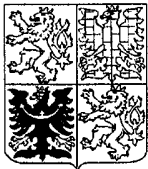


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.08.1997**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.08.1996**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/024284**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)
(86) PCT číslo: **PCT/US97/14756**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/07696**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 551

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 211/06
A 61 K 31/445
A 61 K 38/05
A 61 P 7/02

(71) Přihlašovatel:

RHONE-POULENC RORER
PHARMACEUTICALS INC., Collegeville, PA, US;

(72) Původce:

Chrzan Zofia J., Sellersville, PA, US;
Mencel James J., Lansdale, PA, US;
Toledo-Velasquez David, Lansdale, PA, US;
Windisch Vincent, Green Lane, PA, US;
Woodward Rick G., Harleysville, PA, US;
Salazar Diane C., Wayne, PA, US;
Vemuri Narasimha M., Phoenixville, PA, US;
Gardetto Anthony J., Oley, PA, US;
Powers Matthew R., Barto, PA, US;
Kubiak Gregory G., Wilmington, DE, US;
Liu Robert C., Walnut Creek, CA, US;
Vanasse Benoit J., Collegeville, PA, US;
Sherbine James P., Voorhees, NJ, US;
Rodriguez Walter, Douglasville, PA, US;
Sledeski Adam W., Collegeville, PA, US;

(74) Zástupce:

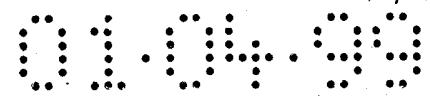
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Stabilní, nehygrokopická krystalická forma N-
[N-[N-
(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]ových
derivátů

(57) Anotace:

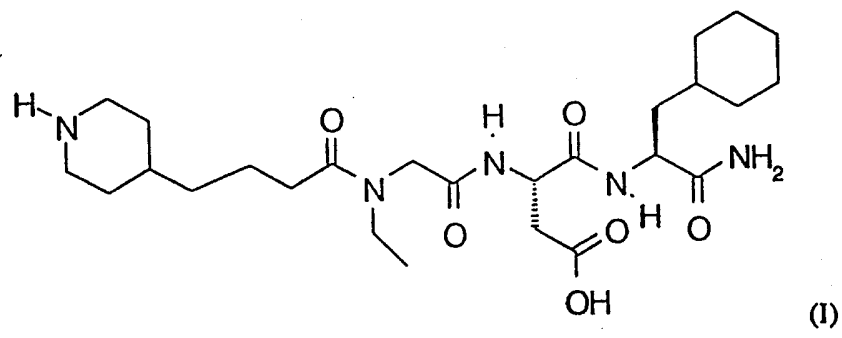
Stabilní, nehygrokopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]ových derivátů, která má antithrombické účinky, zahrnující inhibici shlukování destiček a vytváření thrombu u savců a je užitečná při prevenci a léčení thrombosis spojené s chorobnými stavy, jako je infarkt myokardu, mrtvice, onemocnění periferních arterií a roztroušené intravaskulární koagulace.



Stabilní, nehygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]ových derivátů

Oblast techniky

Vynález se týká nehygroskopické stálé krystalická formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu obecného vzorce I

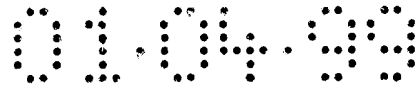


kteřý má antithrombické účinky, zahrnující inhibici shlukování destiček a vytváření thrombu u savců a je užitečná při prevenci a léčení thrombosis spojené s chorobnými stavy, jako je infarkt myokardu, mrtvice, onemocnění periferních arterií a roztroušené intravaskulární koagulace.

Kromě toho se vynález týká způsobu přípravy krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu obecného vzorce I, farmaceutických prostředků, které ho obsahují a meziproductů pro jejich přípravu.

Dosavadní stav techniky

Hemostasis, biochemie krevní srážlivosti, je neobyčejně složitý jevem, při kterém normální plná krev a tělesná tkáň spontánně zastaví krvácení z poraněných žil. Efektivní hemostasis vyžaduje kombinovanou aktivitu cévních, destičkových

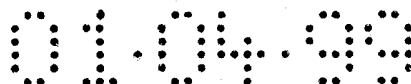


a plasmatických faktorů stejně jako řídicí mechanismus k zabránění nadměrné srážlivosti a trombotických následků. Poruchy, nedostatečnost nebo nadměrnost kterékoli z těchto tří složek mohou vést k hemoragickým a thrombotickým důsledkům.

Ulpívání destiček, rozptylování a agregace extrabuněčných matric jsou ústředními ději při vytváření thrombu. Tyto děje zprostředkovává rodina adhesivních glykoproteinů, tedy fibrinogenu, fibronektinu a Willebrandova faktoru. Fibrinogen je spolupracujícím činitelem při agregaci destiček, zatímco fibronektin podporuje připoutávání destiček a rozptylové reakce a von Willebrandův faktor je významný při připoutávání destiček a rozptylování na subendotheliální matrice. Poloha vazebních míst fibrinogenu, fibronektinu a Willebrandova faktoru byla lokalizována na proteinový komplex destičkových membrán, známý pod jménem glykoprotein IIb/IIIa.

Adhesivní glykoproteiny, jako fibrinogen, se nespojují s normálně klidovými destičkami. Jsou-li však destičky aktivovány agonistem, jakým je například thrombin nebo adenosindifosfát, změní destičky svůj tvar, pravděpodobně k zajištění dostupnosti vazebních míst GPIIb/IIIa pro fibrinogen. Sloučení na podle vynálezu blokuje fibrinogenní receptor a má tudíž shora uvedené antithrombické účinky.

Zjistilo se, že přítomnost Arg-Gly-Asp (RGD) ve fibrinogenu, fibronektinu a von Willebrandově faktoru je nutnou podmínkou pro jejich interakci s receptorem povrchu buněk (Ruoslahti E., Pierschbacher, Cell 44, str. 517 až 518, 1986). Zdá se, že i dvě další sekvence aminokyselin se podílejí na funkci fibrinogenu spojování destiček, jmenovitě sekvence Gly-Pro-Arg a sekvence dodekapeptidu His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val. Ukázalo se, že malé syntetické peptidy obsahující RGD nebo dodekapeptid se vážou na receptor GPIIb/IIIa destiček a konkurenčně zabraňují vazbě fibrinogenu, fibronektinu a von



Willebrandova faktoru stejně jako brání agregaci aktivovaných destiček (Plow a kol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, str. 8057 až 8061, 1985; Ruggeri a kol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. str. 5708 až 5712, 1986; Ginsberg a kol.. J.Biol. Chem. 260, str. 3931 až 3936, 1985; a Gartner a kol., J. Biol. Chem. 260, 11, str. 89 až 94, 1987).

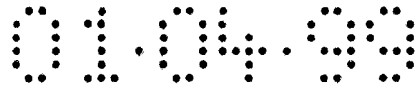
Tjoeng a kol. (americký patentový spis číslo 5 037 808 a 4 879 313) uvádí, že sloučeniny indolyly, obsahující asparagyllové podíly guanidinoalkanoylu a guanonidinoalkanoylu, jsou inhibitory agregace destiček.

V americkém patentovém spise číslo 4 992 463 (uděleném 12. února 1991) uvádí Tjoeng a kol., že řada arylových a aralkylových mimetických sloučenin guanidinoalkylového peptidu vykazuje inhibiční účinky vůči agregaci destiček a specificky popisuje řadu monomethoxyfenylpeptidových mimetických a dimethoxyfenylpeptidových mimetických sloučenin a mimetickou sloučeninu bifenylalkylpeptid.

V americkém patentovém spise číslo 4 857 508 (uděleném 15. srpna 1989) uvádí Adams a kol., že řada derivátů guanidinoalkylpeptidu, obsahující koncové aralkylové substituenty, vykazuje inhibiční působení na agregaci destiček a uvádí specificky řadu bifenylových a naftylových derivátů O-methyltyrosinu obsahujících funkčnost koncového aminu.

Haverstick, D.M. a kol. (Blood 66 (4), str. 946 až 952, 1985) uvádí, že řada syntetických peptidů, včetně Arg-Gly-Asp-Ser a Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, je schopna inhibovat thrombinem vyvolanou agregaci destiček.

Plow, E.F. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, str. 3711 až 3715, 1982) uvádí, že tetrapeptid glycyl-L-prolyl-L-arginyl-L-prolin inhibuje vazbu fibrinogenu na lidské destičky.



Ve francouzské přihlášce vynálezu číslo 86/17507, podané 15. prosince 1986, se uvádí, že deriváty tetrapeptidu, pentapeptidu a hexapeptidu, obsahující sekvenci -Arg-Gly-Asp-, jsou užitečnými antithrombickými činidly.

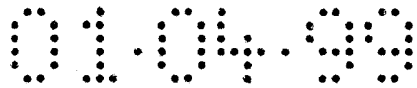
V americkém patentovém spise číslo 4 683 291 (uděleno 28. července 1987) uvádí Zimmerman a kol., že řada peptidů, zahrnujících šest až čtyřicet aminokyselin, které obsahují sekvenci -Arg-Gly-Asp-, je inhibítorem vazby destiček.

V evropské přihlášce vynálezu číslo O 319 506, zveřejněné 7. června 1989, se uvádí, že řada tetrapeptidových, pentapeptidových a hexapeptidových derivátů obsahujících sekvenci -Arg-Gly-Asp-, je inhibítorem agregace destiček.

Cyklické peptidové analogy, obsahující podíl Gly-Asp, jsou uváděny v americkém patentovém spise číslo 5 023 233 jako antagonisty fibrinogenového receptoru.

Peptidy a pseudopeptidy obsahující amino-, guanidino-, imidazoloylové a/nebo amidinoalkanoylové a alkenoylové podíly, se uvádějí jako antithrombická činidla v amerických přihláškách vynálezu, které jsou dosud v řízení, číslo 07/677 006, podané 28. března 1991, číslo 07/534 385, podané 7. června 1990, a 07/460 777, podané 4. ledna 1990, a v americkém patentovém spise číslo 4 952 562 a v mezinárodní přihlášce vynálezu číslo PCT/US90/05448 podané 25. září 1990, jejichž autorem je autor tohoto vynálezu.

Peptidy a pseudopeptidy obsahující podíly amino-, guanidino- alkybenzoylové a alkenylbenzoylové, fenylakanoylové a fenylakenoylové se uvádějí jako antithrombická činidla v americké přihlášce vynálezu, která je dosud v řízení, číslo 07/475 043, podané 5. února 1990, a v mezinárodní přihlášce vynálezu číslo PCT/US91/02471, podané 11. dubna 1991, zveřejněné



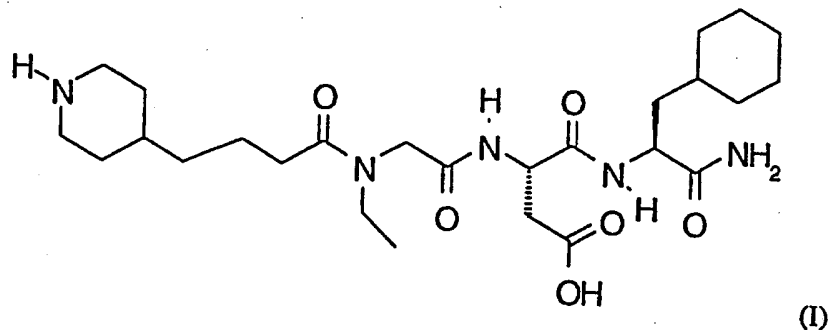
zejména N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamid, které inhibují agregaci destiček a vytváření thrombu u savců a jsou užitečné při prevenci a léčení trombózy. N-[N-[N-(4-(Piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamid podle světového patentového spisu PCT číslo WO95/10295, je amorfni, hygroskopický a je fyzikálně nestabilní, jelikož váže vodu. Světový patentový spis PCT číslo WO95/10295 neuvádí nehygroskopickou stabilní krystalickou formu N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu.

Ve světovém patentovém spise PCT číslo WO95/10295 se uvádí, že azacykloalkylalkanoylové peptidy a pseudopeptidy se připravují obecně postupy syntézy peptidů v pevné fázi nebo v roztoku, přičemž se používá výchozích materiálů a/nebo snadno dostupných meziproductů od společností dodávajících chemikálie, jako je Aldrich nebo Sigma (H. Paulsen, G. Merz, V. Weichart, "Solid-Phase Synthesis of Glycopeptide Sequences" [Syntéza v pevné fázi glykopeptidových sekvencí] *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 1988; H. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli a P. Grogg, "Peptide Synthesis by a Combination of Solid-Phase and Solution Methods I; A New Very Acid-Labile Anchor Group for the Solid-Phase Synthesis of Fully Protected Fragments, [Peptidová syntéza kombinací způsobů v pevné fázi a v roztoku. Nová velice kyselinově labilní kotvicí skupina pro syntézu v pevné fázi plně chráněných fragmentů], *Tetrahedron Letters* 29, str.4005, 1988); Merrifield, R.B. "Solid-Phase Peptide Synthesis after 25 Years: The Design and Synthesis of Antagonists of Glucagon" [Syntéza peptidu v pevné fázi po 25. letech: Konstrukce a syntéza antagonistů glukagonu], *Macromol. Chem. Macromol. Symp.* 19, str. 31, 1988). Kromě toho se ve světovém patentovém spise PCT číslo WO95/10295 uvádí, že amorfni a hygroskopická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu se připra-

tetraazacykloalkylalkynoylpeptidů a pseudopeptidů.

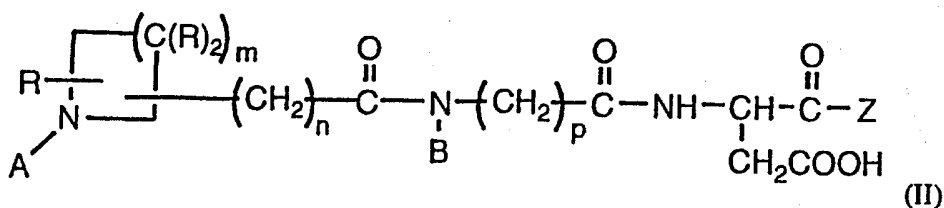
Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nehygroskopická stabilní krystalická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]- (L)-asparagyl]- (L)-β-cyklohexylalaninamidu obecného vzorce I,



kteřá podle vynálezu má antithrombotické účinky, včetně inhibice agregace destiček a vytváření thrombu u savců a je užitečná při prevenci a léčení thrombosis spojené s chorobnými stavy, jako je infarkt myokardu, mrtvice, onemocnění periferních arterií a roztroušené intravaskulární koagulace. Kromě toho se vynález týká způsobu přípravy nehygroskopické stabilní krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethyl-glycyl]- (L)asparagyl]- (L)-β-cyklohexylalaninamidu a farmaceutických prostředků, které ji obsahují a meziproductů pro její přípravu.

Dále se vynález týká způsobu přípravy derivátu tetra-aza-cykloalkylalkanoylpeptidu nebo pseudopeptidu obecného vzorce II

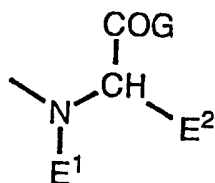


kde znamená

A atom vodíku

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

Z skupinu



E¹ atom vodíku,

E² α -uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α -aminokyseliny, atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, heterocyklylovou, substituovanou heterocyklylovou, heterocyklylalkylovou, substituovanou skupinu heterocyklylalkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, na které jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh,

G skupinu OR¹ nebo NR¹R²,

R¹ a R² na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

R atom vodíku, skupinu alkylovou, arylovou nebo aralkylovou,

m číslo 1 až 5

n číslo 0 až 6 a

p číslo 1 až 4,

a zejména nehygroskopické stabilní krystalické formy N-[N-[N-[4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu.

Vynález blíže objasňuje následující podrobný popis a připojené obrázky.

Přehled obrázků

Na obr. 1 je obrazec práškové rentgenové difrakce vzorku nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu připravené podle příkladu 13, způsob A.

Na obr. 2 je obrazec práškové rentgenové difrakce vzorku nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu připravené podle příkladu 13, způsob B (a).

Na obr. 3 je obrazec práškové rentgenové difrakce vzorku nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu připravené podle příkladu 13, způsob B (b).

Na obr. 4 je obrazec práškové rentgenové difrakce vzorku hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu připravené podle příkladu 14.

Na obr. 5 je obrazec práškové rentgenové difrakce vzorku

nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)-butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]- (L)- β -cyklohexylalaninamidu připravené podle příkladu 14.

Na obr. 6 je mikrokolorimetrický graf uvolněné energie jako funkce času pro tři různé pokusy, které byly provedeny podle popisu v příkladu 15. Pokusy byla sledována tepelná činnost různých krystalických forem N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu, vystavených působení par různých rozpouštědel. Stopa (A) na obr. 6 ukazuje, že byl-li hygroskopický N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)-butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamid, připravený podle příkladu 5 nebo 11, vystaven působení 80% relativní vlhkosti (nasycený roztok chloridu draselného) po dobu 30 hodin při teplotě 40 °C, během níž exponovaná hygroskopická forma sloučeniny se promění na nehygroskopickou formu, dochází k silné exothermické reakci. Stopa (B) na obr. 6 ukazuje neexothermickou reakci, ke které dochází, je-li hygroskopický N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)-butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamid, připravený podle příkladu 5 nebo 11, vystaven působení par methanolu při teplotě 40 °C (rozpuštědla jiného než voda, ve které je sloučenina rozpustná) a methanol tedy nepodporuje mobilitu uvnitř krystalů této formy při konvezi na nehygroskopickou formu. Stopa (C) na obr. 6 ukazuje neexothermickou konverzi, ke které dochází, když je nehygroskopický N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamid, připravený podle příkladu 13, vystaven působení 80% relativní vlhkosti při teplotě 40 °C a nehygroskopická forma sloučeniny tedy nepodléhá za těchto podmínek konverzi, je tudíž stabilní formou.

Na obr. 7 je mikrokolorimetrický graf uvolněné energie jako funkce času pro tři různé pokusy, které byly provedeny podle popisu v příkladu 15. Pokusy sledují tepelnou činnost konverse hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)bu-

tanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu na její nehygroskopickou formu, je-li vystavena působení par při 80% relativní vlhkosti při teplotách 40, 50 a 60 °C. Čísla znamenají konversi trvající přibližně 24 hodin při teplotě 40 °C, 6,5 hodin při teplotě 50 °C a 3 hodiny při teplotě 60 °C.

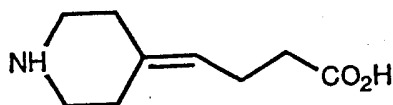
Na obr. 8 je mikrokaloimetrický graf uvolněné energie jako funkce času pro čtyři různé pokusy, které byly provedeny podle popisu v příkladu 15. Pokusy sledují tepelnou činnost konverse hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu na její nehygroskopickou formu, je-li vystavena při teplotě 60 °C působení par při 60% až 65% relativní vlhkosti, 75% relativní vlhkosti, 80% relativní vlhkosti a 100% relativní vlhkosti. Význačná čísla na obr. 8 svědčí o tom, že vyšší relativní vlhkost produkuje rychlejší konverzi. Jiným význakem je, že konverse na nehygroskopickou formu sloučeniny nastává při 100% relativní vlhkosti při teplotě 60 °C bez zkapalnění, které se vyskytuje u hygroskopické formy při teplotě místnosti. Na základě těchto výsledků se očekává, že rychlost konverse na nehygroskopickou formu je značně rychlejší než rychlost zkapalnění hygroskopické formy při teplotě 60 °C.

Na obr. 9 je porovnání závislosti procentového přírůstku hmotnosti na procentové relativní vlhkosti prostředí pro hygroskopickou (■) a nehygroskopickou (●) formu N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)-butanoyl]-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu při teplotě 25 °C zjištěné při pokusu 16. Z obr. 9 vyplývá, že hygroskopická forma pohlcuje více vody než nehygroskopická forma při zvyšování relativní vlhkosti prostředí a výrazněji při relativních vlhkostech větších než 60 %. Kromě toho ukazuje obr. 9, že hygroskopická forma sloučeniny nedsorbuje vlhkost na své původní procento vlhkosti, zatímco nehygroskopická forma sloučeniny na své původní procento vlhkos-

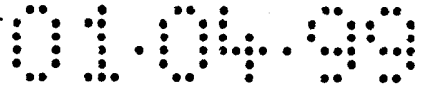
ti desorbuje.

Jednotlivé používané zkratky a výrazy mají následující význam:

BOC	terc.-butoxykarbonyl
CBZ	benzyloxykarbonyl
Gly	glycin
Asp	asparagová kyselina
Obzl	benzyloxy
TFA	trifluoroctová kyselina
Cha	β -cyklohexylalanin
EtOAc	ethylacetát
DMF	dimethylformamid
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
TBTU	(2-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborát
DI	deionizovaná voda
PNP	p-nitrofenol
PFP	pentafluorfenol
DCU	dicyklohexylmočovina
NMM	N-methylmorfolin
MTBE	methyl-terc.-butylether
RH	relativní vlhkost
THF	tetrahydrofuran
PipBu	4-piperidinmásečná kyselina
PipBuen	(4-piperidin)butylidenylkarboxylová kyselina vzorce



Výrazem "pacient" se vždy míní člověk nebo jiný savec.



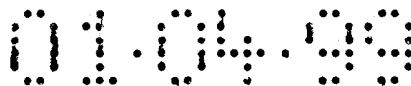
Výrazem "farmaceuticky vhodná sůl" se vždy míní sůl mateřské sloučeniny obecného vzorce I, která je poměrně neškodná pro pacienta, pokud se použije v terapeutické dávce, přičemž se příznivé farmaceutické vlastnosti mateřské sloučeniny obecného vzorce I nenarušují vedlejšími účinky, připisovanými protiiontu sloučeniny ve formě soli. Farmaceuticky vhodná sůl zahrnuje obojetný iont nebo vnitřní sůl sloučeniny obecného vzorce I.

Výrazem "alkyl" se vždy míní nasčená alifatická uhlovodíková skupina s přímým nebo s rozvětveným řetězcem mající 1 až 20 atomů uhlíku. Rozvětvením se míní, že je nižší alkylová skupina, například skupina methylová, ethylová nebo propylová vázána na lineární alkylový řetězec. Výhodnými alkylovými skupinami s přímým nebo s rozvětveným řetězcem jsou nižší alkylové skupiny, což jsou alkylové skupiny s 1 až 10 atomy uhlíku. Nejvýhodnějšími alkylovými skupinami jsou alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku.

Výrazem "cykloalkyl" se vždy míní nasčená karbocyklická skupina s jedním nebo s několika kruhy mající 3 až 10 atomů uhlíku. Jakožto výhodné cykloalkylové skupiny se uvádějí skupina cyklopropylová, cyklobutylová, cyklopentylová, cyklohexylová, cykloheptylová a dekahydronaftylová skupina.

Výrazem "cykloalkylalkyl" se vždy míní alkylová skupina substituovaná cykloalkylovou skupinou. Jakožto výhodné cykloalkylalkylové skupiny se uvádějí skupina cyklopentylmethylová, cyklohexylmethylová, cyklohexylethylová, dekahydronaft-1-ylmethylová a dekahydronaft-2-ylmethylová skupina.

Výrazem "alkylcykloalkyl" se vždy míní cykloalkylová skupina substituovaná alkylovou skupinou. Příkladně se uvádějí skupina 1-, 2-, 3- nebo 4- methylcyklohexylová nebo ethylcyklohexylová.



Výrazem "alkylcykloalkylalkyl" se vždy míní alkylová skupina substituovaná alkylcykloalkylovou skupinou. Příkladně se uvádějí skupina 1-, 2-, 3- nebo 4- methylcyklohexylmethylová nebo ethylcyklohexylmethylová nebo 1-, 2-, 3- nebo 4- methylcyklohexylethylová nebo ethylcyklohexylethylová skupina.

Výrazem "azacykloalkan" se vždy míní nasycený alifatický kruh obsahující atom dusíku. Výhodné azacykloalkanové skupiny zahrnují skupinu pyrolidinovou a piperidinovou.

Výrazem "přírodně se vyskytující α -aminokyselina" se vždy míní glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, cystein, methionin, prolin, hydroxyprolin, kyselina asparagová, asparagin, glutamin, glutamová kyselina, histidin, arginin, ornithin a lysin.

Výrazem " α -uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α -aminokyselina" se vždy míní podíl, který substituuje α -uhlíkový atom přírodně se vyskytující α -aminokyseliny. Příkladně se jako α -uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α -aminokyseliny uvádí skupina isopropylová, methylová a karboxymethylová pro valin, alanin a asparagovou kyselinu.

Výrazem "skupina chránící aminoskupinu" se vždy míní snadno odstranitelná skupina, o které je známo, že chrání aminoskupinu před nežádoucími reakcemi v průběhu přípravy a která je selektivně oddělitelná. Použití skupin, chránících aminoskupinu, je v oboru ke chránění aminoskupiny před nežádoucími reakcemi v průběhu přípravy obecně známé (příkladně se uvádí T.H. Green a P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2. vydání, John Walley & Sons, New Yourk, 1991). Jakožto výhodné skupiny ke chránění aminoskupiny se příkladně uvádějí skupina formylová, acetylová, chloracetylová, trichloracetylová, o-nitrofenylacetylová, o-nitrofenoxyacetylová, trifluoracetylová, acetoacetylová, 4-chlorbutyrylová, isobutyrylová, o-

nitrocinnamoylová, pikolinoylová, acylisothiokyanátová, aminokaproylová a benzoylová skupina a acyloxyskupiny, jako jsou skupina methoxykarbonylová, 9-fluorenylmethoxykarbonylová, 2-2,2-trifluorethoxykarbonylová, 2-trimethylsilylethoxykarbonylová, vinyloxykarbonylová, allyloxykarbonylová, terc.-butyloxykarbonylová (BOB), 1,1-dimethylpropinyloxykarbonylová, benzyloxykarbonylová (CBZ), p-nitrobenzyloxykarbonylová a 2,4-dichlorbenzyloxykarbonylová skupina.

Výrazem "kyselá labilní skupina chránící aminoskupinu" se vždy míní shora definovaná skupina chránící aminoskupinu, která se snadno odstraňuje kyselinou zatímco zůstává poměrně stabilní k působení jiných činidel. Výhodnou kyselou labilní skupinou, chránící aminoskupinu, je terc.-butyloxykarbonylová skupina (BOB).

Výrazem "k hydrogenaci labilní skupina chránící aminoskupinu" se vždy míní shora definovaná skupina chránící aminoskupinu, která se snadno odstraňuje hydrogenací zatímco zůstává poměrně stabilní k působení jiných činidel. Výhodnou k hydrogenaci labilní skupinou chránící aminoskupinu je benzyloxykarbonylová (CBZ).

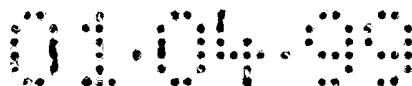
Výrazem "skupina chránící kyselinovou skupinu" se vždy míní snadno odstranitelná skupina, o které je známo, že chrání skupinu karboxylové kyseliny (-COOH) před nežádoucími reakcemi v průběhu přípravy a která je selektivně oddělitelná. Použití skupin, chránících karboxylovou skupinu, je v oboru ke chránění skupiny karboxylové kyseliny před nežádoucími reakcemi v průběhu přípravy obecně známé (příkladně se uvádí T.H. Green a P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2. vydání, John Walley & Sons, New Yourk, 1991). Jakožto výhodné skupiny ke chránění skupiny karboxylové kyseliny se příkladně uvádějí skupina methoxymethylová, tetrahydropyranylová, benzyloxymethylová, substituovaná a nesubstituovaná skupina fena-

cylová, 2,2,2-trichlorethylová, terc.-butinylová, cinnamylová, substituovaná a nesubstituovaná skupina benzylová a skupina trimethylsilylová, a podíly amidů a hydrazidů, jako je skupina N,N-dimethylová, 7-nitroindolylová, hydrazidová a N-fenylhydrazidová.

Výrazem "k hydrogenaci labilní skupina chránící kyselinovou skupinu" se vždy míní shora definovaná skupina chránící kyselinovou skupinu, která se snadno odstraňuje hydrogenací zatímco zůstává poměrně stabilní k působení jiných činidel. Výhodnou k hydrogenaci labilní skupinou chránící kyselinovou skupinu je benzylová skupina.

Výrazem "aryl" se vždy míní fenylová nebo naftylová skupina substituovaná jednou nebo několika substituenty arylových skupin, které jsou stejné nebo různé, přičemž se "substituentem arylových skupin" míní příkladně skupina alkylová, alkenylová, alkinylová, arylová, arylalkylová, hydroxylová, alkoxykupina, aryloxykupina, aralkoxykupina, skupina hydroxyalkylová, acylová, formylová, karboxykupina, skupina alkenylová, aroylová, atom halogenu, skupina trifluormethylová, kyanoskupina, skupina alkoxykarbonylová, aryloxykarbonylová, aralkoxykarbonylová, acylaminoskupina, aroylaminoskupina, skupina karbamoylová, alkylkarbamoylová, dialkylkarbamoylová, arylkarbamoylová, aralkylkarbamoylová, alkylsulfonylová, alkylsulfinylová, arylsulfonylová, arylsulfinylová, aralkylsulfonylová, aralkylsulfinylová nebo skupina vzorce $-NR_aR_b$, kde znamená R_a a R_b na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, arylovou nebo aralkylovou.

Výrazem "aralkyl" se vždy míní alkylová skupina substituovaná arylovou skupinou. Jakožto výhodná aralkylová skupina se uvádí skupina benzylová, naft-1-ylmetylová, naft-2-ylmetylová a fenethylová skupina.



Výrazem "substituovaný aralkyl" se vždy míní aralkylová skupina substituovaná v arylovém podílu jednou nebo několika substituenty arylových skupin.

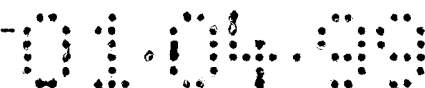
Výrazem "heterocyklyl" se vždy míní přibližně 4- až 15-členný monocyklický nebo multicyklický kruhový systém, přičemž jeden nebo několik atomů kruhu je jiných než atom uhlíku, přičemž je to například atom dusíku, kyslíku nebo síry. Jakožto výhodné heterocyklylové skupiny se uvádějí skupina pyridylová, pyrimidylová a pyrrolidylová skupina.

Výrazem "substituovaný heterocyklyl" se vždy míní heterocyklylová skupina substituovaná jednou nebo několika substituenty arylových skupin.

Výrazem "heterocyklylalkyl" a "substituovaný heterocyklylalkyl" se vždy míní alkylová skupina substituovaná heterocyklylovou skupinou nebo substituovanou heterocyklylovou skupinou.

Výrazem "hygroskopicitá" se vždy míní sorpce množství nebo stavu vody dostatečné k ovlivnění fyzikálních nebo chemických vlastností látky (Eds. J. Swarbrick a J. C. Boylan, Encyclopedia of Pharmaceutical technology, sv. 10, str. 33).

Výhodnou sloučeninou, připravenou způsobem podle vynálezu, je sloučenina obecného vzorce II, kde znamená E² atom vodíku, skupinu alkylovou, hydroxymethylovou, 1-hydroxyethylovou, merkaptomethylovou, 2-methylthioethylovou, karboxymethylovou, 2-karboxyethylovou, 4-aminobutylovou, 3-guanidinopropylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, heterocyklylovou, substituovanou heterocyklylovou, heterocyklylalkylovou, substituovanou skupinu heterocyklylalkylovou, nebo E¹



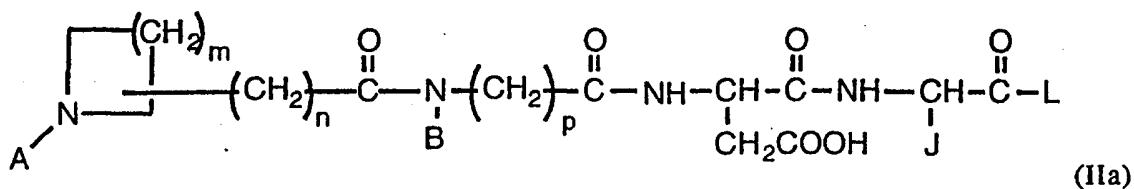
a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, se kterými jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh, za podmínky, že heterocyklylalkylová skupina je jiná než skupina indo-3-ylmethylovu.

Výhodnější sloučeninou, připravenou způsobem podle vynálezu, je sloučenina obecného vzorce II, kde znamená E² atom vodíku, skupinu alkylovou, hydroxymethylovou, 1-hydroxyethylou, merkaptomethylovou, 2-methylthioethylou, karboxymethylovou, 2-karboxyethylou, 4-aminobutylovou, 3-guanidinopropylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, se kterými jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh.

Ještě výhodnější sloučeninou, připravenou způsobem podle vynálezu, je sloučenina obecného vzorce II, kde znamená E² atom vodíku, skupinu alkylovou, hydroxymethylovou, 1-hydroxyethylou, merkaptomethylovou, 2-methylthioethylou, karboxymethylovou, 2-karboxyethylou, 4-aminobutylovou, 3-guanidinopropylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, se kterými jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh.

Další výhodnější sloučeninou, připravenou způsobem podle vynálezu, je sloučenina obecného vzorce II, kde znamená B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou skupinu.

Obzvláště výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce IIa



kde znamená

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou a alkylaralkylovou,

J atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou arylovou, aralkylovou, substituovanou aralkylovou, alkylarylovou a alkylaralkylovou,

L skupinu OR^1 nebo NR^1R^2 ,

R^1 a R^2 na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

m číslo 1 až 5,

n číslo 2 až 6 a

p číslo 1 nebo 2.

Obzvláště výhodnějšími jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce IIa, kde znamená

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou,

J atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cyklo-

alkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou,

m číslo 3 a

n číslo 3 nebo 4.

Obzvláště ještě výhodnějšími jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce IIa, kde znamená

B skupinu alkylovou,

J skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou,

R¹ a R² na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou,

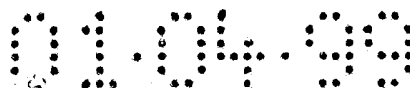
m číslo 3,

n číslo 3 nebo 4 a

p číslo 1.

Především obzvláště výhodnou je podle vynálezu sloučenina obecného vzorce IIa, kterou je N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamid.

Vynález se týká také způsobu přípravy stabilní, nehygroscopické krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu. Podle vynálezu tato forma sloučeniny je schopná vyvinout stabilní prostředek sloučeniny podle vynálezu. Stabilní nehygroscopická krystalická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninami-

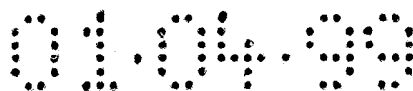


du má také vysokou teplotu tání a nemá sklon absorbovat vodu. Stabilní forma má také jedinečnou a neočekávanou odolnost proti vlhkosti a teplotě i při vyšších hodnotách, než jsou běžné při dopravě, výrobě dávkovacích forem nebo při dlouhodobé dopravě nebo při dlouhodobém skladování. Tyto vlastnosti usnadňují výrobu dávkovacích forem. Konverze sloučeniny na stabilní formu nevede ke ztrátě materiálu nebo jeho čistoty a nemá nepříznivý vliv na vlastnosti částic.

Vynález zahrnuje všechny možné kombinace výhodných sloučenin, zvláště výhodných a obzvláště výhodných provedení shora uvedených.

Sloučenina podle vynálezu je užitečné ve formě volné zásady nebo kyseliny, podvojně soli nebo ve formě farmaceuticky vhodné soli. Vynález všechny tato provedení zahrnuje.

Pokud je sloučenina podle vynálezu substituovaná zásaditou skupinou, připravuje se adiční sůl s kyselinou, která je jednoduchou a běžnější formou pro použití. V praxi je častější použití soli než volné zásady. Kyselinou, které se může používat pro přípravu adiční soli s kyselinou, je s výhodou kyselina, která s volnou zásadou vytváří farmaceuticky vhodnou sůl, tedy sůl, jejíž aniont je pro pacienta netoxický ve farmaceutické dávce soli, takže příznivě inhibuje jev agregace destiček a vytváření thrombu jako volná zásada a nemá vedlejší vlivy, které by se připisovaly aniontu. Jakkoliv se dává přednost farmaceuticky vhodným solím volných zásad, jsou všechny adiční soli s kyselinou užitečné jako forma volné zásady, pokud je určitá sůl, jako taková žádoucí toliko jako meziproduct, například, když se sůl připravuje pouze pro účely čištění a identifikace, nebo jestliže se jí používá jakožto meziproductu pro přípravu farmaceuticky vhodné soli při iontové výměně. Farmaceuticky vhodné soli, které spadají do rozsahu vynálezu, se příkladně odvozují od kyselin ze souboru, který zahrnuje minerální kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, sírová,



fosforečná a sulfamová a organické kyseliny, jako je kyselina octová, citronová, mléčná, vinná, malonová, methansulfonová, ethansulfonová, benzensulfonová, p-toluensulfonová, cyklohexylsulfamová a chinová kyselina. Jakožto odpovídající adiční soli s kyselinou se uvádějí hydrohalogeniny, například hydrochlorid a hydrobromid, sulfát, nitrát, sulfamát, acetát, citrát, laktát, vinan, malonát, methansulfonát, ethansulfonát, benzensulfonát, p-toluensulfonát, cyklohexylsulfamát a chinát.

Adiční soli s kyselinou sloučenin podle vynálezu se mohou připravovat reakcí volné zásady se vhodnou kyselinou o sobě známými nebo upravenými způsoby. Například se adiční sůl s kyselinou sloučenin podle vynálezu může připravovat rozpuštěním volné zásady ve vodně alkoholickém roztoku nebo v jiném vhodném rozpouštědle obsahujícím vhodnou kyselinu a izolací soli odpařením roztoku nebo reakcí volné zásady a kyseliny v organickém rozpouštědle, přičemž se sůl přímo oddělí nebo se může získat zahuštěním roztoku.

Volné sloučeniny podle vynálezu se mohou regenerovat ze solí použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů. Například se mateřské sloučeniny podle vynálezu mohou regenerovat ze svých adičních solí s kyselinou zpracování alkálií, například vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného nebo vodným amoniakálním roztokem.

Pokud je sloučenina podle vynálezu substituovaná kyselou skupinou, připravuje se adiční sůl se zásadou, která je jednoduchou a běžnější formou pro použití. V praxi je častější použití soli než volné kyseliny. Zásadou, které se může používat pro přípravu adiční soli se zásadou je s výhodou zásada, která s volnou kyselinou vytváří farmaceuticky vhodnou sůl, tedy sůl, jejíž kaniont je pro pacienta netoxický ve farmaceutické dávce soli, takže příznivě inhibuje jev agregace destiček a vytváření thrombu jako volná zásada a nemá vedlejší vlivy,



• které by se připisovaly kaniontu. Farmaceuticky vhodné soli zahrnují například soli s alkalickými kovy a s kovy alkalických zemin. Farmaceuticky vhodné soli, které spadají do rozsahu vynálezu, jsou soli odvozené příkladně od následujících zásad: hydrid sodný, hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid vápenatý, hydroxid hlinitý, hydroxid lithný, hydroxid hořečnatý, hydroxid zinečnatý, amonium, ethylendiamin, N-methylglukamin, lysin, arginin, ornithin, cholin, N,N'-dibenzylethylendiamin, chlorprocain, diethanolamin, procain, N-benzylfenethylamin, diethylamin, piperazin, tris(hydroxymethyl)aminomethan a tetramethylamoniumhydroxid.

• Kovové soli sloučenin podle vynálezu se mohou připravovat reakcí sloučeniny ve formě volné kyseliny se zásadou ze souboru zahrnujícího například hydrid, hydroxid, uhličitan a podobnou reaktivní sloučeninu zvoleného kovu o sobě známými nebo upravenými způsoby ve vodném nebo v organickém rozpouštědle. Vodným používaným rozpouštědlem může být voda nebo směs vody a organického rozpouštědla, s výhodou alkoholu, například methanolu nebo ethanolu, ketonu, například acetonu, alifatického etheru, například tetrahydrofuranu nebo esteru, například ethylacetátu. Takové reakce se zpravidla provádějí při teplotě místnosti, mohou se však provádět také za zahřívání.

• Aminové soli sloučenin podle vynálezu se mohou připravovat reakcí sloučeniny ve formě volné kyseliny s aminem ve vodném nebo v organickém rozpouštědle. Vodným používaným rozpouštědlem může být voda nebo směs vody a organického rozpouštědla, s výhodou alkoholu, například methanolu nebo ethanolu, etheru, například tetrahydrofuranu nebo nitrilu, například acetonitrilu nebo ketonu, například acetonu. Amoniové soli sloučenin ve formě kyseliny se mohou připravovat podobným způsobem.

• Volné sloučeniny podle vynálezu se mohou regenerovat ze solí použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů. Na-

příklad se mateřské sloučeniny podle vynálezu mohou regenerovat ze svých adičních solí se zásadou zpracováním kyselinou, například kyselinou chlorovodíkovou.

Jakkoliv jsou užitečné aktivní sloučeniny podle vynálezu jako takové, jsou soli sloučenin podle vynálezu užitečné pro účely čištění připravovaných sloučenin, za využívání například rozdílné rozpustnosti solí a mateřské sloučeniny, vedlejších produktů a/nebo výchozích látek o sobě známými způsob pro pracovníky v oboru.

Sloučeniny podle vynálezu mohou obsahovat asymetrická centra. Tato asymetrická centra mohou být na sobě nezávisle v R nebo v S konfiguraci. Pracovníkům v oboru je zřejmé, že určité sloučeniny obecného vzorce I mohou vykazovat geometrický isomerismus. Geometrické isomery zahrnují cis a trans formy sloučenin podle vynálezu majících alkenylové podíly. Vynález zahrnuje individuální geometrické isomery a stereoisomery a jejich směsi.

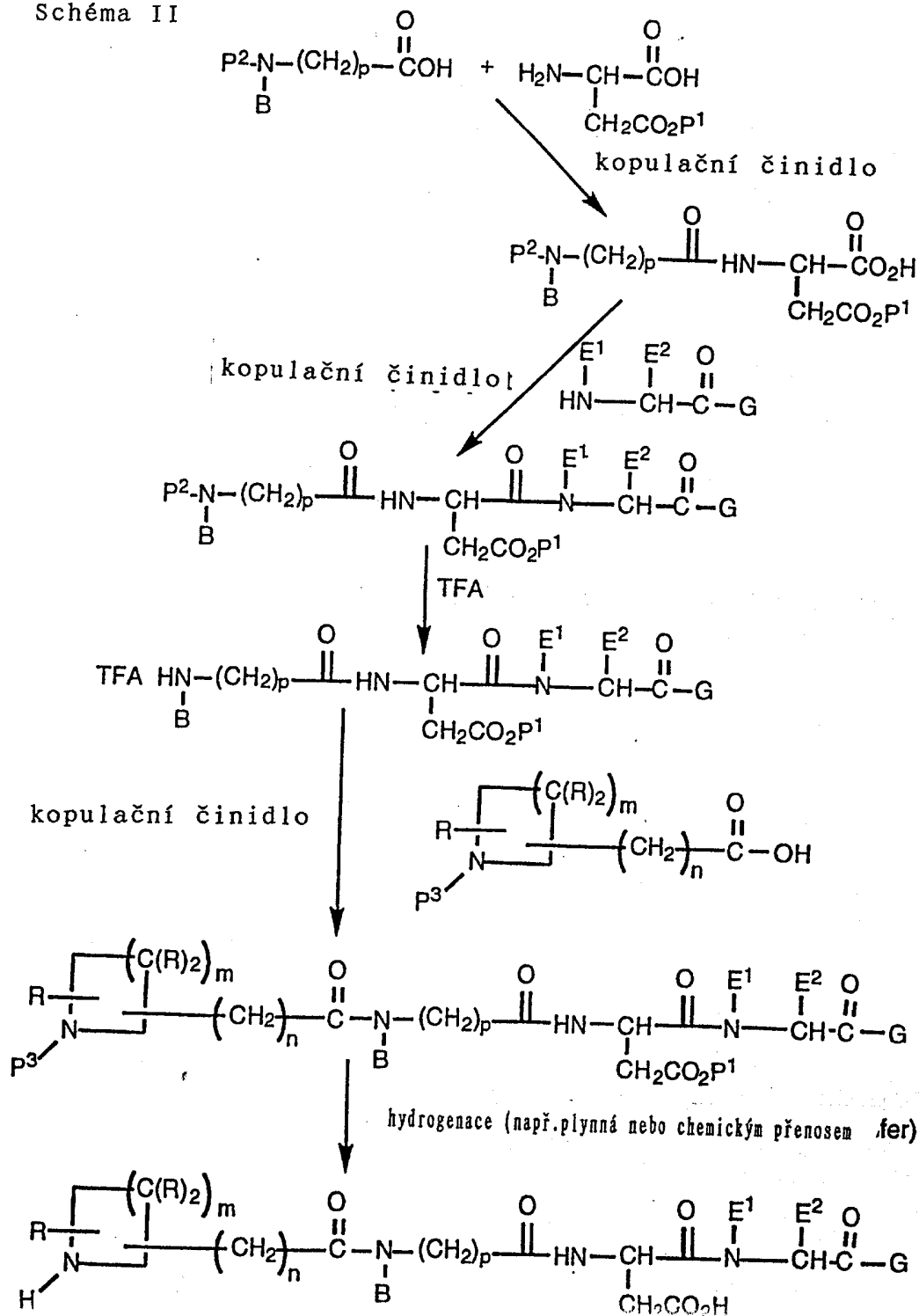
Takové isomery se mohou oddělovat ze směsí použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů, jako jsou například chromatografické způsoby a překrystalovávání nebo se mohou připravovat odděleně ze vhodných isomerů nebo z jejich meziproduktů, například použitím nebo přizpůsobením shora popsaných způsobů.

Americké přihlášky vynálezu číslo 08/138 820 a 08/476 750 popisují způsoby přípravy amorfnní sloučeniny obecného vzorce II a zvláště amorfnní sloučeniny obecného vzorce I.

Nový způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce II a zvláště krystalické sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu objasňuje schéma II, přičemž B, E¹, E², G, R, m, n a p mají shora uvedený význam a P¹ znamená při hydrogenaci labilní sku-

pinu chránící kyselinovou skupinu, například skupinu benzylo-
vou, P² labilní skupinu chránící aminoskupinu, například sku-
pinu terc.-butoxykarbonylovou (BOC) a P³ při hydrogenaci la-
bilní skupinu chránící aminoskupinu, například skupinu benzyl-
oxykarbonylovou (CBZ).

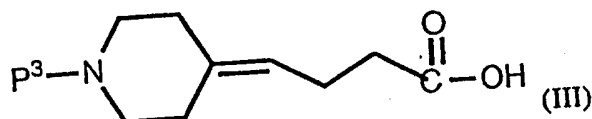
Schéma II



V průběhu přípravy sloučenin obecného vzorce I nebo jejich meziproductů může být žádoucí nebo nutné předcházet sesítující reakci mezi chemicky aktivními substituenty na přírodně se vyskytujících aminokyselinách nebo pseudoaminokyselinách. Takové substituenty se mohou chránit o sobě známými chránícími skupinami, které se následně mohou odstraňovat nebo se mohou popřípadě ponechávat za použití o sobě známých způsobů k dosažení žádaného produktu nebo meziproductu (například T.H. Green Protective Groups in Organic Synthesis, Walley New York, 1981). Selektivní zavádění a odstraňování chránící skupiny mohou být rovněž nutné nebo žádoucí k předcházení konverze nebo odstranění existujících substituentů nebo k umožnění následující reakce k dosažení žádaného produktu.

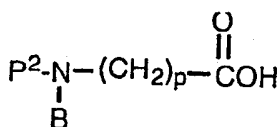
Způsob podle schéma II je příkladným způsobem přípravy sloučeniny obecného vzorce II, připomíná se však, že se sloučenina obecného vzorce I může rovněž tímto způsobem připravit za použití vhodných výchozích látek. Při přípravě sloučeniny obecného vzorce I způsobem podle schéma II znamená B skupinu ethylovou, E¹ atom vodíku, E² cyklohexylmethylovou skupinu, G aminoskupinu, R atom vodíku, m číslo 3, n číslo 3, p číslo 1, P¹ skupinu benzylovou, P² skupinu terc.-butoxykarbonylovou (BOC) a P³ skupinu benzyloxykarbonylovou (CBZ).

Alternativně se sloučenina obecného vzorce I způsobem podle vynálezu připravuje stejně jako podle schéma II s tou výjinkou, že se se použije sloučeniny obecného vzorce III



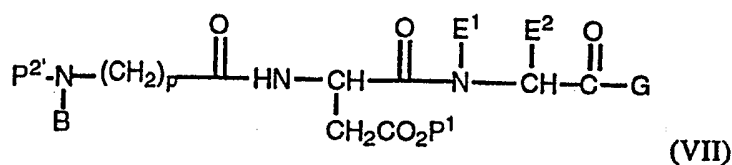
kde má P³ shora uvedený význam, místo sloučeniny obecného vzorce IV

například N-methylmorfolinu, přičemž se reakce provádí přibližně za teploty místnosti až přibližně za teploty 40 °C. Aktivace aminokyseliny nebo pseudoaminokyseliny obecného vzorce



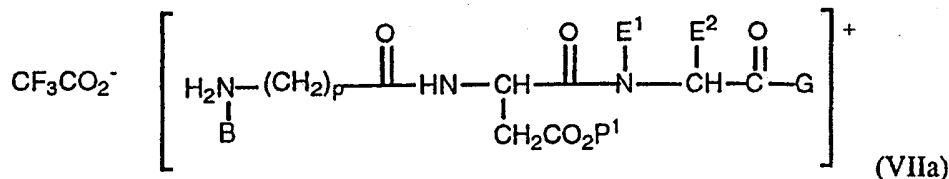
kde B, P² a p mají shora uvedený význam, pro kopulaci se může provádět za použití neizolovaných aktivních esterů p-nitrofenolem, pentafluorfenolem a N-hydroxysukcinimidem přes dicyklohexylkarbodiimid. Doba kopulace je 1 až 20 hodin v závislosti na použitých aminokyselinách nebo pseudoaminokyselinách, které se mají kopulovat, na aktivačním činidle, na rozpouštědle a na teplotě. Centrální dipeptid jakožto produkt stupně 1 se neizoluje. Reakční směs se ve stupni 1 zpravidla promývá vodou nebo zředěnou vodnou kyselinou (například vodnou kyselinou chlorovodíkovou) a používá se přímo bez sušení ve stupni 2. V případě, kdy se použije aktivních esterů na fenolové bázi, extrahuje se centrální peptid do alkalického vodého prostředí z reakční směsi a posléze se reextrahuje po okyselení vodného roztoku zpět do organického rozpouštědla; roztok se nechává přímo reagovat jako ve stupni 2.

Dipeptidového meziproductu obecného vzorce VI se používá pro přípravu tripeptidového meziproductu obecného vzorce VII



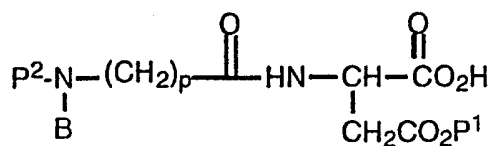
kde B, E¹, E², F, G, P¹ a p mají shora uvedený význam a kde znamená P²' skupinu P² nebo skupinu TFA.H-. Jestliže P²' znamená skupinu TFA.H-, znamená symbol "." disociaci trifluoroc-

tové kyseliny (TFA) na $F_3CCO_2^-$ a H^+ , přičemž H^+ protonuje koncový amin ve sloučenině obecného vzorce VII, to je vytvoření trifluoracetátové soli obecného vzorce VIIa

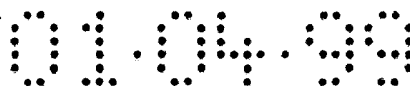


V případě přípravy sloučeniny obecného vzorce I je tripeptidovým meziproduktem podle vynálezu P^2 '-N(Et)Gly-(L)-Asp-(OBzl)-(L)-Cha-NH₂.

Ve stupni 2 se kopulace aminokyseliny nebo pseudoaminokyseliny na centrální dipeptid může provádět buď v dichlormethanu nebo ve směsi ethylacetátu a dimethylformamidu nebo tetrahydrofuranu přibližně za teploty místnosti nebo za nižší teploty než je teplota místnosti. Aktivace centrálního dipeptidu obecného vzorce



kde mají B, P¹, P² a p shora uvedený význam, pro kopulaci se může provádět za použití neizolovaných aktivních esterů pentafluorfenolu nebo N-hydroxysukcinimidu prostřednictvím dicyklohexylkarbodiimidu. Aktivace se také může provádět za použití isopropylchlorformátu. Doba kopulace je 1 až 20 hodin v závislosti na použitých aminokyselinách nebo pseudoaminokyselinách, které se mají kopulovat, na aktivačním činidle, na rozpouštědle a na teplotě. Tripeptid jakožto produkt se neizoluje. Když se tripeptid neizoluje, promývá se reakční směs vodnou organickou zásadou například vodným roztokem N-methylmorfolinu a vodnou kyselinou (například vodnou kyselinou chlorovodíkovou)

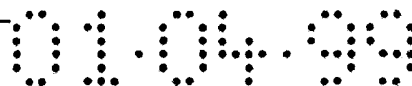


a nechává se reagovat "ve stavu v jakém je" ve stupni 3 po promytí vodou a bez sušení.

Ve stupni 3 podle schéma II se odstraňuje chránící skupina, například skupina BOC z tripeptidu, získaného ve stupni 2, například použitím roztoku trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu nebo použitím směsi bromovodíku v kyselině octové a v ethylacetátu. Reakce se může provádět přibližně za teploty místnosti a vyžaduje přibližně jednu hodinu (v případě způsobu založeného na použití bromovodíku) a přibližně dvě hodiny (v případě způsobu založeného na použití trifluoroctové kyseliny). Sůl kyseliny produkovaného tripeptidu se izoluje odfiltrováním krystalické pevné látky buď přímo z reakční směsi (v případě způsobu založeného na použití bromovodíku) nebo po částečném odstranění rozpouštědla destilací a přidáním nepolárního rozpouštědla do zbytku.

Další způsob podle vynálezu je charakterizován jako jeden řetězený způsob rychlé a jednoduché přípravy TFA.H-N(Et)Gly-(L)-Asp-(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ z BOC-N(Et)Gly-OH, přičemž jde o reakci v jedné nádobě zahrnující první dva kopulační stupně podle schéma II a zpracování trifluoroctovou kyselinou. Jedině se získá TFA.HN(Et)Gly-(L)-Asp-(OBzl)-(L)-Cha-NH₂, jelikož přímo vykristaluje z roztoku řetězové reakce. Tento řetězový způsob vylučuje tři odpovídající oddělené reakční stupně podle schéma 2 a řeší problém přípravy jednoduchým způsobem šetřícím čas a náklady, výhodným pro živodní prostředí.

Schéma II znázorňuje konstrukci polypeptidu v obráceném pořádku, přičemž vychází z aminokyseliny, chráněné na atomu dusíku, a postupně se přidává na karboxylové zakončení na rozdíl od obvyklého pořádku, kdy se polypeptid konstruuje postupnou amidací na amonovém zakončení aminokyseliny s chráněným C-zakončením. Obrácený způsob syntézy podle vynálezu vyžaduje chránění atomu dusíku pouze na první aminokyselině za umožnění



použití od tohoto bodu dopředu směřující postupné aminokyseliny bez chránicí skupiny na buď aminovém nebo kyselinovém zakončení (s výjimkou funkčních skupin postranního řetězce). Obrácený způsob syntézy také racionalizuje výrobu sloučenin obecného vzorce II a zvláště sloučenin obecného vzorce I tím, že umožňuje použít kontinuálního způsobu výroby na rozdíl od přetržitého způsobu normálního pro peptidovou chemii v rprztkové fázi. Nový přístup snižuje náklady odstraněním opatřování aminokyselin chráněných na aminovém zakončení. Není zapotřebí žádných speciálních zařízení, reakčních činidel nebo analytických metod.

Jiným způsobem podle vynálezu je reprodukovatelný způsob přípravy nehygroskopické stálé krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu novou konverzí v pevném stavu z hygroskopické krystalická formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu, připravené způsobem podle schéma II a uváděný jako alternativní reakční stupně.

Hygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu je fyzikálně nestálá a převádí se působením vlhkosti a teploty na vysoce stálou nehygroskopickou krystalickou formu N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu.

Obecné podmínky podle vynálezu pro konverzi z hygroskopická krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu na vysoce stálou nehygroskopickou krystalickou formu N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)-β-cyklohexylalaninamidu se ovlivňují za statických a dynamických podmínek.

Statický způsob podle vynálezu je popisován jako statická konverze, jelikož zahrnuje vystavení hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)- β -cyklohexylalaninamidu v nepohybující se nádobě, jako jsou lékovky nebo mísy za určitých podmínek působení teploty a vlhkosti v komoře seřízeným prostředím. Tato statická konverze se provádí za teploty přibližně 20 až přibližně 80 °C, výhodněji za teploty přibližně 40 až přibližně 80 °C a za reaktivní vlhkosti přibližně 40% až 100%, s výhodou 65% až 80%.

Dynamický způsob podle vynálezu je popisován jako dynamická konverze, jelikož zahrnuje vystavení hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)- β -cyklohexylalaninamidu inkubací za podmínek teploty a vlhkosti jako v případě statického modelu avšak za míchání včetně převracení hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)- β -cyklohexylalaninamidu v rotační odpařovací baňce nebo ve válcové nádobě (ve vlhkostní píce) s lopatkovým mícháním.

Následující příklad praktického provedení vynález blíže objasňují, nijak však vynález neomezují. Procenta a díly jsou míněny hmotnostně, pokud není uvedeno jinak.

Pokud není uvedeno jinak míní se hodnotami hmotové spektrální analýzy výsledky nízko rozlišujícího bombardování rychlým atomem prováděného na zařízení VG 70SE s "vypočtenými" hodnotami (M+H)⁺. Hodnoty nukleárních rezonančních magnetických spekter jsou získány na zařízení Bruker ACF 300 v D₂O. Blesková chromatografie se provádí na silikagelu. Vysokovýkonná kapalinová chromatografie (HPLC) se provádí na C-18 reverzních fázových sloupcích s částicemi o velikosti 8 až 15 μ m.



Pokud není uvedeno jinak jsou obrazce práškové rentgenové difrakce získány za použití difraktometru Siemens D5000 s měděným zdrojem záření (1,8 kW, 45 kV a 40 mA). Vzorky se před měřením melou k eliminaci vlivu velikosti částic produktu na píkove intenzity. Přibližně 60 mg vzorku se vnáší do držáku vzorku 1,5 x 1 cm a odečítání se provádí v oboru 4 až 40° 2 theta (2 θ) se stupněm 0,04° a při celkové expozici jedna sekunda na stupeň.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-OH
(Stupeň 1, schéma II)

Do 3-hrdlé baňky s kulatým dnem se předloží 51 g (0,25 mol) BOC-N(Et)Gly-OH, 35 g (0,25 mol) PNP, 400 ml ethylacetátu a 100 ml dimethylformamidu. Směs se míchá do rozpuštění a ochladí se na teplotu 4 až 6 °C. Během 10 minut se přikape roztok 51,5 g (0,25 mol) dicyklohexylkarbodiimidu ve 125 ml ethylacetátu, přičemž se teplota udržuje na 5 °C až přibližně 8 °C. Když byl přidán veškerý dicyklohexylkarbodiimid, odstraní se chladicí lázeň a směs se míchá 1,5 hodiny, přičemž se zahřeje na teplotu místnosti (20 až 22 °C). Vytvoří se pevná sraženina DCU. Vytvoření esteru PNP se zjistí analytickou chromatografií HPLC (vymizení BOC-N(Et)Gly-OH). Reakční směs se zfiltruje a zbytek DCU se promyje 2 až 50 ml dávkami ethylacetátu a promývací kapalina se přidá k filtrátu. DCU se vyhodí.

Do míchaného zfiltrovaného roztoku se přidá 67 g (0,3 mol) H₂N-(L)-Asp(OBz)-OH v podobě suspence ve 150 ml (138 g, 1,36 mol) NMM. Směs se zahřeje na teplotu 38 až 40 °C a udržuje se na teplotě po dobu 41 hodin, což je doba, při které

analytická HPLC ukáže úplné spotřebování BOC-N(Et)Gly-OPNP. Reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C a nezreagovaný H₂N-(L)-Asp(OBz)-OH se odfiltruje. Roztok se ochladí a znovu zfiltruje, čímž se získá dalších 1,2 g (21,7 g; 11,2 g představuje přidaný 20% přebytek a 10,5 g (0,047 mol) představuje nezreagovaný materiál).

Zfiltrovaný roztok se extrahuje ve 2 l nálevce Squibb jedním dílem 500 ml deionizované vody, následované dvěma 250 ml dávkami. Spojený vodný roztok se extrahuje třemi 300 ml podíly roztoku 1:1 MTBE/EtOAc k odstranění zbývajících PNP (analytická HPLC ukazuje pouze zbývajících stopy), ochladí se na 5 °C a okyselí se z pH 8,9 na hodnotu pH 1,79 přikapáním 150 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Okyselený vodný roztok nevykazuje žádný žádaný produkt. Ethylacetátové extrakty se spojí, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují se a zkoncentrují se na rotační odparce při teplotě 35 °C. Výsledný bleděoranžový olej se přečerpá při teplotě 35 °C k maximálnímu odstranění zbylého rozpouštědla a k získání 85,68 g BOC-N(Et)-Gly-(L)-Asp(OBz)-OH v podobě oleje (21,3 mmol, 85,5% výtěžek nekorigovaný o zbylé rozpouštědlo).

Charakteristika:

NMR (250 Hz): 7,3 ppm (s), 5,1 ppm (s), 3,3 ppm (dq), 3,0 (dq), 1,4 ppm (s), 1,1 (t)

MS:M = 408; M+1 = 409 neleženo

HPLC: 90,79A% (3,87A% p-nitrofenol, neokorigováno na e)

Analýsa: C₂₀H₂₈N₂O₇,

H, N; C nalezeno 57,54, vypočteno 58,81

Příklad 2

Příprava BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂

(Stupeň 2 podle schéma II)

Způsob A: Isopropylchlorformátový způsob

Jeden ekvivalent BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-OH se rozpustí v ethylacetátu (6 až 8 objemů; 1:6,5 hmotnost/objem) a udržuje se na teplotě -15 až 0 °C. Přidá se NMM (1 ekvivalent) při udržování na teplotě -15 až asi 0 °C. Do chráněného isopeptidového roztoku se při teplotě -15 až 0 °C přidá isopropylchlorformát (1 až 1,1 ekvivalent). Reakční směs se udržuje na teplotě -15 až asi 0 °C po dobu 2 až 5 minut. Do studeného dipeptidového roztoku, udržovaného na teplotě -15 až asi 0 °C, se přidá roztok H₂N-(L)-Cha-NH₂ (1 ekvivalent) v THF (10 objemů; 1:10 hmotnost/objem). Reakce se sleduje kontrolními vzorky (HPLC) po 15 minutách, po jedné hodině a dvou 2 hodinách k hodnocení úplnosti reakce. (Reakce je ukončena, když množství pozorovaného peptidu je menší než 10 % na plochu analýsou HPLC).

BOC-tripeptidový produkt se vysráží přímo z reakčního roztoku a z reakční směsi se odfiltruje, promyje se ethylacetát (2x, 1 objem; hmotnost/objem) a vysuší se ve vakuu. Obvyklý výtěžek je >60 % teorie, o čistotě >90A%; <1A% epimerického diastereomeru asparagové kyseliny.

Novým suspendováním v ethylacetátu se získá konečný výtěžek přibližně 60 % teorie BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ se zlepšenou čistotou >95A% při snížení obsahu diastereo- isomeru na <0,5 %.

Specifický příklad isopropylchlorformátové metody, při zachování obecného postupu podle způsobu A a za použití 4,55 g (8,1 mmol) BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-OH poskytuje množství připraveného BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ 3,26 g (97,9 A% čistého 0,3A% diastereomeru) při 70% teoretickém výtěžku.

Způsob B : Způsob za použití komplexu pentafluorofenoldicyklohexylkarbodiimidu

V ethylacetátu se rozpustí pentafluorofenol (PFP, 2,9 ekvivalentu) a dicyklohexylkarbodiimidu (1 ekvivalent) (5 objemů, 1:5 hm/obj) při teplotě místnosti a ochladí se na teplotu -15 až 0°C . V ethylacetátu (6 objemů, 1:6 hm/obj) se rozpustí jeden ekvivalent BOC-N(Et)-Gly-(L)-Asp(OBz)-OH a smísí se s jedním ekvivalentem $\text{H}_2\text{N}-(\text{L})-\text{Cha}-\text{NH}_2$, který byl předem rozpuštěn v dimethylformamidu (10 obj., 1:10 hm/obj). Do roztoku PFP a dicyklohexylkarbodiimidu se přikape roztok dipeptid/ $\text{H}_2\text{N}-(\text{L})-\text{Cha}-\text{NH}_2$ a teplota se udržuje -15 až 0°C . Po dobu 5 až šestnáct hodin se reakční směs udržuje na teplotě 15 až 22°C a kontrolní vzorky (HPLC) se odebírají po 1, 2, 3, 4, a 16 hodinách k hodnocení úplnosti proběhnutí reakce. (Reakce je ukončena, když množství pozorovaného dipeptidu je menší než 2 % na plochu analysou HPLC).

Reakční směs se zfiltruje a filtrační koláč (DCU) se promyje ethylacetátem (2x 0,5 objemů, hm/obj). Filtrát se zpracuje vodou, (10 obj, 1:10 hm/obj) a vodná vrstva se odstraní. Vrstva ethylacetátová se promyje vodou (1x, 5 objemů, 1:5 hm/obj). Vrstva ethylacetátová se ochladí k vysrážení produktu, který se promyje ethylacetátem (2x 0,4 objemy; 1:0,4 hm/obj). Izolované molární zisky jsou >60 % v obvyklé čistotě $>90\text{A}\%$, s 1-4A % epimerního diastereomeru asparagové kyseliny.

Novým suspendováním v ethylacetátu se získá konečný výtěžek přibližně 60 % teorie BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ se zlepšenou čistotou $>99\text{A}\%$ při redukci diastereoisomeru na $<0,5$ %.

Specifický příklad způsobu za použití pentafluorofenoldicyklohexylkarbodiimidu komplexu při zachování obecného postupu podle způsobu B a za použití 10 g (24,5 mmol) BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-OH poskytuje množství připraveného BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ 8,15 g (99 A% čistého, 0,49A % diastereomeru) při 59% teoretickém výtěžku.



Způsob C: Způsob založený na použití systému hydroxybenzotriazol (HOBT)/2-(1H-benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborát (TBTU)

V dimethylformamidu se rozpustí jeden ekvivalent BOC-N(Et)-Gly-(L)-sp(OBzl)-OH (9 až 10 objemů; 1:10 hm/obj) a udržuje se na teplotě místnosti. Do tohoto roztoku se přidá H₂N-(L)-Cha-NH₂, (jeden ekvivalent) a hydroxybenzotriazol (HOBT, 1 ekvivalent). Výsledný roztok se ochladí na přibližně 0 až 10 °C a přidá se NMM (1 až 1,1 ekvivalent). Kopulační činidlo, TBTU (1-1,1 ekvivalent) se rozpustí v dimethylformamidu (4-5 objemů, 1:5 hm/obj) a přidá se do roztoku chráněného dipeptidu při teplotě přibližně 0 až 10 °C. Tento roztok se míchá přibližně 3 hodiny při teplotě přibližně 10 °C až přibližně 25 °C, dokud HPLC neukáže ukončení reakce (méně než 2 % výchozího materiálu na plochu). Do míchané směsi 5% vodného roztoku chloridu sodného (přibližně 4 objemy na reakční objem) se přidá reakční směs a ethylacetát (přibližně 2 objemy na reakční objem). Fáze se oddělí a vodná fáze se extrahuje další dávkou ethylacetátu (přibližně 1,5 objemů na reakční objem). Organická fáze se spojí a promyje se postupně 0,5 N vodným roztokem kyseliny citronové (přibližně 0,6 až 0,7 objemů na objem organické fáze), 10% vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (dvakrát, přibližně 0,6 až 0,7 objemů na objem organické fáze) a 25% roztokem chloridu sodného (přibližně 0,3 až 0,4 objemů na objem organické fáze). Výsledná organická fáze se zkoncentruje na přibližně čtvrtinu až polovinu objemu za sníženého tlaku při teplotě přibližně 30 až 50 °C a do tohoto teplého roztoku se přidá stejný objem heptanu. Směs se míchá a ochladí se na teplotu 0 ° až přibližně 20 °C k vysrážení žádaného tripeptidu. Tato pevná látka se odfiltruje a smísí se s ethylacetát a heptanem a vysuší se. Obvyklý výtěžek je >60 % teorie s obvyklou čistotou >95,7A % epimerního diasteromeru asparagové kyseliny <2A %.

Jako specifický příklad způsobu založeného na použití systému HOBT/TBTU, při sledování obecného způsobu C, se použije 10 g (24,5 mmol) BOC-N(Et)-Gly-(L)-Asp(OBzl)-OH a pak se připraví 9,3 g BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp-(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ při teoretickém výtěžku 67,7% (96,1A % čistého, 1,77A % diastereomeru při Asp).

Hmotové spektrum: M 560,7 vypočteno; M+1 561 nalezeno
teplota tání 182,17 °C (DSC)

¹HNMR (delta vs TMS, D₆ DMSO): 0,89 (m, 1H), 0,94 (m, 1H), 1,0 (dt, 2H), 1,15 (m, 2H), 1,06 až 1,3 (m, 4H), 1,36 (d, 9H), 1,4 až 1,74 (m, 6H), 2,65 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 3,75 (d, 2H), 4,2 (s, 1H), 4,66 (d, 1H), 5,08 (s, 2H), 7,02 (s, 1H), 7,18 (d, 1H), 7,36 (s, 5H), 7,88 (dd, 1H), 8,24 (dd, 1H).

Příklad 3

Příprava TFA-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂
(Stupeň 3, schéma II)

V dichlormethanu (hmotnostně přibližně 1:12) se rozpustí BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ a při teplotě místnosti se do roztoku přidá TFA. Roztok se míchá, dokud HPLC neukáže ukončení reakce (tři až pět hodin). Roztok se zkoncentruje na přibližně polovinu objemu při teplotě 40 až 45 °C. Do tohoto teplého roztoku se při udržování teploty >40 °C přidá MTBE (přibližně 1:10 hm/obj. proti BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂). Směs se ochladí pomalu na teplotu přibližně 5 °C a míchá se jednu hodinu k zajištění úplné krystalizace. Výsledná pevná látka se odfiltruje a ochladí se MTBE. Pevná látka se vysuší za sníženého tlaku a analyzuje se ke zjištění obsahu TFA.N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (test HPLC hm/hm). Výtěžek je obecně téměř kvantitativní, čistota >95A %.

Hmotové spektrum: M 460 (volná zásada) vypočteno; M+1 461 nalezeno

Analýza: C₂₆H₃₇N₄O₇F₃ N, H, F, C 54,35 vypočteno 53,82 nalezeno

$^1\text{H NMR}$ (delta vs TMS, D_6 DMSO): 0,9 (m, 2H), 1,16 (t, 6H), 1,5 (m, 1H), 1,5 až 1,8 (m, 6H), 2,65 (dd, 1H), 2,9 (m, 3H), 3,7 (s, 2H), 3,9 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 5,1 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,2 (s, 5H), 8,13 (d, 1H), 8,7 až 8,8 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (vyčnívající signály, delta vs TMS, D_6 DMSO): 10,76, 25,49, 25,68, 25,96, 31,66, 33,07, 33,36, 36,25, 38,59, 41,88, 47,02, 49,40, 50,47, 65,71, 127,81-128,34, 135,82, 165,10, 169,34, 173,79

Specifické příklady odstraňování chránicí skupiny jsou v tabulce A.

Tabulka A

Lab	Množství reakční škály	Výtěžek a čistota A%
Příklad	(BOC-N(Et)Gly-(L)-Asp-(OBzl)-(L)-Cha-NH ₂)	(TFA.N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH ₂)
1	7,5 g (13,3 mmol)	7,4 g (12,9 mmol) 97% výtěžek 98,8 A% čistý
2	6,53 g (11,6 mmol)	6,4 (11,1 mmol) 97% výtěžek 98,47A% čistý

Příklad 4

Příprava CBZ-PipBu-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂
(Stupeň 4, schéma II)

Připraví se suspence přibližně ekvimolárních množství (TFA.N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂, CBZ-PipBu a TBTU v systému ethylacetát, dimethylformamidu a voda (objemově 100:8:4, přibližně 11:1 obj/hm proti TFA.N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-

(L)-Cha-NH₂. Tato suspence se ochladí na teplotu 0 až 10 °C a přidají se přibližně 3 až 4 ekvivalenty NMM. Směs se nechá ohrát na teplotu místnosti, a míchá se tak dlouho až je podle HPLC reakce ukončena (jednu až tři hodiny, během té doby se objeví roztok). Přidá se voda (2 až 3 X původního přidaného množství) a fáze se nechají oddělit. Vodná fáze se uchová a organická fáze se promyje dvěma dalšími dávkami vody. Tyto spojené vodné promývací kapaliny se zpětně extrahují ethylacetátem a spojené organické fáze se promyjí 25% vodným roztokem chloridu sodného. Organická fáze se zkoncentruje za sníženého tlaku na přibližně polovinu objemu a přidá se MTBE (objemově přibližně polovina vůči objemu roztoku). Směs se nechá vykristalovat (několik hodin) a pevná látka se vysuší za sníženého tlaku. Obsah CBZ-PipBu-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ se analyzuje HPLC, test hmotnost/hmotnost. Výtěžek je zpravidla >80 % teorie, čistota >95A %.

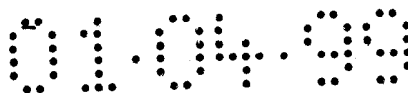
Specifický příklad přípravy při zachování obecného postupu stupně 4, poskytuje 7,25 g TFA.N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ 7,9 g CBZ-PipBu-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (>99A % čistého O,08A% diastereomeru při Asp), teoretický výtěžek 84 % teorie.

Hmotové spektrum: M 747 vypočteno ; M+1 748 nalezeno

Analýza: C₄₁H₅₇N₅O₈ H,N,C 65,84 vypočteno 65,38 nalezeno
teplota tání 101,6 °C (DSC)

¹HNMR (delta vs TMS, CDCl₃): 0,88 (m, 1H), 0,98 (m, 1H) 1,13 (2H), 1,23 (m, 6H), 1,4 (m, 1H), 1,62 až 1,76 (m, 8H), 1,86 (qd, 1H), 2,35 (t, 1H), 2,74 (dd, 2H), 3,25 (dd, 1H), 3,47 (q, 2H), 3,7 (d, 1H), 3,84 (d, 1H), 4,15 (ds, 2H), 4,5 (qd, 1H), 4,68 (dt, 1H), 5,07 (d, 1H), 5,14 (bd, 2H), 5,16 (d, 1H), 7,28 až 7,39, (m, 10H), 7,57 (dd, 1H).

¹³CNMR (delta vs TMS, CDCl₃): (vyčnívající píky) 66,93 (oba benzylové uhlíky), 127,78 až 128,64 (oba fenyllové kruhy), 155,249, 170,00, 170,24, 171,69, 174,27, 175,21 (všechny karbonylové uhlíky).



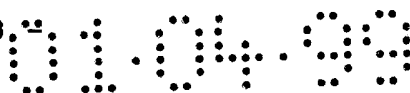
Příklad 5

Příklad hygroskopické krystalické formy N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexyl-alaninamid

(Stupeň 5, schéma II)

Připraví se směs obsahující CBZ-PipBu-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂, formát amonný a 10 % palladium na uhlí ve 20:1 systému alkohol/voda (10:1 obj/hm vs. CBZ-PipBu-N(Et)-Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂). Tato směs se zahřeje na teplotu 40 až 50 °C a míchá se až do chvíle, kdy je podle HPLC reakce ukončena (1 až 2 hodiny). Směs se ochladí na teplotu místnosti a zfiltruje se k odstranění katalyzátoru. Výsledný roztok se zahřeje na teplotu 40 až 50 °C a přidá se aceton (přibližně objem vs. zfiltrovaný roztok), roztok se nechá vychladnout na teplotu 35 až 40 °C. Do směsi se naočkuje N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexyl-alaninamid a z něho vykristaluje hygroskopická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexyl-alaninamidu při ochlazení na teplotu místnosti (několik hodin). Pevné látky se izolují od filtrováním v prostředí dusíku a promyjí se acetonem. Pevné látky se vysuší za sníženého tlaku a analyzují se ke zjištění obsahu krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexyl-alaninamidu (HPLC hm/hm). Výtěžek je obvykle >85 % teorie, čistota >95A %.

Specifický příklad přípravy při zachování obecného postupu podle stupně 5 poskytuje 5 g CBZ-PipBu-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ 3,1 g hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu v podobě bílé pevné látky (čistota 99,6A %) ve stechiometrickém výtěžku 89,4 % teorie.



Jakožto další sloučeniny připravené podle příkladů 1 až 5, avšak při použití příslušných výchozích látek se uvádějí:

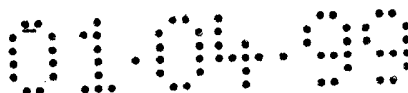
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-valin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-D-valin,
- N-[N-[N-(3-(piperidin-4-yl)propanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-valin,
- N-[N-[N-(5-(piperidin-4-yl)pentanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-valin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- α -cyklohexylglycin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-norleucin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- α -(2,2-dimethyl)prop-3-yl-gycin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- β -dekahydronaft-1-yl-alanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- α -2-cyklohexylethyl)glycin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-fenylalanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- β -naft-1-yl-alanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- β -naft-2-yl-alanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- β -cyklohexylalaninethylester,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-L- β -cis-dekahydronaft-2-ylalanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]- α -aminocyklohexankarboxylová kyselina,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]- β -cyklohexyl-D-alanin,
- N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-

β -dekahydronaft-1-yl-alanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklohexylalaninethylamid,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklooktylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklohexylmethylalaninamid,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -adamant-1-ylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -(1,2,3,4)-tetrahydronaft-5-ylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -(4-cyklohexyl)cyklohexylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cykloheptylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklooktylalaninamid,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 α -cyklohexylpropylglycin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklooktylmethylalanin,
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklopentylalanin a
 N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]asparagyl]-
 β -cyklohexylmethylalaninethylester.

Příklad 6

Příprava 4-N-CBZ-piperidonu

Směs 40 kg N-(benzyloxykarbonyl)sukcinimidu a 26 kg (175 mol) 4-piperidon.kyseliny chlorovodíkové.H₂O ve 38,8 kg vody a 88 kg tetrahydrofuranu se míchá 2,5 hodiny při teplotě 15±5 °C až do konce rozpouštění (přibližně 15 minut). Do míchané (exothermické) směsi se přidá NMM (22,8 kg) při udržování teploty



20 °C nebo nižší. Lázeň se míchá 2,5 hodiny při teplotě 15±5 °C až do chvíle, kdy je podle HPLC reakce ukončena. Směs se zředí na 115,2 kg MTBE a 38,8 kg vody a míchá se 5 minut při teplotě 20 ± 5 °C. Míchání se ukončí, vrstvy se nechají oddělit a vodná (nižší) vrstva se odstraní a vyhodí se. Organická vrstva se promyje 2x 129,6 kg vody (míchá se 5 minut, fáze se oddělí a vodná (nižší) vrstva se odstraní a vyhodí se. Organická vrstva se promyje 5,2 kg chloridu sodného 46,8 kg vody (míchá se 5 minut, fáze se oddělí a vodná (nižší) vrstva se odstraní a vyhodí se. Organická fáze se zpracuje 11,5 kg síranem hořečnatým za míchání po dobu jedné hodiny, načež se směs zfiltruje. Reaktor se vypláchne 8 kg MTBE (roztok se zfiltruje a spojí se s hlavním filtrátem; celkový obsah vody ve filtrátu je 0,52 %). Objem směsi se sníží na polovinu destilací za sníženého tlaku při teplotě 30 °C. Vakuum se zruší dusíkem a zbytek se ochladí na teplotu 20 °C (obsah vody zbytku: 0,43 %). Zbytek se zředí 57,6 kg MTBE, pak se objem směsi znovu zmenší na polovinu ve vakuu při teplotě 30 °C (obsah vody zbytku: 0,25 %). To se opakuje 5x. Konečný obsah v reaktoru se zředí 28,8 kg MTBE a míchá se 5 minut, načež se zjistí obsah vody a obsah 4-N-CBZ-piperidonu; (voda 0,05 %; hmotnost/hmotnost 4-N-CBZ-piperidonu: hmotnostně 22,66 %, 35,36 kg, 155 mol, 88,6 % stechiometrického výtěžek).

Příklad 7

Příprava PipBu

Za probublávání dusíku a při míchání se připraví roztok 53,5 kg 3-karboxypropyltrifenylfosfoniumbromidu ve 230,1 kg 1,2-dimethoxyethanu. Během 35 minut se přidá systém terc.-butoxid draselný/tetrahydrofuran (20 hm.%, 141,8 kg roztoku) při udržování teploty 24 až 28 °C. Směs se míchá půl hodiny při této teplotě až do ukončení reakce podle HPLC. Míchaná směs se ochladí na teplotu 10±2 °C, pak se do směsi přidá 96,45 kg

(titr:1,15 molární eq.vs.) 4-CBZ-piperidonu v MTBE během 40 minut, tak aby teplota zůstala $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. Směs se míchá při této teplotě 10 minut, pak se zahřeje na teplotu $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ a míchá se dvě hodiny při této teplotě. Do míchané směsi se přidá roztok 22,5 kg koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové ve 245,6 kg vody za udržení teploty $20\pm 2^{\circ}\text{C}$; konečná hodnota pH je 0,5. Směs se extrahuje za míchání 214,0 kg methyl-terc.-butyletheru. Míchání se ukončí, fáze se nechají oddělit a vodná vrstva (spodní) se odstraní a vyhodí. Organická fáze se promyje 133,75 kg vody (míchá se 5 minut, rozdělí se, vodná vrstva (spodní) se odstraní a vyhodí pak se promyje 10,7 kg 50% roztoku hydroxidu sodného ve 126 kg vody (míchá se 10 minut, vrstvy se oddělí a vyhodí se organická (horní) vrstva). Vodná vrstva se extrahuje 2x 123,05 kg ethylacetátu (míchá se 5 minut, vrstvy se oddělí a vyhodí se organická (horní) vrstva). Do míchané vodné vrstvy se přidá 13,1 kg koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové do hodnoty pH 2,5 až 3,5 (konečná hodnota pH 2,82), pak se směs extrahuje 123,05 kg ethylacetátu (míchá se pět minut a vodná vrstva (spodní) se odstraní a vyhodí. Roztok ethylacetátu se promyje 133,75 kg vody (míchá se pět minut, vrstvy se oddělí a vodná vrstva (spodní) se odstraní a vyhodí, pak se zjišťuje (hm/hm) obsah CBZ-PipBuen (celková hmotnost:194,86 kg, 17,05 % CBZ-PipBuen [33,22 kg, 108 mol, 87,9 % stechiometrického výtěžku).

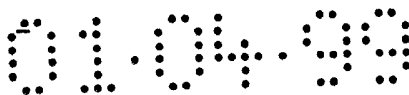
Do tlakové nádoby z nerezavějící oceli se za míchání vneše roztok PipBuenu v ethylacetátu spolu se 6,6 kg 5% palladia na uhlí (hm. 50 % vody) a směs se zahřeje na teplotu $55\pm 2^{\circ}\text{C}$. Do směsi se přidá formát draselný (38,2 kg), rozpuštěný v 66,4 kg vody při udržování teploty $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ (přibližně 30 minut). Směs se míchá dvě hodiny při teplotě $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ a reakce se ukončí (HPLC). Do reaktoru se přidá 6,6 kg celitu a 33,2 kg vody, směs se zamíchá a zfiltruje. Reaktor se vypláchne 33,2 kg vody, zfiltruje se a přidá se k hlavnímu filtrátu. Filtrát se přelije do nové nádoby, ochladí se na teplotu 20 až 25°C ,

vrstvy se nechají oddělit a organická vrstva se vyjme a vyhodí. Vodná vrstva se okyselí 52,1 kg koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH 2 až 3 (konečná hodnota pH je 2,82), pak se extrahuje 4x 129,5 kg methylenchloridu (míchá se pět minut, vrstvy se oddělí, odstraní a zahodí se organická vrstva). Vodná fáze se nastaví za míchání na hodnotu pH 6,1 přísadou 17,85 kg vodného 50% roztoku hydroxidu sodného. Směs se zfiltruje, čímž se získá 224 kg roztoku obsahujícího 17,6 kg (103 mol) 4-(3'-karboxypropyl)piperidinu.

Příklad 8

Příprava CBZ-PipBu

Roztok 224 kg 4-(3'-karboxypropyl)piperidinu ve vodném roztoku hydroxidu sodného se smíchá s 55,3 kg tetrahydrofuranu a směs se za míchání ochladí na teplotu 8 ± 2 °C. Při udržování teploty na nižší než 10 °C se přidá NMM (20,9 kg). Po ukončeném přidávání se teplota nastaví na 8 ± 2 °C a během 1 hodiny se přidá 25,7 kg 1-(benzyloxykarbonyl)sukcinimidu, rozpuštěného ve 49,8 kg tetrahydrofuranu, při udržování teploty nižší než 15 °C. Reakce se ukončí (podle HPLC) po třech hodinách při teplotě 10 až 15 °C. Přidá se koncentrovaná vodná kyselina chlorovodíková (29,9 kg) k nastavení hodnoty pH na 2,5 až 3,5 (konečná hodnota pH 3,3), pak se do směsi přidá 61,4 kg MTBE a směs se míchá 5 minut. Míchání se ukončí a vrstvy se nechají oddělit a vodná (spodní) vrstva se oddělí jako odpad. Vrstva MTBE se promyje 3 dávkami po 83,1 kg vody (míchání 10 minut, 5 minut a 5 minut); vodná fáze se nechá oddělit a v každém případě se odstraní. Bez míchání se přidá 8,3 kg 50% vodného hydroxidu sodného ve 95,7 kg vody a po ukončené přísadě se směs míchá přibližně 5 minut. Míchání se ukončí, fáze se nechají oddělit a organická (horní) vrstva se oddělí a vyhodí se. Vodná vrstva se vrátí do reaktoru a extrahuje se 2x 38,4 kg methylterc.-butyletheru (míchá se pět minut, vrstvy se oddělí a organické vrchní vrstvy se vyjmou/vyhodí). Tato operace se opa-



kuje za použití 18,5 kg methyl-terc.-butyletheru. Vodná vrstva, vrácená do reaktoru se okyslí na hodnotu pH 2,5 až 3,5 (konečná hodnota pH je 3,37) 9,9 kg koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové. Směs se extrahuje 76,4 kg methyl-terc.-butyletheru (míchá se pět minut, vrstvy se oddělí a vodní (dolní) vrstva se vyjme/vyhodí). Organická vrstva se promyje (za pětiminutového míchání) roztokem 1,1 kg hydrogenuhličitanu sodného ve 12,4 kg vody (míchá se 5 minut, vrstvy se oddělí a vodná (dolní) vrstva se vyjme/vyhodí) a pak 41,5 kg vody (míchá se pět minut, vrstvy se oddělí a vodná (dolní) vrstva se vyjme/vyhodí). V reaktoru se vytvoří podtlak a těkavá rozpouštědla se odstraní při teplotě 55 °C až do ukončení odtékání destilátu. Přidá se toluen (32,4 kg) a směs se destiluje za tlaku okolí až do ukončení odtékání destilátu, přičemž teplota stoupne na 90 až 95 °C. Směs se pak ochladí na 30 až 35 °C, do reaktoru se přidá (ve dvou fázích) heptan (56,85 kg), směs se zahřeje na teplotu 90 až 95 °C (jedna fáze). Směs se pak znovu ochladí na teplotu 38 až 42 °C. Přidají se očkovací krystaly CBZ-PipBu a produkt během jedné hodiny ze směsi vykristaluje. Pevná látka se odfiltruje a promyje se 19,35 kg směsi toluen/heptan 1:2 a pak 33,4 kg heptanu. Filtrační koláč se vysuší ve vakuu při teplotě 40 °C (0,13% ztráta při analýze sušení), čímž se získá 22,4 kg (72,96 mol, 42 % stechiometrického výťažku vztaženo na 4-piperidon) CBZ-PipBu.

Příklad 9

Příprava CBZ-PipBuenu

Do suspence 82 g 3-karboxypropyltrifenylfosfoniumbromidu ve 407 ml 1,2-diethoxyethanu se při teplotě 14 °C přidá během 25 minut 220 g hmotnostně 20% terc.-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu při udržování teploty reakční směsi 24 až 28 °C. Směs se míchá jednu hodinu, ochladí se na 10 °C, načež se přidá během 30 minut za stálého chlazení roztok 52,5 g 4-N-

CBZ-piperidonu ve 246 ml terc.-butylmethyletheru. Po ukončení přísady se směs míchá 10 minut při teplotě 12 °C, ohřeje se na 20 °C a míchá se dalších 30 minut. Reakční směs se zpracuje 10 minut 410 ml 1N vodné kyseliny chlorovodíkové, zředí se 328 ml terc.-butylmethyletheru, načež se fáze oddělí. Organická fáze se promyje 205 ml vody, pak 210 ml 1N vodného roztoku hydroxidu sodného. Vrstva hydroxidu sodného, která obsahuje produkt, se shromáždí zvlášť, promyje se třikrát vždy 189 g ethylacetátu, okyselí se na hodnotu pH 3,48 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkové a extrahuje se 189 ml ethylacetátu. Ethylacetátová vrstva se oddělí, promyje se 211 ml vody, suší se 30 minut 10 g síranem hořečnatým, zfiltruje se a zkoncentruje ve vakuu. Olejovitý zbytek (50,7 g) vykristaluje ze systému toluen/heptan, čímž se získá celkem 29,46 g (výtěžek 50,9 % teorie přibližně 95%A čistého) CBZ-PipBuenu.

Hmotové spektrum: M 303 vypočteno, M+1 304 nalezeno

¹HNMR (delta vs TMS, CDCl₃): 2,2 (t, 2H), 2,25 (t, 2H), 2,35 (m, 4H), 3,45 (m, 4H), 5,15 (s, 2H), 5,2 (m, 1H), 7,33 (2, 5H).

¹³CNMR (delta vs TMS, CDCl₃) 22,43, 28,2, 34,26, 35,66 44,88, 45,74, 67,20, 122,02, 127,83, 127,95 128,45, 128,69, 128,90, 136,17, 136,72, 155,34, 178,39

Příklad 10

Příprava CBZ-PipBuen-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂
Alternativní stupeň schema II)

Do dvouplášťové baňky se vnese CBZ-PipBuen (70 g, 0,23 mol) a dimethylformamidu (230 ml) a míchá se za chlazení na 0 °C, načež se najednou přidá TBTU (74,9 g, 0,23 mol). Teplota se udržuje 0 °C a započne se s přidáváním DIPEA (61,9 g, 0,61 mol). Po 45 minutách se přidá TFA-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (138,7 g, 0,24 mol) v podobě roztoku v dimethylformamidu (230 ml). Hodnota pH se nastaví na 7 až 8 přísadou DIPEA (45 ml) a směs se nechá dosáhnout teploty místnosti. Po dvou

hodinách je reakce ukončena (podle HPLC). Směs se vlije do vody (2,5 l) a extrahuje se ethylacetát (1 l). Vodná fáze se extrahuje zpět ethylacetát (0,3 l). Organické vrstvy se spojí, promyjí se vodným roztokem citronové kyseliny (hmotnostně 5%, 2x 1 l), promyjí se vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (hmotnostně 5%, 2x 1 l), a promyjí se vodou (2 l). Vrstva ethylacetátu se přelije do 2 l baňky a přidá se heptan (500 ml) za míchání k navození krystalizace. Pevná látka se odsaje na Buchnerově nálevce, promyje se systémem ethylacetát/heptan (obj. 2:1, 1l) a vysuší se na konstantní hmotnost, čímž se získá CBZ-PipBuen-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (143,2 g, 0,19 mol), výtěžek 83 % teorie).

Hmotové spektrum: M 745,91 vypočteno; M+1 : 746 nalezeno

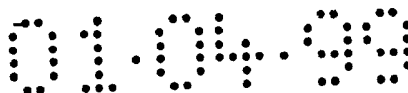
Analýsa: C₄₁H₅₅N₅O₇ C: vypočteno 66,02 nalezeno 65,53, H, N.

¹HNMR (delta vs TMS, CDCl₃): 0,86 (qd, 1H), 0,98 (qd, 1H), 1,16 (t, 2H), 1,24 (dt, 6H), 1,37 (m, 1H), 1,64 až 1,78 (m, 4H), 1,86 (qd, 1H), 2,2 (bd, 4H), 2,35 (m, 1H), 2,4 (m, 2H), 2,74 (dd, 1H), 3,07 (m, 4H), 3,52 (d, 1H), 3,85 (d, 1H), 4,12 (q, 1H), 4,49 (qd, 1H), 4,68 (dt, 1H), 5,07 (d, 1H), 5,14 (s, 1H), 5,16 (d, 1H), 5,22 (t, 2H), 6,45 (s, 1H), 7,28 (d, 1H), 7,26 (s, 5H), 7,35 (s, 5H), 7,56 (d, 1H).

¹³CNMR (delta vs TMS, CDCl₃): 14,15, 22,68, 24,95, 25,61, 26,03, 26,45, 28,20, 31,71, 32,89, 33,80, 33,89, 34,00, 35,63, 38,37, 44,79, 45,13, 45,65, 50,23, 51,34, 60,40, 66,87, 67,06, 76,50, 77,13, 77,77, 122,46, 126,88, 127,80, 128,60, 135,15, 155,19, 170,11, 170,20, 171,61, 173,76, 175,35

Příklad 11

Příprava hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu (alternativní stupeň 5 schema II)

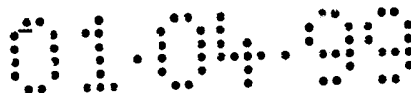


Do 5-litrové opláštěné baňky se vnese CBZ-PipBuen-N(Et)Gly-(L)-Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (140 g, 0,19 mol), amoniumformát (61 g, 0,96 mol) a 10% paladium na uhlí (50% vlhký typ degusa, 28 g). Přidá se ethanol (200 proof [uznávaná jednotka lihovitosti], 1260 ml), isopropanol (70 ml) a voda (DI, 70 g). Směs se ohřeje na teplotu 40 až 50 °C a míchá se až do ukončení reakce podle HPLC (pět hodin). Směs se nechá vychladnout na teplotu místnosti, zfiltruje se a katalyzátor se odstraní. Výsledný roztok se zahřeje na teplotu 40 až 50 °C a přidá se aceton (přibližně stejný objem jako zfiltrovaný roztok) a směs se ochladí na 35 až 40 °C. Do směsi se naočkuje N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamid a vykristaluje hygroskopická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu za vychladnutí na teplotu místnosti (několik hodin). Pevná látka se odsaje na Buchnerově nálevce, v prostředí dusíku, filtrační koláč se promyje acetonem a vysuší se na vzduchu do konstantní hmotnosti, čímž se získá N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamid (84,3 g, 0,16 mol), výtěžek 84,8 % teorie, >95A %).

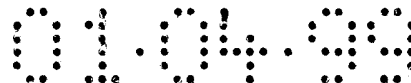
Příklad 12

Způsob seřetěžené přípravy TFA-N(Et(Gly)-(L)-Asp(OBzl)-(L)Cha-NH₂ (alternativní stupně 1 až 3 schema II)

Do baňky o obsahu 500 ml, opatřené teploměrem, se vnese BOC-N(Et)-Gly (20,3 g, 0,1 mol), N-hydroxysukcinimid (11,5 g, 0,1 mol) a dichlormethan (200 ml). Směs se míchá střední rychlostí a do výsledného roztoku se přidá dicyklohexylkarbodiimid (20,6 g, 0,1 mol) najednou jako pevná látka. Roztok se míchá jednu hodinu za mírně exotermické reakce (teplota se zvýší ze 20 na 28 °C) a DCU se vysráží. Výsledná suspenze se vakuově zfiltruje na Buchnerové nálevce opatřené filtračním papírem



Whatman #1. Filtrační koláč se promyje dichlormethanem (2x 25 ml). Filtráty se vrátí do původní 500 ml baňky a pak se postupně přidá (L)Asp(OBzl) (22,3 g, 0,1 mol), NMM (33,8 ml, 0,3 mol) a dimethylformamidu (80 g, 1,01 mol). Po dvouhodinovém míchání při teplotě místnosti je vytvoření BOC-N(Et(Gly-(L)-Asp(OBzl) ukončeno (podle HPLC). Reakční směs se vlije do extrakční nálevky obsahující ledovou vodu (100 mml). Směs se okyslí kyselinou chlorovodíkovou (36%, 25 ml) na hodnotu pH 1. Vrstvy se rozdělí a dichlormethanová vrstva se promyje ledovou vodou (100 ml) a fáze se oddělí (vodná fáze má hodnotu pH 3 až 4). Dichlormethanová vrstva se vrátí do původní 500 ml baňky, do které se postupně přidá NH₂-(L)-Cha-NH₂ (17 g, 0,1 mol), N-hydroxysukcinimid (11,5 g, 0,1 mol) a dicyklohexylkarbodiimidu (20,6 g, 0,1 mol) najednou vždy v podobě pevné látky. Po dvouhodinovém míchání při teplotě místnosti, je vytvoření BOC-N(Et)Gly-(L)Asp(OBzl)(L)-Cha-NH₂ ukončeno (podle HPLC) a DCU se vakuově zfiltruje na Buchnerově nálevce opatřené filtračním papírem Whatman #1. Filtrační koláč se promyje deionizovanou vodou (200 ml) obsahující N-methylmorfolin (15 ml, hodnota pH 8 až 9). Fáze se oddělí a dichlormethanová vrstva se opět promyje vodou (DI 2x 150 ml). Dichlormethanová fáze se promyje 150 ml 1N kyselinou chlorovodíkovou (hodnota pH 1). Fáze se oddělí a dichlormethanová vrstva se opět promyje deionizovanou vodou (200 ml, hodnota pH 3). Dichlormethanový roztok BOC-N(Et)Gly-(L)Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ se vrátí k vyčištění do 500 ml baňky a přidá se TFA (100 ml). Po 2-hodinovém míchání při teplotě místnosti je vytvoření TFA.HN(Et)Gly-(L)Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ ukončeno (podle HPLC). Reakční směs se destiluje ve vakuu k odstranění dichlormethanu a většiny TFA, pak se přidá očkovačlo a MTBE (500 ml) k zahájení krystalizace. Směs se vakuově zfiltruje na Buchnerově nálevce opatřené filtračním papírem Whatman #1. Filtrační koláč se promyje MTBE (2x 25 ml) a po vysušení na vzduchu se získá TFA.HN(Et)Gly-(L)Asp(OBzl)-(L)-Cha-NH₂ (46,8 g, 81,5 % teorie) v podobě bílé pevné látky (>97A% čisté, <0,2A% D-Asp diast.).



Příklad 13

Příprava stabilní nehygroskopické krystalické formy
N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-
asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu

Způsob A - statická konverze

Hygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu (7,45 kg) se rozemele v kladivovém mlýně. Výsledná pevná látka 7,35 kg se umístí na vysoušecí mísu (90x28 cm) a mísa se překryje perforovanou hliníkovou fólií. Mísa se pak utěsněně vloží do vlhkostní pece (LUNARIRE Humidity Cabinet model No. CEO 941W-3). Pec se udržuje utěsněná po dobu konverzního procesu, kromě odebrání vzorků k analýze. Pec se nastaví na 40% relativní vlhkost (RH) a teplotu 60 °C na 1 hodinu. Pak se vlhkostní pec nastaví na 80% RH/60 °C s prodlevou 12 hodin. Vzorek se vyjme po 18 hodinách při 80 RH/60 °C a rentgenovou práškovou difrakcí se posoudí konverse na nehygroskopickou krystalickou formu N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-aspartyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu. Vlhkostní pec se znovu utěsní a nastaví se na 40% RH/60 °C s prodlevou 2 hodiny. Pec se znovu nastaví na podmínky okolí a mísa se pak z pece vyjme a získá se nehygroskopická, krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-aspartyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu (7,2 kg, výtěžek 96,6 % teorie). Konverse je potvrzena obrazcem rtg. difrakce (obr. 1). Rentgenová prášková difrakce je také uvedena v tabulce jako funkce rostoucího řádu úhlu difrakce (2 theta) odpovídajícího mezivrstevové vzdálenosti (d) krystalu v nanometrech čtení za sekundu (Cps) a relativní pík intenzity (v %) (tabulka I, N znamená číslo).

01.04.99

Tabulka I

-N-	20	---d---	---Cps---	---%---
1	5,065	1,74314	86,00	5,82
2	6,323	1,39672	248,00	16,78
3	7,518	1,17489	221,00	14,95
4	8,163	1,08222	496,00	33,56
5	8,780	1,00633	155,00	10,49
6	10,383	0,85125	218,00	14,75
7	11,351	0,77886	112,00	7,58
8	12,596	0,70218	999,00	67,59
9	13,858	0,63852	316,00	21,38
10	15,191	0,58274	1338,00	90,53
11	16,476	0,53759	481,00	32,54
12	16,745	0,52901	556,00	37,62
13	17,980	0,49294	679,00	45,95
14	18,572	0,47735	1079,00	73,00
15	18,799	0,47165	1230,00	83,22
16	19,147	0,46315	1229,00	83,15
17	19,619	0,45211	1380,00	93,37
18	20,200	0,43924	1246,00	84,30
19	20,466	0,43360	1478,00	100,00
20	20,870	0,42528	1088,00	73,61
21	21,625	0,41061	584,00	39,51
22	22,088	0,40210	891,00	60,28
23	22,840	0,38903	613,00	41,47
24	23,947	0,37129	597,00	40,39
25	24,569	0,36203	680,00	46,01
26	25,608	0,34757	506,00	34,24
27	27,015	0,32978	1100,00	74,42
28	27,837	0,32022	420,00	28,42
29	27,967	0,31877	400,00	27,06
30	29,255	0,30502	536,00	36,27
31	29,689	0,30066	603,00	40,80
32	30,665	0,29130	518,00	35,05
33	31,318	0,28538	451,00	30,51
34	31,894	0,28036	533,00	36,06
35	33,370	0,26829	518,00	35,05
36	33,562	0,26679	552,00	37,35
37	33,919	0,26407	581,00	39,31
38	34,840	0,25730	561,00	37,96
39	35,789	0,25069	559,00	37,82
40	35,940	0,24967	560,00	37,89
41	36,780	0,24416	740,00	50,07
42	37,042	0,24249	736,00	49,80
43	37,959	0,23684	683,00	46,21
44	39,017	0,23066	643,00	43,50

Způsob B. Dynamické podmínky

a. Konverze formy

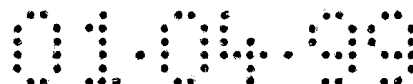
Hygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexyl -



alaninamidu (50 g) se vnese do 400 ml odměrného válce (výška 6 cm) na kruhové podložce a opatří se mechanickým míchadlem. Přístroj se umístí do pece s řízenou vlhkostí (LUNARIRE Humidity Cabinet model č. CEO 941W-3). Otáčky míchadla se nastaví na 275/min a teplota 60 °C a relativní vlhkost 40% se ustaví během 30 minut. Sloučenina se udržuje za těchto podmínek po dobu jedné hodiny, načež se podmínky během 45 minut změni na 80% RH/60 °C. Sloučenina se udržuje za těchto podmínek po dobu 16 hodin než se znovu podmínky upraví na 40% RH/60°C na dobu 3,2 až 5 hodin. Sloučenina se nechá vychladnout na teplotu místnosti (výška 4 cm); pak se z odměrného válce vyjme, čímž se získá nehygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)-β-cyklohexylalaninamidu (výtěžek >95 % teorie). Konverse se potvrdí obrazcem rentgenové difrakce (obr. 2). Rentgenová prášková difrakce je také uvedena v tabulce jako funkce rostoucího řádu úhlu difrakce (2 theta) odpovídajícího mezivrstevové vzdálenosti krystalu (d) v nanometrech čtení za sekundu (Cps) a relativní pík intenzity (v %) (tabulka II, N znamená číslo).

Tabulka II

-N-	2θ	---d---	---Cps---	---%---
1	5,186	1,70268	196,00	8,43
2	6,371	1,38615	722,00	31,07
3	7,570	1,16689	516,00	22,20
4	8,232	1,07323	1094,00	47,07
5	8,817	1,00206	257,00	11,06
6	10,428	0,84761	365,00	15,71
7	11,377	0,77714	129,00	5,55
8	11,600	0,76223	117,00	5,55
9	12,667	0,69828	1805,00	77,67
10	13,913	0,63599	551,00	23,71
11	14,398	0,61468	178,00	7,66
12	15,226	0,58440	2285,00	98,32
13	16,538	0,53557	861,00	37,05
14	16,773	0,52814	929,00	39,97
15	18,019	0,49190	1132,00	48,71
16	18,672	0,47483	1871,00	80,51
17	18,815	0,47125	2052,00	88,30
18	19,204	0,46178	2071,00	89,11



19	19,654	0,45132	2226,00	95,78
20	20,237	0,43845	1939,00	83,43
21	20,523	0,43240	2324,00	100,00
22	20,934	0,42400	1656,00	71,26
23	21,691	0,40938	923,00	39,72
24	22,143	0,40112	1411,00	60,71
25	22,910	0,38786	994,00	42,77
26	24,007	0,37037	964,00	41,48
27	24,642	0,36097	991,00	42,64
28	25,642	0,36097	991,00	42,64
29	27,070	0,32913	1687,00	72,59
30	27,855	0,32002	688,00	29,60
31	29,497	0,30258	843,00	36,27
32	29,497	0,30013	878,00	37,78
33	30,751	0,29051	809,00	34,81
34	31,916	0,28017	821,00	35,33
35	33,982	0,26360	882,00	37,95
36	35,200	0,25475	865,00	37,22
37	36,001	0,24926	841,00	36,19
38	36,927	0,24322	1106,00	47,59
39	38,389	0,23429	968,00	41,65

b. Konverse formy

Hygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu (370 g) se vnese do 2 l rotační odparkové baňky. Baňka se umístí do rotační odparky (Heidolph UV 2002) a spustí se do přehřáté (58 °C) lázně (Heidolph MR 2002). Pomocí vakuové vývěvy se upraví tlak na 6000 Pa (Divatrion DV1), načež se vakuum zruší řízeným způsobem k vytvoření vlhkého prostředí v oddělené, vyhřívané baňce obsahující vodu. Přívod vlhkého prostředí se řídí přístrojem regulujícím vlhkost (Vausalo Humiditique and Temperature Traumettor) k dosažení RH 79% uvnitř přístroje (vnitřní tlak 13000 až 18000 Pa). Nádoba rotační odparky se pak otáčí během pěti hodin 145 až 160 otáčkami za minutu, přičemž se vyhřívací lázeň udržuje na teplotě přibližně 60 °C a RH se udržuje na 71 až 79 %. Vakuum se zruší dusíkem, nádoba i její obsah se nechají vychladnout na teplotu okolí a produkt se vyjme, čímž se získá nehygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu. Podobně se zpracuje druhá dávka 317 g hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu za získání nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethyl-

glycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu . Konverse se potvrdí obrazcem rtg. difrakce (obr.3). Obě dávky dají dohromady 667 g nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu (celkový výtěžek 97 % teorie). Konverse se potvrdí obrazcem rentgenové difrakce (obr.3). Rentgenová prášková difrakce je také uvedena v tabulce jako funkce rostoucího řádu úhlu difrakce (2 theta) odpovídajícího mezivrstevové vzdálenosti (d) krystalu v nanometrech čtení za sekundu (Cps) a relativní pík intenzity (v %) (tabulka III, N znamená číslo.).

Tabulka III

-N-	2 θ	---d---	---Cps---	---%---
1	5,124	1,72309	180,00	10,17
2	6,328	1,39565	408,00	23,05
3	7,574	1,16623	305,00	17,23
4	8,191	1,07851	556,00	31,41
5	8,797	1,00432	166,00	9,38
6	10,398	0,85004	244,00	13,79
7	12,628	0,70040	1198,00	67,68
8	13,871	0,63791	353,00	19,94
9	15,218	0,58172	1543,00	87,18
10	15,723	0,56317	187,00	10,56
11	16,538	0,53558	589,00	33,28
12	16,751	0,52882	621,00	35,08
13	18,024	0,49175	869,00	49,10
14	18,640	0,47563	1156,00	65,31
15	18,809	0,47141	1241,00	70,11
16	19,191	0,46210	1521,00	85,93
17	19,659	0,45120	1413,00	79,83
18	20,865	0,44064	1303,00	73,62
19	20,495	0,43299	1770,00	100,00
20	20,865	0,42539	1120,00	63,28
21	21,616	0,41077	683,00	38,59
22	22,113	0,40166	919,00	51,92
23	22,950	0,38719	697,00	39,38
24	24,117	0,36871	659,00	37,23
25	24,618	0,36132	716,00	40,45
26	25,644	0,34709	662,00	37,40
27	26,297	0,33862	486,00	27,46
28	27,052	0,32934	1270,00	71,75
29	27,960	0,31885	518,00	29,27
30	29,640	0,30115	705,00	39,38
31	30,744	0,29058	695,00	39,27
32	33,465	0,26755	697,00	39,38
33	33,840	0,26467	764,00	43,16
34	35,812	0,25053	736,00	41,58
35	36,811	0,24396	858,00	48,47
36	37,076	0,24228	919,00	51,92
37	38,185	0,23549	870	49,15
38	39,622	0,22728	882,00	49,83

Příklad 14

Grafy rentgenová práškové difrakce vzorku N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu v hygroskopické krystalické formě a jeho konvertovaná nehygroskopická krystalická forma

Připraví se vzorek hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu stejně jako podle příkladu 5 nebo 11 a převede se na odpovídající nehygroskopickou krystalickou formu způsobem podle příkladu 13. Graf rentgenové práškové difrakce hygroskopické krystalické formy je na obr. 4 a nehygroskopické krystalické formy je na obr. 5. Rentgenová prášková difrakce je také uvedena v tabulce jako funkce rostoucího řádu úhlu difrakce (2 theta) odpovídajícího mezivrstevové vzdálenosti krystalu (d) v nanometrech čtení za sekundu (Cps) a relativní pík intenzity v % (tabulka IV a V, N znamená číslo.).

Tabulka IV

-N-	2 θ	---d---	---Cps---	---%---
1	5,073	1,74037	1487,00	86,50
2	6,451	1,36905	447,00	26,00
3	7,837	1,12712	411,00	23,91
4	8,491	1,04049	602,00	35,02
5	9,699	0,91119	93,00	5,41
6	10,488	0,84278	421,00	24,49
7	11,570	0,76423	92,00	5,35
8	12,550	0,70474	411,00	23,91
9	13,576	0,65168	760,00	44,21
10	15,327	0,57763	606,00	35,25
11	15,790	0,56080	456,00	26,53
12	16,179	0,54739	346,00	20,13
13	16,770	0,52824	938,00	54,57
14	17,085	0,51856	685,00	39,85
15	17,750	0,49927	924,00	53,75
16	18,151	0,48835	741,00	43,11
17	18,504	0,47909	593,00	34,50
18	19,323	0,45897	930,00	54,10
19	19,714	0,44996	792,00	46,07
20	20,545	0,43194	1719,00	100,00
21	21,388	0,41510	897,00	52,18
22	22,381	0,39691	373,00	21,70

01.04.99

23	22,870	0,38852	258,00	15,01
24	23,640	0,37604	563,00	32,75
25	23,841	0,37292	680,00	39,56
26	24,048	0,36976	623,00	36,24
27	24,746	0,35949	338,00	19,66
28	25,200	0,35311	366,00	21,29
29	25,792	0,34513	590,00	34,32
30	26,266	0,33901	731,00	42,52
31	26,959	0,33045	555,00	32,29
32	27,426	0,32494	769,00	44,74
33	27,967	0,31876	528,00	30,72
34	29,020	0,30744	771,00	44,85
35	29,922	0,29837	491,00	28,56
36	30,970	0,28851	384,00	22,34
37	31,552	0,28332	510,00	29,67
38	33,338	0,26854	627,00	36,47
39	34,838	0,25731	520,00	30,25
40	35,873	0,25012	653,00	37,99
41	36,107	0,24855	639,00	37,17
42	37,162	0,24174	683,00	39,73
43	38,509	0,23359	775,00	45,08
44	39,701	0,22684	784,00	45,61

Tabulka V

-N-	2θ	---d---	---Cps---	---%---
1	5,152	1,71371	123,00	7,34
2	6,386	1,38287	483,00	28,84
3	7,580	1,16540	389,00	23,22
4	8,225	1,07410	752,00	44,90
5	8,801	1,00390	180,00	10,75
6	10,408	0,84928	276,00	16,48
7	12,660	0,69863	1399,00	83,52
8	13,914	0,63594	391,00	23,34
9	15,251	0,58047	1675,00	100,00
10	16,541	0,53548	608,00	36,30
11	16,771	0,52818	652,00	38,93
12	18,047	0,49112	775,00	46,27
13	18,676	0,47472	1078,00	64,36
14	18,902	0,46910	1099,00	65,61
15	19,182	0,46231	1151,00	68,72
16	19,697	0,45035	1164,00	69,49
17	20,240	0,43838	1049,00	62,63
18	20,568	0,43147	1403,00	83,76
19	29,933	0,42403	1024,00	61,13
20	21,684	0,40951	569,00	33,97
21	22,122	0,40150	746,00	44,54
22	22,970	0,38685	564,00	33,67
23	24,080	0,36927	546,00	32,60
24	24,218	0,36720	556,00	33,19
25	24,694	0,36023	618,00	36,90
26	25,680	0,34662	510,00	30,45
27	26,400	0,33732	403,00	24,06
28	27,105	0,32871	1093,00	65,25
29	27,929	0,31920	450,00	26,87
30	29,360	0,30395	555,00	33,13
31	29,724	0,30031	595,00	35,52
32	30,340	0,29435	429,00	25,61
33	30,693	0,29105	552,00	32,96

34	31,353	0,28507	476,00	28,42
35	31,822	0,28098	531,00	31,70
36	32,006	0,27940	545,00	32,54
37	32,885	0,27213	485,00	28,96
38	33,508	0,26722	547,00	32,66
39	34,040	0,26316	606,00	36,18
40	34,839	0,25730	580,00	34,63
41	35,998	0,24928	596,00	35,58
42	36,680	0,24480	629,00	37,55
43	36,948	0,24309	727,00	43,40
44	37,197	0,24152	703,00	41,97
45	39,602	0,22739	697,00	41,61

Příklad 15

Isotermické mikrokalořimetrické testy hygroskopické a ne-hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu

Isotermické mikrokalořimetrické testy hygroskopické a ne-hygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu se provádějí na přístroji Thermometric^R Thermal Activity Monitor (TAM). Konverse v tuhém stavu různých krystalických forem se studují tím, že se vystaví formy působení různých vlhkostí nebo par rozpouštědel a různých teplot. Použitými nasycenými roztoky k dosažení různé vlhkosti jsou: chlorid draselný (80% RH), chlorid sodný (75% RH) a bromid sodný (65% RH). Přibližně 100 mg množství se odváží ve skleněné ampuli TAM a mikrohygrostat obsahující nasycený solný roztok (s nadbytkem pevné látky) nebo organické rozpouštědlo se vnese do ampule. Ampule se utěsní, vyrovná se na teplotu pokusu a spustí se do měřicí polohy v TAM. Stejný systém obsahující promytý mořský písek místo zkoušené formy se umístí na referenční stranu. Měří se výkon (μ W) v závislosti na čase (obr. 6 až 8).

Příklad 16

Isothermy sorpce vlhkosti hygroskopické a nehygroskopické



krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu

Isothermy sorpce vlhkosti hygroskopické a nehygroskopické krystalické formy N-[N-[N-(4-piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl]-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu se získají na váze vlhkosti VTI MB300G. Pokusy se provádějí buď tak, že se vystaví 15 mg příslušné krystalické formy prostředí se vzrůstající a klesající relativní vlhkostí a sleduje se nárůst hmotnosti (v každém rovnovážném stupni) jako funkce procenta relativní vlhkosti (obr.9), nebo při udržování příslušné krystalické formy při konstantní vlhkosti a sledováním nárůstu hmotnosti v závislosti na čase.

Sloučeniny obecného vzorce II vykazují užitečné farmakologické účinky a začleňují se proto do farmakologických prostředků a používá se jich k léčení pacientů trpících určitými patologickými stavy.

Vynález se týká také způsobu léčení pacientů trpících stavy, které mohou být zmírněny i preventivním podáváním inhibitoru agregace destiček zabraňováním vazbě fibrinogenu na aktivované destičky a jiné adhesivní glykoproteiny podílející se na agregaci a srážení krve. Kromě toho se vynález týká způsobu prevence nebo léčby thrombosis, spojené s určitými chorobnými stavy, jako je infarkt myokardu, mrtvice, choroba vnějších arterií a roztroušená intravaskulární koagulace u lidí a jiných savců.

Léčením se zde vždy míní jak profylační terapie tak ošetřování ke zlepšení stavu.

Vynález se také týká farmaceutických prostředků, které obsahují farmaceuticky vhodné množství alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I spolu s farmaceuticky vhodným nosičem a

excipientem.

V praxi se mohou sloučeniny podle vynálezu podávat jakým-koli vhodným způsobem, například zevně, inhalací, parenterálně, rektálně nebo orálně, s výhodou však orálně.

Sloučeniny obecného vzorce II se předkádají ve formách umožňujících podávání nejvhodnější cestou a vynález se také týká farmaceutických prostředků obsahujících alespoň jednu sloučeninu podle vynálezu, která je vhodná k použití v humánní a veterinární medicíně. Tyto prostředky se mohou připravovat o sobě známými způsoby za pomoci jednoho nebo několika farmakologicky vhodných pomocných činidel nebo excipientů. Mezi pomocná činidla patří mimo jiné ředidla, sterilní vodná media a různá netoxická organická rozpouštědla. Prostředky mohou být podávány ve formě tablet, pilulek, kapslí, granulí, prášků, vodných roztoků nebo suspensí, injektovatelných roztoků, eliksírů, a sirupů a mohou obsahovat jedno nebo několik činidel volených ze souboru zahrnujícího sladidla, ochucovače, barviva, stabilizátory nebo konzervační prostředky k získání farmaceuticky přijatelných prostředků.

Volba nosiče a obsah účinné látky v nosiči se stanoví zpravidla podle rozpustnosti a chemických vlastností produktu, podle příslušného způsobu podání podle zvyklostí farmaceutické praxe. Například excipienty jako je laktosa, citrát sodný, uhličitan vápenatý, dikalciumfosfát a desintegrační činidla, jako škrob, alginové kyseliny a určité komplexní silikagely kombinované s mazadly, jako je stearát hořečnatý, natriumlaurylsulfát a mastek mohou být použity k přípravě tablet. K přípravě kapslí se s výhodou používá laktosa a polyethylenglykolů o vysoké molekulové hmotnosti. Použije-li se vodných suspensí, mohou obsahovat emulgátory nebo činidla usnadňující suspendování. Stejně jako jiných materiálů lze použít ředidel, jako jsou sacharosa, ethanol, polyethylenglykol, propylenglykol,

glycerol a chloroform nebo jejich směsi.

K parenterálnímu podávání se používá emulsí, suspensí nebo roztoků sloučenin podle vynálezu v rostlinném oleji, například v sezamovém oleji, v podzemnicovém oleji, v olivovém oleji nebo ve vodo-organickém roztoku jako je voda a propylen-glykol, injektovatelné organické estery, jako je ethyloleát, stejně jako sterilní vodné roztoky farmaceuticky přijatelných solí. Roztoky solí produktů podle vynálezu se také hodí k podávání intramuskulárním nebo subkutánním injektováním. Vodné roztoky, také zahrnující roztoky solí v čisté destilované vodě, mohou také sloužit k intravenóznímu podávání za předpokladu že jejich hodnota pH je vhodně upravena, že jsou správně pufovány a isotonicky upraveny s dostatečným množstvím glukosy nebo chloridu sodného a že jsou sterilizovány teplem, zářením a/nebo mikrofiltrací.

K zevnímu podávání se hodí gely (na bázi vody nebo alkoholů), krémy nebo masti obsahující sloučeniny podle vynálezu. Sloučeniny podle vynálezu mohou být také začleněny do gelů nebo matric k aplikaci jako náplasti, které umožňují řízené uvolňování sloučenin transdermální bariérou.

Prostředky v pevném stavu k rektálnímu podávání zahrnují čípky formulované známými postupy obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce II.

Procento aktivní složky v prostředcích podle vynálezu se může měnit tak, aby tvořilo podíl vhodné dávky. Případně může být současně podáno více dávek. Použitá dávka může být určena lékařem nebo kvalifikovanou lékařskou osobou a závisí na žádaném terapeutickém účinku, cestě podání a trvání léčby a na stavu pacienta. Dávkovací režim při způsobu podle vynálezu zaručuje maximální terapeutickou odezvu dokud nedojde ke zlepšení a potom minimální účinnou hladinu, která přináší úlevu. Ob-

vykle může být orální dávka 0,1 mg/kg až přibližně 100 mg/kg, s výhodou přibližně 0,1 mg/kg až 20 mg/kg a nejvýhodněji přibližně 1 mg/kg až 20 mg/kg a i.v. dávka přibližně 0,1 µg/kg až přibližně 100 µg/kg, s výhodou přibližně 0,1 mg/kg až 50 mg/kg. V každém jednotlivém případě se dávky určují v souladu s určujícími faktory pro léčeného pacienta, jako je věk, celkový zdravotní stav a jiné charakteristiky, které mohou ovlivnit účinnost prostředku podle vynálezu.

Kromě toho může být sloučenina obecného vzorce II podávána tak často jak je potřeba k dosažení žádoucího terapeutického účinku. Někteří pacienti mohou rychle reagovat na vyšší nebo nižší dávku a mohou shledávat podstatně slabší udržovací dávky za přiměřené. U jiných pacientů může být nutné dlouhodobé léčení 1 až 4 dávkami denně, s výhodou jednou až dvakrát denně, podle fyziologických požadavků každého jednotlivého pacienta. Obvykle může být účinný produkt podáván orálně 1 až 4x za den. U jiných pacientů může být ovšem nutné nepředepisovat více než jednu až dvě dávky za den.

Sloučenina obecného vzorce II vykazuje výrazné farmakologické účinky podle testů popsaných v literatuře, přičemž se má zato, že výsledky testů jsou v korelaci s farmakologickou činností u lidí a jiných savců. Následující výsledky farmakologických testů in vitro a in vivo jsou typické pro sloučeninu obecného vzorce II.

Následující farmakologické testy vyhodnocují inhibiční působení sloučeniny obecného vzorce II na fibrinogenem zprostředkovanou agregaci destiček, vazbu fibrinogenu na thrombinem stimulované destičky a inhibici ex vivo agregace destiček vyvolané ADP a výsledky těchto testů jsou v korelaci s inhibičními vlastnostmi sloučeniny obecného vzorce II in vivo.

Zkouška agregace destiček je založena na zkoušce popsané

v literatuře (Blood 66 (4), str. 946 až 952, 1985). Zkouška fibrinogenové vzby je v podstatě zkouškou, kterou popsal Z. M. Ruggeri a kol., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, str. 5708 až 5712, 1986) a E. F. Plow a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, str. 8057 až 8061 (1985). Zkouška inhibice agregace destiček vyvolané ADP ex-vivo je založena na zkoušce, kterou popsal Zucker, "Platelet Aggregation Measured by the Photoelectric Method" Methods in Enzymology 169, str. 117 až 133 (1989).

Zkouška agregace destiček

Příprava fixně aktivovaných destiček

Destičky se izolují z lidských koncentrátů destiček technikou gelové filtrace, jak ji popsal G. A. Margueri a kol. (J. Biol. Chem. 254, str. 5357 až 5363, 1979) a Z. M. Ruggeri a kol., (J. Clin. Invest. 72, str. 1 až 12, 1983). Destičky se suspendují v koncentraci 2×10^8 buněk/ml v modifikovaném Tyrodově pufru prostém vápníku, obsahujícím 127 mM chloridu sodného, 2 mM chloridu hořečnatého, 0,42 mM dinatriumhydrogenfosforečnanu, 11,9 mM hydrogenuhličitanu sodného, 2,9 mM chlorid draselný, 5,5 mM glukosy, 10 mM HEPES při hodnotě pH 7,35 a 0,35 % lidského albuminového séra (HSA). Tyto promyté destičky se aktivují přidáním lidského α -thrombinu v konečné koncentraci 2 jednotky/ml, následovaným inhibitorem thrombinu I-2581 v konečné koncentraci 40 μ M. Do aktivovaných destiček se přidá paraformaldehyd v konečné koncentraci 0,50 % a inkubují se 30 minut při teplotě místnosti. Fixované aktivované destičky se získají 15 minutovým odstředováním při 650xg. Pelety destiček se promyjí čtyřikrát uvedeným Tyrodovým pufrem - 0,35% HSA a resuspendují se na 2×10^8 buněk/ml v témže pufru.

Zkouška agregace destiček

Fixované aktivované destičky se inkubují s volenou dávkou testované sloučeniny z hlediska zabránění agregaci destiček po

dobu jedné minuty a agregace se zahájí přísadou lidského fibrinogenu v konečné koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$. K záznamu agregace destiček se použije profileru agregace destiček model PAP-4. Rozsah inhibice agregace se vyjadřuje jako procento pozorované míry agregace v nepřítomnosti inhibitoru. Pro každou sloučeninu se pak vypočte IC_{50} , což je množství inhibitoru potřebné ke snížení míry agregace o 50% (například E. F. Plow a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, str. 8057 až 8061, 1985).

Zkouška vazby fibrinogenu

Destičky se zbaví zbytků plasmy technikou gradientu hustoty albuminu, kterou popsal P. N. Walsh a kol. (Br. J. Haematol. str. 281 až 296, 1977), jak ji modifikovali V. Trapani-Lombardo a kol., (J. Clin. Invest. 76, str. 1950 až 1958, 1985). V každé pokusné směsi se destičky stimulují v Tyrodově pufru (Z.M. Ruggeri a kol., J. Clin. Invest. 72, str. 1 až 12, 1983) lidským α -thrombinem 10 minut při teplotě 22 až 25 $^{\circ}\text{C}$ ($3,125 \times 10^{11}$ destiček na litr thrombinu při 0,1 NIH jednotek/ml). Přidá se pak Hirudin ve 25-násobném přebytku (jednotka/jednotka) pět minut před přidáním izotopem ^{125}J značeného fibrinogenu a testované sloučeniny. Po těchto přísadách je konečný počet destiček ve směsi 1×10^{11} /litr. Po inkubaci dalších 30 minut při teplotě 22 až 25 $^{\circ}\text{C}$ se vázaný a volný ligand oddělí odstředěním 50 μl směsi až 300 μl 20% sacharosu při 12000 \times g v trvání 4 minut. Peleta destiček se oddělí od zbytku směsi ke zjištění radioaktivity, vázané na destičky. Ve směsích obsahujících nadbytek neznačeného ligandu se měří nespecifická vazba. Jsou-li křivky vazby analyzovány Scatchardovou analýzou, odvozuje se nespecifická vazba jako parametr z vazební isothermy pomocí počítačového programu (P. J. Munson, Methods. Enzymol. 92, str. 542 až 576 (1983)). Ke zjištění koncentrace každé sloučeniny potřebné k inhibici 50 % fibrinogenové vazby na thrombinem stimulované destičky (IC_{50}) se testuje každá sloučenina při alespoň šesti koncentracích fibrinogenu znače-



ného ^{125}J drženého na $0,176 \mu\text{mol/l}$ ($60 \mu\text{g/ml}$). Hodnota IC_{50} se odvodí z vynesení vazby zbytkového fibrinogenu v závislosti na logaritmu koncentrace sloučenin ve vzorku.

Inhibice agregace destiček vyvolané ADP ex-vivo

Experimentální protokol

Kontrolní krevní vzorky se získají 5 až 10 minut před podáním testované sloučeniny psům mongrel o hmotnosti 10 až 20 kg. Sloučenina je podána intragastrikálně vodnou dávkou nebo orálně v želatinové kapsli. Vzorky krve (5 ml) se odebírají ve 30-minutových intervalech po dobu tří hodin a pak 6, 12 a 24 hodin po dávce. Každý vzorek krve se získá z mozkové žíly a odebere se přímo do plastové injekční stříkačky obsahující jeden díl 3,8 % trinitriumcitrátu na 9 dílů krve.

Agregace psích destiček ex-vivo

Krevní vzorky se odstřeďují po dobu 10 minut při otáčkách 1000/min k získání plasmy bohaté na destičky (PRP). Po odstranění PRP se vzorek odstřeďuje dalších 10 minut při otáčkách 2000/min k získání plasmy chudé na destičky (PPP). Počet destiček v PRP se zjistí pomocí čítače Coulter (Counter Electronic, Hialeah, FL). J-li koncentrace destiček v PRP větší než 300 000 destiček/ μl , zředí se PRP pomocí PPP k nastavení počtu destiček na 300 000 destiček/ μl . Podíly PRP (250 μl) se pak umístí do silikonizovaných skleněných kyvet (7,25x55 mm, Bio/Data Corp., Horsham, PA). Přidá se Epinephrin (konečná koncentrace 1 μM) do PRP, která se inkubuje jednu minutu při teplotě 37 °C. Do PRP se přidá stimulátor agregace destiček, ADP na konečnou koncentraci 10 μM . Agregace destiček se sleduje spektrofotometricky za použití aggregometru v průchozím světle (Bio/Data Plated Aggregation Profiler, model PAP-4, Bio/Data Corp., Horsham, PA). K testování sloučeniny se zaznamenává

dvojitě rychlost změny (sklon) průsvitnosti a maxima průsvitnosti (maxima agregace). Data agregace destiček jsou vyjádřena jako procento poklesu (průměr \pm SEM) ve sklonu nebo se maximum agregace porovnává s hodnotami získanými z kontrolní PRP, která je připravena z krevních vzorků, získaných před podáním testované sloučeniny.

Sloučenina obecného vzorce II vykazuje výraznou aktivitu v uvedených testech a považuje se za užitečnou v prevenci a k léčení thrombózy spojené s některými chorobnými stavy. Anti-thrombotické působení při zkoušce agregace psích destiček *ex vivo* je předpokladem takového působení u lidí (například J. L. Catalfamo a W. Jean Dodds, "Isolation of Platelets from Laboratory Animals" *Methods Enzymol.* 169, část A, 27, 1989). Výsledky zkoušek sloučeniny obecného vzorce II uvedenými způsoby jsou shrnuty v tabulce VI. V téže tabulce jsou také výsledky porovnávacích zkoušek pro 4,4-(piperidyl)butanoylglycylasparagyltryptofan, tedy sloučeniny podle zveřejněného evropského patentového spisu číslo EP O 479 481. (V následující tabulce jsou v prvním řádku výsledky zkoušek sloučeniny podle příkladu 15 a ve druhém řádku pro porovnání výsledky testu uvedené sloučeniny podle evropského patentového spisu číslo EP O 479 481).

Tabulka VI

Inhibice agregace fixované destičky (IC ₅₀ μ M)	Dávka (mg/kg)	Inhibice agregace destiček vyvolané ADP <i>ex-vivo</i> procento inhibice <i>ex vivo</i> agregace destiček po orálním podání				
		hodiny				
		1	3	6	12	24
0,097	5	100	100	100	98	50
0,047	5	53	<20			

Pracovníkům v oboru shora uvedené příklady vynález a jeho přednosti dostatečně objasňují a znova se připomíná, že není záměrem, aby vynález v nějakém smyslu omezovaly.

Průmyslová využitelnost

Stabilní, nehygroskopická krystalická forma N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl]-N-ethylglycyl]ových derivátů která má antithrombické účinky, zahrnující inhibici shlukování destiček a vytváření thrombu u savců pro výrobu farmaceutických prostředků pro prevenci a léčení thrombosis spojené s chorobnými stavy, jako je infarkt myokardu, mrtvice, onemocnění periferních arterií a roztroušené intravaskulární koagulace.

Handwritten signature

PROJEKTOVÁ KANCELÁŘ
Vlastimil ŠTOLČEK KALENSKÝ
A PARTNERI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika



1999-551

P A T E N T O V É N Á R O K Y

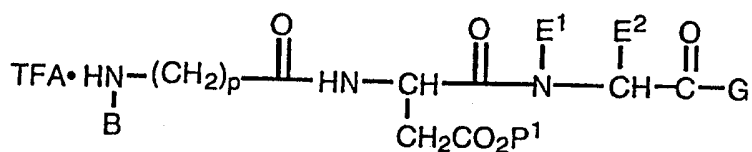
1. β -Benzylester N-(N-terc.-butoxykarbonyl-N-ethylglycyl)-(L)-asparagové kyseliny.
2. (L)- β -Cyklohexylalaninamid N-[N-[N-[4-[N-benzyloxykarbonylpiperidin-4-yl]butanoyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl]- β -benzylesteru
3. 4-(4-Piperidin)butylidenylkarboxylová kyselina.
4. (L)- β -Cyklohexylalaninamid N-[N-[N-[3-[N-benzyloxykarbonyl-4-piperidin)propylidenylkarbonyl]-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl]- β -benzylesteru.
5. Nehygroskopický krystalický N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)- β -cyklohexylalaninamid nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl.
6. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje β -benzylester N-(N-terc.-butoxykarbonyl-N-ethylglycyl)-(L)-asparagové kyseliny podle nároku 1 a farmaceutický nosič.
7. Způsob přípravy nehygroskopického krystalického N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl]-(L)- β -cyklohexylalaninamidu , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se na hygroskopický krystalický N-[N-[N-(4-(piperidin-4-yl)butanoyl)-N-ethylglycyl)-(L)-asparagyl)-(L)- β -cyklohexylalaninamid působí prostředím o přibližně 40 až 100% relativní vlhkosti o teplotě přibližně 20 až 80 °C.
8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se působí prostředím o přibližně 65 až 80% relativní vlhkosti.

9. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se působí prostředím o přibližně 40 až 80% reaktivní vlhkosti.

10. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se působí za statických podmínek.

11. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se působí za dynamických podmínek.

12. Způsob přípravy soli sloučeniny obecného vzorce



kde znamená

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

E¹ atom vodíku,

E² α-uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α-aminokyseliny, atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, heterocyklylovou, substituovanou heterocyklylovou, heterocyklylalkylovou, substituovanou skupinu heterocyklylalkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, na které jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh,

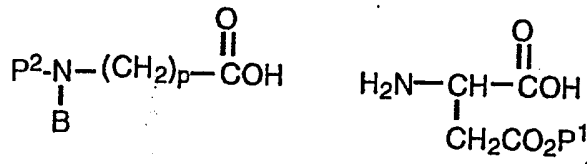
G skupinu OR^1 nebo NR^1R^2 ,

R^1 a R^2 na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

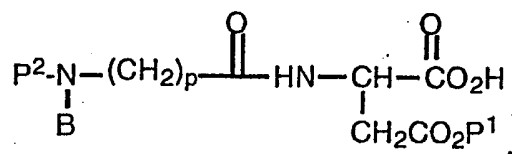
p číslo 1 až 4,

P^1 skupinu chránící kyselou skupinu,

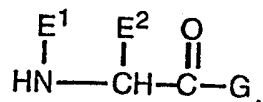
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kopuluje sloučenina obecného vzorce



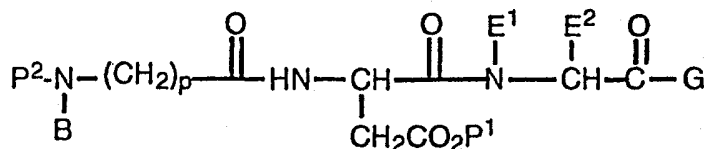
kde znamená P^2 skupinu chránící aminoskupinu labilní za kyselých podmínek, první meziproduct obecného vzorce



se kopoluje se sloučeninou obecného vzorce



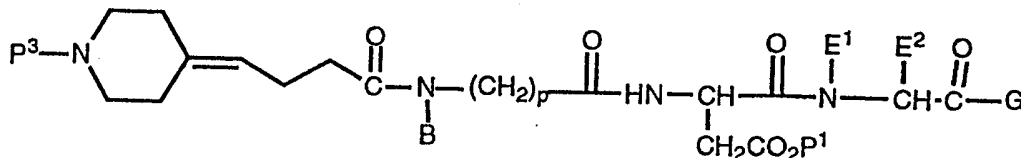
a druhý meziproduct obecného vzorce



se nechává reagovat s trifluoroctovou kyselinou k odstranění chránicí skupiny P².

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m , že P¹ znamená při hydrogenaci labilní skupinu chránicí kyselou skupinu.

14. Sloučenina obecného vzorce



kde znamená

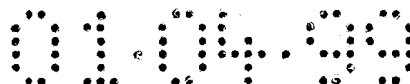
P³ skupinu chránicí aminoskupinu,

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

P¹ skupinu chránicí kyselou skupinu,

E¹ atom vodíku,

E² α-uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α-aminokyseliny, atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, heterocyklylovou, substituovanou heterocyklylovou, heterocyklylalkylovou, substituovanou skupinu heterocyklylalkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, na které jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh,



G skupinu OR^1 nebo NR^1R^2 ,

R^1 a R^2 na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

p číslo 1 až 4.

15. Sloučenina podle nároku 14, kde P^1 znamená při hydrogenaci labilní skupinu chránící kyselou skupinu a P^3 při hydrogenaci labilní skupinu chránící aminoskupinu.

16. Sloučenina podle nároku 15, kde znamená

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

E^1 atom vodíku,

E^2 atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou nebo substituovanou skupinu aralkylovou,

L skupinu OR^1 nebo NR^1R^2 ,

R^1 a R^2 na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou a

p číslo 1 nebo 2.

17. Sloučenina podle nároku 16, kde znamená

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou,

E² atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou.

18. Sloučenina podle nároku 17, kde znamená

B skupinu alkylovou,

E² skupinu alkylovou, cykloalkylovou nebo cykloalkylalkylovou,

R¹ a R² na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou nebo alkylcykloalkylalkylovou,

p číslo 1.

19. Sloučenina podle nároku 18, kde znamená

P³ skupinu benzyloxykarbonylovou,

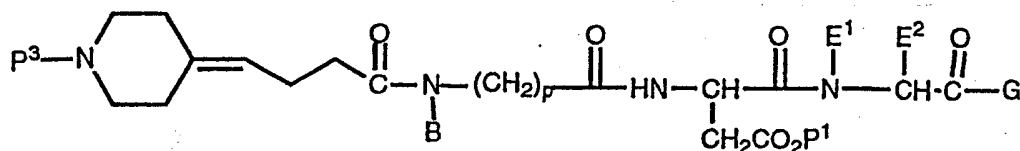
B skupinu ethylovou,

P¹ skupinu benzylovou,

E² skupinu cyklohexylmethylovou,

G skupinu NH₂.

20. Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce



kde znamená

P³ skupinu chránící aminoskupinu,

B skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

P' skupinu chránící kyselou skupinu,

E¹ atom vodíku,

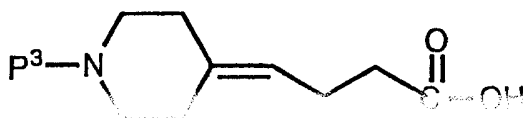
E² α-uhlíkový postranní řetězec přírodně se vyskytující α-aminokyseliny, atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, substituovanou skupinu arylovou, aralkylovou, substituovanou skupinu aralkylovou, heterocyklylovou, substituovanou heterocyklylovou, heterocyklylalkylovou, substituovanou skupinu heterocyklylalkylovou, nebo E¹ a E² spolu s atomem dusíku a uhlíku, na které jsou vázány, tvoří 4-členný, 5-členný, 6-členný nebo 7-členný azacykloalkanový kruh,

G skupinu OR¹ nebo NR¹R²,

R¹ a R² na sobě nezávisle atom vodíku, skupinu alkylovou, cykloalkylovou, cykloalkylalkylovou, alkylcykloalkylovou, alkylcykloalkylalkylovou, arylovou, aralkylovou, alkylarylovou nebo alkylaralkylovou,

p číslo 1 až 4,

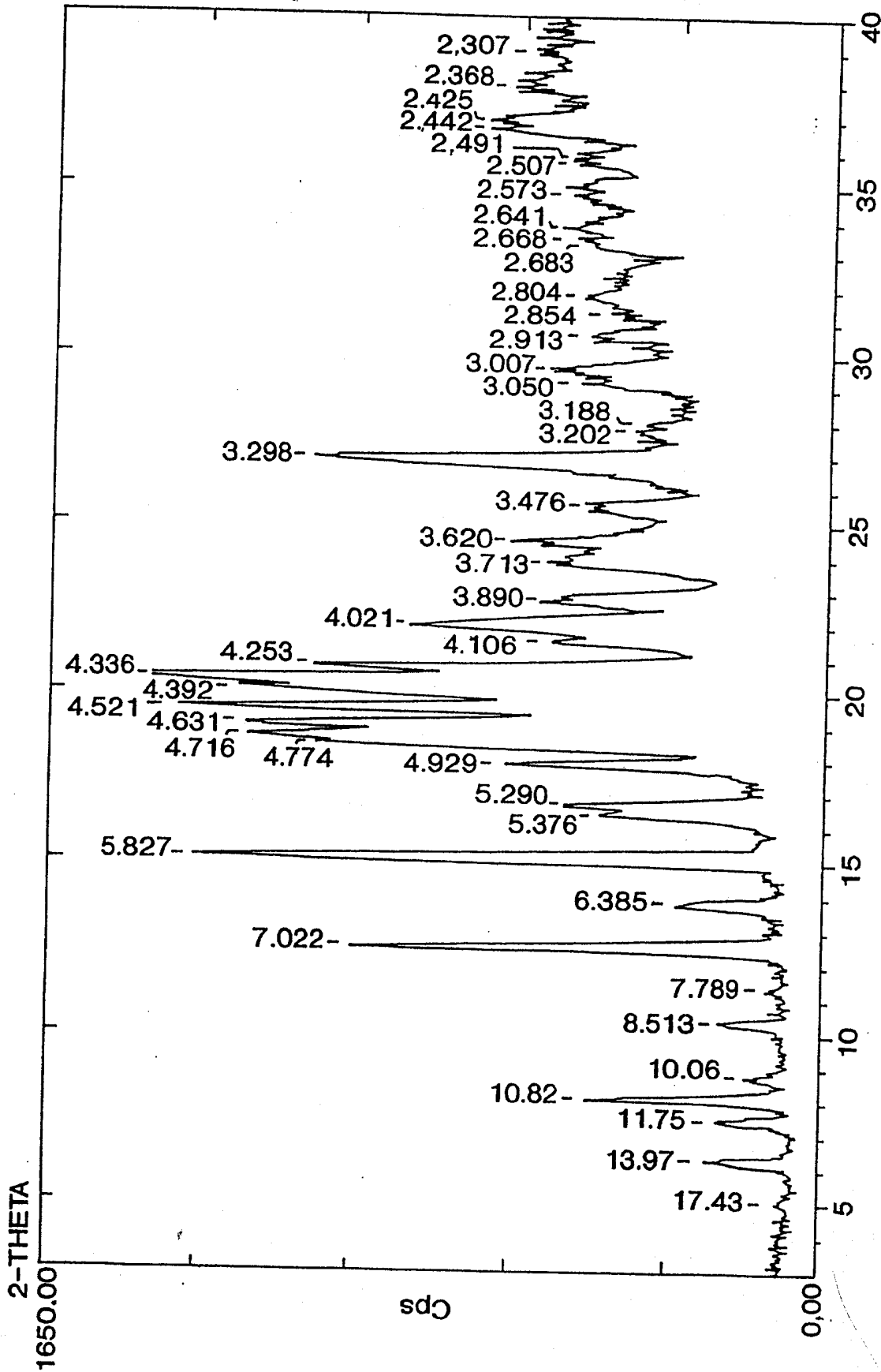
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kopuluje derivát 4-piperidin)butylidenkarboxylové kyseliny obecného vzorce



01.04.99

1999-551

1 / 9

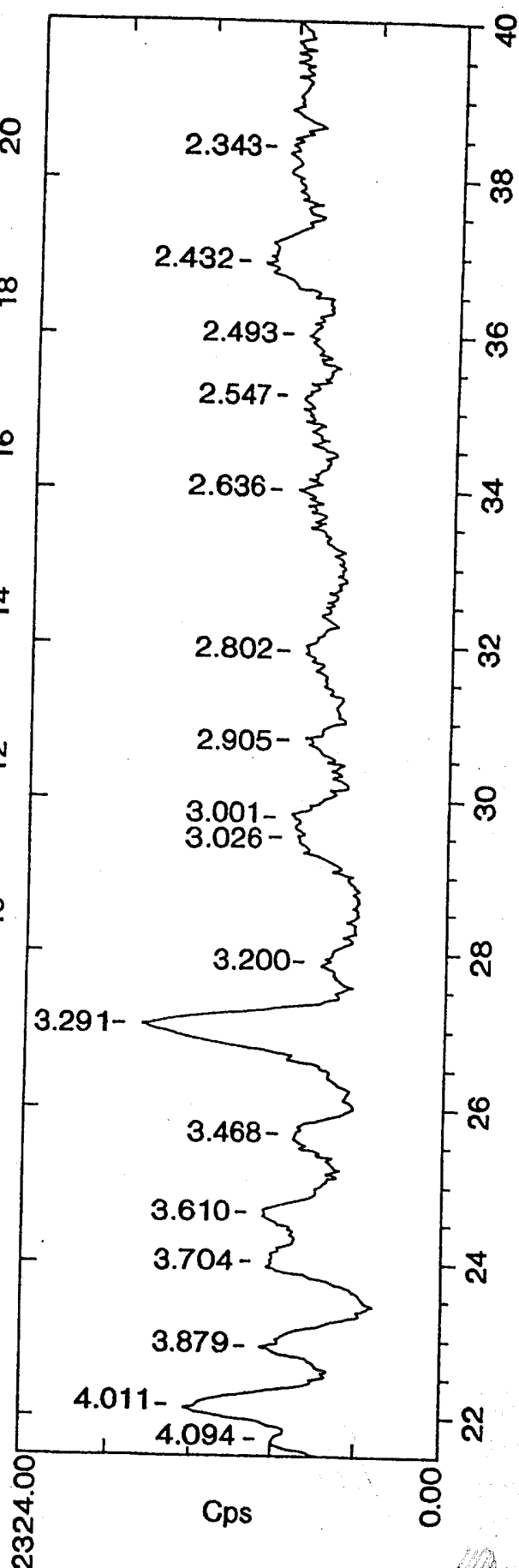
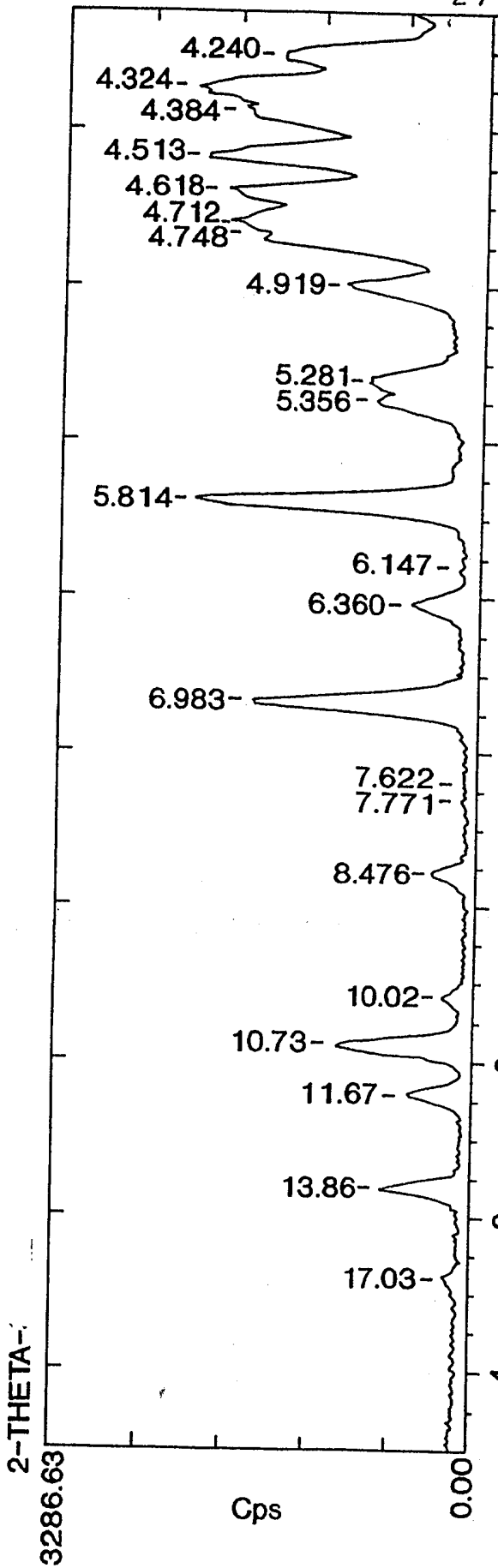


1
OBR.

010499

1099-557

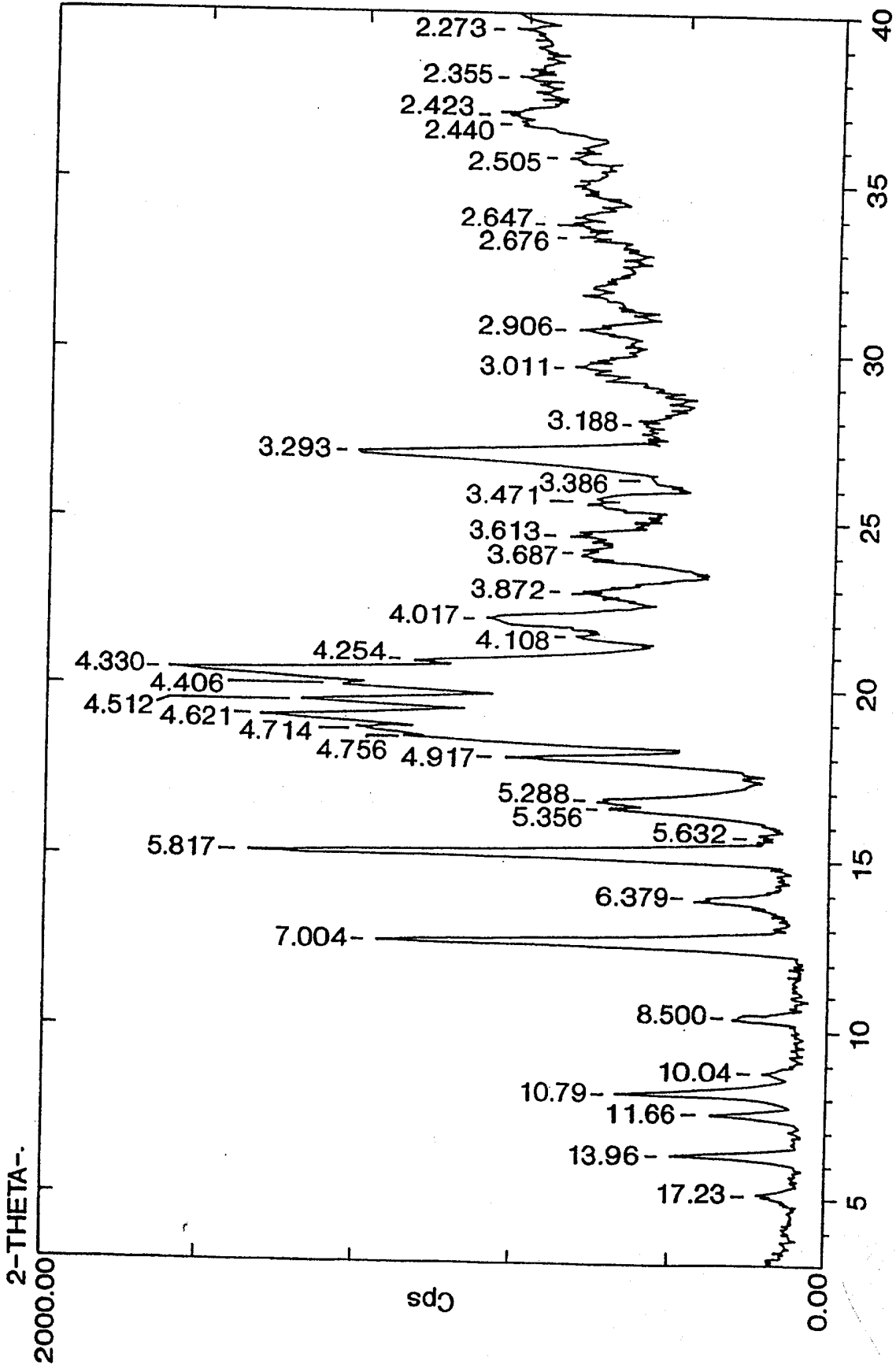
2 / 9



DBB

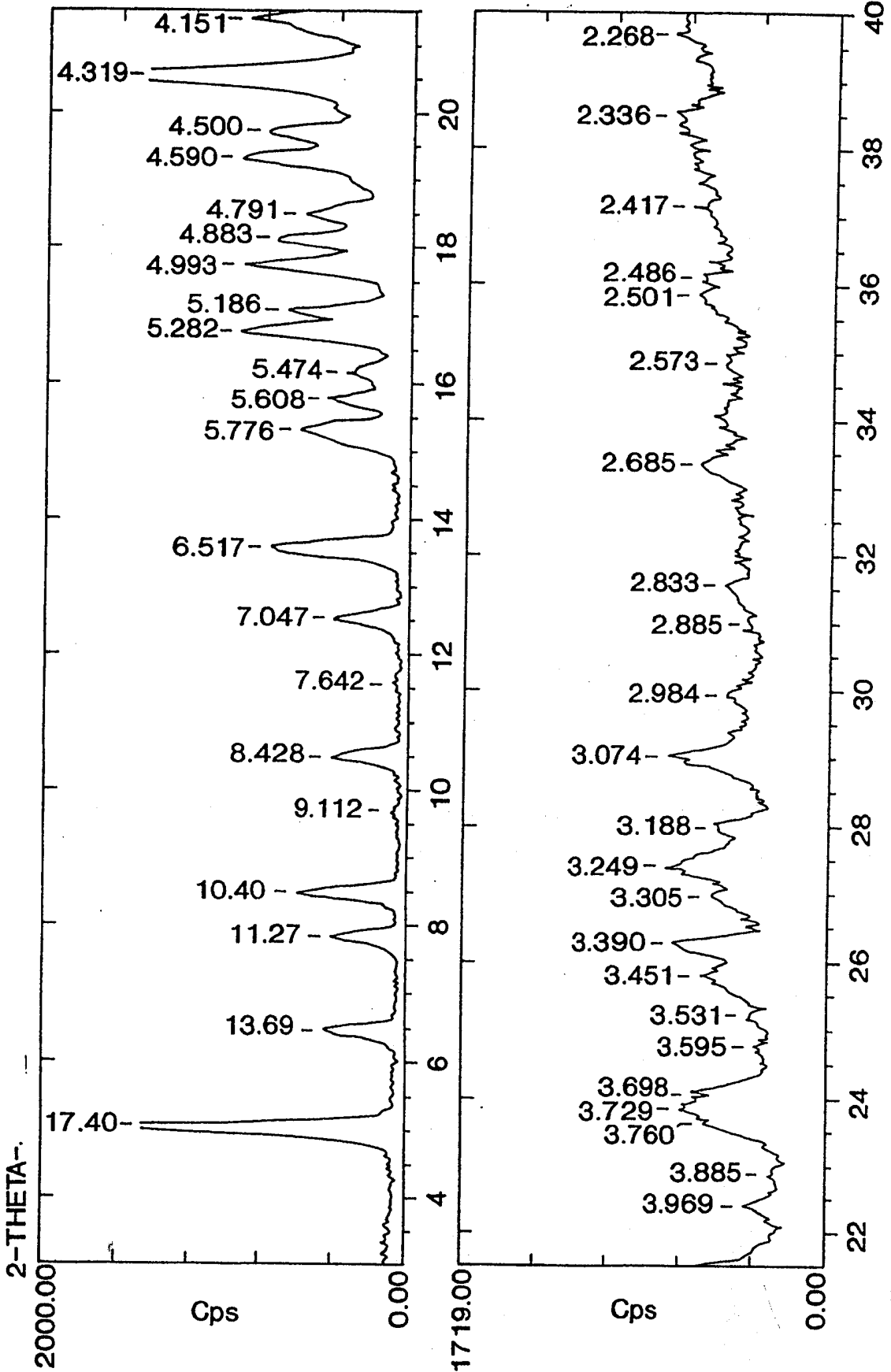
2

[Handwritten signature]



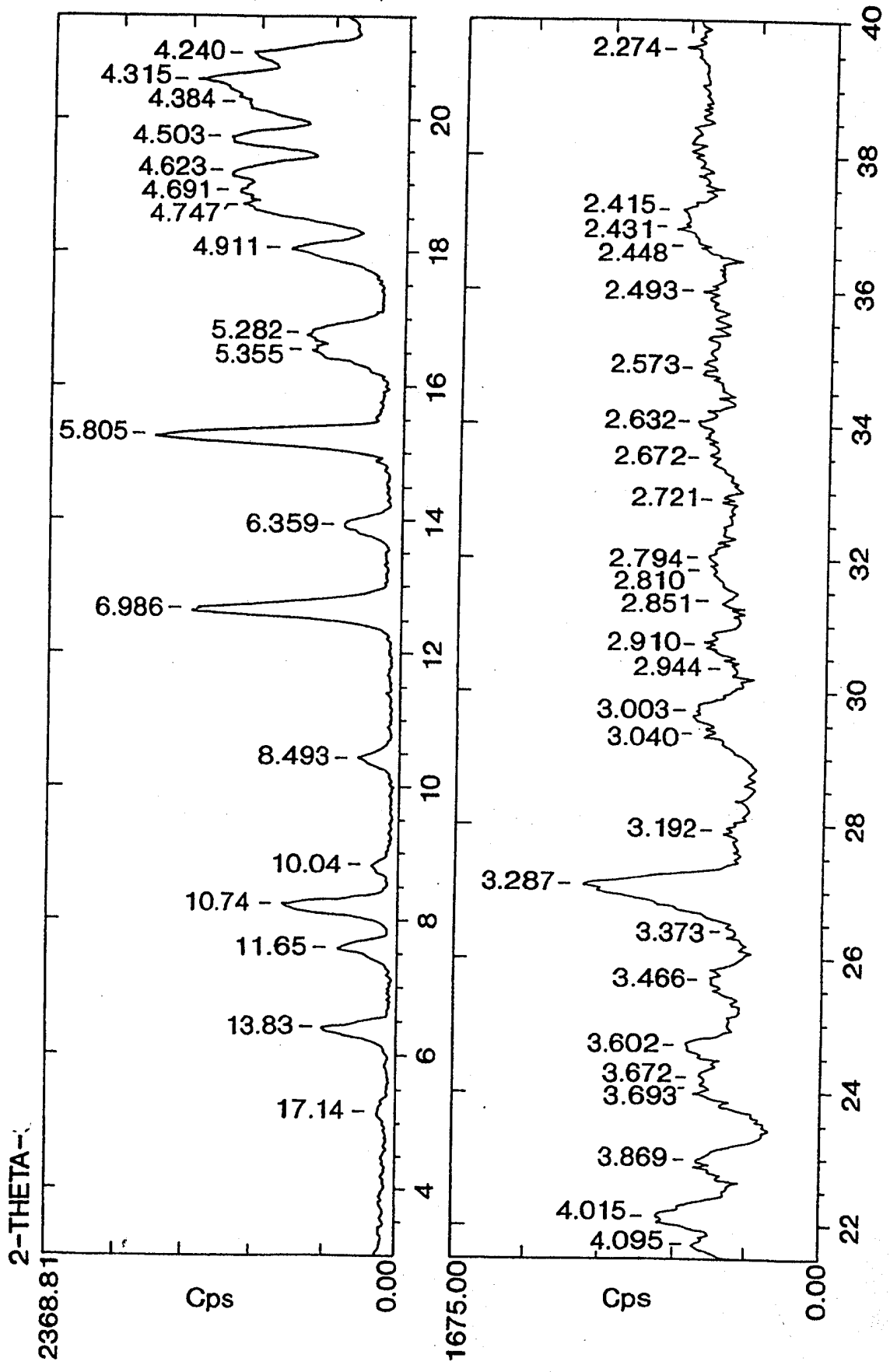
QBR. 3

010499



010499

5/9

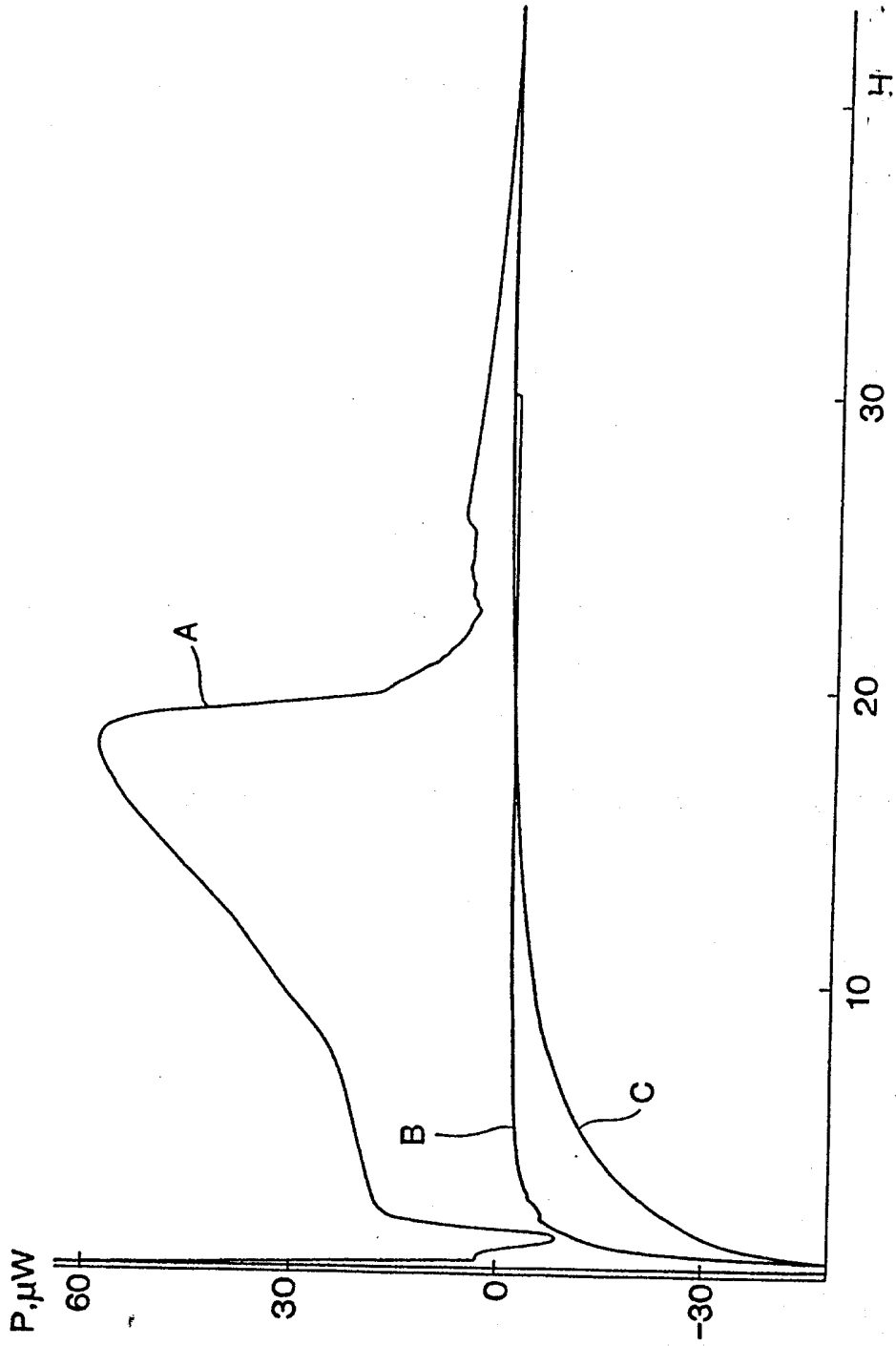


OBR. 5

Handwritten signature and other illegible markings.

01.04.99 1999-557

6/9



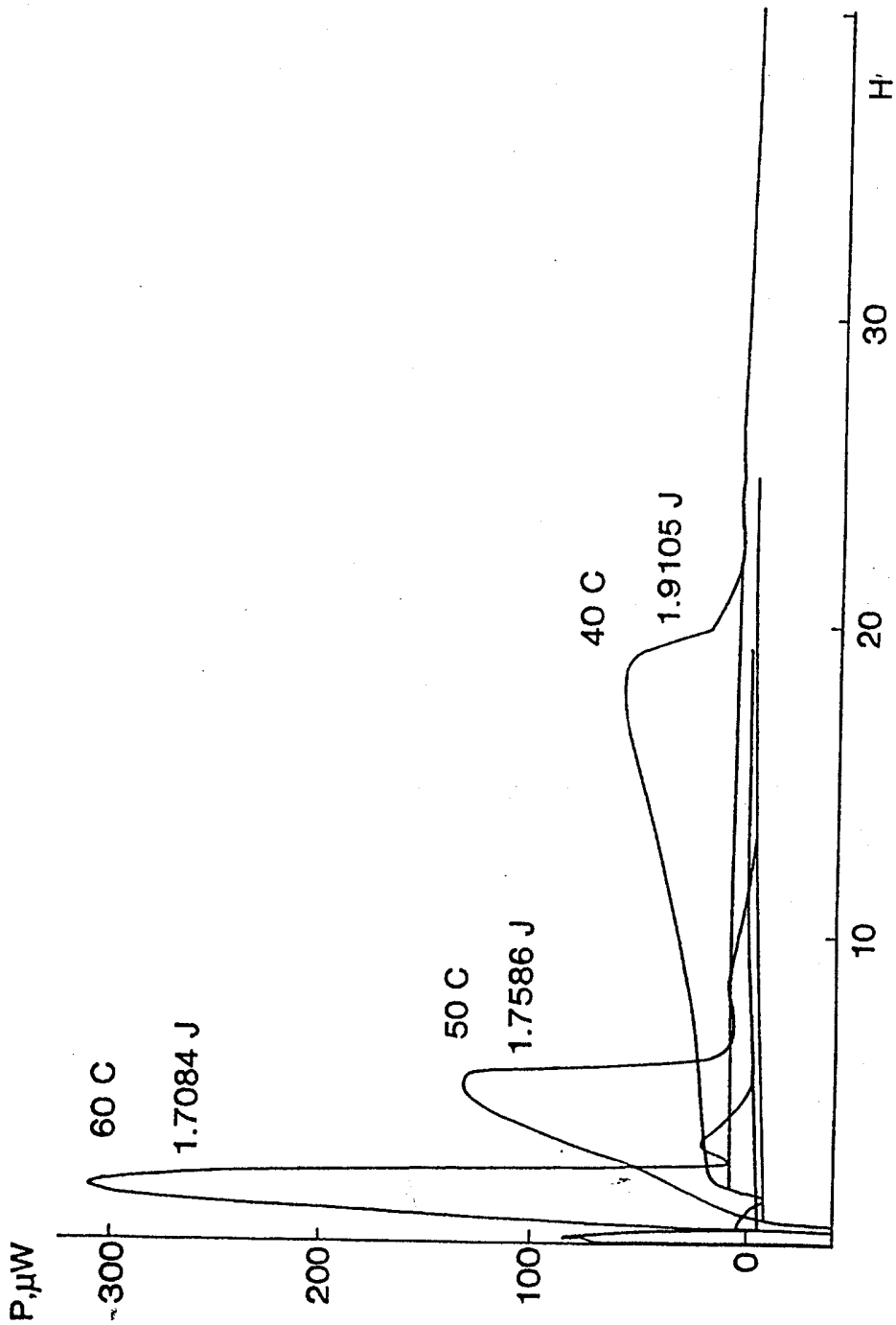
OBR. 6

Handwritten signature

01.04.99

1999-557

7/9

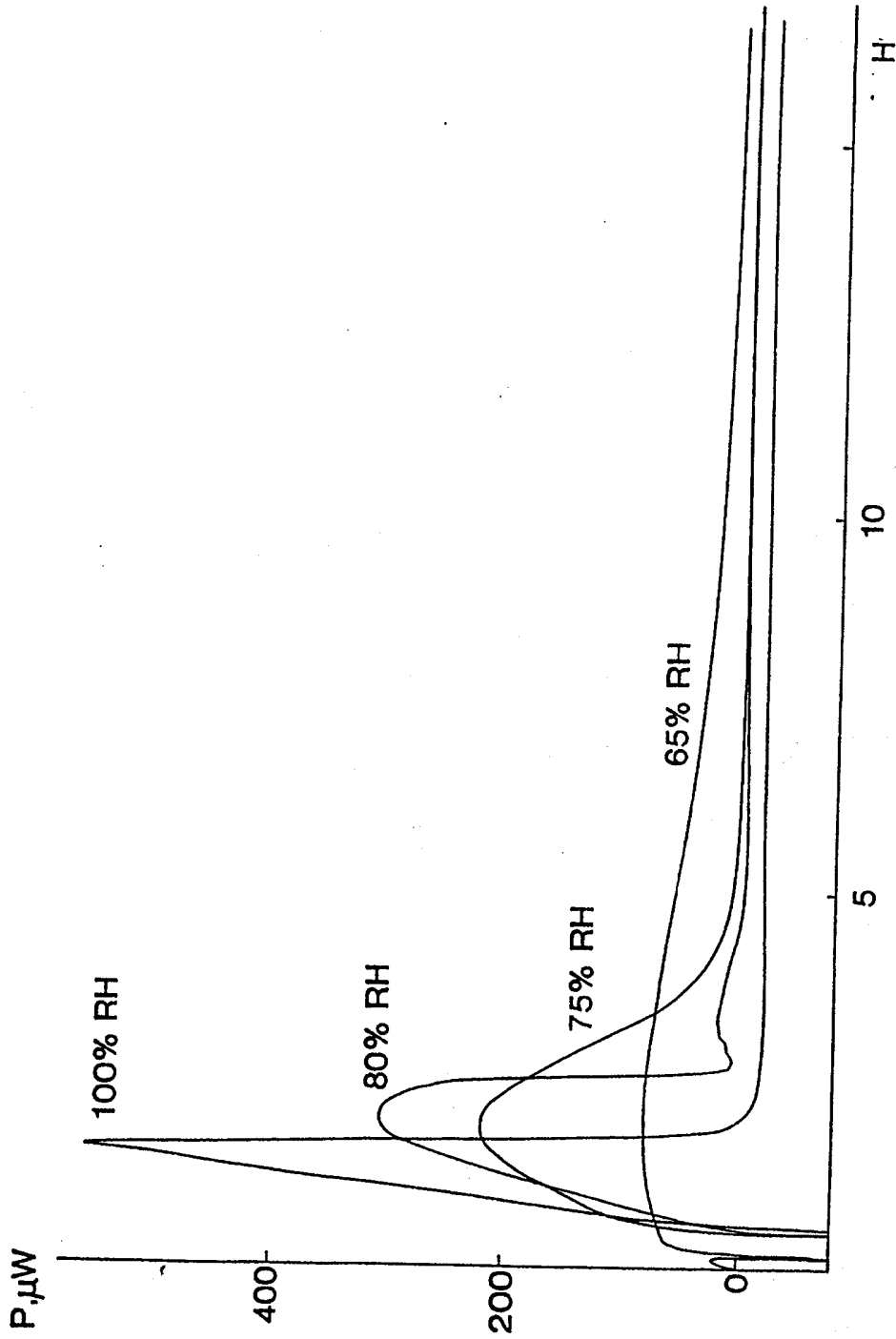


OPR. 7

01.04.99

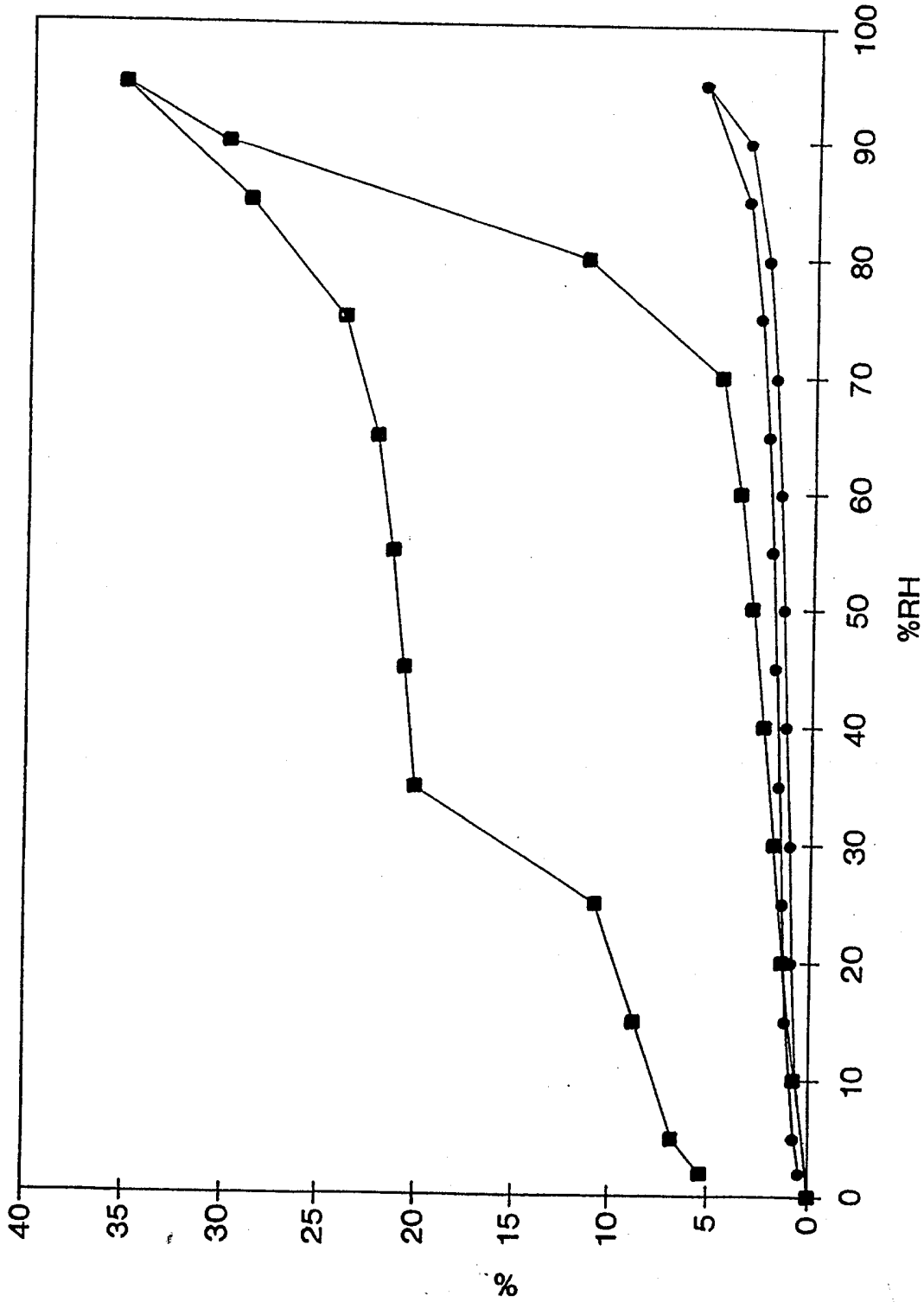
1999-551

8/9



OBR. 8

FOR THE DIRECTOR
OF THE
[Signature]



OBR. 9

JUD. PEV. VALENTY
ed. [Signature]