

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

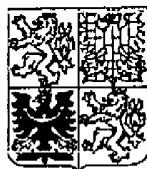
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1168-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.10.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/1092**

(33) Země priority: **DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**
(Věstník č. 9/99)

(86) PCT číslo: **PCT/DK97/00426**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/15542**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 261/12
C 07 D 261/18
C 07 D 275/03
C 07 D 413/04
~~**C 07 D 417/04**~~
A 61 K 31/41

(71) Přihlášovatel:

H. LUNDBECK A/S, Copenhagen-Valby, DK;

(72) Původce:

Bank-Andersen Benny, Copenhagen, DK;

Bogeso Klaus Peter, Horsholm, DK;

Krogsgaard-Larsen Povl, Allerød, DK;

Moltzen Lenz Sibylle, Gentofte, DK;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha
1, 11000;

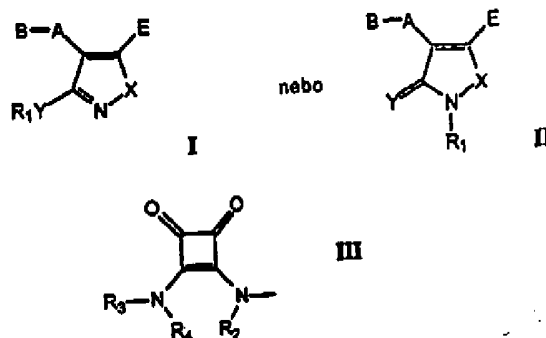
(54) Název přihlášky vynálezu:

**3-alkoxyisoxazol-4-ylsubstituované
deriváty 2-aminokarboxylové kyseliny**

(57) Anotace:

3-alkoxyisoxazol-4-yl-substituované deriváty 2-aminokarboxylové kyseliny nebo jejich sirné analogy obecného vzorce I nebo II, kde R₁ je atom vodíku, C₁-alkyl, C₂-alkenyl, C₂-alkinyl, cykloalk/en/yl, cykloalk/en/yl-C₁-alk/en/in/yl nebo fenylo-C₁-alk/en/in/yl, kde fenylová skupina je popřípadě substituována; A je vazba nebo rozdělovací skupina zvolená ze skupiny C₁-alkylen, C₂-alkenylen nebo C₂-alkinylen a cykloalkylen; B je skupina -CR_a/NR_bR_c/-COOR₅, kde R_a-R_c jsou nezávisle atom vodíku nebo C₁-alkyl, a R₅ je definováno jako R₁ nebo pívaloyloxymethyl, nebo B je skupina vzorce III, kde R₂, R₃ a R₄ jsou nezávisle zvoleny ze skupiny atom vodíku, C₁-alkyl, C₂-alkenyl, C₂-alkinyl, cykloalk/en/yl, cykloalk/en/yl-C₁-alk/en/in/yl, fenylo-C₁-alkyl, thienyl-C₁-alkyl a C₁-alkyl, C₂-alkenyl a C₂-alkinyl, kde jeden nebo více atomů uhlíku je nahrazeno atomem N, O, a/nebo S; nebo R₃ a R₄ jsou spojeny za vytvoření skupiny C₂-alkylen, C₂-alkenylen nebo C₂-alkinylen; nebo

R₄ a R₂ jsou spojeny za vytvoření skupiny C₁-alkylen, C₂-alkenylen nebo C₂-alkinylen, případně mono- nebo di-substituované skupinou hydroxy nebo methyl nebo za vytvoření skupiny CH₂O-CH₂; E je COOR₆, kde R₆ je definováno jako R₅, nebo E je tetrazol-5-yl, 1,2,4-triazol-3-yl nebo 1,2,3-triazol-4-yl; X je O nebo S; Y je O nebo S; a jejich farmaceuticky přijatelné soli, které jsou ligandy receptorů excitačních aminokyselin /EAA/, zvláště receptorů AMPA a/nebo NMDA, použitelné při léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, schizofrenie, bolesti, deprese nebo úzkosti.



CZ 1168-99 A3

3-alkoxyizoxazol-4-yl-substituované deriváty 2-aminokarboxylové kyseliny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové třídy (3-alkoxyizoxazol-4-yl)-substituovaných derivátů 2-aminokarboxylové kyseliny a jejich sirných analogů. Sloučeniny jsou ligandy receptoru excitačních aminokyselin (EAA), zvláště ligandy receptoru AMPA a/nebo NMDA použitelné při léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, schizofrenie, Alzheimerovy choroby, bolesti, deprese a úzkosti.

Dosavadní stav techniky

V důsledku intenzivního studia excitačních mechanismů v centrálním nervovém systému (CNS) v průběhu posledních tří dekad je nyní souhlasný názor v tom, že (S)-glutamát (Glu) je hlavním neurotransmiterem EAA v CNS (Lodge, D. *Excitatory Amino Acids Health and Disease*. J. Wiley & Sons: Chichester, 1988; Wheal, H.; Thomson, A., *Excitatory Amino Acids a Synaptic Transmission*. Academic Press: London, 1991; Meldrum, B. S., *Excitatory Amino Acid Antagonist*. Blackwell Sci. publ.: Oxford, 1991; Krogsaaard-Larsen, P., Hansen, J. J., *Excitatory Amino Acid Receptors: Design of Agonist and Antagonists*.; E. Horwood: Chichester, 1992). Nervový přenos uskutečňovaný glutamátem je zprostředkován velkým počtem receptorů rozříděných do alespoň čtyř heterogenních rodin receptorů pojmenovaných NMDA, AMPA, kyselina kainová, a metabotropní třídy receptorů (Monaghan, D. T, a další, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989, 29, 365 - 402; Watkins, J. C., Krogsaaard-Larsen, P., Honoré,

T., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**, 11, 25 - 33; Simon, R. P., *Excitatory Amino Acids*. Thieme Med. Publ.: New York, **1992**).

Existují velmi silné důkazy pro podporu názoru, že nadměrná excitace - zprostředkovaná receptory EAA ("excitotoxicita") je nejdůležitější faktor při cerebrální ischemii po mrtvici, úrazu hlavy, dušení, subarachnoidální hemoragii, zástavě srdce a jiných situacích (Lodge, D., **1988** výše; Meldrum, B. S., **1991** výše). Na zvířecích modelech bylo ukázáno, že poškození způsobená různými ischemickými stavy mohou být inhibována podáváním antagonistů Glu. Ačkoliv je tedy relativní důležitost různých tříd receptorů EAA při ischemických poškozeních nejasná, panuje obecný souhlas, že antagonisté receptoru EAA jsou potenciálními terapeutickými prostředky při těchto stavech.

Hromadí se důkazy pocházející z různých oblastí neurochemického a farmakologického výzkumu ukazují na to, že nesprávné mechanismy receptoru EAA, které mohou zahrnovat také "excitotoxicitu", mají úlohu v Huntingtonově chorobě (Young, A. B. a další, *Science* **1988**, 241, 981 - 983), epileptických poruchách (Krogsgaard-Larsen, P.; Hansen, J. J., **1992** výše), Parkinsonově chorobě (Klockgether, T.; Turski, L. *Trends. Neurosci.* **1989**, 12, 285 - 286) a Alzheimerově chorobě (Greenamyre, J. T.; Maragos, W. F. *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* **1993**, 5, 61 - 94; Francis, P. T a další, *J. Neurochem.* **1993**, 60, 1589 - 1604).

Navíc se mohou centrální receptory EAA účastnit synaptického mechanismu podporujícího schizofrenii (Reynolds, G. P., *Trends. Pharmacol. Sci.* **1992**, 13, 116 - 121), bolest a úzkost (Drejer, J. v: *Excitatory Amino Acid Receptors: Design of Agonists and Antagonists* (eds. Krogsgaard-Larsen, P.; Hansen, J. J.) E. Horwood: Chichester **1992**, str. 352 - 375) a depresi (Trullas, R., Skolnick, P., *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, 185, 1 - 10 a Trullas a další, *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, 203, 379 - 385. Snížená funkce receptorů EAA (hypoaktivita

EAA) tak patrně hraje úlohu např. při schizofrenii (Deutsch, S. I. a další, *Clin. Neuropharmacol.* **1989**, 12, 1 - 13) a některých klinických příznacích pozorovaných u Alzheimerovy choroby (Greenamyre, J. T. a další, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **1988**, 12, 421 - 430). Je možné, že „excitotoxicita“ stejně jako hypoaktivita EAA se účastní v komplexních mechanismech spojených s Alzheimerovou chorobou (Greenamyre, J. T., **1988** výše; Greenamyre, J. T.; Maragos, W. F., **1993**, výše).

Předpokládá se tedy, že ligandy receptoru EEA budou použitelné při léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, úzkosti, schizofrenie, deprese a bolesti.

Většina dosud testovaných receptorů EAA vykazuje více nebo méně vyjádřenou neurotoxicitu v modelových systémech a tím může být omezeno klinické použití těchto sloučenin (Carlsson, M.; Carlsson, A., *Trends. Neurosci.* **1990**, 13, 272 - 276), (Willets, J.; Balster, R. L.; Leazer, J. D., *Trends. Pharmacol. Sci.*, **1990**, 11, 423 - 428).

Látky částečně antagonistující EAA vykazující vhodnou rovnováhu mezi agonismem a antagonismem mohou být na druhé straně terapeuticky zajímavé co se týče výše uvedených indikací (Greenamyre, J. T., **1988** výše; Christensen, I. T. a další, *Drug. Des. Del.*, **1989**, 5, 57 - 71; Francis, P. T. a další, *J. Neurochem.* **1993**, 60, 1589 - 1604). Látky s částečně agonistickým účinkem mohou mít v důsledku antagonistického profilu jejich EAA terapeuticky využitelnou neuroprotektivní schopnost a současně mohou být dostatečně agonistické pro zabránění celkové blokády nervového přenosu zprostředkovaného příslušným receptorem EAA.

Bylo ukázáno, že ATPA, 5-terc-butylanalóg AMPA (kyselina (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylizoxazol-4-yl)propionová), je systémově aktivní a v testech na zvířatech nemá neurotoxické účinky (Ornstein, P. L. a další, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 2046 - 2048;

Lauridsen, J.; Honoré, T.; Krogsgaard-Larsen, P., *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 66 - 672).

Podobně bylo zjištěno, že jako samotná AMPA, mají selektivní agonistické účinky na receptory AMPA mono- a bicyklické analogy AMPA (Hansen, J. J.; Krogsgaard-Larsen, P., *Med. Res. Rev.* **1990**, 10, 55 - 94; Krogsgaard-Larsen, P.; Hansen, J. J, **1992** výše). Jeden z těchto analogů, kyselina (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-fenylizoxazol-4-yl)propionová (APPA), ve které je methylová skupina AMPA nahrazena fenylovou skupinou, má slabý ale jedinečný parciální agonistický profil (Christensen, I. T. a další, **1989**, výše).

ACPA, (kyselina (RS)-2-amino-3-(3-karboxy-5-methylizoxazol-4-yl)propionová) byla popsána jako silný agonista receptoru AMPA (Madsen, U. a Wong, E. J., *Med. Chem.* **1992**, 35, 107 - 111).

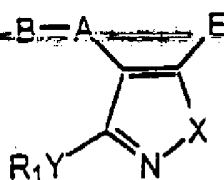
Navíc WO-A1 95012587 popisuje třídu (5-arylizoxazol-4-yl)-nebo (5-arylizothiazol-4-yl)-substituovaných 2-aminokarboxylových kyselin jako ligandy receptoru EAA.

Jak je zřejmé z uvedených údajů, ligandy receptoru EEA aktivní vůči CNS a nevykazující neurotoxicitu s dobrým pronikáním do CNS jsou potřebné pro léčení různých výše uvedených onemocnění; předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí takových nových léčiv.

Podstata vynálezu

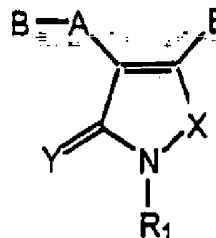
Nyní bylo zjištěno, že ligandy receptoru EEA, zvláště ligandy receptoru AMPA a/nebo NMDA je nová třída (3-alkoxyizoxazol-4-yl)-substituovaných derivátů 2-aminokarboxylové kyseliny a jejich sírné analogy.

Předkládaný vynález se tedy týká nové třídy sloučenin obecného vzorce I nebo II



I

nebo

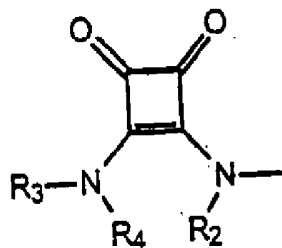


II

kde R_1 je atom vodíku, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkinyl, cykloalk(en)yl, cykloalk(en)yl- C_{1-6} alk(en/in)yl nebo feny- C_{1-6} alk(en/in)yl, kde fenylová skupina je popřípadě substituována skupinou CF_3 , atomem halogenu, skupinou C_{1-6} alkyl nebo C_{1-6} alkoxy;

A je vazba nebo oddělovací skupina (spacer) zvolená ze skupiny C_{1-6} alkylen, C_{2-6} alkenylen nebo C_{2-6} alkinylen a cykloalkylen;

B je skupina $-CR_a(NR_bR_c)-COOR_5$, kde $R_a - R_c$ jsou nezávisle atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl, a R_5 je definováno jako R_1 nebo pivaloyloxymethyl, nebo B je skupina vzorce III



III

kde R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle zvoleny ze skupiny

a) atom vodíku, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkinyl, cykloalk(en)yl, cykloalk(en)yl- C_{1-6} alk(en/in)yl, feny- C_{1-6} alkyl, thienyl- C_{1-6} alkyl, a

b) C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl a C_{2-6} alkinyl, kde jeden nebo více atomů uhlíku je nahrazeno atomem N, O, a/nebo S; nebo

R_3 a R_4 jsou spojeny za vytvoření skupiny C_2-C_6 alkylen, C_2-C_6 alkenylen nebo C_2-C_6 alkinylen; nebo

R_4 a R_2 jsou spojeny za vytvoření skupiny C_1-C_3 alkylen, C_2-C_3 alkenylen nebo C_2-C_3 alkinylen, popřípadě mono- nebo disubstituované skupinou hydroxy nebo methyl nebo za vytvoření skupiny CH_2O-CH_2 ;

E je $COOR_6$, kde R_6 je definováno jako R_5 , nebo E je tetrazol-yl, 1,2,4-triazol-3-yl nebo 1,2,3-triazol-4-yl;

X je O nebo S; Y je O nebo S; a

jejich farmaceuticky přijatelné soli.

V dalším hledisku se vynález týká způsobu výroby nových sloučenin vzorce I nebo II.

V ještě dalším hledisku se vynález týká farmaceutického prostředku s obsahem nové sloučeniny vzorce I nebo II spolu s vhodným farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředivem.

V ještě dalším hledisku se vynález týká použití I nebo II pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, schizofrenie, bolesti, deprese nebo úzkosti.

Bylo zjištěno, že některé sloučeniny podle vynálezu jsou ligandy receptoru AMPA s afinitami v mikromolárních koncentracích a bylo také zjištěno, že některé sloučeniny se vážou na receptory NMDA. Navíc se zjistilo, že některé ze sloučenin podle vynálezu mají agonistické účinky, zatímco jiné mají účinky antagonistické. Sloučeniny podle vynálezu jsou tedy použitelné při léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, schizofrenie, bolesti, deprese nebo úzkosti. Sloučeniny, kde R_5 a/nebo R_6 nejsou atomy vodíku, jsou prekurzory sloučenin, ve kterých R_5 a R_6 jsou atomy vodíku.

Podrobný popis vynálezu

Některé sloučeniny obecného vzorce I nebo II mohou existovat jako optické izomery a tyto optické izomery jsou také zahrnuty v rámci vynálezu.

V obecném vzorce I a II má termín C₁₋₆alkyl zahrnovat alkylovou skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem s 1 až 6 atomy uhlíku, včetně jako je methyl, ethyl, 1-propyl, 2-propyl, 1-butyl, 2-butyl, 2-methyl-2-propyl atd. Podobně C₂₋₆alkenyl a C₂₋₆alkinyl označují přímé nebo rozvětvené skupiny s 2 až 6 atomy uhlíku a C₁₋₆alkylen, C₂₋₆alkenylen a C₂₋₆alkinylen označují rozvětvené nebo přímo dvojvazné skupiny. Cykloalkyl označuje skupinu s 3 až 7 atomy uhlíku a termín C₁₋₆alkoxy označuje skupiny obsahující C₁₋₆alkylovou, C₂₋₆alkenylovou nebo C₂₋₆alkinylovou část jak definováno výše.

Termín "alk(en/in)yl" znamená, že skupinou může být skupina alkyl, alkenyl nebo alkinyl.

Termín vazba (definovaný pro A) znamená, že B může být připojeno přímo k 4-poloze izoxazolového kruhu.

Halogen znamená fluor, chlor, brom nebo jód.

Některé sloučeniny obecného vzorce I nebo II mohou existovat ve formě svých farmaceuticky přijatelných solí, které jsou v rámci vynálezu rovněž zahrnuty.

Solí sloučenin obecného vzorce I nebo II jsou soli vytvořené s netoxickými organickými kyselinami, například maleinovou, fumarovou, benzoovou, askorbovou, šťavelovou, vinnou, mléčnou a jablečnou, nebo anorganickými kyselinami jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, fosforečná a dusičná nebo může jít o soli s anorganickými bázemi jako jsou soli s alkalickými kovy, např. sodné, draselné nebo lithné, soli s kovy alkálických zemin, např. vápenaté nebo hořečnaté nebo amonné soli nebo soli s organickými bázemi.

Ve vzorci I. a II znamená A s výhodou vazbu nebo C₁-C₃alkylen, nejvýhodněji methylen.

B je s výhodou -CR₂(NR_bR_c)-COOR₅, kde R_b - R_c je atom vodíku a R_a je atom vodíku nebo C₁₋₆alkyl, vhodně methyl, nebo skupina vzorce III, kde R₂, R₃ a R₄ jsou atom vodíku nebo C₁₋₆alkyl, nebo R₄ a R₂ jsou spojeny za vytvoření C₁-C₃alkylenové skupiny. Nejvýhodněji je B skupina -CH(NH₂)-COOH nebo skupina vzorce III, kde každá ze skupin R₂, R₃ a R₄ je atom vodíku.

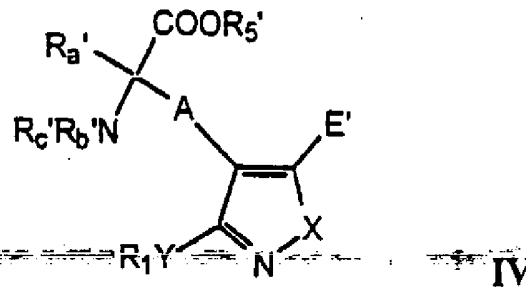
S výhodou znamená E COOH, triazolyl nebo tetrazolyl, s výhodou COOH. Další podskupina zahrnuje sloučeniny, kde E znamená COOR₆, kde R₆ není H. Ve výhodné podskupině sloučenin podle vynálezu jsou X a Y atom kyslíku. Další skupiny jsou skupiny, kde X je O a Y je S; Y je O a X je S; a popřípadě X a Y jsou S.

R₁ je s výhodou C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl nebo C₂₋₆alkinyl. Zvláště vhodné skupiny R₁ jsou methyl, ethyl, propyl, butyl a propargyl.

Ve výhodném provedení vynálezu je sloučeninou sloučenina vzorce I, kde A je vazba nebo C₁-C₃alkylen, B je -CH(NH₂)-COOH nebo skupina vzorce III, kde každá R₃, R₄ a R₂ je atom vodíku, X a Y jsou obě atom kyslíku a R₁ je C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl nebo C₂₋₆alkinyl. Zvláště vhodné skupiny R₁ jsou methyl, ethyl, propyl, butyl a propargyl.

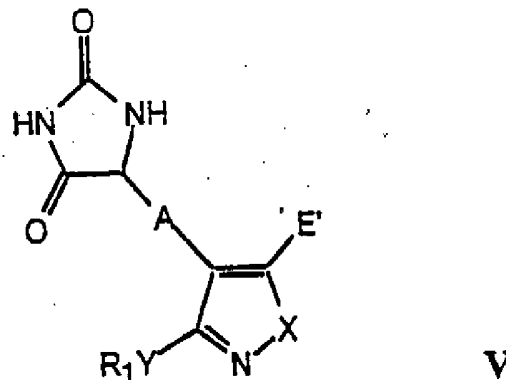
Podle vynálezu se sloučeniny vzorce I nebo II připravují následujícími způsoby. Pro jednoduchost jsou reakce a) - e) a g) - h) ukázány pouze pro vzorec I. Některé způsoby mohou být použity i pro vzorec II.

a) pro získání sloučeniny vzorce I, kde B je -CR_a(NR_bR_c)-COOR₅, kde R_a - R_c a R₅ jsou jak definováno výše a alespoň jedna ze skupin R_b, R₅ a R₆ je atom vodíku, odstranění ochranných skupin ze sloučeniny obecného vzorce IV



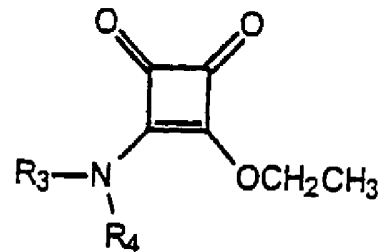
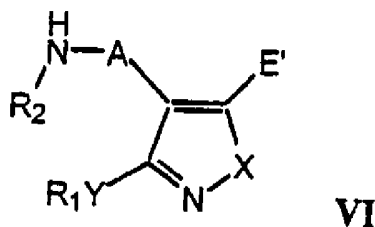
kde R_1 , A, X a Y jsou jak definováno výše, R_a' - R_c' , E' a R_5' jsou jak definováno výše pro R_a - R_c popřípadě E a R_5 , nebo jsou ochranné skupiny za předpokladu, že alespoň jedna skupina z E' , R_5' a R_c' je ochranná skupina;

b) pro získání sloučeniny vzorce I, kde B je $-CR_a(NR_bR_c)-COOR_5$, kde R_b , R_c a R_5 jsou všechny atomy vodíku, odstranění ochranných skupin ze sloučeniny obecného vzorce V



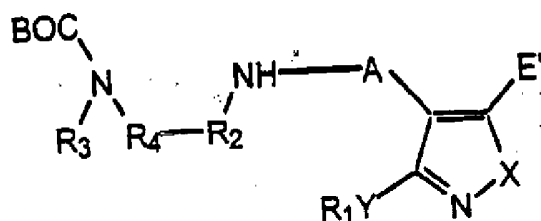
kde R_1 , A, Y, X a E' jsou jak definováno výše;

c) pro získání sloučeniny vzorce I, kde B je skupina vzorce III, adičně-eliminací reakcí sloučeniny obecného vzorce IV se sloučeninou obecného vzorce VII



kde skupiny R_1 - R_4 , A, X, Y a E' jsou jak definováno výše;

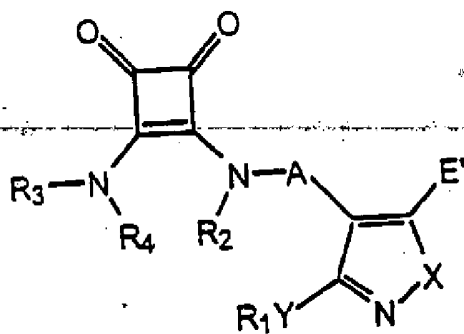
d) pro získání sloučeniny vzorce I, kde B je skupina vzorce III, kde R^4 a R^2 jsou spojeny za vytvoření skupiny C_{1-3} alkylen, C_2-C_3 alkenylen nebo C_2-C_3 alkinylen, popřípadě mono- nebo disubstituované skupinou hydroxy nebo methyl, reakce sloučeniny vzorce VIII



VIII

kde R_1 , R_3 , A, X, Y a E' jsou jak definováno výše; R_4 a R_2 jsou spojeny za vytvoření skupiny jak definováno výše a BOC je t-butoxykarbonyl, s 3,4-diethoxy-3-cyklobuten-1,2-dionem a následným uzavřením kruhu a odstraněním ochranných skupin;

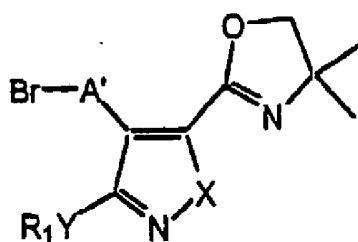
e) pro získání sloučeniny vzorce I, kde B je skupina vzorce III a jedna nebo více skupin $R_2 - R_4$ jsou různé od vodíku, alkylation sloučeniny obecného vzorce IX



IX

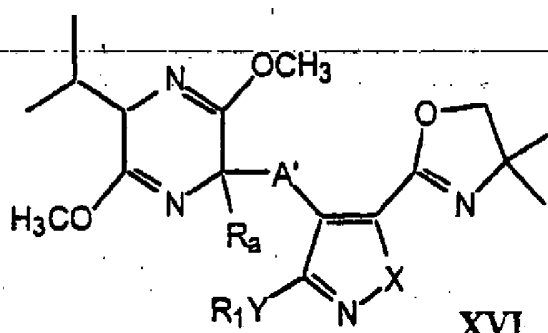
kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , A, X, Y a E' jsou jak definováno výše, avšak alespoň jedna ze skupin $R_2 - R_4$, znamená atom vodíku;

f) pro získání sloučeniny vzorce I nebo II, alkylation sloučeniny obecného vzorce X



XV

Schöllkopfově bis-laktimové syntéze aminokyselin a následnému odstranění ochranných skupin ze získaného bislaktimetheru vzorce XVI.



XVI

kde X, Y, R_a a R_1 jsou jak definováno výše a A' je jak definováno pro A, s tím rozdílem, že nemusí jít o vazbu.

Při způsobu podle vynálezu jsou výhodné skupiny následující:

Pro E = COOH: 4,5-dihydro-4,4-dimethyloxazol-2-yl, C_{1-6} alkyl nebo benzyl; pro R_5 = atom vodíku: C_{1-6} alkyl a pro R_b = atom vodíku: C_{1-6} alkylkarbonyl.

Jednostupňové odstranění ochranných skupin podle způsobu a) se provádí působením vhodné vodné kyseliny na sloučeninu vzorce IV, s výhodou 0,5 - 12 N vodné HCl, 48 % vodného HBr, nebo nasyceného roztoku HBr v kyselině octové. Ochranné skupiny je možno také odstraňovat postupně použitím vodných kyselin a vodných bází, s výhodou postupně ve vodné kyselině jako je 0,5 - 12 N HCl, vodné bázi jako 1 - 8 N NaOH a vodné kyselině jako 0,5 - 12 N HCl, nebo postupně ve vodné bázi jako 1 - 8 N NaOH a vodné kyselině jako je 0,5 - 12 N HCl.

Výchozí materiály vzorce IV se vhodně připravují z kyseliny 3-alkoxy-4-methylizoxazolkarboxylové (WO 95/12587, A1) úplným odstraněním ochranných skupin ve vodné kyselině za výše uvedených podmínek odstraňování ochranných skupin, popřípadě esterifikací kyseliny 3-hydroxy-4-methylizoxazol-5-karboxylové a následnou alkylací vhodným halogenidem nebo jednoduše alkylací. Potom se provádí bromace 4-methylisoxazolové skupiny a následná alkylace prekurzorem aminokyseliny, např. diethylacetamidomalonátem. Další 4-alkylizoxazoly mohou být připraveny řetězovým prodlužováním, například alkylací kyanidem nebo diethylmalonátem a následným převedením na primární alkylhalogenid nebo aldehyd. Halogenid může být zpracován jak je uvedeno výše. Aldehyd může být použit jako výchozí materiál pro výrobu sloučenin obecného vzorce V.

V kroku b) se odstranění ochranných skupin provádí působením vhodné vodné kyseliny nebo vodné báze na sloučeninu vzorce V, s výhodou 0,5 - 8 N vodné kyseliny chlorovodíkové. Toto odstraňování ochranných skupin může být také prováděno v postupných krocích použitím vodných kyselin a vodných bází jak je uvedeno výše pro metodu a). Hydantoinový kruh může být také rozštěpen vodným roztokem $Ba(OH)_2$, vodnou 10 - 70 % kyselinou sírovou nebo použitím enzymů jako jsou hydantoinázy. Rozštěpení hydantoinového kruhu může být prováděno buď před nebo po odstranění ochranné skupiny E. Skupina R_1 může být znovu zavedena alkylací po úplném odstranění ochranných skupin z hydantoinového meziprojektu.

Hydantoinové kruhy ve sloučeninách obecného vzorce V se běžně vytvářejí způsoby popsanými v Ware, E., *Chem. Rev.*, **1950**, 46, 403 - 470. Štěpení hydantoinového kruhu se výhodně provádí analogicky podle způsobů popsaných v Curry, K. a další, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 864 - 867, Farrington, G. K. a další, *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 2062 - 2067, Grunewald, G. L. a další, *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 754 - 758, Hiroi, K. a další, *Chem. Pharm. Bull.*, **1968**, 16, 444 - 447 nebo Stark, G. R. a další, *J. Biol. Chem.*, **1963**, 238, 214 - 226.

Výchozím materiálem pro výrobu sloučenin vzorce V může být látka získaná podle výše uvedeného popisu u výchozích materiálů pro způsob a). Pokud je A vazba, aldehyd může být připraven z brommethylové sloučeniny bromací a následným převedením na aldehyd.

Adičně-eliminační reakce podle způsobu c) se pohodlně provádí v protickém organickém rozpouštědle jako je alkohol, s výhodou v přítomnosti vhodné anorganické báze jako je vodný NaOH při pokojové teplotě. Meziprodukty vzorce VII je možno vyrobit způsoby popsanými v Cohen, S. a další, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 1533-1536, EP-A2-0496561 nebo Kinney, W. A. a další, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 4720 - 4726.

Meziprodukt obecného vzorce VI je možno snadno připravit Gabrielovou syntézou primárních aminů jak je popsáno v Sheehan, J. C. a další, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 2786 - 88. Alkylhalogenidové výchozí materiály se vhodně získávají podle popisu uvedeného výše u výchozích surovin použitých při způsobu a).

Odstraňování ochranných skupin se vhodně provádí vodnou kyselinou nebo vodnou bází, s výhodou 0,58 N HCl nebo vodným 0,5 - 8 N NaOH, buď při pokojové teplotě nebo při zvýšených teplotách.

Při způsobu d) se provádí reakce a následné otevření kruhu a odstranění ochranných skupin podle popisu v Kinney a další, EP-A2-0496561.

Suroviny vzorce VIII mohou být získány reakcí např. 4-brommethylizoxazolu získaného u popisu výchozích látek u způsobu a) s mono-BOC-chráněným alkylendiaminem podle EP-A2-0496561.

Alkylace sloučenin obecného vzorce IX způsobem e) se pohodlně provádí v inertním organickém rozpouštědle jako je vhodný alkohol, keton nebo dimethylformamid, s výhodou v přítomnosti vhodné báze jako je hydrid sodný, uhličitán draselný nebo triethylamin,

jak se popisuje v Kinney, W. A, EP-A2-0496561. Výchozí sloučeniny vzorce IX mohou být získány způsobem c).

U způsobu f) se provádí odstraňování ochranných skupin ze sloučenin obecných vzorců XI a XII podle popisu uvedeného pro způsob a) nebo použitím roztoku kyseliny chlorovodíkové v diethyletheru nebo jiným způsobem odstraňování ochranných skupin bez přítomnosti vody. Výchozí látka X se získá podle popisu uvedeného pro výchozí látky pro způsob a) výše.

U způsobu g) je možno provádět esterifikaci v oboru známými způsoby, například působením kyselého roztoku alkoholu. Výchozí látky se připravují podle způsobu a) - e) nebo h).

Rozdělování sloučenin obecného vzorce I se vhodně provádí tvorbou diastereomerních solí s opticky aktivními kyselinami nebo bázemi, například 1-fenylethylaminem. V některých případech se dělení provádí výhodně vytvořením diastereomerních sloučenin a následnou separací diastereomerů bleskovou chromatografií nebo krystalizací. Některé diastereomery mohou být vhodně připraveny asymetrickou syntézou použitím Schöllkopfovy bis-laktimové syntézy aminokyselin podle způsobu h). Při této syntéze jsou výchozími látkami alkyhalogenidy získané postupem popsaným výše pro výchozí suroviny u způsobu a). Ochrannou skupinou pro 5-karboxyizoxazolovou skupinu je s výhodou 2-oxazolinová skupina vyrobená z odpovídajícího 5-kyanoizoxazolu (WO 95/12587, A1) kondenzací s aminoalkoholem.

Soli sloučenin podle vynálezu se snadno připravují v oboru známými způsoby, tj. reakcí sloučeniny buď s ekvivalentním množstvím kyseliny nebo báze v rozpouštědle mísitelném s vodou jako je aceton nebo ethanól, s izolací soli zakoncentrováním a ochlazením nebo reakcí s nadbytkem kyseliny nebo báze v rozpouštědle nemísitelném s vodou jako je ethylether nebo chloroform, s přímým

oddělením solí. Tyto soli mohou být také vyrobeny klasickou metodou podvojného rozkladu vhodných solí.

Sloučeniny obecného vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinami mohou být podávány jakýmkoliv vhodným způsobem, např. orálně nebo parenterálně, a sloučeniny mohou být v jakékoli vhodné formě pro tyto způsoby podávání, např. ve formě tablet, kapslí, prášků, sirupů nebo roztoků nebo disperzí pro injekce.

Účinná denní dávka sloučeniny obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli je od 10 µg/kg do 50 mg/kg tělesné hmotnosti.

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude dále ilustrován na příkladech, které však v žádném případě nemají být považovány za omezující.

Všechny teploty tání byly určovány na přístroji Büchi SMP-20 a jsou nekorigované. Spektra ^1H NMR a ^{13}C NMR byla zaznamenávána na spektrometru Bruker 250 MHz (250,13 MHz pro ^1H NMR a 62,90 MHz pro ^{13}C NMR) s použitím TMS jako vnitřního standardu, pokud není uvedeno jinak.

Hmotnostní spektra byla získána na systému Quattro MS-MS firmy VG Biotech, Fisons Instruments připojeném k modulárnímu systému HPLC HP 1050. 20 - 50 µl vzorku (10 µg/ml) rozpuštěného ve směsi 1 % kyseliny octové ve směsi acetonitril/voda = 1 : 1 nebo ve směsi acetonitril/voda/vodný amoniak (25 %) = 25 : 25 : 1 (zwitterionty) bylo zavedeno autosamplerem s průtokem 30 µl/min do elektrorozprašovacího zdroje. Spektra byla zaznamenávána za standardních podmínek pro získání informace o molekulové hmotnosti ((M + H)⁺) nebo ((M - H)). Pozadí bylo odečteno.

Analytická HPLC byla prováděna na koloně 150 x 4,6 mm Lichrocart 250 - 4 (Merck) s elucí při 35 °C průtokem 1 ml/min roztokem methanol/0,01 M octan amonný, pH 8 = 3 : 2. Byly použity přístroje čerpadlo L6200 HPLC pump, a termostat kolony L5025 column thermostat a detektor L4000A UV-VIS detector (nastavený na 230 nm). Diastereomerní čistota vyjádřená jako diastereomerní přebytek (de) byla vypočtena z plochy vrcholů.

Chirální analýza HPLC byla prováděna na koloně 150 x 4,6 mm Sumichiral OA-5000 s elucí při pokojové teplotě s průtokem 1 ml/min 5 mM CuSO₄ (aq). Byly použity přístroje autosampler AS 2000, čerpadlo L6200 HPLC pump, termostat kolony T6300 column thermostat a detektor L4250 UV-VIS detector (nastavený na 240 nm), a počítačový interface D 6000, všechny Merck-Hitachi. Enantiomerní čistoty vyjádřené jako enantiomerní přebytek (ee) byly vypočteny z ploch vrcholů.

Příklad 1

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-methoxyizoxazol-4-yl)propionové (sloučenina 1)

1) Kyselina 3-hydroxy-4-methylizoxazol-5-karboxylová

Kyselina 3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylová (15 g, 88 mmol) a 47 % HBr (vod.) (150 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 6 hod. Roztok byl ochlazen a krystalická v názvu uvedená sloučenina byla oddělena filtrací (8,7 g, 69 %): teplota tání 257 - 259 °C. Ke kyselému filtrátu byla přidána voda (100 ml) a filtrát byl extrahován diethyletherem (6 x 400 ml). Organické extrakty byly promyty roztokem soli (100 ml), sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu za získání surové v názvu uvedené sloučeniny (3,0 g, 24 %). Celkový výtěžek 93 %. Směs ze dvou příprav byla použita v následujícím kroku.

2) Ethyl 3-hydroxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát

Kyselina 3-hydroxy-4-methylizoxazol-5-karboxylová (6,0 g, 42 mmol) a nasycený roztok HCl v EtOH (110 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 4 hod. Roztok byl koncentrován ve vakuu a zbytek rozpuštěn v EtOAc, sušen (MgSO₄) a odpařen ve vakuu za získání surové v názvu uvedené sloučeniny (7,2 g, 100 %). Malý vzorek byl rekrystalizován (EtOAc/heptan) za získání bezbarvých krystalů: teplota tání 133 - 134 °C. Surový produkt byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

3) Ethyl 3-methoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát

Směs ethyl 3-hydroxy-4-methylizoxazolkarboxylátu (1,0 g, 5,8 mmol), methyljodidu (0,4 ml, 5,8 mmol) a K₂CO₃ (1,6 g, 11,7 mmol) v DMF (40 ml) byla zahřívána při 40 °C 1 hod. Směs byla vlita do směsi led/voda (100 ml) a extrahována diethyletherem (3 x 100 ml). Organické extrakty byly promyty vodou (2 x 50 ml), roztokem soli (50 ml), sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu (0,8 g, 74 %). Postup byl opakován pro získání surového produktu ekvivalentnímu 17,5 mmol výchozího materiálu, který byl čištěnbleskovou chromatografií (silikagel, eluent: dichloromethan/diethylether = 9 : 1) za získání surové v názvu uvedené sloučeniny jako žlutého oleje (1,4 g, 43 %), který byl užít v dalším kroku bez dalšího čištění.

4) Ethyl 4-(brommethyl)-3-methoxyizoxazolkarboxylát

Ethyl 3-methoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát (1,3 g, 7,0 mmol), NBS (1,4 g, 7,9 mmol), dibenzoylperoxid (katalytické množství) a tetrachlormethan (40 ml) byly vařeny pod zpětným chladičem 10 hod. Směs byla ochlazena, zfiltrována a koncentrována



ve vakuu za získání surové v názvu uvedené sloučeniny jako žlutého oleje (1,8 g, 97 %). Surový produkt byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

5) Ethyl 2-acetamido-2-(ethoxykarbonyl)-3-[5-(ethoxykarbonyl)-3-methoxyizoxazol-4-yl]propionát

Směs diethylacetamidomalonátu (1,6 g, 7,4 mmol) a terc.-butoxidu draselného (0,9 g, 8,0 mmol) v N-methylpyrrolidonu (30 ml) byla míchána při pokojové teplotě 30 min. Byl přidán ethyl 4-(brommethyl)-3-methoxyizoxazol-5-karboxylát (1,8 g, 6,8 mmol) v N-methylpyrrolidonu (10 ml), (teplota 22 - 28 °C) a získaná směs byla míchána při pokojové teplotě 1,5 hod. Reakční směs byla vlita na směs led/voda (100 ml) a vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 150 ml). Organické extrakty byly promyty vodným roztokem terc.-butoxidu draselného, vodou (100 ml) a roztokem soli (100 ml), sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: EtOAc/heptan = 1 : 1) poskytla surovou v názvu uvedenou sloučeninu (1,8 g, 66 %). Malý vzorek byl rekrystalizován (EtOAc/heptan) za získání bezbarvých krystalů: teplota tání 78 - 80 °C. Surový produkt byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

6) Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-metoxizoxazol-4-yl)propionové (sloučenina 1)

Suspenze ethyl 2-acetamido-2-(ethoxykarbonyl)-3-[5-(ethoxykarbonyl)-3-methoxyizoxazol-4-yl]propionátu (1,2 g, 3,0 mmol) v 0,5 M HCl (100 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 48 hod. Směs byla ochlazená, promyta dichlormethanem (100 ml) a diethyletherem (2 x 100 ml), zfiltrována a koncentrována ve vakuu. Byla přidána voda (5 ml) a pH bylo nastaveno na 3 přidáním NaOH (0,1 M a 1 M). Vodná fáze byla zahuštěna ve vakuu (2 ml) a sraženina oddělena filtrací. Sraženina byla míchána ve vodě (2 ml) při pokojové teplotě 24 hod, za

poskytnutí sloučeniny 1, po filtraci (70 mg, 10 %): teplota tání 222 - 225 °C (rozkl.); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2,88 (dd, 1 H), 3,01 (dd, 1 H), 3,85-3,96 (m, 1 H), 3,90 (s, 3 H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 22,70, 52,38, 57,32, 103,25, 159,43, 165,95, 170,66 (2 C); MS ((M + H) $^+$) m/z 231. Anal. ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0,25 \text{ H}_2\text{O}$), vypočteno C 40,94, H 4,51, N 11,94; nalezeno C 41,01, H 4,37, N 11,91.

Následující sloučeniny byly vyrobeny podobným způsobem:

Kyselina (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionová
(sloučenina 2)

Teplota tání 238 - 240 °C (rozkl.); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1,34 (t, 3 H), 2,90 (dd, 1 H), 3,03 (dd, 1 H), 3,96 (dd, 1 H), 4,23 (q, 2 H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 14,46, 22,41, 51,89, 65,63, 103,34, 159,22, 164,97, 169,75, 170,40; MS ((M + H) $^+$) m/z 245. Anal. ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$) vypočteno C 44,27, H 4,95, N 11,47; nalezeno C 44,10, H 4,92, N 11,34.

Kyselina (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-izopropoxyizoxazol-4-yl)-
propionová (sloučenina 3)

Teplota tání 242 - 243 °C (rozkl.); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1,32 (dd, 6 H), 2,88 (dd, 1 H), 3,01 (dd, 1 H), 3,96 (dd, 1 H), 4,79 (h, 1 H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 21,57, 21,77, 22,35, 51,82, 73,13, 103,56, 159,22, 164,91, 169,08, 170,36; MS ((M + H) $^+$) m/z 259. Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$) vypočteno C 46,51, H 5,46, N 10,85; nalezeno C 46,37, H 5,46, N 10,83.

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-hydroxyizoxazol-4-yl)-propionové (sloučenina 4)

Teplota tání 175 - 177 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3,00 (d, 2 H), 3,88 (t, 1 H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 23,07, 52,07, 105,84, 159,41, 162,11, 169,89, 170,78; MS ((M + H) $^+$) m/z 217. Anal. ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$) vypočteno C 38,10, H 3,88, N 12,70; nalezeno C 37,72, H 3,98, N 12,52.

Příklad 2

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-2,3-dihydro-2-methyl-3-oxoizoxazol-4-yl)propionové (sloučenina 5)

Ethyl 2,3-dihydro-2,4-dimethyl-3-oxoizoxazolkarboxylát

Směs ethyl 3-hydroxy-4-methylizoxazolkarboxylátu (2,0 g, 11,7 mmol) a K_2CO_3 (4,0 g, 29 mmol) v ethanolu (50 ml) byla zahřívána při 40 °C celkem 26 hod. Po 1 hod byl přidán methyljodid (0,8 ml, 13 mmol), a byl přidáván ještě 3 x během dalších 25 hod. Roztok byl zfiltrován a zahuštěn ve vakuu (podle ^1H NMR, byla získána směs 1 : 1 v názvu uvedené sloučeniny a ethyl 3-methoxy-4-methylizoxazolkarboxylátu). Blesková chromatografie (silikagel, eluent: dichlormethan/diethylether = 9 : 1, potom 1 : 1) poskytla ethyl 3-methoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát jako žlutý olej (0,40,18 %) a v názvu uvedenou sloučeninu (0,45 g, 21 %). Malý vzorek naposledy uvedené látky byl rekrystalizován (EtOAc/heptan) za získání bezbarvých krystalů: teplota tání 64 - 65 °C. Surová v názvu uvedená sloučenina byla použita v následujícím kroku bez dalšího čištění.

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-2,3-dihydro-2-methyl-3-oxoizoxazol-4-yl)propionové (sloučenina 5)

V názvu uvedená sloučenina byla získána postupem analogickým s krokem 2) - 6) z příkladu 1, s použitím produktu 1) výše

(70 mg, bezbarvé krystaly, 72 %). Teplota tání 211-212 °C (rozkl.); ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 2,87 (dd, 1 H), 2,97 (dd, 1 H), 3,43 (s, 3 H), 3,92 (dd, 1 H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 23,10, 32,32, 51,79, 106,51, 158,59, 162,37, 166,64, 170,35; MS ($(\text{M} + \text{H})^+$) m/z 231. Anal. ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$) vypočteno C 40,94, H 4,51, N 11,94; nalezeno C 40,93, H 4,55, N 11,71.

Podobným způsobem byla vyrobena následující sloučenina:

Monohydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-2-ethyl-2,3-dihydro-3-oxoizoxazol-4-yl)propionové (sloučenina 6).

^1H NMR (D_2O , 1,4-dioxan δ 3,70) δ 1,28 (t, 3 H), 3,19 (d, 2 H), 4,01 (q, 2 H), 4,18 (t, 1 H); ^{13}C NMR (D_2O , 1,4-dioxan δ 67,40) δ 12,87, 23,85, 42,31, 53,27, 110,57, 159,88, 162,65, 166,67, 172,55; MS ($(\text{M} + \text{H})^+$) m/z 245. Anal. ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) vypočteno C 41,22, H 5,38, N 10,68; nalezeno C 41,28, H 4,74, N 10,27.

Příklad 3

Kyselina (S)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionová (sloučenina (S)-2)

Kyselina (R)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionová (sloučenina (R)-2)

1) 5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxy-4-methylizoxazol

3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karbonitril (2,6 g, 17,1 mmol), 5,4 M NaOMe v MeOH (0,6 ml, 3,4 mmol) a EtOH (80 ml) byly míchány při pokojové teplotě 30 min. Byla přidána kyselina octová (2,2 ml, 39,3 mmol) a 2-amino-2-methylpropan-1-ol (1,8 ml, 18,8 mmol) a získaná směs byla vařena pod zpětným chladičem 20 hod. Reakční směs byla

ochlazená, byla přidána voda (100 ml) a směs byla extrahována EtOAc (3 x 100 ml). Organické extrakty byly promyty 1 M NaOH (50 ml), roztokem soli, sušeny (MgSO_4) a odpařeny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v EtOH (60 ml), a byl přidán roztok KOH (1,8 g, 32 mmol) ve vodě (12 ml) a směs byla míchána při pokojové teplotě 20 hod. EtOH byl odstraněn ve vakuu, byla přidána voda (80 ml) a vodná fáze extrahována EtOAc (3 x 100 ml). Organické extrakty byly promyty vodou, roztokem soli, sušeny (MgSO_4) a odpařeny ve vakuu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: EtOAc/heptan/triethylamin = 75 : 25 : 1) poskytla surovinu v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (2,0 g, 52 %).

2) 4-(brommethyl)-5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol

5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxy-4-methylizoxazol (2,0 g, 8,9 mmol), NBS (1,75 g, 9,8 mmol) a tetrachlormethan (150 ml) byly vařeny pod zpětným chladičem 5 hod. Směs byla ochlazená, zfiltrována a koncentrována ve vakuu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: toluen/EtOAc/triethylamin = 100 : 10 : 1) poskytla v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (2,0 g, 74 %).

3) (2S,5R)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazin
a (2R,2R)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4 yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazin

1,6 M roztok butyllithia v hexanu (1,9 ml, 3,0 mmol) byl přidán k předem ochlazenému (78 °C) roztoku (2R)-(-)-2,5-dihydro-2-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazinu (0,5 ml, 2,8 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (8 ml). Míchání pokračovalo při -78 °C 10 min, byl přidán 4-(brommethyl)-5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-

ethoxyizoxazol (0,85 g, 2,8 mmol) rozpuštěný v tetrahydrofuranu (5 ml) a získaná směs byla míchána při -78 °C 4,5 hod. Reakční směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu a byla koncentrována ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v diethyletheru (40 ml) a vlit do směsi led/voda (40 ml). Vrstvy byly odděleny a vodná fáze extrahována diethyletherem (2 x 40 ml). Organické extrakty byly promyty roztokem soli, sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: heptan/EtOAc = 3 : 1) poskytla (2S,5R) - v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (0,65 g, 57 %): de = 99,2 % (retenční čas asi 38 min). Další eluce poskytla surovou (2R,5R) - v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (38 mg, 3 %).

4) (2R,5S)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4-yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazin
a (2S,5S)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4-yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazin

V názvu uvedená sloučenina byla získána postupem popsaným v kroku 3) výše s použitím (2S)(+)-2,5-dihydro-2-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazin jako výchozího materiálu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: heptan/EtOAc = 3 : 1) poskytla (2R,5S) - v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (0,8 g, 54 %): de >99,2 % (retenční čas asi 38 min). Další eluce poskytla (2S,5S) - v názvu uvedenou sloučeninu jako žlutý olej (60 mg, 4 %).

5) Kyselina (S)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionová
(sloučenina (S)-2)

Suspenze (2S,5R)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4-yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazinu (0,6 g, 1,5 mmol) v 1 M kyselině trifluoroctové (200 l) byla vařena pod zpětným chladičem 5 hod. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu (2 ml), zbytek byl rozpuštěn ve vodě (50 ml)



a promyt vodou EtOAc (3 x 50 ml). Vodná fáze byla zfiltrována, odpařena ve vakuu dosucha a zbytek byl smíchán s vodou (10 ml). Vytvořená sraženina byla míchána při pokojové teplotě 24 h, oddělena filtrací a rekrystalizována (voda) za poskytnutí sloučeniny (S)-2 jako bezbarvých krystalů (0,12 g, 33 %): teplota tání 259 - 261 °C (rozkl.); ee >99 % (retenční čas asi 30 min); ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,34 (t, 3 H), 2,90 (dd, 1 H), 3,03 (dd, 1 H), 3,96 (dd, 1 H), 4,23 (q, 2 H); MS ((M + H)⁺) m/z 245. Anal. (C₉H₁₂N₂O₆) vypočteno C 44,27, H 4,95, N 11,47; nalezeno C 44,45, H 4,96, N 11,46.

6) Kyselina (R)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)-propionová (sloučenina (R)-2)

K míchanému roztoku (2R,5S)-2,5-dihydro-2-[[5-(4,5-dihydro-4,4-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-ethoxyizoxazol-4-yl]methyl]-5-izopropyl-3,6-dimethoxypyrazinu (0,6 g, 1,5 mmol) a MeOH (7 ml) byl přidán 0,25 M HCl (74 ml, 7,4 mmol) a získaná směs byla míchána při pokojové teplotě 2 hod. pH bylo nastaveno na 7 by přidáním vodného amoniaku (0,5 M) a MeOH bylo odstraněno ve vakuu. pH bylo nastaveno na 8 - 9 přidavkem vodného amoniaku (0,5 M) a vodná fáze byla extrahována EtOAc (4 x 50 ml). Organické extrakty byly promyty roztokem soli, sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu. Zbytek byl suspendován v 1 M HCl a směs byla vařena pod zpětným chladičem 4,5 hod. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu (2 ml), zbytek rozpuštěn ve vodě (50 ml) a promyt EtOAc (3 x 50 ml). Vodná fáze byla zfiltrována, odpařena ve vakuu dosucha a zbytek smíchán s vodou (10 ml). Vytvořená sraženina byla míchána při pokojové teplotě 2 hod, oddělena filtrací, rekrystalizována (voda) za poskytnutí sloučeniny (R)-2 jako bezbarvých krystalů (0,13 g, 36 %): teplota tání 258 - 260 °C (rozkl.); ee >99 % (retenční čas asi 50 min); ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,34 (t, 3 H), 2,90 (dd, 1 H), 3,03 (dd, 1 H), 3,96 (dd, 1

H), 4,23 (q, 2 H); MS ((M + H)⁺) *m/z* 245. Anal. (C₉H₁₂N₂O₆) vypočteno C 44,27, H 4,95, N 11,47; nalezeno C 44,56, H 4,95, N 11,53.

Příklad 4

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-[3-ethoxy-5-(1H-1,2,4-triazol-3-yl)-izoxazol-4-yl]-propionové (sloučenina 7)

N-[(dimethylamino)methyliden]-3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxamid

Roztok 3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxamidu (3,5 g, 21 mmol) v dimethylacetalu N,N-dimethylformamidu (15 ml) byl míchán při 120 °C 15 min. Po ochlazení byla oddělena v názvu uvedená sloučenina jako bezbarvé krystaly (4,2 g, 91 %).

3-(3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-yl)-1H-1,2,4-triazol

K roztoku hydrátu hydrazinu (0,6 ml, 12,4 mmol) v kyselině octové (15 ml) byl přidán N-(dimethylamino)-methyliden-3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxamid (1,8 g, 8,0 mmol). Reakční směs byla míchána při 90 °C 15 min a potom ponechána při pokojové teplotě krystalizovat za poskytnutí čisté v názvu uvedené sloučeniny (1,2 g, 77 %): teplota tání 194 - 196 °C. Byla přidána voda (40 ml) a vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 30 ml). Organické extrakty byly promyty roztokem soli, sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu za získání surové v názvu uvedené sloučeniny (0,3 g, 20 %). Materiál z těchto dvou příprav byl spojen.

3-(3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-yl)-1-trityl-1H-1,2,4-triazol

K 3-(3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-yl)-1H-1,2,4-triazolu (1,1 g, 5,7 mmol), triethylaminu (2,5 ml, 18 mmol) a DMF (20 ml) byl přidán tritylchlorid (1,6 g, 5,7 mmol) v DMF (5 ml). Směs byla míchána při

pokožové teplotě 5 h a vlita na směs led/voda (200 ml). Vodná fáze byla extrahována diethyletherem (3 x 200 ml) a organické extrakty byly promyty vodným roztokem Na_2CO_3 (10 %) (200 ml) a roztokem soli (200 ml). Roztok byl sušen (Na_2SO_4) a koncentrován ve vakuu za získání surově v názvu uvedené sloučeniny (2,5 g). Malý vzorek byl krystalizován (EtOAc) za získání jediného izomeru jako bezbarvých krystalů. Teplota tání 181 - 183 °C. Surový produkt byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

3-[4-(brommethyl)-3-ethoxyizoxazol-5-yl]-1-trityl-1H-1,2,4-triazol

Směs 3-(3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-yl)-1-trityl-1H-1,2,4-triazolu (2,4 g, 5,5 mmol) a NBS (1,1 g, 6,2 mmol) v tetrachlormethanu (150 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 3 hod. Reakční směs byla ochlazena, zfiltrována a koncentrována ve vakuu za získání v názvu uvedené sloučeniny (2,8 g). Surový produkt byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

Ethyl 2-acetamido-3-[3-ethoxy-5-(1-trityl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)izoxazol-4-yl]-2-(ethoxykarbonyl)propionát

Směs diethylacetamidomalonátu (1,3 g, 6,0 mmol) a terc.-butoxidu draselného (0,73 g, 6,5 mmol) v N-methylpyrrolidonu (30 ml) byla míchána při pokojové teplotě 30 min. Byl přidán 3[4-(brommethyl)-3-ethoxyizoxazol-5-yl]-1-trityl-1H-1,2,4-triazol (2,8 g, 5,4 mmol) v N-methylpyrrolidonu (20 ml), (teplota 22 - 28 °C) a získaná směs byla míchána při pokojové teplotě 2 hod. Získaná směs byla vlita do směsi led/voda (250 ml) a vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 250 ml). Organické extrakty byly promyty vodným roztokem terc.-butoxidu draselného a roztokem soli, sušeny (Na_2SO_4) a koncentrovány ve vakuu. Blesková chromatografie (silikagel, eluent: EtOAc/ heptan/triethylamin = 50 : 50 : 2) poskytla v názvu uvedenou sloučeninu (2,2 g, 62 %): teplota tání 145 - 149 °C.

Hydrát kyseliny (RS)-2-amino-3-[3-ethoxy-5-(1H-1,2,4-triazol-3-yl)izoxazol-4-yl]propionové (sloučenina 7)

Suspenze ethyl 2-acetamido-3-[3-ethoxy-5-(1-trityl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)izoxazol-4-yl]-2-(ethoxykarbonyl)propionátu (1,5 g, 2,3 mmol) v 1 M HCl (150 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 24 hod. Roztok byl ochlazen, promyt diethyletherem (2 x 150 ml) a dichlormethanem (150 ml), zfiltrován a koncentrován ve vakuu. Byla přidána voda (5 ml) a pH bylo nastaveno na 3,5 přidavkem NaOH (0,1 M a 1 M) za poskytnutí sloučeniny 7 filtrací (0,35 g, 56 %): teplota tání 225 - 227 °C (rozkl.); ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,38 (t, 3 H), 2,94 (dd, 1 H), 3,18 (dd, 1 H), 3,58 (dd, 1 H), 4,30 (q, 2 H), 8,64 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 14,52, 23,60, 53,30, 65,93, 104,25, 146,18, 150,87, 158,44, 169,47, 170,51; MS ((M + H)⁺) m/z 268. Anal. (C₁₀H₁₃N₅O₄·0,05 H₂O) vypočteno, C 44,20, H 5,01, N 25,77; nalezeno C 44,42, H 5,29, N 25,52.

Příklad 5

Kyselina (RS)-2-amino-3-[3-ethoxy-5-(5-tetrazolyl)izoxazol-4-yl]-propionová (sloučenina 8)

Byla připravena způsobem analogickým se způsobem z příkladu 4 z ethyl 2-acetamido-3-[3-ethoxy-5-(tetrazol-5-yl)izoxazol-4-yl]-2-(ethoxykarbonyl)propionátu.

Příklad 6

Kyselina (RS)-2-amino-3-(3-benzyloxy-5-karboxyizoxazol-4-yl)-propionová (sloučenina 9)

Kyselina (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-hydroxyzoxazol-4-yl)-propionová (3,5 g, 11,8 mmol) a roztok HCl v ethanolu (50 ml) byly

vařeny pod zpětným chladičem 2,5 hod a odpařeny dosucha ve vakuu za získání ethyl (R,S)-2-amino-3-(5-ethoxykarbonyl-3-hydroxyizoxazol-4-yl)propionátu (4,15 g, 100 %).

Směs di-terc.-butyldikarbonátu (3,1 g, 14 mmol), triethylaminu (3,8 g, 37 mmol) a 1,4-dioxanu (15 ml) byla přidána k roztoku ethyl (RS)-2-amino-3-(5-ethoxykarbonyl-3-hydroxyizoxazol-4-yl)propionátu (4,15 g, 11,7 mmol) ve vodě/1,4-dioxanu (1 : 1) (50 ml) a získaná směs byla míchána při pokojové teplotě 16 hod. 1,4-dioxan byl odpařen ve vakuu a vodná fáze byla okyselena zředěnou vodnou HCl. Vodná fáze byla extrahována ethylacetátem a organické extrakty byly promyty vodou, roztokem soli, sušeny ($MgSO_4$) a koncentrovány ve vakuu. Blesková chromatografie (SiO_2 , eluent: heptan/ethylacetát/kyselina octová (1 : 1, 4 %)) poskytla ethyl (RS)-2-terc.-butoxykarbonylamino-3-(5-ethoxykarbonyl-3-hydroxyizoxazol-4-yl)-propionát jako olej (4,1 g, 92 %).

Směs ethyl (RS)-2-terc.-butoxykarbonylamino-3-(5-ethoxykarbonyl-3-hydroxyizoxazol-4-yl)propionátu (3,2 g, 8,6 mmol), K_2CO_3 (2,4 g, 17,2 mmol) v acetonu (40 ml) byla zahřívána na teplotu varu pod zpětným chladičem. Byl přidán benzylbromid (2,2 g, 12,9 mmol) a směs byla vařena pod zpětným chladičem 1,5 hod. Koncentrace ve vakuu a blesková chromatografie (SiO_2 , eluent: heptan/ethylacetát (2 : 1)) poskytla ethyl (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-[3-benzyloxy-5-(ethoxykarbonyl)izoxazol-4-yl]propionát (1,64 g, 41 %) a ethyl (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(2-benzyl-5-ethoxykarbonyl-2,3-dihydro-3-oxoisoxazol-4-yl)propionát (0,7 g, 18 %).

Směs ethyl (R,S)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-[3-benzyloxy-5-(ethoxykarbonyl)izoxazol-4-yl]propionátu (0,65 mg, 1,4 mmol) a 1 M NaOH (50 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 16 hod. Směs byla ochlazená (5 °C), okyselena zředěnou vodnou HCl a zakoncentrována ve vakuu. Zbytek byl rekrystalizován z vody za získání kyseliny (RS)-2-amino-3-(3benzyloxy-5-karboxyizoxazol-4-yl)-

propionové (0,1 g, 23 %): teplota tání 209 -211 °C (rozkl.); ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,95 (dd, 1 H), 3,05 (dd, 1 H), 3,99 (t, 1 H), 5,26 (s, 2 H), 7,31-7,52 (m, 5 H); MS ((M + H)⁺) m/z 307. Anal. vypočteno C 54,89, H 4,62, N 9,15; nalezeno C 54,31, H 4,56, N 8,97.

Podobným způsobem byly vyrobeny následující sloučeniny:

Kyselina (RS)-2-amino-3-(3-propoxy-5-karboxyizoxazol-4-yl)-propionová (sloučenina 10)

Teplota tání 250 - 251 °C (rozkl.). ¹H NMR (D₂O, dioxan, 1 M NaOD) δ 0,95 (t, 3 H), 1,76 (se, 2 H), 2,78 (dd, 1 H), 2,90 (dd, 1 H), 3,42 (dd, 1 H), 4,17 (t, 2 H). ¹³C NMR δ 12,3, 24,4, 29,8, 58,3, 74,9, 111,5, 164,3, 166,6, 173,9, 184,8. MS ((M+H)⁺) m/z 259. Anal. vypočteno C 46,51, H 15,46, N 10,85; nalezeno C 46,43, H 5,41, N 10,54.

Kyselina (RS)-2-amino-3-(3-butoxy-5-karboxyizoxazol-4-yl)propionová (sloučenina 11)

Teplota tání 238 - 240 °C (rozkl.). ¹H NMR (D₂O, dioxan, 1 M NaOD) δ 0,95 (t, 3 H), 1,43 (se, 2 H), 1,76 (qui, 2 H), 2,8 (dd, 1 H), 2,91 (dd, 1 H), 3,44 (dd, 1 H), 4,25 (t, 2 H). ¹³C NMR (D₂O, dioxan, 1 M NaOD) δ 13,79, 19,30, 27,90, 31,03, 56,39, 71,27, 109,65, 162,39, 164,72, 172,02, 182,92. MS ((M+H)⁺) m/z 273. Anal. vypočteno C 48,53, H 5,92, N 10,29; nalezeno C 48,80, H 5,99, N 10,34.

Kyselina (RS)-2-amino-3-(3-allyloxy-5-karboxyizoxazol-4-yl)propionová
(sloučenina 12)

Teplota tání 239 - 240 °C (rozkl.). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,93 (dd, 1 H), 3,06 (dd, 1 H), 3,99 (dd, 1 H), 4,73 (d, 2 H), 5,29 (dd, 1 H), 5,44 (dd, 1 H), 6,05 (dq, 1 H).

Dále byly podobně připraveny následující sloučeniny:

Kyselina (RS)-2-amino-3-[3-(trans-2-but-en-oxy)-5-karboxyizoxazol-4-yl]propionová

Kyselina (RS)-2-amino-3-[3-(3-methyl-2-but-en-oxy)-5-karboxyizoxazol-4-yl]propionová

Příklad 7

Monohydrát hydrochloridu kyseliny (RS)-2-amino-3-(2-benzyl-5-karboxy-2,3-dihydro-3-oxoizoxazol-4-yl)-propionové (sloučenina 13)

Směs ethyl (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(2-benzyl-5-ethoxykarbonyl-2,3-dihydro-3-oxoizoxazol-4-yl)propionátu (0,9 g, 1,9 mmol) a 1 M HCl byla vařena pod zpětným chladičem 5 hod. Směs byla odpařena ve vakuu dosucha (0,56 g, 80 %): teplota tání 146 - 148 °C (rozkl.); ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 3,08 (dd, 1 H), 3,19 (dd, 1 H), 4,17 (br s, 1 H), 5,16 (s, 2 H), 7,24-7,45 (m, 5 H); MS ((M + H)⁺) m/z 307. Anal. vypočteno C 46,60, H 4,76, N 7,77; nalezeno C 46,88, H 4,81, N 7,96.

Příklad 8Hydrochlorid benzyl (R,S)-2-amino-3-(5-benzyloxykarbonyl-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionátu (sloučenina 14)

Směs di-terc.-butyldikarbonátu (1,1 g, 4,9 mmol), NaHCO₃ (1,1 g, 13 mmol) a 1,4-dioxanu (3 ml) byla přidána k roztoku kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionové (1,0 g, 4,1 mmol) ve vodě/1,4-dioxanu (1 : 1) (10 ml) a získaná směs byla míchána při pokojové teplotě 16 hod. 1,4-dioxan byl odpařen ve vakuu a vodná fáze okyselena zředěnou vodnou HCl. Vodná fáze byla extrahována ethylacetátem a organické extrakty byly promyty vodou a roztokem soli. Sušení (MgSO₄), koncentrování ve vakuu a blesková chromatografie (SiO₂, eluent: ethylacetát/ethanol/kyselina octová (3 : 1, 4 %)) poskytlo kyselinu (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionovou (1,4 g, 100 %).

Ke směsi kyseliny (R,S)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionové (1,4 g, 4,1 mmol), benzylbromidu (1,4 g, 8,2 mmol) ve směsi benzen/tetrahydrofuran (4 : 1) byl přidán 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (1,3 g, 8,6 mmol) a získaná směs byla vařena pod zpětným chladičem 3 hod. Směs byla zfiltrována a odpařena ve vakuu. Blesková chromatografie (SiO₂, eluent: ethylacetát/heptan (1 : 3)) poskytla benzyl (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(5-benzyloxykarbonyl-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionát jako olej (1,9 g, 86 %).

Směs benzyl (RS)-2-[(terc.-butoxykarbonyl)amino]-3-(5-benzyloxykarbonyl-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionátu (1,9 g, 3,6 mmol) a nasycený roztok HCl v dietyletheru (40 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 2 hod. Vytvořené krystaly byly odděleny filtrací, míchány s ethylacetátem a odděleny filtrací (0,53 g, 32 %): teplota tání 142 - 144 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,32 (t, 3 H), 3,17 (dd, 1 H), 3,25 (dd, 1 H), 4,17-4,32 (m, 3 H), 5,09 (dd, 2 H), 5,39 (s, 2 H), 7,24-7,53 (m,

10 H); MS ((M + H)⁺) *m/z* 425. Anal. vypočteno C 59,93, H 5,48, N 6,08; nalezeno C 59,70, H 5,49, N 6,26.

Příklad 9

Oxalát ethyl (R,S)-2-amino-3-(3-ethoxy-5-ethoxykarbonylizoxazol-4-yl)-propionátu (sloučenina 15)

Směs kyseliny (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)-propionové (2,0 g, 8,2 mmol) a roztok HCl v ethanolu (35 ml) byla vařena pod zpětným chladičem 3 hod za získání ethyl (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionátu. K ethyl (RS)-2-amino-3-(5-karboxy-3-ethoxyizoxazol-4-yl)propionátu (0,6 g) byl přidán zředěný roztok NaOH a vodná fáze byla extrahována ethylacetátem. Organické extrakty byly promyty roztokem soli, sušeny (MgSO₄), zfiltrovány a odpařeny dosucha ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v acetonu (6 ml) a byl přidán roztok kyseliny šťavelové (0,14 g, 1,6 mmol) v acetonu (6 ml) a vytvořená sraženina byla oddělena filtrací (110 mg, 10 %): teplota tání 159 - 161 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,11 (t, 3 H), 1,32 (t, 3 H), 1,36 (t, 3 H), 3,02 (dd, 1 H), 3,11 (dd, 1 H), 3,98-4,16 (m, 3 H) 4,32 (q, 2 H), 4,37 (q, 2 H); MS ((M + H)⁺) *m/z* 301. Anal. vypočteno C 46,15, H 5,69, N 7,18; nalezeno C 46,38, H 5,69, N 7,36.

Příklad 10

Oxalát butyl (RS)-2-amino-3-(5-butoxykarbonyl-3-ethoxyizoxazol-4-yl)-propionátu (sloučenina 16)

Sloučenina byla získána podobným postupem, který je popsán v příkladu 9, s použitím roztoku HCl v butanolu. Teplota tání 120 - 121 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 0,84 (t, 3 H), 0,92 (t, 3 H), 1,14-1,31 (m, 2 H), 1,31-1,51 (m, 4 H), 1,37 (t, 3 H) 1,62-1,75 (m, 2 H), 3,01 (dd, 1 H), 3,13 (dd, 1 H), 3,98-4,09 (m, 3 H), 4,16-4,36 (m, 4 H); MS ((M+

H⁺) m/z 357. Anal. vypočteno C 51,11, H 6,79, N 6,28; nalezeno C 51,06, H 6,82, N 6,35.

Příklad 11

Kyselina [4-(2-amino-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)aminomethyl]-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylová (sloučenina 17)

Ethyl-3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát

K acetylchloridu (25 ml, 0,35 mol) byl přidán EtOH (250 ml) při 0 °C a roztok byl míchán při 0 °C 20 min. Byl přidán roztok kyseliny 3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylové (WO 95/12587, A1) (18 g, 0,10 mol) v EtOH (20 ml) a získaná směs byla vařena pod zpětným chladičem 4 hod. Směs byla ochlazena, byl přidán NaHCO₃ (200 ml) a byla extrahována diethyletherem (3 x 300 ml). Organické extrakty byly sušeny (MgSO₄) a koncentrovány ve vakuu za poskytnutí surové v názvu uvedené sloučeniny (18 g, 86 %).

Ethyl-4-brommethyl-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylát

Ethyl-3-ethoxy-4-methylizoxazol-5-karboxylát (18 g, 91 mmol), NBS (17,5 g, 100 mmol), dibenzoylperoxid (1 g, 4,1 mmol) v tetrachlormethanu (500 ml) byl vařen pod zpětným chladičem 16 hod. Směs byla ochlazena, zfiltrována a koncentrována ve vakuu za poskytnutí surové v názvu uvedené sloučeniny (24,5 g, 97 %).

Ethyl-3-ethoxy-4-ftalimidomethylizoxazol-5-karboxylát

Roztok ethyl 4-brommethyl-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylátu (5 g, 17,9 mmol) v DMF (85 ml) byl přidán k suspenzi ftalimidu draselného (3,6 g, 19,7 mmol) v DMF (125 ml) při 90 °C. Získaná směs byla míchána při 90 °C 40 min. Potom byla ochlazena a koncentrována ve vakuu. Byla přidána voda (250 ml) a vodní fáze byla extrahována

diethyletherem (2 x 200 ml). Organické extrakty byly sušeny (MgSO_4) a koncentrovány ve vakuu za získání surového produktu, který byl rekrystalizován (EtOH) za získání v názvu uvedené sloučeniny (3,70 g, 60 %): teplota tání 93 - 94 °C

Hydrochlorid kyseliny 4-aminomethyl-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylové

Roztok ethyl 3-ethoxy-4-ftalimidomethylizoxazol-5-karboxylátu v 1 M NaOH byl vařen pod zpětným chladičem 45 min. Směs byla ochlazená, byla přidána koncentrovaná HCl a extrahována diethyletherem (3 x 400 ml). Organické extrakty byly koncentrovány ve vakuu, byl přidán 1 M HCl (600 ml) a směs byla vařena pod zpětným chladičem 1 hod. Po ochlazení byla směs promyta diethyletherem (3 x 600 ml) a koncentrována ve vakuu za získání surového produktu, který byl rekrystalizován (kyselina octová) za získání v názvu uvedené sloučeniny (1,5 g, 82 %): teplota tání 215 - 216 °C (rozkl.).

Kyselina [4-(2-amino-3,4-dioxocyklobut-1-en-1-yl)aminomethyl]-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylová

K roztoku hydrochloridu kyseliny 4-aminomethyl-3-ethoxyizoxazol-5-karboxylové (12 g, 5,4 mmol) a 3-amino-4-ethoxycyklobut-3-en-1,2-dionu (0,60 g, 5,9 mmol) v EtOH (300 ml) byl přidán 1 M NaOH (12 ml). Získaná suspenze byla míchána při pokojové teplotě 16 hod, potom koncentrována ve vakuu, byla přidána voda (100 ml) a směs byla promyta EtOAc (2 x 100 ml). pH bylo upraveno na ca. 3 přidávkem 1 M HCl. Sraženina byla odfiltrována a rekrystalizována (voda) za poskytnutí v názvu uvedené sloučeniny jako žlutého prášku (0,71 g, 47 %): teplota tání 236 - 238 °C (rozkl.). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 1,30 (t, 3 H), 4,22 (q, 2 H), 4,68 (bs, 2 H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 14,41, 35,27, 65,54, 107,16, 159,14, 163,54, 168,71, 169,15, 169,73, 183,20, 183,34. MS ((M + H) $^+$) m/z 282. Anal.

(C₁₁H₁₁N₃O₆, 2,25 H₂O) vypočteno C 41,06, H 4,86, N 13,06; nalezeno C 41,16, H 4,46, N 12,96.

Farmakologie

Sloučeniny podle vynálezu byly testovány podle známých a spolehlivých testovacích metod.

Vazba [³H]AMPA

V tomto testu se stanoví afinita léčiva k receptorům AMPA měřením schopnosti vytěsnit [³H]AMPA z receptorů AMPA.

Test se prováděl podle modifikované verze metody podle Honoré, T. a Nielsen, M., *Neurosci. Lett.* **1985**, 54, 27 -32. Test byl prováděn v přítomnosti KSCN. To znamená, že byla označena pouze vazebná místa s vysokou afinitou k [³H]AMPA.

Membránové preparáty byly získány metodou podle Ransom, R. W. a Stec, *J. Neurochem.*, **1988**, 51, 830 - 836.

Model kortikálního klínu

Model kortikálního klínu je test, při kterém se vyšetřují řezy mozku křesy in vitro pro kvantifikaci účinku ligandů na různé Glu-receptory a vyhodnocení farmakologického profilu ligandů (tj. vlastnosti agonista/antagonista). Test byl prováděn podle popisu v Harrison, N. L. a Simmonds, M. A. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, 84, 381 - 391 podle modifikace Wheatley, P. L. *Br. J. Pharmacol.*, **1986**, 87, str. 159.

Tabulka 1. Kortikální klín

Sloučenina	Profil	EC ₅₀ (μM)	pK ₁	Subtyp receptoru
1	Agonista	1,2		AMPA
2	Agonista	4,8		AMPA
(S)-2	Agonista	4,4		AMPA
(R)-2	Antagonista		3,28	AMPA
3	Agonista	40,0		AMPA
8	Agonista	2000		AMPA
10	Agonista	80		AMPA
11	Část. agonista	325		AMPA
12	Agonista	40		AMPA
13	Antagonista		3,5	NMDA
17	Antagonista		3,3	NMDA

Výsledky

Bylo zjištěno, že sloučeniny jsou ligandy receptoru excitačních aminokyselin (EAA). Bylo zjištěno, že některé ze sloučenin mají agonistické účinky na receptory AMPA a u jiných sloučenin bylo zjištěno, že jsou selektivními antagonisty receptoru AMPA nebo NMDA. Sloučeniny měly účinnost v oblasti μM.

Příklady formulací

Farmaceutické prostředky podle vynálezu je možno připravit běžnými v oboru známými způsoby.

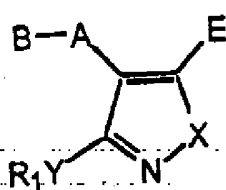
Tablety mohou být například připraveny mísením aktivní složky s běžnými adjuvantními látkami a/nebo diluenty a následným

stlačením směsi v běžném tabletovacím stroji. Příklady adjuvans nebo diluentů jsou: kukuřičný škrob, laktóza, talek, stearan hořečnatý, želatina, gummy apod. Mezi další adjuvantní nebo aditivní látky patří barviva, aromatické látky, ochranné látky, které mohou být použity za předpokladu, že jsou kompatibilní s aktivními složkami. Roztoky pro injekce mohou být vyrobeny rozpuštěním aktivní složky a možných aditiv v části vehikula, s výhodou ve sterilní vodě, nastavením požadovaného objemu roztoku, sterilizací roztoku a rozplněním do vhodných ampulí nebo nádobek. Vhodnými běžně používanými aditivy jsou látky pro úpravu osmotického tlaku, ochranné látky, antioxidanty atd.

Zastupuje:

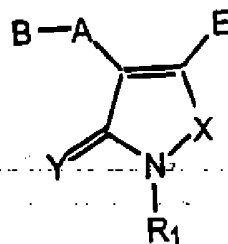
PATENTOVÉ NÁROKY

1. 3-alkoxyizoxazol-4-yl-substituované deriváty 2-aminokarboxylové kyseliny nebo jejich sirmé analogy obecného vzorce I nebo II



I

nebo

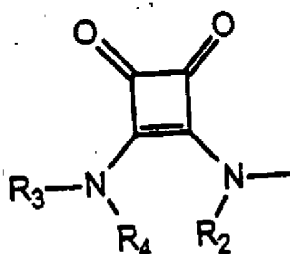


II

kde R_1 je atom vodíku, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkinyl, cykloalk(en)yl, cykloalk(en)yl- C_{1-6} alk(en/in)yl nebo feny- C_{1-6} alk(en/in)yl, kde fenylová skupina je popřípadě substituována skupinou CF_3 , atomem halogenu, skupinou C_{1-6} alkyl nebo C_{1-6} alkoxy;

A je vazba nebo propojovací skupina zvolená ze skupiny C_{1-6} alkylen, C_{2-6} alkenylen nebo C_{2-6} alkinylen a cykloalkylen;

B je skupina $-CR_a(NR_bR_c)-COOR_5$, kde $R_a - R_c$ jsou nezávisle atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl, a R_5 je definováno jako R_1 nebo pivaloyloxymethyl, nebo B je skupina vzorce III



III

kde R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle zvoleny ze skupiny



a) atom vodíku; C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl, C₂₋₆alkinyl, cykloalk(en)yl, cykloalk(en)yl-C₁₋₆alk(en/in)yl, fenyl-C₁₋₆alkyl, thienyl-C₁₋₆alkyl, a

b) C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl a C₂₋₆alkinyl, kde jeden nebo více atomů uhlíku je nahrazeno atomem N, O, a/nebo S; nebo R₃ a R₄ jsou spojeny za vytvoření skupiny C₂-C₆alkylen, C₂-C₆alkenylen nebo C₂-C₆alkinylen; nebo

R₄ a R₂ jsou spojeny za vytvoření skupiny C₁-C₃alkylen, C₂-C₃alkenylen, nebo C₂-C₃alkinylen, popřípadě mono- nebo disubstituované skupinou hydroxy nebo methyl nebo za vytvoření skupiny CH₂O-CH₂;

E je COOR₆, kde R₆ je definováno jako R₅, nebo E je tetrazol-5-yl, 1,2,4-triazol-3-yl nebo 1,2,3-triazol-4-yl;

X je O nebo S; Y je O nebo S; a

jejich farmaceuticky přijatelné soli.

2. Sloučenina podle nároku 1, vyznačující se tím, že má vzorec I.

3. Sloučenina podle nároku 1, vyznačující se tím, že má vzorec II.

4. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že E je skupina COOR₆, kde R₆ není atom vodíku, s výhodou skupina C₁₋₆alkyl fenyl-C₁₋₆, alk(en/in)yl nebo pivaloyloxymethyl.

5. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že E je COOH.
6. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že E je tetrazol-5-yl, 1,2,4-triazol-3-yl nebo 1,2,3-triazol-4-yl.
7. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že B je skupina vzorce $CR_aNR_bR_c-COOR_5$.
8. Sloučenina podle nároku 7, vyznačující se tím, že R_b a R_c znamenají atom vodíku a R_a je atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl, s výhodou atom vodíku nebo methyl.
9. Sloučenina podle nároku 7 nebo 8, vyznačující se tím, že R_5 je atom vodíku.
10. Sloučenina podle nároku 7 nebo 8, vyznačující se tím, že R_5 není atom vodíku, s výhodou C_{1-6} alkyl, fenyl- C_{1-6} alk(en/in)yl nebo pivaloyloxymethyl.
11. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že B je skupina vzorce III.
12. Sloučenina podle nároku 11, vyznačující se tím, že R_2 , R_3 a R_4 znamenají atom vodíku nebo C_{1-6} alkyl

nebo R_4 a R_2 jsou spojeny za vytvoření C_1 - C_3 alkylenové skupiny.

13. Sloučenina podle nároku 12, vyznačující se tím, že každá ze skupin R_2 , R_3 a R_4 je atom vodíku.
14. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 13, vyznačující se tím, že X je atom kyslíku.
15. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 13, vyznačující se tím, že X je atom síry.
16. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 15, vyznačující se tím, že Y je atom kyslíku.
17. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 15, vyznačující se tím, že Y je atom síry.
18. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 17, vyznačující se tím, že R_1 je C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl nebo C_{2-6} alkinyl, s výhodou methyl, ethyl, propyl nebo propargyl.
19. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 18, vyznačující se tím, že A je vazba nebo C_1 - C_3 alkylen, s výhodou methylen.

20. Sloučenina podle nároku 2, vyznačující se tím, že A je vazba nebo C₁-C₃alkylen, B je -CH(NH₂)-COOH nebo skupina vzorce III, kde každá ze skupin R₃, R₄ a R₂ je atom vodíku, X a Y jsou obě atom kyslíku a R₁ je C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl nebo C₂₋₆alkinyl, s výhodou methyl, ethyl, propyl, butyl a propargyl.

21. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje sloučeninu podle některého z nároků 1 až 20 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředivem.

22. Použití sloučeniny podle některého z nároků 1 až 20 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení mozkové ischemie, Huntingtonovy choroby, epileptických poruch, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, schizofrenie, bolesti, deprese nebo úzkosti.

Zastupuje: