



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57772 (13) C2

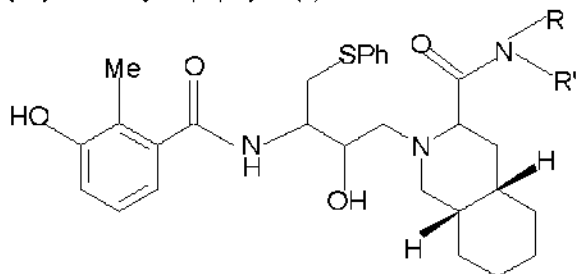
(51) 7 C07D217/22, A61K31/47

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ІНГІБІТОРИ ПРОТЕАЗИ ВІЛ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ ТА СПОСІБ
ІНГІБУВАННЯ ПРОТЕАЗИ РЕПЛІКАЦІЇ ВІЛ

1

2

- (21) 99095049
 (22) 12 03 1998
 (24) 15 07 2003
 (86) PCT/US98/04735, 12 03 1998
 (31) 08/815,951
 (32) 13 03 1997
 (33) US
 (46) 15 07 2003, Бюл. №7, 2003 р
 (72) Альбідзаті Кім Ф., US, Райх Зігфрід, US, Варні
 Майкл Д., US, Джанг Канін Е., CN, Кобаясі Такуо,
 JP
 (73) АГУРОН ФАРМАСУТИКАЛЗ, ІНК., US, ДЖЕ-
 ПЕН ТОБАККО ІНК., JP
 (56) WO 95 09843, 13 04 95
 (57) 1 Сполука формули (9)



, 9

де R та R' незалежно обирають з групи, яку утво-
 рюють H, заміщена або незаміщена група алкіл-
 OR¹, циклоалкільна група, заміщена C₁-
 C₆алкільною групою або групою C₁-C₆алкіл-ОН,
 гетероциклічна група, заміщена C₁-C₆алкільною
 групою або групою C₁-C₆алкіл-ОН, група алкіл-
 NR²R³ і група алкіл-S(X)(Y)R⁴,

у яких

R¹ - H, заміщений або незаміщений алкіл або
 ацильна група,

R², R³ незалежно обрані з групи, яку складають H,
 заміщений або незаміщений алкіл, циклоалкіл,
 гетероциклічна група, арильна група, ацильна гру-
 па і сульфонільна група,

R⁴ - H, заміщений або незаміщений алкіл, цикло-
 алкіл, гетероциклічна група або арильна група,

X, Y незалежно є =O або відсутні,

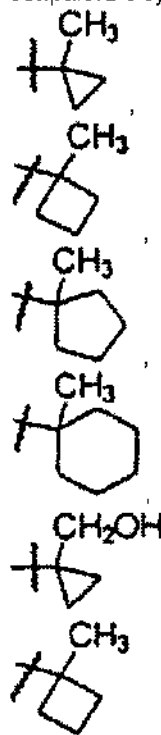
а також її фармацевтично прийнятні сіль або
 сольват

2 Сполука за п 1 або її фармацевтично прийнятні
 сіль або сольват, які відрізняються тим, що R - H

3 Сполука за п 1 або її фармацевтично прийнятні
 сіль або сольват, які відрізняються тим, що, коли
 щонайменше одна з груп R, R' є групою алкіл-OR¹,
 то R¹ - H

4 Сполука за п 1 або її фармацевтично прийнятні
 сіль або сольват, які відрізняються тим, що, коли
 щонайменше одна з груп R, R' є групою алкіл-OR¹,
 то зазначений алкіл-OR¹ обирають з групи, яку
 складають -C(CH₃)₂CH₂OH, -CH(CH₃)CH₂OH, -
 CH₂CH₂OH, -C(CH₃)(CH₂OH)₂, -C(CH₃)₂-O-CH₂-O-
 CH₃, C(CH₃)₂-O-CH₂-O-CH₃ і -C(CH₃)₂CH₂-O-ацил

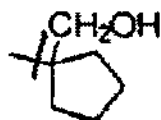
5 Сполука за п 1 або її фармацевтично прийнятні
 сіль або сольват, які відрізняються тим, що, коли
 щонайменше одна з груп R, R' є циклоалкільною
 групою, заміщеною C₁-C₆алкілом або групою C₁-
 C₆алкіл-ОН, то зазначену циклоалкільну групу
 обирають з сукупності, утвореної сполуками



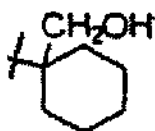
(13) C2

(11) 57772

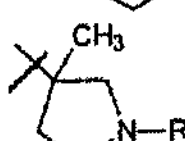
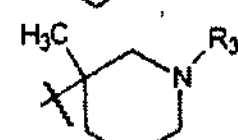
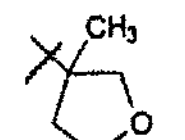
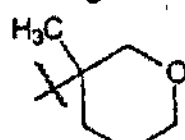
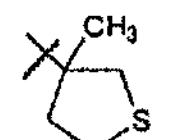
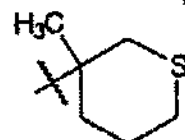
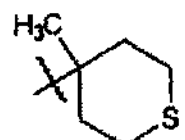
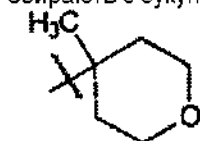
(19) UA



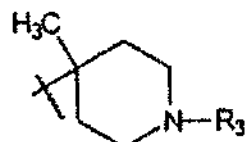
та



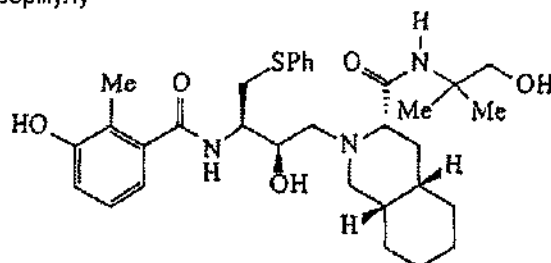
6. Сполука за п 1 або її фармацевтично прийнятні сіль або сольват, які відрізняються тим, що, коли щонайменше одна з груп R, R' є циклоалкільною групою, заміщеною C₁-C₈алкілом або групою C₁-C₈алкіл-OH, то зазначену циклоалкільну групу обирають з сукупності, утвореної сполуками



та

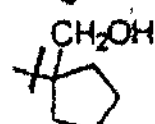
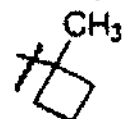
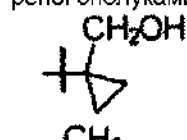


7. Сполука за п 1, яка відрізняється тим, що має формулу

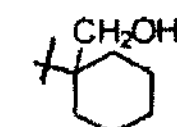


, 21

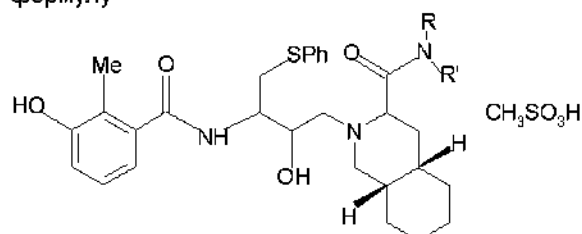
або її фармацевтично прийнятні сіль або сольват
8. Сполука за п 2 або її фармацевтично прийнятні сіль або сольват, які відрізняються тим, що, коли R' є циклоалкільною групою, заміщеною C₁-C₈алкілом або групою C₁-C₈алкіл-OH, то зазначену циклоалкільну групу обирають з сукупності, утвореної сполуками



та



9. Сіль за п 1, яка відрізняється тим, що має формулу



9b

10. Фармацевтична композиція, яка містить

(а) ефективну кількість сполуки за п 1 і

(б) фармацевтично прийнятний носій для неї

11. Фармацевтична композиція, яка містить

(а) ефективну кількість сполуки за п 7 і

(б) фармацевтично прийнятний носій для неї

12. Спосіб інгібування протеази реплікації ВІЛ, який передбачає введення носію інфекції ефективної кількості сполуки за п 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату

13 Спосіб інгібування протеази реплікації ВІЛ, який передбачає введення носію інфекції ефективною кількістю сполуки за п 7 або її фармацевтично прийнятної солі або сольовату

14 Сполука за п 1, яка відрізняється тим, що має чистоту вище 90%

15 Сполука за п 1, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 95%

16 Сполука за п 1, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 97%

17 Сполука за п 1, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 99%

18 Сполука за п 7, яка відрізняється тим, що має чистоту вище 90%

19 Сполука за п 7, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 95%

20 Сполука за п 7, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 97%

21 Сполука за п 7, яка відрізняється тим, що має чистоту щонайменше 99%

22 Фармацевтична композиція за п 10, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту вище 90%

23 Фармацевтична композиція за п 10, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 95%

24 Фармацевтична композиція за п 10, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 97%

25 Фармацевтична композиція за п 10, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 99%

26 Фармацевтична композиція за п 11, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту вище 90%

27 Фармацевтична композиція за п 11, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 95%

28 Фармацевтична композиція за п 11, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 97%

29 Фармацевтична композиція за п 11, яка відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 99%

30 Спосіб за п 12, який відрізняється тим, що сполука має чистоту вище 90%

31 Спосіб за п 12, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 95%

32 Спосіб за п 12, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 97%

33 Спосіб за п 12, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 99%

34 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що сполука має чистоту вище 90%

35 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 95%

36 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 97%

37 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що сполука має чистоту щонайменше 99%

Винахід стосується нової сукупності хімічних сполук, що можуть використовуватись як інгібітори протеази ВІЧ, і використання таких сполук як анти-вірусних агентів

Синдром Набутого Імунодефіциту (СНІД) є порівняно нещодавно розпізнаним захворюванням або станом. СНІД повільно руйнує імунну систему організму і викликає прогресивне погіршення стану центральної та периферійної нервових систем. З часу його першого розпізнання на початку 80-х років СНІД швидко поширився і вже досяг масштабів епідемії серед певних верств населення. Інтенсивні дослідження дозволили виявити агента, відповідалого за хворобу, а саме, Т-лімфотропічного ретровірусу III людини (ТЛВЛ-III), який частіше називають вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ).

ВІЛ належить до класу вірусів відомих як ретровіруси. Геном ретровірусу складається з РНК, яка перетворюється у ДНК зворотною транскрипцією. Потім ця ретровірусна ДНК стійко вбудовується у хромосому клітин організму і, використовуючи для цього реплікативні механізми цих клітин, виробляє нові ретровірусні частини і розповсюджує інфекцію на інші клітини. Вважається, що ВІЛ має особливу спорідненість до клітин лімфоцитів Т-4 людини. Інфікування ВІЛ цих білих кров'яних клітин зменшує їх кількість і, нарешті, імунна система стає непрацездатною і неефективною проти різних хвороб, наприклад, пневмонії

Pneumocystis Carini, саркоми Капосі і раку лімфосистеми.

Хоча механізм формування і функціонування ВІЛ залишається не зовсім зрозумілим, ідентифікація вірусу дозволила досягти певного прогресу у контролі хвороби. Було, наприклад, виявлено, що азидотимідинові ліки ефективно інгібують зворотну транскрипцію ретровірусного генома ВІЛ і, таким чином, забезпечують якщо не лікування, то затримання розвитку хвороби у пацієнтів, вражених СНІД. Продовжуються пошуки ліків, здатних вилікувати або принаймні поліпшити контроль ВІЛ.

Звичайно ретровірусна реплікація забезпечує посттрансляційну обробку поліпротеїнів. Цю обробку здійснює віральна закована протеаза ВІЛ, створюючи зрілі поліпептиди, які потім сприяють формуванню і функціонуванню інфекційного вірусу. Якщо придушити цей молекулярний процес, то нормальне продукування ВІЛ зупиниться. Таким чином, інгібітори протеази ВІЛ можуть діяти проти ВІЛ як анти-вірусні агенти.

Протеаза ВІЛ є одним з трансльованих продуктів гену роі структурного протеїну ВІЛ. Ця ретровірусна протеаза специфічно діє на інші структурні поліпептиди, розщеплюючи їх у дискретних сайтах з вивільненням цих щойно активованих структурних протеїнів і ферментів і роблячи цим віріон реплікативно-компетентним. Отже, інгібування протеази ВІЛ сильними сполуками може відвернути провірусне інтегрування інфікованих Е-лімфоцитів

у ранній фазі життєвого циклу ВІЛ-1, а також інгібувати вірусний протеолітичний процес на пізній стадії. Крім того, інгібітори протеази є легко доступними, мають довшу тривалість життя у віруси і менш токсичні, ніж існуючі ліки, можливо, завдяки їх специфічності до ретровірусної протеази.

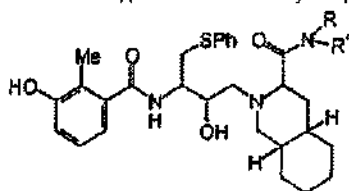
Винахід стосується нового класу хімічних сполук, здатних інгібувати і/або блокувати активність протеази ВІЛ і припиняти розповсюдження вірусу ВІЛ, фармацевтичних композицій, що містять ці сполуки і використання цих сполук як інгібіторів протеази ВІЛ.

Винахід стосується сполук загальної формули (9), наведеної далі, їх фармацевтичне прийнятних солей, пропрепаратів і сольватів, здатних інгібувати протеазу, кодовану ВІЛ типу ВІЛ-1 або ВІЛ-2. Ці сполуки можуть використовуватись для лікування інфекцій ВІЛ і СНІД.

Ці сполуки, їх фармацевтичне прийнятні солі і фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть використовуватись як окремо, так і у сполученні з іншими анти-вірусними або імуномодуючими агентами, або разом з антибіотиками або вакцинами.

Сполуки згідно з винаходом можуть бути використані також як пропрепарати. Винахід включає також способи лікування СНІД, способи лікування ВІЛ-інфекцій і способи інгібуння протеази ВІЛ.

Винахід включає сполуки формули (9)



9

де R та R' незалежно обирають з групи, яку утворюють H, заміщена або незаміщена група алкіл-OR¹, циклоалкільна група, заміщена C₁-C₆алкільною групою або групою C₁-C₆алкіл-OH, гетероциклічна група, заміщена C₁-C₆алкільною групою або групою C₁-C₆алкіл-OH, група алкіл-NR²R³ і група алкіл-S(X)(Y)R⁴,

у яких

R¹-H, заміщений або незаміщений алкіл або ацильна група,

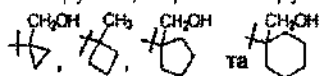
R², R³ незалежно обрано з групи, яку складають H, заміщений або незаміщений алкіл, циклоалкіл, гетероциклічна група, арильна група, ацильна група і сульфонільна група,

R⁴-H, заміщений або незаміщений алкіл, циклоалкіл, гетероциклічна група або арильна група,

X, Y незалежно є = O або відсутні,

а також її фармацевтичне прийнятні пропрепарат, сіль або сольват.

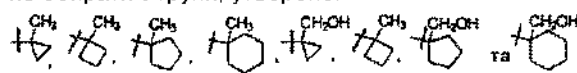
Бажано, щоб R була H, R' була циклоалкільною групою, обраною з групи, утвореної



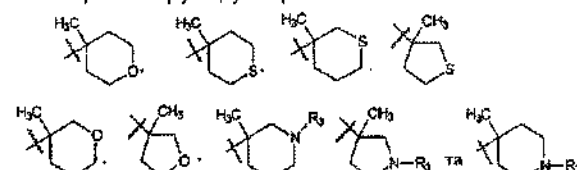
Бажано, щоб у сполуках формули 9 щонайменше одна з груп R, R' була групою алкіл-OR¹, де R¹-H. Зокрема, якщо щонайменше одна з груп R, R' є групою алкіл-OR¹, то алкіл-OR¹ обирають з групи, яку складають -C(CH₃)₂CH₂OH, -

CH(CH₃)CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -C(CH₃)(CH₂OH)₂, -C(CH₃)₂-O-CH₂-O-CH₃, C(CH₃)₂-O-CH₂-O-CH₃ і -C(CH₃)₂CH₂-O-ацил або їх фармацевтично прийнятні пропрепарат, сіль або сольват.

Якщо щонайменше одна з груп R, R' є циклоалкільною групою, заміщеною C₁-C₆алкілом або групою C₁-C₆алкіл-OH, циклоалкільну групу бажано обирати з групи, утвореної

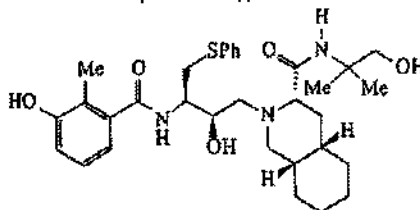


Якщо щонайменше одна з груп R, R' є гетероциклічною групою, заміщеною C₁-C₆алкілом або групою C₁-C₆алкіл-OH, гетероциклічну групу бажано обирати з групи, утвореної



де R³-H, заміщений або незаміщений алкіл, циклоалкіл, гетероциклічна група або арильна група, або ацильна група, або сульфонільна група,

Бажаною сполукою формули (9) є [3S-[2(2S*,3S*)-3-α, 4α-β, 8α-β]]-N-(1,1-диметил-2-гідроксietил)декагидро-2-[2-гідрокси-3-[(3-гідрокси-2-метилбензоіл)аміно]-4-(фенілтіо)бутил]-3-ізохінолінкарбоксамід.



21

ї його фармацевтичне прийнятні солі і аналогі пропрепарату. Бажані пропрепарати можна одержати заміною гідрогену у одній з спиртових груп ациловою групою, краще амінокислотною ациловою групою.

Винахід, крім того, включає фармацевтичні композиції, які містять ефективну кількість сполуки формули (9) або її фармацевтичне прийнятної солі у спорученні з фармацевтичне прийнятним носієм, наприклад, розріджувачем або наповнювачем.

Винахід включає також спосіб лікування СНІД, який передбачає введення носію інфекції або пацієнту, наприклад, примату, ефективної кількості сполуки згідно з винаходом.

Винахід, крім того, включає спосіб інгібуння реплікації ВІЛ, який передбачає введення у інфіковану ВІЛ клітину, або у клітину, чутливу до такого інфікування, організму носія інфекції або пацієнта, наприклад, примата, ефективної кількості сполуки згідно з винаходом.

Винахід включає нові сполуки загальної формули (9), описаної вище, які можна використати для лікування інфекції ВІЛ і/або СНІД.

Посиланням включено патент США 5 484 926, заявки 08/708 411 та 08/708 607 на патент США і заявки JP 95-248183 та JP-95-248184 на патент Японії з зауваженням, що усі визначення, терміни, змінні, позначення тощо, використані у цих доку-

ментах, стосуються лише відповідного документа

Деякі з цих незалежних один від одного документів можуть містити однакові терміни або позначення. Наприклад, змінна X , спільна для усіх документів може відповідати різним замісникам або угрупованням у різних документах. Фахівцю зрозуміло, що у кожному окремому документі значення змінних обмежені їх застосуванням саме у цьому документі і тому позначення змінних можна замінити за умови, що вони все одно відповідатимуть тим же конкретним замісникам і угрупованням.

Сполуки формули (9) можуть бути пропрепаратами, які поліпшують фармацевтичні характеристики сполуки, наприклад такі фармакокінетичні якості, як біодоступність або розчинність сполуки. Виготовляти пропрепарати можна у звичайні способи, відомі фахівцям. Бажаний пропрепарат можна приготувати ацилюванням або алкілюванням вихідного спирту, у якому R або R' – $\text{CH}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Усі температури наведено у $^{\circ}\text{C}$, усі одиниці вимірювання – це одиниці маси за винятком рідин, для яких використано одиниці об'єму.

Термін "алкіл" стосується лінійних або розгалужених ланцюгових груп, які, бажано, мають 1-8, краще, 1-6, найкраще 1-4 атомів карбону. Термін " C_1 - C_6 алкіл" стосується лінійної або розгалуженої ланцюгової групи з 1-6 атомами карбону. Прикладами C_1 - C_6 алкілів можуть бути метил, етил, n -пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, втор-бутіл, t -бутіл, пентил, неопентил, гексил, ізогексил тощо. Термін " C_1 - C_6 алкіл" включає термін " C_1 - C_4 алкіл".

Термін "циклоалкіл" стосується насиченого або частково насиченого моно- або полікарбоциклічного кільця з 5-14, бажано, 3-7, ще краще з 3-6 атомами карбону, прикладами якого є циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил тощо. Прикладом циклоалкілу є C_5 - C_7 циклоалкіл, який є насиченим гідрокарбоновим кільцем з 5-7 атомами карбону.

Термін "алкоксил" стосується -О-алкілу. Прикладом є C_1 - C_6 алкоксил, який є лінійним або розгалуженим алкільним ланцюгом з 1-6 атомами карбону, з'єднаними з атомом кисню. Прикладами C_1 - C_6 алкоксильних груп можуть бути метоксид, етоксид, пропоксид, ізопропоксид, бутоксид, втор-бутоксид, t -бутоксид, пентоксид, гексоксид тощо. Термін " C_1 - C_6 алкоксил" включає термін " C_1 - C_4 алкоксил".

Термін "арил" стосується карбоциклічного або гетероциклічного, ароматичного 5-14-членного моно або поліциклічного кільця. Прикладами арилів можуть бути феніл, нафтил, антріл, фенантрин, тіеніл, піроліл, імідазоліл, піразоліл, фурил, ізотіазоліл, фуразаніл, ізоксаліл, тiazоліл, піридил, піразиніл, піримідиніл, піридазиніл, триазиніл, бензо[b]тієніл, нафто[2,3- b']тієніл, ізобензофураніл, хроменіл, ксантеніл, феноксатієніл, індолізиніл, ізоіндоліл, індоліл, індазоліл, пуриніл, ізохіноліл, хіноліл, фтапазиніл, нафтиридиніл, хіноксалил, хінзоліл, бензотіазоліл, бензімідазоліл, тетрагідрохіноліл, циноліл, птеридиніл, карбазоліл, бета-карболіл, фенантридиніл, акридиніл, перимідиніл, фенантроліл, феназиніл, ізотіазоліл, фенотіазиніл і феноксазиніл.

Термін "арилоксил" стосується -О-арилу.

Термін "здатна до гідролізу група" стосується групи, яка, будучи з'єднана з киснем, утворює естер, що може бути гідролізований з утворенням гідроксильної групи. Прикладами є, як варіант, заміщені ацильні, сульфонатні та фосфатні функціональні угруповання, а також блоковані або не-блоковані амінокислотні, гемісукцинатні та нікотинатні залишки.

Галоген – це фтор, хлор, бром або йод.

Термін "карбоцикл" стосується ароматичного або насиченого або частково насиченого 5-14 членного моно- або поліциклічного кільця, наприклад, 5-7-членного моно- або 7-10-членного біциклічного кільця, у якому усі члени є атомами карбону.

Термін "гетероцикл" стосується ароматичного або насиченого або частково насиченого 5-14 членного моно- або поліциклічного кільця, наприклад, 5-7-членного моно- або 7-10-членного біциклічного кільця з 1-3 гетероатомами, обраними з сульфору, азоту і кисню, у якому будь-який з гетероатомів азоту і сульфору, як варіант, можуть бути окиснені, а будь-який з гетероатомів азоту може бути кватернізований. Гетероциклічне кільце може бути приєднане до будь-якого придатного гетеро- або карбонового атома. Приклади включають декагідроізохіноліл, окта-гідротієно[3,2- c']піридиніл, піперидиніл, піперазиніл, азепиніл, піроліл, піролідиніл, піразоліл, піролідиніл, піразоліл, піразолідиніл, фурил, ізотіазоліл, фуразаніл, ізоксаліл, тiazоліл, піридил, піразиніл, піримідиніл, піридазиніл, імідазоліл, ізобензофураніл, фуразиніл, імідазолініл, імідазолідиніл, піридил, піразиніл, піримідиніл, піридазиніл, оксазоліл, оксазолідиніл, ізоксазоліл, тіантриніл, триазиніл, ізоксалідиніл, морфолініл, тiazоліл, таізолідиніл, ізотіазоліл, хінуклідиніл, ізотіазолідиніл, індоліл, хіноліл, хроменіл, ксантеніл, ізохіноліл, бензімідазоліл, тіадіазоліл, бензопіраніл, бензотіазоліл, бензоазоліл, фурил, тетрагідрофурил, тетрагідропіраніл, тієніл, бензотієніл, бензо[b]тієніл, нафто[2,3- b']тієніл, тіаморфолініл, тіаморфолінілсульфоксид, тіаморфолінілсульфон, оксадіазоліл, триазоліл, тетрагідрохіноліл, тетрагідроізохіноліл, феноксатієніл, індолізиніл, ізоіндоліл, індазоліл, пуриніл, ізохіноліл, хіноліл, фтапазиніл, нафтипіридиніл, хіноксалил, хінзоліл, циноліл, птеридиніл, карбазоліл, бета-карболініл, фенантридиніл, акридиніл, перимідиніл, фенантроліл, феназиніл, ізотіазоліл, фенотіазиніл і феноксазиніл.

Термін "тіоетер" включає S-арил, наприклад, фенілтіо і нафтилтіо, насичений або частково насичений S-гетероцикл, 3-(C_5 - C_7)циклоалкіл і S-алкіл, наприклад, (C_1 - C_6)алкілтіо. У тіоетері -арил, -гетероцикл, -циклоалкіл і -алкіл, як варіант, можуть бути заміщеними. Прикладом тіоетеру є (C_1 - C_6)алкілтіо, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-6 атомами карбону, приєднаний до атома сульфору. Групи (C_1 - C_6)алкілтіо включають метилтіо, етилтіо, пропілтіо, ізопропілтіо, бутилтіо, втор-бутилтіо, t -бутилтіо, пентилтіо, гексилтіо тощо.

Термін "меркапто" означає -SH.

Термін "зміно" стосується сполук формули – NL_1L_2 , у яких L_1 , L_2 бажано незалежно обирати з

групи, утвореної киснем, карбоциклічною і гетероциклічними групами, алкілом, сульфонілом і гідрогеном, або сполук формули NC(O)L_3 , де L_3 бажано, є алкілом, алкоксилем, гідрогеном або $-\text{NL}_1\text{L}_2$. Як варіант, алкіл, алкіл і алкоксильні групи можуть бути заміщеними. Прикладом аміну є C_1 - C_4 алкіламін, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону. Прикладами C_1 - C_4 алкіламінових груп можуть бути етиламіно-, метиламіно-, пропіламіно-, ізопропіламіно-, бутиламіно-, втор-бутиламіногрупа тощо. Іншим прикладом аміну є ди- C_1 - C_4 алкіламін, який являє собою два лінійні або розгалужені алкільні ланцюги, кожен з яких має 1-4 атоми карбону, приєднані до спільної аміногрупи. Приклади ди- C_1 - C_4 алкіламінових груп включають диметиламіно-, етил метиламіно-, метил пропіламіно-, етилізопропіламіно-, бутилметиламіно-, втор-бутилметиламіногрупу тощо. Прикладом аміногрупи є також C_1 - C_4 алкілсульфоніламіногрупа, яка являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону, приєднаними до сульфоніламінового угруповання. Прикладами C_1 - C_4 алкілсульфоніламінової групи можуть бути етилсульфоніламіно-, метилсульфоніламіно-, пропілсульфоніламіно-, ізопропілсульфоніламіно-, бутилсульфоніламіно-, втор-бутилсульфоніламіногрупа тощо.

Термін "ацил" стосується сполук формули $\text{L}_6\text{C(O)L}_4$, де L_6 -одиночний зв'язок, $-\text{O}$ або $-\text{N}$, а L_4 - алкіл, аміногрупа, гідроксил, алкоксил або гідроген. Як варіант, алкільна та алкоксильна групи можуть бути заміщеними. Прикладом ацилу є C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, який являє собою лінійний або розгалужений алкоксильний ланцюг з 1-4 атомами карбону, приєднаними до карбонільного угруповання. Прикладами C_1 - C_4 алкоксикарбонільних груп є метоксикарбоніл, етоксикарбоніл, пропоксикарбоніл, ізопроксикарбоніл, бутоксикарбоніл тощо. Іншим прикладом ацилу є карбок-сигрупа, у якій L_6 -одиночний зв'язок, а L_4 -алкоксил, гідроген або гідроксил. Ще одним прикладом ацилу є $\text{N}-(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоіл}$ (L_6 -одиночний зв'язок, а L_4 -аміногрупа), який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону, приєднаними до атому азоту карбамоільного угруповання. Прикладами $\text{N}-(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоільних груп}$ є $\text{N}-(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоіл}$, N -етилкарбамоіл, N -пропілкарбамоіл, N -ізопропілкарбамоіл, N -бутил карбамоіл, N -t-бутилкарбамоіл тощо. Іншим прикладом ацилу є N,N -ди- $(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоіл}$, який має дві лінійні або розгалужені алкільні ланцюги з 1-4 атомами карбону кожний, приєднані до атому азоту карбамоільного угруповання. Прикладами N,N -ди- $(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоільних груп}$ є N,N -диметилкарбамоіл, N,N -етилметилкарбамоіл, N,N -метилпропілкарбамоіл, N,N -етилізопропілкарбамоіл, N,N -бутилметилкарбамоіл, N,N -втор-бутилметилкарбамоіл тощо.

Термін "сульфініл" стосується сполук формули $-\text{SO}-\text{L}_7$, де L_7 -бажано, алкіл, аміногрупа, арил, циклоалкіл або гетероцикл. Алкіл, арил, циклоалкіл і гетероцикл, як варіант, можуть бути заміщеними.

Термін "сульфоніл" стосується сполук форму-

ли $-\text{SO}_2-\text{L}_5$, де L_5 -бажано, алкіл, аміногрупа, арил, циклоалкіл або гетероцикл. Алкіл, арил, циклоалкіл і гетероцикл, як варіант, можуть бути заміщеними. Прикладом сульфонілу є C_1 - C_4 алкілсульфоніл, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону, приєднаними до сульфонільного угруповання. Приклади C_1 - C_4 алкілсульфонільних груп включають метилсульфоніл, етил сульфоніл, пропілсульфоніл, ізопропілсульфоніл, бутил сульфоніл, втор-бутилсульфоніл тощо.

Як уже відзначалось, деякі з груп можуть бути заміщеними. Фактично усі згадані групи, якщо не зумовлено інше, можуть бути заміщеними або не заміщеними. Наприклад, алкіли можуть бути як заміщеними, так і незаміщеними, якщо це окремо не зумовлено. Прикладами замісників для алкілу та арилу можуть бути меркапто-, тое-терна, нітро (NO_2)-, аміно-, арилоксильна, галогено-, гідроксильна, алкоксильна і ацильна групи, а також арильна, циклоалкільна і насичені і частково насичені гетеро-цикли. Приклади замісників для гетероциклу і циклоалкілу включають замісники, перелічені для алкілу та арилу, а також арил і алкіл.

Приклади заміщених арилів включають фенільне або нафтильне кільце, заміщене одним або більше замісниками, бажано, одним-трьма, незалежно обраними з групи, яку складають галоген, гідроксил, морфолін(C_1 - C_4)алкоксикарбоніл, піридил(C_1 - C_4)алкоксикарбоніл, галоген(C_1 - C_4)алкіл, C_1 - C_4 алкіл, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, карбамоіл, $\text{N}-(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкілкарбамоіл}$, аміногрупа, C_1 - C_4 алкіламіногрупа, ди- $(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкіламіногрупа}$ і група формули $-(\text{CH}_2)_a-\text{R}_7$, де $a=1, 2, 3$ або 4 , а R_7 -гідроксил, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, аміногрупа, карбамоіл, C_1 - C_4 алкіламіногрупа або ди- $(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{алкіламіногрупа}$.

Крім того, заміщеним алкілом є галоген(C_1 - C_4)алкіл, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону, до яких приєднані 1-3 атоми галогену. Прикладами галоген(C_1 - C_4)алкільних груп є хлорметил, 2-бромметил, 1-хлорізопропіл, 3-фторпропіл, 2,3-дибромбутил, 3-хлорізобутил, іод-t-бутил, трифторметил тощо.

Іншим заміщеним алкілом є гідрокси(C_1 - C_4)алкіл, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону з приєднаною до нього гідроксильною групою. Прикладами гідрокси(C_1 - C_4)алкільних груп є гідроксиметил, 2-гідроксietил, 3-гідроксипропіл, 2-гідроксизопропіл, 4-гідроксибутил тощо.

Ще одним заміщеним алкілом є C_1 - C_4 алкілтіо(C_1 - C_4)алкіл, який являє собою лінійну або розгалужену C_1 - C_4 алкільну групу з приєднаною до неї C_1 - C_4 алкілтіогрупою. Прикладами C_1 - C_4 алкілтіо(C_1 - C_4)алкільних груп є метилтіометил, етилтіометил, пропілтіопропіл, втор-бутилтіометил тощо.

Іншим заміщеним алкілом є гетероциклічний (C_1 - C_4)алкіл, який являє собою лінійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону з приєднаним до нього гетероциклом. Прикладами гетероциклічних (C_1 - C_4)алкільних груп є піролілметил, пінолілметил, 1-індолілметил, 2-

фурилетил, 3-тен-2-ілпропіл, 1-імідазолізопропіл, 4-тіазолілбутил тощо

Ще одним заміщеним алкілом є арил(C_1 - C_4)алкіл, який являє собою лійний або розгалужений алкільний ланцюг з 1-4 атомами карбону з приєднанням до нього арилом. Прикладами арил(C_1 - C_4)алкільних груп є фенолметил, 2-фенілетил, 3-нафтілпропіл, 1-нафтілізопропіл, 4-фенілбутил тощо

Гетероцикл може бути, наприклад, заміщений 1-3 замісниками, незалежно обраними з групи, яку складають галоген, галоген(C_1 - C_4)алкіл, C_1 - C_4 алкіл, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, карбамоіл, N-(C_1 - C_4)алкілкарбамоіл, аміногрупа, C_1 - C_4 алкіламіногрупа, ди(C_1 - C_4)алкіламіногрупа і група формули $-(CH_2)_a-R_7$, де $a = 1, 2, 3$ або 4 , а R_7 - гідроксил, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, аміногрупа, карбамоіл, C_1 - C_4 алкіламіногрупа або ди(C_1 - C_4)алкіламіногрупа,

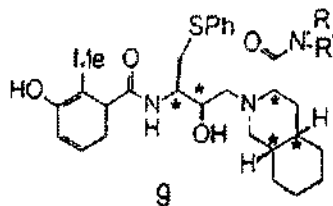
Приклади заміщених гетероциклів включають 3-N-t-бутилкарбоксаміддекагидро-ізохінолініл, 6-N-t-бутилкарбоксамідоктагидротієно[3,2-c]піридиніл, 3-метилімідазоліл, 3-метоксипіридиніл, 4-хлорхінолініл, 4-амінотіазоліл, 8-метилхінолініл, 6-хлорхіноксаліл, 3-етилпіридиніл, 6-метоксibenзімідазоліл, 4-гідроксифурил, 4-метилізохінолініл, 6,8-дибромхінолініл, 2-метил-1,2,3,4-тетрагидроізохінолініл, N-метилхінолініл-2-іл, 2-t-бутоксикарбоніл-1,2,3,4-ізохінолін-7-іл тощо

Приклади гетероциклічних кільцевих систем А або В включають (1) 5-членні моноциклічні кільцеві групи, наприклад, тієніл, піроліл, імідазоліл, піразоліл, фурил, ізотіазоліл, фуразаніл, ізоксаліл, тіазоліл тощо, (2) 6-членні моноциклічні кільцеві групи, наприклад, піридиніл, піразиніл, піримідиніл, придазиніл, тріазиніл тощо і (3) поліциклічні кільцеві групи, наприклад, декагидроізохінолініл, октагидротієно[3,2-c]піридиніл, бензо[b]тієніл, нафто[2,3-b]тієніл, ізобензофураніл, хроменіл, ксантеніл і їх повністю або частково насичені аналоги

Як варіант, циклоалкіл може бути заміщений 1-3 замісниками, незалежно обраними з групи, яку складають галоген, галоген(C_1 - C_4)алкіл, C_1 - C_4 алкіл, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, карбамоіл, N-(C_1 - C_4)алкілкарбамоіл, аміногрупа, C_1 - C_4 алкіламіногрупа, ди(C_1 - C_4)алкіламіногрупа і група формули $-(CH_2)_a-R_7$ де $a = 1, 2, 3$ або 4 , а R_7 - гідроксил, C_1 - C_4 алкоксил, карбоксил, C_1 - C_4 алкоксикарбоніл, аміногрупа, карбамоіл, C_1 - C_4 алкіламіногрупа або ди(C_1 - C_4)алкіламіногрупа. Приклади заміщених циклоалкільних груп включають 3-метилциклопентил, 4-етоксциклогексил, 5-карбоксциклогексил, 6-хлорциклогексил тощо

Приклади заміщених здатних до гідролізу груп включають N-бензилгіліл, N-Cbz-L-валіл і N-метилнікотинат

Сполуки згідно з винаходом мають щонайменше п'ять асиметричних центрів, позначених * у формулі (9)



9

Внаслідок наявності цих центрів сполуки згідно з винаходом можуть існувати у будь-якій можливій стереомеричній формі і можуть використовуватись як суміш оптично активних або рацемічних стереомерів, або поодинокі як суттєво чисті (щонайменше на 95%) стереомери. Винахід включає усі асиметричні форми, індивідуальні стереоізомери і їх сполучення

Індивідуальні стереоізомери можуть бути приготувані з відповідних попередників за допомогою описаних вище процедур, розрізненням рацемічних сумішей або відокремленням діастереомерів. Розрізнення можна здійснювати у присутності розрізняючого агента, хроматографією або багаторазовою кристалізацією або шляхом сполучення цих способів, добре відомих фахівцям. Подальші деталі можна знайти у Jaques et al, Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley & Sons, 1981

Бажано використовувати суттєво чисті (більше як на 50%) сполуки згідно з винаходом, краще щонайменше 75%-ої чистоти, ще краще щонайменше 90%-ої, ще краще щонайменше 95%-ої, ще краще щонайменше 97%-ої, найкраще щонайменше 99%-ої чистоти

Як уже відзначалось, винахід включає фармацевтично прийнятні солі сполук формули (9). Сполука згідно з винаходом може містити достатньо кислотні або достатньо основні функціональні групи, або ті і інші, і, відповідно, вступати у реакцію з будь-якою з великої кількості органічних і неорганічних основ і органічних і неорганічних кислот, утворюючи фармацевтично прийнятні солі

Термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується солей сполуки формули (9), які є суттєво нетоксичними для живих організмів. Прикладами фармацевтично прийнятних солей можуть бути солі, одержані реакцією сполук згідно з винаходом з органічною або неорганічною кислотою або неорганічною базою. Для солей приєднання кислот реакцію звичайно проводять у спільному розчиннику, наприклад, діетилетері або бензолі, а для солей приєднання основи до води або спирту. Звичайно солі випадають у осад протягом від 1 год до 10 днів, після чого їх можна відокремити фільтруванням або у інший відомий спосіб

Для приготування солей приєднання кислот можна використовувати такі неорганічні кислоти, як гідрохлоридна, гідробромидна, гідроїодидна, сульфурова тощо і такі органічні кислоти, як р-толуолсульфонова, метансульфонова, оксалінова, р-бромфенілсульфонова, карбонова, бурштинова, лимонна, бензойна, оцтова тощо

Прикладами фармацевтично прийнятних солей є сульфат, піросульфат, бісульфат, сульфат, бісульфат, фосфат, моногідрофосфат, дигідрофосфат, метафосфат, пірофосфат, хлорид, бромід, іодид, ацетат, пропіонат, деканоат, каприлат, ак-

рилат, формат, ізобцитарат, капроат, гептаноат, пропаноат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себацат, фумарат, малеат, бутин-1,4-діоат, гексин-1,6-діоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гідроксibenзоат, метоксibenзоат, фталат, сульфонат, ксилосульфонат, фенілацетат, фенілпропіонат, фенілбутират, цитрат, лактат, g-гідроксибутират, гліколят, тартрат, метансульфонат, пропансульфонат, нафталін-1-сульфонат, нафталін-2-сульфонат, манделат тощо

Бажаними фармацевтичне прийнятними солями приєднання кислот є утворені такими неорганічними кислотами, як гідрохлоридна і гідробромідна, і такими органічними кислотами, як малеїнова і метансульфонова

Солі приєднання основ включають утворені такими органічними і неорганічними основами, як гідроксид амонію, лужних або лужноземельних металів, карбонати, бікарбонати тощо. Бажаними для приготування таких солей є такі основи, як гідроксиди натрію, калію та амонію, карбонати та бікарбонати натрію і калію, гідроксид кальцію, карбонат кальцію тощо. Найбільш бажаними є калієві та натрієві солі.

"Фармацевтичне прийнятний пропрепарат" означає сполуку, яка за фізіологічних умов або сольволизом може бути перетворена у сполуку формули (9).

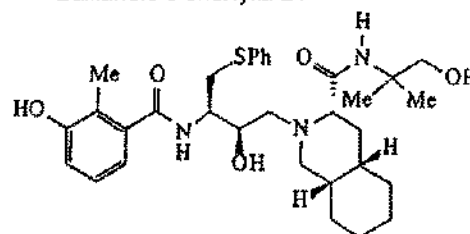
"Фармацевтичне прийнятний сольват" означає сольват, який зберігає біологічну активність і властивості біологічно активних компонентів сполук формули (9).

Необмежуваними прикладами фармацевтичне прийнятних сольватів є сполуки формули (9) у

сполученні з водою, ізопропанолом, етанолом, метанолом, ДМСО, етилацетатом, оцтовою кислотою або етаноламіном.

Слід відзначити, що не має значення, який протиіон утворює сольову частину сполуки згідно з винаходом за умови, що така сіль у цілому є фармацевтичне прийнятною, а протиіон не вносить небажаних властивостей у цю сіль.

Бажаною є сполука 21



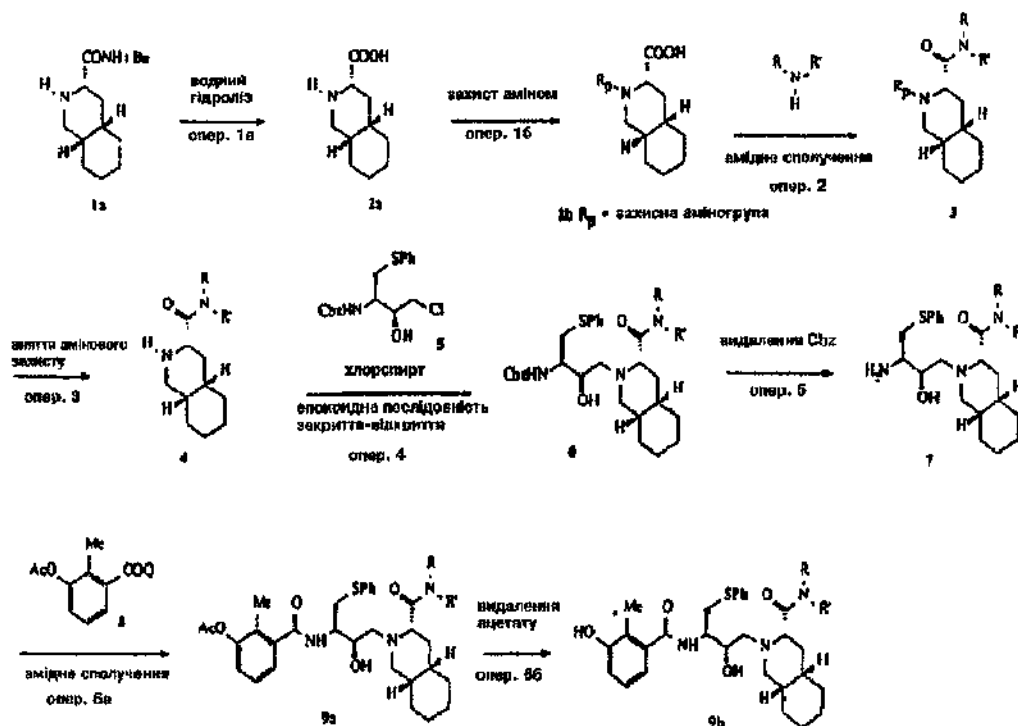
21

тобто [3S-[2(2S*,3S*), 3- α , 4 α - β , 8 α - β]]-N-(1,1-диметил-2-гідроксиетил)декагідро-2-[2-гідрокси-3-[(3-гідрокси-2-метилбензоіл)аміно]-4-(фенілтіо)бутил]-3-ізохінолін-карбоксамід

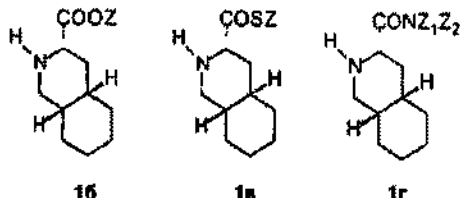
Процедуру приготування сполуки 21 описано нижче, її можна також отримати як метаболіт з плазми пацієнта, якому була уведена [3S-(3R,4 α R*,8 α R*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-гідрокси-3'-фенілтіометил-4'-аза-5'-оксо-5'-(2'-метил-3"-гідроксифент)пентил]-декагідроізохінолін-3-N-тіобутилкарбоксамідна сіль метансульфонової кислоти, описана у патенті США 5484926.

Сполуки формули (9) можна приготувати за реакційною схемою I.

Схема I. Загальна процедура приготування 9б і похідних.

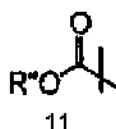


Сполуку 1a (пергідроізохінолін), який можна придбати у NSC Technologies (Чикаго, Ілл.) або у Procos SpA (Мілан, Італія) піддають тривалому кислотному гідролізу (операція 1a) і одержують сполуку 2a. Можна використати різні неорганічні кислоти у водно-органічному розчиннику або у воді при температурі вище 50°C. Прикладом такої кислоти є 6N водна HCl. Замісниками для сполуки 1a можуть бути відповідні естери 1b, тіоестери 1в або інші аміді 1г

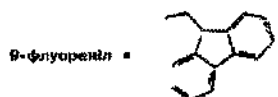
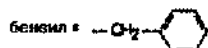
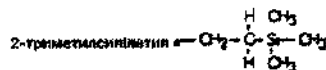
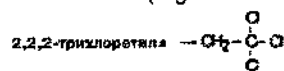


де Z, Z₁, Z₂ незалежно можуть бути алкілом, циклоалкілом, гетероциклічною групою або арилом

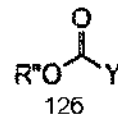
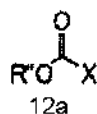
Сполуку 2a захищають у азоті аміну і одержують сполуку 2b (операція 1b). Захисна група R_p є відповідною спряженою групою, що дозволяє уникнути розкладу активованих карбоксилатних похідних сполуки 2b (операція 2). Такі захисні групи за походженням є звичайно карбаматними і мають формулу 11



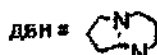
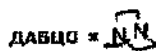
де R''-алкіл, циклоалкіл, арил або гетероцикл, які можна легко видалити депротектуванням після операції 2. Необмежуваними прикладами R'' є метил, етил, пропіл, ізо-пропіл, n-бутил, ізобутил, t-бутил або вищі розгалужені або нерозгалужені алкіл, 2,2,2-трихлоретил, 2-триметилсилілетил, аліл, феніл, заміщений феніл, бензил, заміщений бензил, 9-флуоренілметил, 9-антрилметил і вищі поліциклічні ароматичні кільцеві системи. Матеріали, наведені нижче, можна придбати у Aldrich Chemical Co (Sigma Aldrich Fluka)



Такі захисні групи звичайно встановлюють алкілюванням відповідних галоген-форматних естерів 12a або дикарбонату 12b



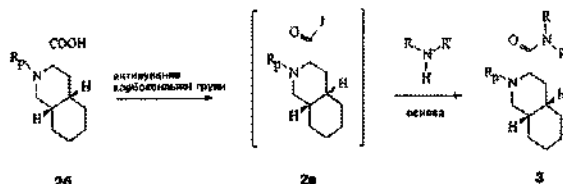
де X-галоген, Y-OCOR'', у присутності придатної бази у органічному розчиннику, типовому для таких реакцій, наприклад галогенованих розчинниках, етерах і гідрокарбонах. Бази звичайно є неорганічними, наприклад, гідроксиди металів, бікарбонати і карбонати, або органічними, наприклад, такі аміни, як тріетиламін, діетиламін, діетилізопропіламін, 1,8-діазабіцикло[2,2,2]октан (ДАБЦО) або відповідні ді- або тріалкіламіни, а також амідинови основи, наприклад, 1,8-діазабіцикло[5,4,0]ундец-7-ин (ДБУ) і 1,8-діазабіцикло[4,3,0]нон-5-ин (ДБН). Наведені нижче матеріали можна придбати у Aldrich Chemical Co (Sigma Aldrich Fluka)



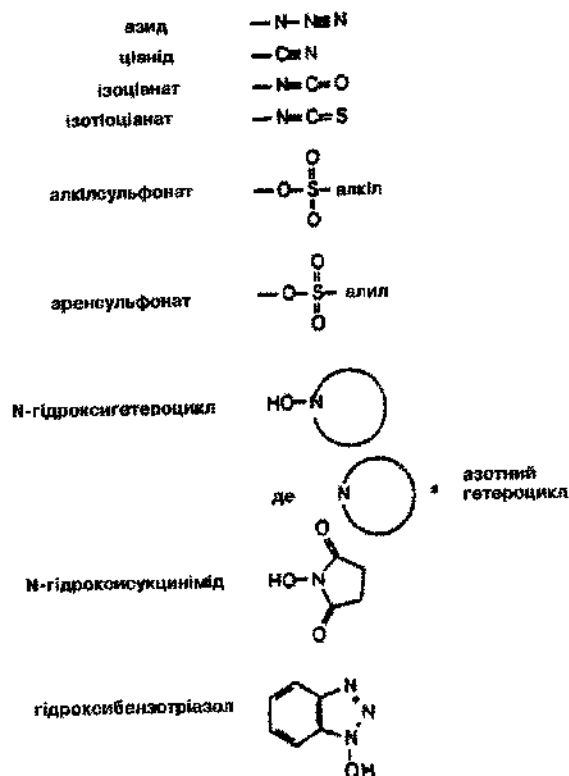
Такі реакції звичайно проводять при температурах від кімнатної до 100°C

Амідне сполучення (операція 2) можна здійснити у різні способи залежно від способу активування карбоксильної групи. Операцією 2 (реакцією карбонової кислоти 2b) встановлюється група J, що дає активовану похідну 2c

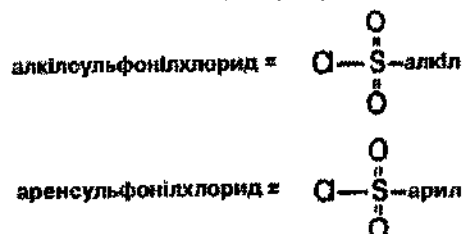
Операція 2



де R_p-захисна аміногрупа, J-будь-яка група, здатна до відщеплення, наприклад, алкоксильна, гідроксильна, галогено-, псевдогалогено- (включаючи азидну, ціанідну, ізоціанатну і ізоціанатну групи), алкільна або аренсульфонатна, ароматична гетероциклічна (з зв'язком через гетероатом) і N-гідроксигетероциклічна група (включаючи гідроксисукцинімідний або гідроксibenзотріазоловий естер). Нижче наведено деякі визначення



Ацилгалогени (2в, J-галоген) можна приготувати, використовуючи такі неорганічні галогенуючі агенти, як тіонілхлорид або бромід, фосфорний трихлорид або бромід, фосфорний пентахлорид або бромід, або органічні агенти, наприклад, оксалілхлорид або трихлорізоціанурова кислота. Естери (2в, J-OR") можна приготувати у різні способи, починаючи з сполучення хлорангідриду 2в, де J-Cl, з бажаним спиртом у присутності органічної або неорганічної основи, подібно використаній при ацилюванні сполуки 12а або 12б. Естер можна також приготувати кислотним естерифікуванням у присутності бажаного спирту. Сульфонати (2в, J-OSO₂W₁, де W₁-алкіл або арил) звичайно готують введенням карбонової кислоти 2б у реакцію з алкілом або арилсульфонілхлоридами у присутності органічної амінової основи, наприклад, тріетиламіну у неполярному розчиннику при температурі нижче 0°C. Алкіл і арилсульфоніл визначено як

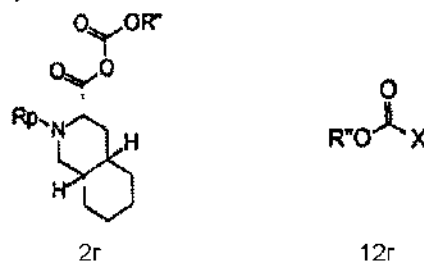


Псевдогалогенні похідні 2в (J-псевдогалоген) звичайно одержують з галогенангідриду 2в (J-галоген) реакцією з неорганічним псевдогалогеном у присутності основи. Необмежуваними прикладами таких основ є гідроксиди металів, бікарбонати і карбонати, або органічні основи, наприклад, такі аміни, як тріетиламін, діетиламін, діетилізопропіламін, 1,8-діазабіцикло[2,2,2]октан (ДБАЦО) або відповідні ді- або тріалкіламіни, а також амідні нові

основи, наприклад, 1,8-діазабіцикло[5,4,0]ундец-7-ин (ДБУ) і 1,8-діазабіцикло[4,3,0]нон-5-ин (ДБН). Бажаною базою є тріетиламін. Гетероароматичні похідні 2в також одержують з галогенангідридів 2в (J-галоген), використовуючи специфічну гетероароматичну сполуку у присутності амінової основи у неполярному розчиннику. N-гідроксигетероциклічні похідні 2в можна виготовити з галогенангідридів, як описано вище, а також алкілкарбодіамідів (алкіл-N=C=N-алкіл) з однаковими або різними алкільними групами, або з арилкарбодіамідів (арил-N=C=N-арил) з однаковими або різними арильними групами, з використанням амінової основи як конденсуючого агента.

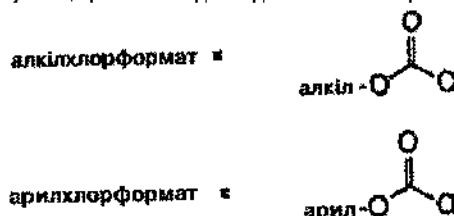
Первинні або вторинні аміни (див. над стрілками операції 2 Схеми 1), які використовуються у процесі сполучення, можуть включати придатні захисні групи залежно від функціональності аміну і способу сполучення. Сполучення 2в з первинним або вторинним аміном може бути виконано за різними процедурами залежно від J. Якщо використовується вільна кислота (2в, J-OH) сполучення здійснюють за допомогою карбодіаміду, використовуючи будь-який з звичайних реагентів цього класу, включаючи дициклогексилкарбодіамід або відповідний діалкілкарбодіамід, солі 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіаміду (ДМЕК) або відповідні водорозчинні реагенти, разом з органічною аміною основою у полярних органічних розчинниках, наприклад, діоксані, ДМФ, N-метилпіролідоні і ацетонітрилі у присутності N-гідрогетероциклічної сполуки, наприклад, N-гідроксисукциніміду або 3-гідроксисензотріазолу.

Галогенформатні естери, наприклад, 12г, можна використати для тимчасового активування кислоти і одержання змішаних ангідридів загальної формули 2г



де X-галоген

Такі естери є типовими і, як показано у 12г, включають метил-, етил-, ізопропіл-, ізобутіл-, n-бутил-, феніл- і відповідні алкіл- та арилформати



Сполука формули 12г може бути інтермедіатом у операції переходу від формули 2б до формули 3

Ці реакції звичайно проводять у різних неполярних органічних розчинниках, наприклад, у таких галогенокарбонах і етерах, як діетиловий етер, метил-t-бутиловий етер, діізопропіловий етер, діо-

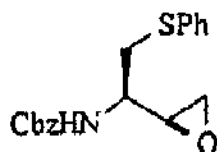
ксан і ТГФ при температурах нижче 0°C у присутності органічної амінової основи, наприклад, триетиламіну, діетиламіну, діетилізопропіламіну, ДАБЦО або відповідних ді- або триалкіламінів, або амідинової основи, наприклад, ДБУ та ДБН

Якщо у сполуці 2в J-галоген або псевдогалоген, сполучення можна проводити у звичайних органічних розчинниках, наприклад, ТГФ, діетилетері, діоксані, метил-*t*-бутиловому естері або інших естерах, ацетоні, циклогексаноні, метилізобутилкетоні і інших кетонах, у естерах, наприклад, етиловому, метиловому і ізопропілацетатному (ІПА), у галогенованих розчинниках, наприклад, галогенованих метанах і етанах, хлорбензолі і інших галогенованих бензолах, у нтрилах, наприклад, ацетонтрилі і пропіонитрилі, у нижчих спиртах, наприклад, етанолі, ізопропанолі, *t*-бутанолі і відповідних спиртах, у полярних органічних розчинниках, наприклад, ДМФ, ДМСО, *N*-метил-2-піролідоні і відповідних амідовмісних розчинниках. Часто використовують основу, яка може бути будь-якою неорганічною основою, наприклад, гідроксидами металів, бікарбонатами і карбонатами, а також органічною основою, наприклад, тріетиламіном, діетиламіном, діетилізопропіламіном, ДАБЦО або відповідними ді- або триалкіламінами, або амідиновою основою, наприклад, ДБУ та ДБН

Фахівець зможе здійснити амідне сполучення (операція 2), використовуючи інші групи J

Видалення захисних груп (операція 3) можна здійснити, використовуючи стандартні методи депротектування цього класу захисних груп. Прості і заміщені алкіл карбамати можна видалити водним розчином основи при температурі до приблизно 100°C, використовуючи будь-який з звичайних неорганічних гідроксидів металів, наприклад, гідроксиду літію, натрію, калію або барію, або інших металів у щонайменше стехіометричній кількості. Для депротектування карбаматів на базі бензилу можна використовувати безводні кислоти, наприклад, HCl, HBr і HI. Придатними є також кислоти Льюїса з бором та алюмінієм, включаючи AlCl₃, BBr₃, BCl₃ у неполярному розчиннику. Можна використовувати також певні заміщені бензиліни, арильні або алкільні групи, якщо спосіб заміщення задовольняє вимозі бути здатними до видалення за певних умов. Наприклад, 2'-триметилсилілетилкарбонільна група є захисною групою, призначеною легко реагувати з 2-триметилсилілетиловою групою у процесі депротектування. Азот аміну можна захистити 2-триметилсилілетилкарбоніл- хлоридом, який потім можна видалити за допомогою джерела іону фтору, наприклад, HF або фториду тетраалкіламонію.

Операцією 4 пергідроізохінолінова частина формули 4 з'єднується з хлорспиртом (сполука 5, Схема I) через епоксидний інтермедіат (13), утворений викликанням основою закриттям віцинової хлоргідринової функціональної групи



13

Виробником сполуки 5 є Kaneka Industries, Japan. Для перетворення "сполука 5-сполука 13-сполука 6" можна кілька разів використати процедуру закриття-відкриття. Епоксид 13 можна ізолювати або увести у реакцію з 4, доданою після утворення сполуки 13, або 4 може бути присутньою з самого початку. Епоксид 13 можна створювати, використовуючи неорганічні основи, наприклад, гідроксиди металів, карбонати і бікарбонати у таких розчинниках, як спирти, наприклад, метанол, етанол або ізопропіловий спирт, або етери, наприклад, ТГФ і діоксан або їх суміші. Епоксид може утворюватись у двофазній системі розчинників, складеної з води і розчину галогенкарбону, наприклад, ДХМ разом з основою. Для прискорення процесу можна використати каталізатор фазового переходу, наприклад, сіль тетраалкіламонію. Відкриття епоксиду 13 з сполукою 4 відбувається у спиртових розчинах або у сумішах спирту і іншого розчинника-етеру або дипольного апротонного розчинника, наприклад, ДМФ або ДМСО. Цю реакцію з сполукою 4, яка дає сполуку 6, найкраще проводити протягом 2-7 год при температурі 50-60°C.

Операцією 5 карбобензилоксильна група видаляється з утворенням вільного аміну 7. Це здійснюється використанням HBr у оцтовій кислоті з співрозчинниками, наприклад, галогенокарбонами, або використанням галогенідів бору, наприклад, BBr₃ і BCl₃ або галогенідів бору, заміщених алкілом, наприклад, бромиду диметилбору у галогенокарбонних розчинниках, наприклад, хлороформі або ДХМ при температурах від 0°C до кімнатної. У іншому варіанті карбобензилоксильну групу можна видалити гідролізом з використанням водно-спиртових розчинів гідроксидів таких металів, як барій, натрій, літій або калій, при температурі вище кімнатної протягом кількох год.

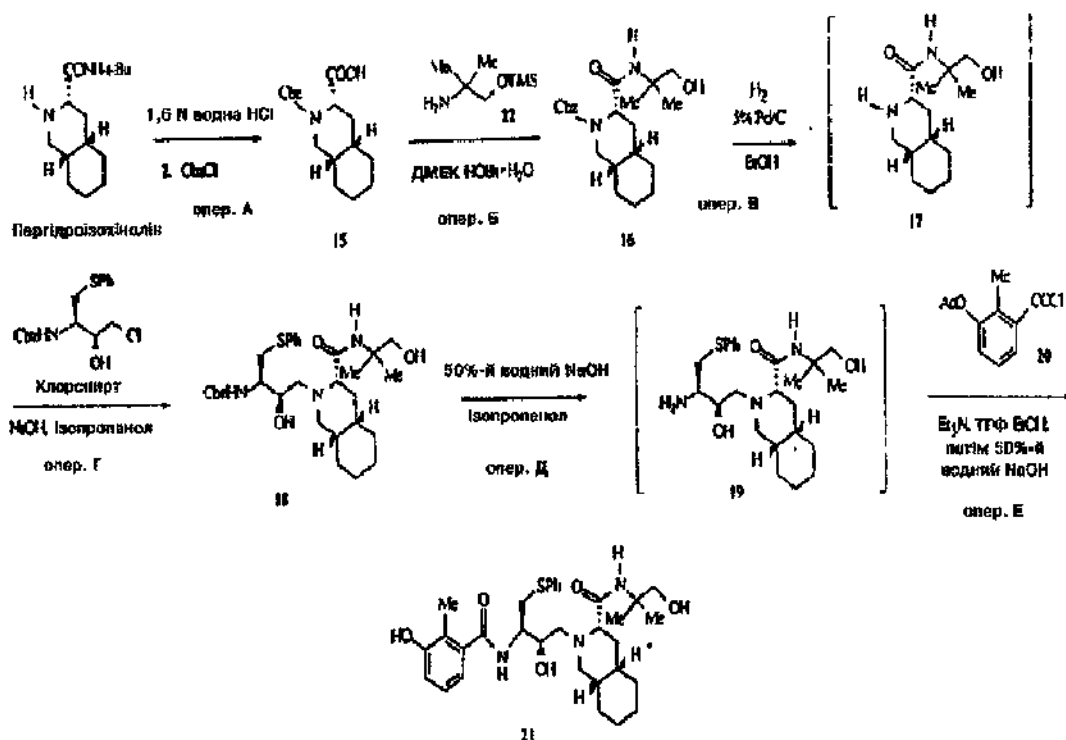
Сполучення похідних бензойної кислоти формули 8 (операція 6а) дає сполуку 9а. У формулі 8 Q може бути здатною до відщеплення групою, зокрема, однією з груп, згаданих при розгляді групи J. Сполуки формули 8, у яких Q-OH або Cl, можна придбати у EMS Datticon, Ленцбург, Швейцарія та Sugai Chemical Industries, Ltd, Японія. Сполучення можна здійснити у багато способів залежно від Q. При використанні вільної кислоти (Q-OH) сполучення можна здійснити, використовуючи базовані на карбодіміді способи з застосуванням будь-якого з звичайних реагентів цього класу, включаючи дициклогексилкарбодімід або відповідні діалкілкарбодіміди, солі 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіміду, або відповідні водорозчинні реагенти, разом з органічною аміновою основою у полярних органічних розчинниках, наприклад, діоксані, ДМФ, *N*-метилпіролідоні і ацетонитрилі у присутності *N*-гідрогетероциклічної сполуки, наприклад, *N*-гідроксисукциніміду або 3-гідроксибензотріазолу. Якщо Q-галоген або псевдогалоген, сполучення можна здійснювати у звичайних органічних розчинниках, наприклад, ТГФ, діетиловому, діоксані, метил-*t*-бутиловому етері або інших етерах, ацетоні, циклогексаноні, метилізобутилкетоні і інших кетонах, естерах, наприклад, етил-, метил- і ізопропіла-цетаті, у галогенованих розчинниках, наприклад, галогенованих

метанах і етанах, у хлорбензолі і інших галогенованих бензолах, у нітрилах, наприклад, ацетоннітрилі і пропіонітрилі, у нижчих спиртах, наприклад, етанолі, ізопропанолі, t-бутанолі і відповідних спиртах, і у полярних органічних розчинниках, наприклад, ДМФ, ДМСО, N-метил-2-піролідоні і відповідних амідомісних розчинниках. Можна використати основи, а саме, будь-яку з неорганічних основ, наприклад, гідроксиди металів, карбонати і бікарбонати, або такі органічні основи, як аміни, наприклад, тріетиламін, діетиламін, діетилізопропіламін, ДАБЦО або відповідні ді- або тріалкіламіни, або амідно-нові основи, наприклад, ДЕУ та ДЕН.

Видалення ацетату (операція 6б) здійснюється водними або спиртовими розчинами неорганічних основ, наприклад, гідроксидів металів, карбонатів та бікарбонатів при температурах від кімнатної до 100°C. Якщо карбоксамідну групу, з'єднану з пергідрізохіноліновою кільцевою системою, захищено функціональною групою, її найкраще видаляти на цій стадії (під час або після операції 6б). Природа цієї операції залежить від виду захисної групи.

Бажаний спосіб здійснення процесу за Схемою 1 наведено на Схемі II.

Схема II Синтез амиду 21



Амінокислота 15, захищена групою Cbz, була сполучена з аміном 22 з утворенням амиду 16. Видалення групи Cbz гідрогенуванням дає амін 17, який сполучається з хлорспиртом через епоксид з утворенням аддукту 18. Звичайне депротектування основою і з'єднання вільного первинного аміну з хлорним ангідридом 20 дає амід 21. Цей процес детально ілюстровано прикладами 1A-E (відповідають до операціям A-E).

Подальші приклади ілюструють винахід, не обмежуючи його об'єму.

Абревіатури

Тп - точка плавлення,

ЯМР - спектр ядерно-магнітного резонансу,

МСУЕ - мас-спектр з збудженням ударом електронів,

МСПД - мас-спектр з польовою десорбцією,

СБША - спектр бомбардування швидкими атомами,

ІЧ - інфрачервоний спектр,

УФ - ультрафіолетовий спектр,

Аналіз - елементний аналіз,

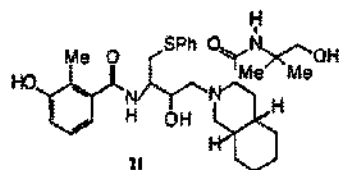
ВЕРХ - високоєфективна рідинна хроматографія,

ТШХ - тонкошарова хроматографія

У ІЧ відзначено не усі максимуми абсорбції, а лише важливі. Для ЯМР використано абревіатури s-синглет, d-дублет, dd-дублет, дублетів, t-триплет, q-квартет, m-мультиплет, dm-дублет, мультиплетів, br s-широкий синглет, br d-широкий дублет, br t-широкий триплет, br m-широкий мультиплет. J-сполучаюча константа. Якщо не зумовлено інше, ЯМР відноситься до вільної бази або сполуки, що синтезується.

ЯМР одержано на приладі General Electric QE-300, 300МГц. Хімічні зсуви наведено у значеннях δ (1/млн). Масові спектри одержані на приладі VG ZAB-3 Spectrometer у Scripps Research Institute, La Jolla, CA. ІЧ зареєстровано спектрометром Midac Corporation. УВ зареєстровано на приладі Varian Cary 3E. ТШР виконано з використанням пластин оксиду кремнію від E. Merck. Тп виміряно на приладі Mettler FP62 без коригування.

Приклад 1 Амід формули 21 [3S-[2(2S*,3S*), 3- α , 4- β , 8- α - β]]-N-(1,1-Диметил-2-гідроксипропіл)декагидро-2-[2-гідрокси-3-[(3-гідрокси-2-метилбензоіл)аміно]-4-(фенілтіо)бутил]-3-ізохінолінкарбоксамід, тобто



А 26,4г (111 ммоль) пергідрохіноліну (від NSC Technologies (Чикаго, Ілл.) або від Procos SpA, Мілан) суспендують у 200мл води і концентрують водною HCl (200мл). Суміш гріють з перемішуванням під зворотним холодильником протягом 3 днів, після чого вона перетворюється у розчин. Розчинники видаляють під зниженим тиском і одержують світложовту тверду речовину, яку суспендують у 200мл 2-пропанолу і фільтрують. Фільтрат піддають випарюванню під зниженим тиском і одержують масло. Додають 100мл EtOAc і 100мл води і доводять pH до 8 доданням 2N водного KOH. Краплями протягом 10хв додають 15,8мл (111 ммоль) бензилхлорформату і підтримують pH від 7 до 8 доданням 2N водного KOH. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18год, після чого додають 200мл EtOAc і промивають органічний шар 1N водною HCl (100мл) і розсолом (100мл). Органічний шар сушать (MgSO₄), фільтрують і піддають випарюванню під зниженим тиском до одержання масла. Продукт очищують хроматографією на колонці силікагелю з елюентом петролейний етер (40-60)/EtOAc (1/1), потім 100% EtOAc. Фракції, що містять продукт, збирають і піддають випарюванню під зниженим тиском, одержуючи 11,3г (32%) сполуки 15 у вигляді безбарвного масла.

¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 7,43-7,28 (m, 5H), 5,17 (br s, 2H), 4,76 (m, 1H), 3,79 (m, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,96 (m, 1H), 1,88-1,15 (m, 10H).

Б 4,2г (31,4 ммоль) 1-гідроксibenзоотраізолу і 6,0г (31,4 ммоль) 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіміду додають розчину 8,3г (26,2 ммоль) кислоти 15 у 128мл ДМФ при кімнатній температурі. Суміш гріють при 80°C протягом 10хв.

Додають 5,1г (31,4 ммоль) 1,1-диметил-2-триметилсипілоксіетиламіну, приготовленого з 1,1-диметил-2-гідроксіетиламіну (Aldrich Chemical and Co) і гексаметилдиси-лазану (Aldrich Chemical and Co) підігріванням суміші під зворотним холодильником протягом кількох год, з подальшим випарюванням легких компонентів, і розчин гріють при 80°C протягом 17год. Жовтий розчин впливають у 250мл EtOAc і 250мл 2N водної HCl. Після 10-хвилинного перемішування додають 750мл EtOAc і суміш промивають водою HCl (3x500мл) і розсолом (250мл). Об'єднані водні шари екстрагують EtOAc (250мл) і об'єднані органічні шари сушать (MgSO₄) і очищують флеш-хроматографією (EtOAc/гексани (50/50), одержуючи 7,9г (78%) сполуки 16 у вигляді безбарвного масла.

¹H ЯМР (300МГц, CD₃OD) δ 7,38 (m, 5H), 5,20 (d, J=8, 1Гц, 1H), 5,10 (m, 1H), 4,53 (m, 1H), 3,78 (dd, J=13,2, 4,4Гц, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,48 (d, J=10,7Гц, 1H), 2,15-1,25 (m, 12H), 1,31 (s, 3H), 1,29 (s, 3H).

В Суміш 7,9г (20,4 ммоль) карбамату 16 і 5% паладію на карбоні (Pd/C) (1,6г) гідрогенують при

345кПа (50 фунтів/кв дюйм) при кімнатній температурі протягом 18 год. Суміш фільтрують через Celite і піддають випарюванню у вакуумі, одержуючи амін 17 у вигляді білої кристалічної твердої речовини.

¹H ЯМР (300МГц, CD₃OD) δ 3,63 (q, J=7,0Гц, 2H), 3,34 (m, 1H), 3,27 (dd, J=11, 8Гц, 3,3Гц, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,02-1,15 (m, 12H), 1,32 (s, 3H), 1,31 (s, 3H).

Г 2,4мл (24,5 ммоль) 10 2N водного NaOH з механічним перемішуванням додають до теплої (27°C) суспензії 10,4г (24,5 ммоль) хлорспирту (від Kaneka Industries, Японія) у 104мл ізопропанолу. Через 1 год для нейтралізації (pH=7) додають приблизно 1мл 1N водної HCl у ізопропанолі (приготовленої доданням 1мл концентрованої водної HCl до 12мл ізопропанолу), потім додають розчин 5,2г (20,4 ммоль) аміну 17 у 50мл ізопропанолу, суспензію гріють при 60°C протягом 10год і ізопропанол видаляють у вакуумі. Залишок розводять EtOAc (150мл) і промивають водою (2x50мл), насиченим водним NaHCO₃ (50мл) і розсолом (50мл). Об'єднані водні шари екстрагують EtOAc (25мл) і об'єднані органічні шари сушать (MgSO₄) і очищують флеш-хроматографією (EtOAc/гексани (75/25), одержуючи 8,98г (76%) сполуки 18 у вигляді білої твердої речовини.

¹H ЯМР (300МГц, CD₃OD) δ 7,33 (m, 10H), 5,08 (AB, J_{AB}=12,2Гц, ΔU_{AB}=12,1Гц, 2H), 3,96 (m, 2H), 3,56 (q, J=7,3Гц, 2H), 3,50 (m, 1H), 3,20 (dd, J=13,6Гц, 9,2Гц, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,64 (m, 2H), 2,20-1,20 (m, 14H), 1,28 (s, 6H).

Д 2,7г (1,8мл, 33,6 ммоль) 50%-го водного NaOH додають до суспензії 6,75г (11,6 ммоль) карбамату у 34мл ізопропанолу при кімнатній температурі, після чого суміш гріють під зворотним холодильником протягом 12 год. Після охолодження до кімнатної температури суміш розводять метил-т-бутиловим етером (600мл) і промивають водою (2x250мл) і розсолом (125мл). Об'єднані водні шари екстрагують метил-т-бутиловим етером (150мл) і об'єднані органічні шари сушать (MgSO₄) і піддають випарюванню у вакуумі, одержуючи суміш сполуки 19 і бензипового спирту у вигляді білої маслянистої твердої речовини.

¹H ЯМР (300МГц, CD₃OD) δ 7,34 (m, 10H), 4,63 (s, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,58 (m, 3H), 3,03-3,60 (m, 5H), 2,17 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,87-1,05 (m, 12H), 1,30 (s, 3H), 1,28 (s, 3H).

Е 3,2мл (4,3мл, 31,2 ммоль) тріетиламіну додають до розчину суміші 4,7г (10,4 ммоль) аміну 19 і 23мл бензипового спирту у 23мл EtOH при кімнатній температурі. Додають розчин 2,4г (11,5 ммоль) 3-ацетокси-2-метилбензоілхлориду 20 (приготовленого за процедурою, наведеною у заявці 08/708 411 від 5 09 1996 на патент США, включений сюди посиланням) у 4мл ТГФ. Через дві години додають 4,1г (2,8мл, 52,2 ммоль) 50%-го водного NaOH і суміш гріють під зворотним холодильником протягом 1год і після охолодження до кімнатної температури нейтралізують до pH=7 водною HCl (2N, 26мл). Далі суміш розводять EtOAc (500мл) і промивають водою (250мл), насиченим водним NaHCO₃ (2x250мл), водою (250мл) і розсолом (125мл). Органічний шар сушать (MgSO₄) і очищують флеш-хроматографією

(EtOAc/гексани (75/25), одержуючи 1,39г (23%) аміну 21 (1173-57A) у вигляді білої піни. Результати ^1H ЯМР вказують на присутність 11% (масових) ЕЮН, які не можуть бути видалені у вакуумі.

Аналіз

^1H ЯМР (300МГц, CD_3OD) δ 7,53 (d, J=7,3Гц, 2H), 7,32 (t, J=7,0Гц, 2H), 7,20 (t, J=7,3Гц, 1H), 7,06 (t, J=8,1Гц, 1H), 6,92 (d, J=8,1Гц, 1H), 6,83 (d, J=8,1Гц, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,61 (dd, J=13,6, 4,0Гц, 1H), 3,45 (AB, ΔU_{AB} =11,0Гц, ΔU_{AB} =18,0Гц, 2H), 3,29 (dd, J=13,6, 10,3Гц, 1H), 3,10 (m, 1H), 2,66 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,22 (m, 2H), 2,04 (m, 1H), 1,86-1,20 (m, 11H), 1,19 (s, 3H), 1,18 (s, 3H).

^{13}C ЯМР (75,5МГц, CD_3OD) δ 175,7, 172,5, 155,9, 138,8, 136,7, 129,8, 128,9, 126,3, 126,0, 122,4, 118,4, 115,9, 70,3, 69,9, 68,2, 59,3, 58,8, 59,4, 53,0, 36,5, 34,2, 34,1, 31,1, 30,7, 26,4, 23,1, 23,0, 20,8, 12,1.

Приклад 2 Здатність до інгібування протеази ВІЛ-1 анти-ВІЛ для сполуки 21 у клітинній культурі.

Для визначення значень K_i для сполуки 21 був використаний аналіз кінетики тісного зв'язування $K_i=5,6\pm 0,91\text{нМ}$.

Способи

Експресія протеази ВІЛ-1

Ген протеази ВІЛ-1 був ізолюваний з вірусного штамму 111B (Ratner L, et al., Nature, 316, 227-284, 1985). Для підвищення стабільності очищеної протеази (Rose J R Et al., J Biol Chem, 268, 11939-11945, 1993) глютаміновий залишок у поз 7 (Q7) був мутований у серин (S) заміщенням сегмента 33 базових пар між сайтами NdeI та BstEII генної послідовності протеази синтетичними олигонуклеотидами, які кодують мутацію Q7S. Модифікована генна послідовність була уведена у плазмідний вектор pGZ (Menge K L Et al., Biochemistry, 34 15934-15942, 1995) під контролем промотора фагу T7. Одержаний таким чином констракт pGZ/HP-19Q7S#9 був трансформований у штамм E. coli BL21(DE3), придбаний у Novagen, Inc.

Експресія протеази ВІЛ-1. Культуру вирощували у середовищі 2YT (1,6% пептону триптикази, 1% дріжджового екстракту, 0,5% NaCl при початковому pH=7,5), яке містило 200мкг/л ампіциліну, у 100-літровому ферментері (Biolafitte SA) при 37°C протягом 5год, після чого індукували доданням 1мМ ізопропіл- β -D-тіолактопіранозиду. Температуру культури під час індукування підвищували до 42°C для прискорення акумуляції рекомбінантної протеази ВІЛ-1 у вигляді нерозчинних включених тілець. Після 2-годинного витримання при 42°C клітини були зібрані поперечно-поточним фільтруванням з використанням касети Pelicon 0,1мкм WPP000C5 (Millipore) і клітинну пасту заморожували до -70°C для зберігання.

Очищення рекомбінантної протеази ВІЛ-1. Усі операції проводились (якщо не зумовлено інше) при 4°C. Концентрації протеїну визначали з використанням розчину BioRad для аналізів на протеїн з альбуміном бичачої сироватки (BioRad, Richmond, CA). Хроматографію і аналіз чистоти протеази ВІЛ-1 виконували електрофорезом у поліакриламідному гелі додецилсульфату натрію (SDS-PAGE). Кінцева чистота протеази ВІЛ-1 >98%,

кінцевий вихід з кожних 100л культури-приблизно 120мг.

Клітинну пасту з 100л культури ресуспендували у 300мл лізисного буфера (50мМ трис-Cl pH 8,0, 25мМ NaCl, 20мМ 2-меркаптоетанолу) мікропсевдозріджували у псевдозріджувачі Microfluidics Corporation при 152000кПа (22000 фунтів/кв дюйм). Сирий клітинний лізат освітлювали центрифугуванням при 14000об/хвип, протягом 20хвип. Протеаза ВІЛ-1 було виявлено переважно у гранулах у вигляді включених тілець, які були піддані багаторазовому промиванню лізисним буфером, до якого було додано 0,1% Triton-X100 і 1М мочевины. Після промивання включені тілця були піддані 20-хвилинному центрифугуванню при 9000об/хвип для утворення гранул. Очищені включені тілця були солюбілізовані у буфері з вмістом 50 мМ трис-Cl pH 8,0, 25 мМ NaCl, 20мМ 2-меркаптоетанолу і 8М мочевины. Розчин освітлювали центрифугуванням при 14000об/хвип і при кімнатній температурі ввели у 300мл колонку Fast Flow Q-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) з урівноваженням тим же буфером. За цих умов протеаза ВІЛ-1 не зв'язувалась з колонкою і з проточних фракцій був одержаний суттєво чистий фермент. Для ренатурації протеїна фракції з колонки Fast Flow Q-Sepharose були діалізовані трьома змінами буфера з вмістом 25мМ NaH_2PO_4 pH 7,0, 25мМ NaCl, 10мМ дитіотреїтолу і 10% гліцеролу. Після повторного згортання ДНК центрифугуванням були відділені невеликі кількості осадженого матеріалу і одержані препарати фермента були концентровані, діалізовані сумішшю 0,5М NaCl, 50мМ MES pH 5,6 і 10мМ дитіотреїтолу і у малих аліквотах (приблизно 2мг/мл) заморожені для зберігання при -70°C.

Аналіз кінетики тісного зв'язування

Протеолітична активність очищеної протеази ВІЛ-1 була виміряна за допомогою модифікованого хромогенного аналізу, запропонованого Річардсом та ін (Richards A D Et al., J Biol Chem, 256, 773-7736, 1990). Як субстрат був використаний синтетичний пептид His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe(paraNO₂)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂ (American Peptide Company) (Nle-норлейцин). Аналіз був виконаний у буфері 0,5М NaCl, 50мМ MES pH 5,6, 10мМ дитіотреїтолу і 2% ДМСО при 37°C. Розщеплення одониткового зв'язу між лейцином і паранітрофенілаланіном (Phe para-NO₂) було виявлено спектрофотометрією зменшення поглинання на 305нм. Початкову швидкість визначали як швидкість зменшення поглинання протягом перших 100с ферментної реакції. За цих умов, з використанням протеази ВІЛ-1 Q7S константа Майкльза (K_m) для цього субстрату становила $59\pm 17\text{мкМ}$.

Для визначення інгібування сполукою 21 був використаний субстрат концентрації 200мкМ. Між 13 і 20 оцінювали концентрації інгібіторів і обчислювали швидкість реакції для кожної концентрації, як описано вище. Дійсне значення K_i , наведене раніше, було визначено комп'ютерною нелінійною апроксимацією даних рівнянням Морисона з використанням метода найменших квадратів (Morrison J F, Biochem Biophys Acta, 185,269-286, 1963).

Приклад 3 Антивірусна дія сполуки 21 на ВІЛ-1 у клітинній культурі.

Штами клітин і вірусів

Штами CEM-SS та MT-2 Т-клітин людини і штами RF та MIB ВІЛ-1 були одержані від AIDS Research and Reference Program, Division of AIDS, NIAID and NIH

Аналіз захисту клітин

Інпбуючу дію кожного з агентів на реплікацію ВІЛ-1 виміряли методом редукції забарвлення МТТ (Alley m C Et al, Cancer Res, 48, 589-601, 1988). Сполуки були розчинені у ДМСО з концентрацією 40 мг/мл, потім розведені у пропорції 1:200 у середовищі культури (RPMI, з доданням 10% бичачої ембріональної сироватки). Від кожного розведеного зразка по 100 мкл були розміщені на 96-гніздовій плиті і була приготовлена напівлогарифмічна послідовність розведень. У окремих пробірках клітини MT-2 і клітини CEM-SS були інфіковані ВІЛ-1 MIB і ВІЛ-1 RF з множинністю інфікування 0,01 та 0,03 відповідно. Після 4-годинного періоду адсорбції до гнізд пластини з ліками були внесені по 100 мкл інфікованих або

неінфікованих клітин, чим була створена кінцева концентрація 10^4 клітин/гніздо. Через 6 (клітини CEM-SS) або 7 (клітини MT-2) днів до випробувальних пластин було додано МТТ (5 мг/мл) і кількість утвореного формазану була виміряна квантифікованою спектрофотометрією на 570 нм. Дані були репрезентовані у процентах формазану, утвореного у оброблених ліками гніздах, порівняно з кількістю формазану, утвореного у гніздах, вільних від ліків. ED_{50} обчислювали як концентрацію ліків, яка підвищувала продуктування (у %) формазану у інфікованих гніздах з ліками на 50% порівняно з цим показником у неінфікованих вільних від ліків гніздах.

Цитотоксичність (CT_{50}) обчислювали як концентрацію ліків, яка знижувала продуктування (у %) формазану у неінфікованих гніздах з ліками на 50% порівняно з цим показником у неінфікованих вільних від ліків гніздах. Терапевтичний індекс (ТІ) обчислювали діленням цитотоксичності (CT_{50}) на антивірусну ефективність (ED_{50}).

ТАБЛИЦЯ 1

Оцінки антивірусної активності і цитотоксичності сполуки 21 у клітинах CEM-SS, сильно інфікованих ВІЛ-1 RF

Сполука	ED_{50} (нМ)	ED_{50} (нМ)	ED_{50} (мкМ)	ТІ
21	34,2	154,1	96,6	2825
азидофідин	52,3	543,1	>374,5	>7161
дидеоксицитидин	94,70	142,0	37,69	398

ТАБЛИЦЯ 2

Оцінки антивірусної активності і цитотоксичності сполуки 21 у клітинах MT-2, сильно інфікованих ВІЛ-1 IIIB

Сполука	ED_{50} (нМ)	ED_{50} (нМ)	ED_{50} (мкМ)	ТІ
21	85,6	-	92,6	1082
азидофідин	430,7	-	109,4	254
дидеоксицитидин	5924	-	176,3	30

Як уже відзначалось, сполуки згідно з винаходом можна використовувати для інпбування протеази ВІЛ, пов'язаної з продуктуванням і складанням вірусного компонента. Втіленням винаходу є спосіб лікування інфекції ВІЛ, який полягає у введенні носію інфекції або пацієнту, наприклад, примату ефективної кількості сполуки (9) або її фармацевтично прийнятної солі. Іншим втіленням винаходу є спосіб лікування СНІД, який полягає у введенні носію або пацієнту, наприклад, примату ефективної кількості сполуки (9) або її фармацевтично прийнятної солі. Ще одним втіленням винаходу є спосіб лікування інфекції ВІЛ, який полягає у введенні носію або пацієнту, наприклад, примату, інфікованому ВІЛ, ефективної кількості сполуки (1) або її фармацевтично прийнятної солі.

Термін "ефективна кількість" означає таку кількість сполуки формули (9) або її фармацевтично прийнятної солі, яка ефективно інпбує пов'язані з протеазою ВІЛ продуктування і складання вірусного компонента. Конкретна доза сполуки, яка згідно з винаходом підлягає введенню для отримання терапевтичного ефекту, залежить від конкретних

обставин, пов'язаних з захворюванням, наприклад, від типу сполуки, що підлягає введенню, і індивідуальних особливостей носія або пацієнта. Денна доза для введення за один раз або частинами може містити сполуку згідно з винаходом у кількості приблизно від 0,01 мг до приблизно 50 мг на кг маси тіла, бажано приблизно від 0,05 мг/кг до приблизно 40 мг/кг, найкраще приблизно від 1,0 мг/кг до приблизно 30 мг/кг.

Сполуки згідно з винаходом можна вводити різними шляхами, включаючи оральне, ректальне, черезшкірне, підшкірне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове і через-носове введення. Сполуки згідно з винаходом бажано вводити у формі композицій. Таким чином, ще одним втіленням винаходу є фармацевтична композиція або суміш, яка містить ефективну кількість сполуки формули (9) або її фармацевтично прийнятну сіль разом з фармацевтично прийнятним носієм, наприклад, розріджувачем або наповнювачем. Бажано, щоб активний інгредієнт складав від 0,01% до 99,9% (за масою) композиції "фармацевтично прийнятний" означає, що носій, наприклад, розріджувач або

наповнювач сумісні з іншими інгредієнтами композиції і не завдає шкоди пацієнту або носію інфекції.

Фармацевтичні композиції з сполуками згідно з винаходом можуть бути приготовлені за допомогою відомих процедур і з використанням загальнодоступних інгредієнтів. У процесі приготування композицій згідно з винаходом до активного інгредієнта домішують носій, або розріджують його носієм, або розміщують його у носії, який може мати форму капсули, саше, паперу або іншого придатного контейнера. Якщо носій слугує як розріджувач, він може являти собою твердий, напівтвердий або рідкий матеріал, який виконує функцію розріджувача або середовища для активного інгредієнта. Отже, композиція може мати форму таблетки, пастилки, саше, облатки, еліксиру, суспензії, емульсії, розчину, сиропу, аерозоля (твердого або у рідкому середовищі), мазі (з вмістом активного інгредієнта до 10%), м'якої або твердої желатинової капсули, супозиторія, стерильного розчину для ін'єкцій, пакетованого стерильного порошку тощо.

Далі наведено приклади композицій, які ілюструють винахід, не обмежуючи його. Термін "активний інгредієнт" відповідає сполуці формули (9) або її фармацевтично прийнятній солі.

Композиція 1

Тверді желатинові капсули з вмістом

Активний інгредієнт	250мг на капсулу
Крохмаль, сухий	200мг на капсулу
Стеарат магнію	10мг на капсулу
Усього	460мг

Композиція 2

Таблетка, яка містить

Активний інгредієнт	250мг на таблетку
Целюлоза мікрокристалічна	400мг на таблетку
Діоксид кремнію фумігований	10мг на таблетку
Стеаринова кислота	5мг на таблетку
Усього	665мг

Композиція 3

Аерозольний розчин з вмістом

Активний інгредієнт	0,25
Метанол	25,75
Пропелант 22 (хлордифторметан)	74
Усього	100

Активну сполуку змішують з етанолом і до суміші додають частину пропеланта 22, охолоджують до -30°C і переносять до заповнювального пристрою. Бажану кількість вносять у резервуар з нержавіючої сталі і додають залишок пропеланта, після чого у резервуарі встановлюють клапан.

Композиція 4

Таблетка, яка містить

Активний інгредієнт	60мг на таблетку
Крохмаль	45мг на таблетку
Целюлоза мікрокристалічна	35мг на таблетку
Полівінілпіролідон (10%-й розчин у воді)	4мг на таблетку
Натрійкарбоксиметиловий крохмаль	4,5мг на таблетку
Стеарат магнію	0,5мг на таблетку
Тальк	1мг на таблетку
Усього	150мг

Активний інгредієнт, крохмаль і целюлозу просіюють через сито, меш №45 (США) і ретельно перемішують. Водний розчин полівінілпіролідону змішують з цим порошком і суміш пропускають через сито, меш №14 (США). Одержані таким чином гранули сушать при 50°C і пропускають через сито, меш №18 (США). Натрійкарбоксиметиловий крохмаль, стеарат магнію і тальк просіюють через сито, меш №60 (США) і додають до гранул, з яких після перемішування пресуванням на таблетковій машині виготовляють таблетки масою 150мг.

Композиція 5

Капсули з вмістом

Активний інгредієнт	80мг на капсулу
Крохмаль	59мг на капсулу
Мікрокристалічна целюлоза	59мг на капсулу
Стеарат магнію	2 на капсулу
Усього	200мг

Активний інгредієнт, крохмаль, целюлозу і стеарат магнію змішують, просіюють через сито, меш №45 (США) і заповнюють тверді желатинові капсули.

Композиція 6

Супозиторії, які містять

Активний інгредієнт	225мг
Гліцериди насичених жирних кислот	2000мг
Усього	2225мг

Активний інгредієнт просіюють через сито, меш № 60 (США) і суспендують у гліцериді насичених жирних кислот, розплавлених при найменшому нагріванні. Суміш розливають у двограмові супозиторійні форми і охолоджують.

Композиція 7

Суспензія, яка містить

Активний інгредієнт	50мг
Натрійкарбоксиметилова целюлоза	50мг
Сироп	1,25мл
Розчин бензойної кислоти	0,10мл
Смакові добавки	за потребою
Забарвлювач	за потребою
Очищена вода	до 5мл

33

Активний інгредієнт просіюють через сито, меш №45 (США) і змішують з натрійкарбоксиметилловою целюлозою і сиропом, одержуючи однорідну пасту. З перемішуванням додають розчин бензойної кислоти, смакові добавки і забарвлювач розводені належною кількістю води, після чого додають воду до бажаного об'єму.

Композиція 8

Композиція для внутрішньовенного введення, яка містить

Активний інгредієнт	100мг
Ізотонічний сольовий розчин	1000мл

57772**34**

Такий розчин призначається для внутрішньовенного введення з швидкістю 1 мл/хвил.

Композиція 9

Таблетка, яка містить

Активний інгредієнт	292мг на таблетку
Силікат кальцію	146мг на таблетку
Поперечноштитий повідон	146мг на таблетку
Стеарат магнію	5мг на таблетку
Усього	589мг