyli, bentsyyli, metyyli, fenyyli, fenyylimetyyli, fenyylietyyli, 4-kloorifenyyli, 3,4-difluorifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli, 2-metoksifenyyli, 3-metoksifenyyli, 4-metoksifenyyli, 2-nitrofenyyli, 3-pyridyyli, 4-fenoksifenyyli; 4-etoksifenyyli; 4-nitrofenyyli; 4-asetyyliaminofenyyli; 4-metyyliureafenyyli; 2-fluorifenyyli; naftyyli; 3-fluorifenyyli; 3-nitrofenyyli; vety; 2-nitrofenyyli; 4-syaanifenyyli; 3-metoksifenyyli; 4-metyylisulfonyyliamino; 3-syaanifenyyli; 4-propionyyliamino; 4-aminofenyyli; 3-aminofenyyli; 4-trifluorimetoksifenyyli; 4-metyylifenyyli; 4-amino-3-nitrofenyyli; 4-hydroksi-3-metoksifenyyli; 4-heksyloksifenyyli; 4-metyyltiofenyyli; 3-furanyyli; 4-dimetyyliaminofenyyli; 3-hydroksi-4-nitrofenyyli; n-pentyyli; karboksimetyyli; 2-karboksietyyli; etynyyli; 2-tienyyli; 2-propenyyli; 2-propynyyli; metyyli ja propyyli.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen 4-karbometoksifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-metoksifenyyli, bentsyyli, metyyli, fenyyli, fenyylimetyyli, fenyylietyyli, 4-kloorifenyyli, 3,4-difluorifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli, 2-metoksifenyyli, 3-metoksifenyyli, 4-metoksifenyyli ja 2-nitrofenyyli.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen 4-metoksifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli,

4-fluorifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-karbometoksifenyyli, fenyylietyyli, fenyylimetyyli, allyyli, etynyyli ja 3,4-metyleenidioksifenyyli.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että ryhmänä R_4 tulevat kyseeseen 4-metoksifenyyli, 3,4-dimetoksifenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-karboksifenyyli, 4-karbometoksifenyyli, fenyylietyyli ja fenyylimetyyli.

22. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että Y on CO, CH_2 tai SO_2.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että Y on CO.

24. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että n on 1.

25. Patenttivaatimuksen 2 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sinä tulevat kyseeseen BIO-1006, BIO-1056, BIO-1089, BIO-1179, BIO-1194, BIO-1221, BIO-1224, BIO-1238, BIO-1245, BIO-1246, BIO-1248, BIO-1270, BIO-1282, BIO-1294, BIO-1321, BIO-1336, BIO-1382 ja BIO-1400.

26. Patenttivaatimuksen 1 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sinä tulevat kyseeseen BIO-1218, BIO-1272, BIO-1311, BIO-1319, BIO-1345, BIO-1347, BIO-1358, BIO-1361, BIO-1388, BIO-1390, BIO-1393, BIO-1396, BIO-1429, BIO-1444, BIO-1474, BIO-1475, BIO-1490, BIO-1515, BIO-1525, BIO-1526, BIO-1536, BIO-1594, BIO-1648, BIO-1655, BIO-1721, BIO-1725, BIO-1726, BIO-1727, BIO-1728, BIO-1729, BIO-1730, BIO-1731 ja BIO-1732.

27. Patenttivaatimuksen 1 mukainen soluadheesiota inhiboiva yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sinä tulevat kyseeseen BIO-1218, BIO-1272, BIO-1311, BIO-1347,

BIO-1393, BIO-1429, BIO-1515, BIO-1725, BIO-1726, BIO-1727, BIO-1728, BIO-1729, BIO-1730, BIO-1731 ja BIO-1732.

28. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää soluadheesiota ehkäisevästi, inhiboivasti tai tukahduttavasti vaikuttavan määrän minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 27 mukaista yhdistettä sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi vaikuttavaa ainetta, jona tulevat kyseeseen kortikosteroidit, keuhkoputkia laajentavat aineet, antiastmaattiset aineet, anti-inflammatoriset aineet, reumalääkkeet, immuunisuppressantit, antimetaboliitit, immuunimodulaattorit, psoriasislääkkeet ja diabeteslääkkeet.

30. Menetelmä nisäkkäässä tapahtuvan soluadheesion ehkäisemiseksi, inhiboimiseksi tai tukahduttamiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainitulle nisäkkäälle annetaan patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukaista farmaseuttista koostumusta.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua menetelmää käytetään soluadheesioon liittyvän tulehduksen ehkäisemiseksi, inhiboimiseksi tai tukahduttamiseksi.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua menetelmää käytetään soluadheesioon liittyvän immuuni- tai autoimmuunireaktion ehkäisemiseksi, inhiboimiseksi tai tukahduttamiseksi.

33. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua menetelmää käytetään sairauden hoitoon tai ehkäisyyn, jona sairautena tulevat kyseeseen astma, artriitti, psoriasis, siirteiden hylkiminen, multippeliskleroosi, diabetes ja suolistotulehdus.