

Даний винахід відноситься до тіольних похідних, що мають інгібуючу активність щодо металопротеїназ, зокрема винахід відноситься до похідних N-меркаптоацилфенілаланіну, придатних для лікування серцево-судинних захворювань.

Інтерес до вивчення молекул, що мають здатність інгібувати металопротеїнази, з точки зору фармакології зумовлений роллю зазначених ферментів, яка проявляється на рівні серцево-судинної системи. Добре відомим є той факт, що сполуки, які мають інгібуючу активність щодо ангіотензинперетворюючого ферменту (АСЕ), дуже перспективні для лікування гіпертензії, серцевої недостатності та постінфарктного стану завдяки тому, що вони інгібують утворення ангіотензину II, речовини, яка чинить різноманітний вплив, у тому числі збільшує кров'яний тиск.

Сполуки, що мають інгібуючу активність щодо ендотелію перетворюючого ферменту (ЕСЕ), придатні як антисудиннозвужувальні агенти, оскільки вони інгібують утворення ендотеліну, пептиду, що складається з 21 амінокислоти та має судиннозвужувальну активність. І навпаки, сполуки, що мають інгібуючу активність щодо ферменту нейтральна ендопептидаза (NEP), який ще називають енкефаліназою, придатні як судиннорозширювальні агенти, оскільки фермент NEP відповідальний за інактивацію не тільки ендогенного енкефаліну, але також і деяких натрійуретичних чинників, серед яких, наприклад, слід відзначити передсерцевий чинник (передсерцевий натрійуретичний чинник або ANF), гормон, секретований серцем, який збільшує розширення кровоносних судин і на нирковому рівні підвищує діурез та натрійурез.

Таким чином, з урахуванням їхніх різних механізмів дії на серцевосудинну систему сполуки, що мають інгібуючу активність щодо металопротеїназ, звичайно використовуються окремо або у комбінації для лікування гіпертензії, ниркової недостатності, застійної серцевої недостатності та ішемічних кардіопатологій.

З тіольних похідних, що мають інгібуючу активність щодо металопротеїназ, як сполуки-найближчі аналоги для NEP- та АСЕ-інгібіторів відповідно розглядаються тіорфан [(DL-(3-меркапто-2-бензилпропанойл)гліцин, вперше описаний Roquest та ін. в Nature, том 288, стор. 286-288 (1980), і каптоприл (The Merck Index, XI вид., №1773, стор. 267).

В літературі описані інші тіольної будови молекули, які мають інгібуючу активність щодо металопротеїназ.

В патентах США 4401677 та 4199512 (обидва на ім'я E.R. Squibb & Sons, Inc.) описані меркаптоалканойльні амінокислоти, що мають інгібуючу активність щодо енкефалінази та інгібуючу активність щодо АСЕ відповідно.

В європейській заявці 0419327 (Societe Civile Bioproject) описані деякі похідні амінокислот, що мають інгібуючу активність щодо енкефалінази та щодо АСЕ відповідно.

В європейській заявці 0449523 (E.R. Squibb & Sons, Inc.) описані меркапто- або ацилтилітіофторметиламіди, які мають інгібуючу активність щодо NEP.

В міжнародній заявці WO 93/08162 [Rhône-Poulenc Rorer S. A.-Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)] описані β,β -дизаміщені α -меркаптометилпропіоніламіди, що мають змішану АСЕ/NEP-інгібуючу активність.

В європейській заявці 0524553 [Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)] описані ацилмеркаптоалканойлдипептиди, що мають інгібуючу активність щодо нейтральної ендопептидази та пептиддипептидази А.

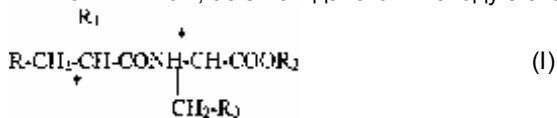
В європейській заявці 0566157 (Schering Corporation) описані тіольні похідні, такі як, наприклад, N-меркаптоациламінокислоти, що мають інгібуючу активність щодо NEP.

α -Меркаптоацильні дипептиди, що мають інгібуючу активність щодо АСЕ та NEP, також описані у S.S. Bhagwat та ін. в Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 7, 735-738, 1995.

В цій останній роботі автори зробили висновок, що присутність біфенілметильної групи додає становлячу інтерес змішану АСЕ/NEP-інгібуючу активність молекулам, які мають будову α -меркаптоацильного дипептиду, а заміщення біфенільної групи такими групами, як α - або β -нафтил, призводить до істотного зниження активності.

Згідно з даним винаходом були виявлені похідні N-меркаптоацилфенілаланіну, які мають виражену інгібуючу активність щодо ангіотензинперетворюючого ферменту, а також щодо ферменту нейтральна ендопептидаза (змішана або подвійна АСЕ/NEP-інгібуюча активність), що робить їх особливо придатними для лікування серцево-судинних патологій.

Таким чином, об'єктом даного винаходу є сполуки формули



де

R означає меркаптогрупу або групу R_4COS , яка перетворюється в організмі в меркаптогрупу;

R_1 означає C_2 - C_4 алкільну групу з прямим або розгалуженим ланцюгом або арильну чи арилалкільну групу, що має від 1 до 6 атомів вуглецю в алкільному фрагменті, де арил означає феніл або 5- чи 6-членний ароматичний гетероцикл з одним або двома гетероатомами, відібраними з групи, включаючої азот, кисень та сірку, необов'язково заміщений одним або кількома однаковими чи різними замісниками, відібраними з групи, включаючої атоми галогену, гідроксигрупи, алкокси-, алкіл-, алкілтіо-, алкілсульфонільні або алкоксикарбонільні групи, які мають від 1 до 6 атомів вуглецю в алкільному фрагменті, C_1 - C_3 алкільні групи, які містять один або декілька атомів фтору, карбоксигрупи, нітрогрупи, аміно- або амінокарбонільні групи, ациламіногрупи, алкіламіногрупи, аміносульфонільні групи, моно- чи діалкіламіно- або моно- чи діалкіламінокарбонільні групи, що мають від 1 до 6 атомів в алкільному фрагменті;

R_2 означає водень, C_1 - C_4 алкільну групу з прямим чи розгалуженим ланцюгом або бензильну групу;

R_3 означає фенільну групу, заміщену 5- або 6-членним ароматичним гетероциклом, який містить один або два гетероатоми, відібраних з групи, включаючої азот, кисень та сірку, причому фенільна і гетероциклічна групи необов'язково заміщені одним або кількома однаковими чи різними замісниками, що

мають значення, вказані для R₁;

R₄ означає C₁-C₄алкільну групу з прямим чи розгалуженим ланцюгом або фенільну групу;

атоми вуглецю, позначені зірочкою, є стереогенними центрами;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

Сполуки формули I містять два стереогенних центри і тому можуть перебувати у формі стереоізомерів.

Таким чином, об'єктом даного винаходу є сполуки формули I в формі стереоізомерної суміші, а також в формі окремих стереоізомерів.

Сполуки формули I, що пропонуються, виявляють змішану ACE/NEP-інгібуючу активність і придатні для лікування серцево-судинних захворювань. Хоча обидва поняття "змішана" та "подвійна" використовуються; взаємозамінно, поняття "подвійна" є більш широко застосовуваним в літературі для сполук, що мають одночасно як ACE-, так і NEP-інгібуючу активність.

В контексті даного опису поняття "змішана" і "подвійна" розглядаються як еквівалентні.

В контексті даного опису, якщо не вказане інше, під поняттям "алкільна група з прямим або розгалуженим ланцюгом" розуміють алкіл, такий, як метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, ізобутил, н-пентил, 2-пентил, 3-пентил, ізопентил, трет-пентил, н-гексил та ізогексил; під поняттям "алкоксигрупа з прямим або розгалуженим ланцюгом" розуміють алкоксигрупу, таку, як метокси-, етокси-, н-пропокси- та ізопропоксигрупу; під поняттям "атом галогену" розуміють атом фтору, хлору, бромово або йоду; під поняттям "ацил" розуміють ацильну групу, що є похідним аліфатичної або ароматичної карбонової кислоти, такої, як оцтова, пропіонова, масляна і бензойна кислота; під поняттям "5- або 6-членний ароматичний гетероцикл з 1 або 2 гетероатомами, відібраними з групи, включаючої азот, кисень та сірку", розуміють таку групу, як тiazол, ізоксазол, оксазол, ізотіазол, піразол, імідазол, тіофен, пірол, піридин, піримідин, піразин, піридазин та фуран, необов'язково сконденсований з бензольним кільцем.

Прикладами фармацевтично прийнятних солей сполук формули I є солі лужних або лужно-земельних металів та солі фармацевтично прийнятих органічних основ.

Прийнятними сполуками формули I є сполуки, в яких R₃ означає фенільну групу, заміщену в положенні 4 гетероциклічною групою.

Більш прийнятними в цьому ряді є сполуки формули I, в яких R₁ означає арилалкільну групу, необов'язково заміщену одним або кількома однаковими або різними замісниками, відібраними з групи, включаючої атоми галогену, гідроксигрупу, алкільну або алкоксигрупу.

Ще більш прийнятними сполуками в цьому ряді є сполуки формули I, в яких R₁ означає феніалкільну групу, необов'язково заміщену одним або кількома однаковими чи різними замісниками, відібраними з групи, включаючої атоми галогену, гідроксигрупу, алкільну або алкоксигрупу.

Прийнятними прикладами фармацевтично прийнятних солей сполук формули I є солі лужних металів, таких, як натрій, літій та калій.

Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що сполуки формули I, в яких R означає групу R₄COS, мають здатність перетворюватися в організмі у сполуки, в яких R є меркаптогрупою, а сполуки формули I, в яких R₂ означає алкільну або бензильну групу, є біологічними попередниками (проліками) відповідних сполук формули I, в яких R означає меркаптогрупу (R означає SH) або R₂ означає атом водню (R₂ означає H) відповідно.

Конкретні приклади більш прийнятних сполук формули I за винаходом включають;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

бензильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-піридил)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(3-піридил)фенілаланіну;

етильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-фурил)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(5-піримідиніл)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-піразиніл)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-тієніл)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(3-тієніл)фенілаланіну;

метильний ефір N-(3-фенілкарбонілтїо-2-фенілметилпропіоніл)-4-(3-фурил)фенілаланіну;

метильний ефір N-[3-фенілкарбонілтїо-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

метильний ефір N-[3-ацетилтїо-2-(3-метоксифеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

метильний ефір N-[3-ацетилтїо-2-(2-фторфеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

метильний ефір N-[3-фенілкарбонілтїо-2-(2-тієніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

метильний ефір N-[2-(2-фурил)метил-3-фенілкарбонілтїопропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

метильний ефір N-[2-(3-метил-5-ізоксазоліл)метил-3-фенілкарбонілтїопропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланіну;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-піридил)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(3-піридил)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-фурил)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(5-піримідиніл)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-піразиніл)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(2-тієніл)фенілаланін;

N-(3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл)-4-(3-тієніл)фенілаланін;

N-[3-меркапто-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-[3-меркапто-2-(3-метоксифеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-[3-меркапто-2-(3-тієніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-[3-меркапто-2-(3-метил-5-ізоксазоліл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-[2-(2-фторфеніл)метил-3-меркаптопропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін;

N-[2-(2-фурил)метил-3-меркаптопропіоніл]-4-(2-тіазоліл)фенілаланін.

Одержання запропонованих згідно з даним винаходом сполук формули I проводять відповідно до способу синтезу, включаючого взаємодію між сполукою формули



де R та R₁ мають вказані вище значення, та похідним фенілаланіну формули



де R₂ та R₃ мають вказані вище значення.

Реакцію конденсації проводять відповідно до способів, загальноприйнятих в хімії пептидів.

До проведення реакції може виявитися доцільним відповідним чином захистити необов'язкові функціональні групи, які можуть перешкоджати взаємодії. Необов'язковий захист проводять загальноприйнятими способами. Стосовно сполук, в яких R означає групу R₄COS, більш прийнятно використати як проміжні речовини сполуки формули II, одержуючи таким чином відповідні сполуки формули I, в яких R означає групу R₄COS, з яких шляхом гідролізу можуть бути одержані сполуки формули I, в яких R означає групу SH. Оцінка придатності необов'язкового захисту, а також вибір прийнятного типу захисту, відповідного реакції, що проводиться, та функціональним групам, що підлягають захисту, добре відомі фахівцям в даній галузі. Вилучення необов'язкових захисних груп проводять відповідно до загальноприйнятих способів.

Загальні приклади застосування захисних груп в органічній хімії можна знайти у Theodor W. Greene та Peter G.M. Wuts в "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Inc., 2-е вид., 1991.

Сполуки формули II є відомими або легко можуть бути одержані відомими методами, як описано, наприклад, в патенті Великобританії 1576161 на ім'я E.R. Squibb & Sons, Inc. В альтернативному варіанті сполуки формули II можуть бути одержані відповідно до методів синтезу, описаних у M.C. Fournie-Zalusky та ін. в J. Med. Chem., 1994, 37, 1070-1083.

Проміжні сполуки формули III також є відомими або легко можуть бути одержані відомими методами. Наприклад, сполуки формули III можуть бути одержані відповідно до способів синтезу, описаних у W.C Shieh та ін. в J. Org. Chem., 1992, 57, 379-381.

В альтернативному варіанті сполуки формули III можуть бути одержані за допомогою методів поєднання (поперечного поєднання) з використанням як вихідні речовини галогенованих гетероциклічних сполук та похідних станілфенілаланіну, як описано у D.C. Wilbur та ін. в Bioconjugate Chem., 1993, 4, 574-580.

Сполуки формули I в формі окремих стереоізомерів одержують шляхом стереоселективного синтезу або розподілу стереоізомерної суміші відповідно до загальноприйнятих способів.

Одержання солей сполук, що пропонуються, формули I також проводять відповідно до загальноприйнятих способів.

Сполуки формули I за винаходом виявляють змішану ACE/NEP-інгібуючу активність і придатні для лікування серцево-судинних захворювань.

Інгібуючу активність сполук формули I оцінювали в дослідях *in vitro* (приклад 8). Зокрема інгібуючу активність сполук формули I оцінювали в порівнянні з вищезазначеними тіорфаном та каптоприлом. Виявлена інгібуюча активність *in vitro* сполук формули I, виражена у вигляді значення IC₅₀, виявляється в діапазоні наномолярних (нМ) концентрацій. Виявлена інгібуюча активність щодо ACE виявилася співставною з активністю каптоприлу, а інгібуюча активність щодо NEP виявилася вищою, ніж у тіорфану.

Крім того, інгібуючу активність сполук формули I також оцінювали в дослідях *ex vivo* в порівнянні з відомими сполуками (приклад 9). Зокрема як еталони для порівняння застосовували N-[3-меркапто-2-(3,4-метилендіоксифеніл)метилпропіоніл]-(S)-фенілаланін та N-[3-меркапто-2-(3,4-метилендіоксифеніл)метилпропіоніл]-(S)-тірозин, описані як інгібітори енкефалінази та ACE у вищезазначеній європейській заявці 0419327 та позначені в даному описі як сполуки R-1 та R-2 відповідно, а також N-(3-меркапто-2-метилпропанойл)-L-тірозин та N-(3-меркапто-2-метилпропанойл)-L-триптофан, описані як інгібітори ACE в патенті США 4199512 та як інгібітори енкефалінази в патенті США 4401677 і позначені в даному описі як сполуки R-3 та R-4 відповідно.

ACE/NEP-інгібуючу активність в дослідях *ex vivo* зокрема визначали оцінкою ферментативної активності в гомогенатах тканини (легені та нирки для ACE- та NEP-активності відповідно), взятих у щурів зі спонтанною гіпертензією (SHR), яким тестовані сполуки вводили внутрішньовенно або орально. Слід відзначити, що активність, яку виявляють сполуки формули I в дослідях *ex vivo*, підтверджує змішану активність (подвійну активність), виявлену в дослідях *in vitro*, також і після орального введення. Більш того, виявлена зазначена активність виявилася істотно більш високою, ніж у сполук-еталонів.

Для практичного застосування в терапії на основі сполук формули I можуть бути виготовлені тверді або рідкі фармацевтичні композиції, придатні для орального або парентерального введення. Таким чином, фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість сполуки формули I в суміші з носієм, призначені для фармацевтичного застосування, є ще одним об'єктом даного винаходу. Конкретними прикладами фармацевтичних композицій за даним винаходом є таблетки, таблетки з покриттям, капсули, грануляти, розчини та суспензії, придатні для орального введення, розчини та суспензії, придатні для парентерального введення. Фармацевтичні композиції за винаходом одержують відповідно до загальноприйнятих способів.

Добова доза сполуки формули I або відповідних проліків може залежати від ряду чинників, таких, як серйозність захворювання, індивідуальна реакція пацієнта або тип композиції, але вона звичайно складає 0,1-10мг на кг ваги тіла і може застосовуватися у вигляді однократної дози або може бути поділена на декілька добових доз.

Нижче винахід проілюстрований на прикладах. Якщо не вказане інше, швидку хроматографію проводили з використанням силікагелю для швидкої хроматографії компанії Baker (код 7024-00).

Приклад 1

Одержання етилового ефіру N-трет-бутоксикарбоніл-4-(5-піримідиніл)-L-фенілаланіну

Суміш, що містить 5-піримідинілборну кислоту (850мг; 2ммоль), етиловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-трифторметилсульфоніл-L-фенілаланіну (450мг; 2,2ммоль), розчин карбонату натрію (530мг) у воді (2,59мл) та суміш толуол:етанол у співвідношенні 10:4,5 (20мл), дегазували азотом протягом 30хв. Далі до реакційної суміші додавали тетра-кис-(трифенілфосфін)паладій(0) (120мг; 0,06ммоль), нагрівали до 90°C і витримували при перемішуванні протягом 3год. Після цього суміш витримували при кімнатній температурі і знов додавали етиловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-трифторметилсульфоніл-L-фенілаланіну (112мг) і тетракис(трифенілфосфін)паладій(0) (30мг). Суміш ще раз нагрівали до 90°C і витримували при перемішуванні протягом 18год. Після охолодження реакційної суміші до кімнатної температури додавали етилацетат (100мл) і воду (40мл). Фази поділяли і органічну фазу висушували над сульфатом натрію та упарювали під вакуумом. Одержаний залишок очищали швидкою хроматографією (силікагель, елюент гексан:етилацетат у співвідношенні 7:3, тиск азоту 0,1атм.), одержуючи при цьому етиловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(5-піримідиніл)-L-фенілаланіну (130мг; вихід 14%) у вигляді безбарвного масла.

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,24 (t, 3H, CH₂-CH₃); 1,40 [s, 9H, C (CH₃)₃]; 3,01-3,25 (m, 2H, CH₂-CH); 4,19 (q, 2H, CH₂-CH₃); 4,52-4,65 (m, 1H, CH-COO); 5,06 (d, 1H, NH); 7,25-7,52 (m, 4H, фенілен); 8,91 (s, 2H, N-CH-C-CH-N); 9,19 (s, 1H, N-CH-N).

Приклад 2

Одержання метилового ефіру N-трет-бутоксикарбоніл-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну

Метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(трифторметилсульфоніл)-L-фенілаланіну (8г, 32,3ммоль) та хлорид біс(трифенілфосфін)паладію (2,3г) додавали до розчину 2-триметилстанілтіазолу (13,8г; 32,3ммоль) в суміші тетрагідрофуран:толуол у співвідношенні 10:1 (50мл), попередньо дегазованої азотом. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 24год. і після цього ще раз додавали 2-триметилстанілтіазол (2г). Через 6год. при нагріванні зі зворотним холодильником знов додавали метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(трифторметилсульфоніл)-L-фенілаланіну (2г) та хлорид біс(трифенілфосфін)паладію (700мг). Утворену реакційну суміш витримували, перемішуючи, при 70°C протягом 16год., а після цього охолоджували до кімнатної температури. Після цього до суміші додавали воду (200мл) і екстрагували метиленхлоридом (4x200мл). Об'єднані органічні фази висушували над сульфатом натрію і упарювали під вакуумом. Одержаний залишок очищали експрес-хроматографією (силікагель, елюент метиленхлорид:етилацетат у співвідношенні 9:1, тиск азоту 0,1атм.), одержуючи при цьому метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (2,3г; вихід 20%).

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,40 [s, 9H, C (CH₃)₃]; 3,00-3,21 (m, 2H, CH₂); 3,70 (s, 3H, COOCH₃); 4,42-4,65 (m, 1H, CH-COO); 5,02 (bd, 1H, NH); 7,30 (d, 1H, S-CH-CH-N); 7,81 (d, 1H, S-CH-CH-N); 7,15-7,90 (m, 4H, фенілен).

Приклад 3

Одержання метилового ефіру N-трет-бутоксикарбоніл-4-(3-піридил)-L-фенілаланіну

3-бромпіридин (1,67г; 10ммоль) та тетракис(трифенілфосфін)паладій(0) (370мг; 0,219ммоль) додавали до розчину метилового ефіру N-трет-бутоксикарбоніл-4-(трибутилстаніл)-L-фенілаланіну (4г; 7,03ммоль), одержаного згідно з D.S. Wilbur та ін., Bioconjugate Chem., 1973, 4, 574-580, у безводному диметилформаміді (30мл), попередньо дегазованому азотом. Реакційну суміш витримували при перемішуванні протягом 10хв. при кімнатній температурі і після цього витримували при 105°C протягом 6год. Знов додавали тетракис(трифенілфосфін)паладій(0) (0,0035ммоль), суміш витримували при 105°C протягом 8год. і охолоджували до кімнатної температури. Після цього в реакційну суміш додавали воду (100мл) і екстрагували гексаном (3x150мл). Об'єднані органічні фази промивали насиченим водним розчином фториду калію, висушували над сульфатом натрію і упарювали під вакуумом. Одержаний залишок об'єднували з етилацетатом і фільтрували. Утворений розчин упарювали під вакуумом і залишок очищали експрес-хроматографією (силікагель, елюент гексан:етилацетат у співвідношенні 8:2, тиск азоту 0,1атм.), одержуючи метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(3-піридил)-L-фенілаланіну (1,5г; вихід 60%) у вигляді безбарвного масла.

МС (С. І.): (M+H)⁺=357.

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,40 [s, 9H, C (CH₃)₃]; 3,00-3,20 (m, 2H, CH₂); 3,71 (s, 3H, COOCH₃); 4,55 (m, 1H, CH-COO); 5,05 (bd, 1H, NH); 7,19-7,51 (m, 4H, фенілен); 7,30-8,82 (bm, 4H, піридил).

Аналогічним чином одержували наступні сполуки:

метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(2-піридил)-L-фенілаланіну:

МС (С. І.): (M+H)⁺=357;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,40 [s, 9H, C(CH₃)₃]; 3,03-3,21 (m, 2H, CH₂-CH); 3,70 (s, 3H, COOCH₃); 4,54-4,65 (m, 1H, CH-COO); 4,98 (d, 1H, CONH); 7,16-7,21 (m, 1H, N-C-CH-CH); 7,65-7,77 (m, 2H, N-CH-CH-CH); 7,19-7,93 (m, 4H, фенілен); 8,63-8,68 (m, 1H, N-CH);

метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(2-піразиніл)-L-фенілаланіну:

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,40 [s, 9H, C(CH₃)₃]; 3,02 (m, 2H, CH₂); 3,70 (s, 3H, COOCH₃); 4,53-4,70 (m, 1H, CH-COO); 5,03 (bd, 1H, NH); 7,21-7,98 (m, 4H, фенілен); 8,49 і 8,62 [2 (bs, 2H, N-CH-CH-N)]; 9,00 (s, 1H, CH-N-CH-CH);

метилловий ефір N-трет-бутоксикарбоніл-4-(2-тієніл)-L-фенілаланіну:

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,41 [m, 9H, C(CH₃)₃]; 2,98-3,18 (m, 2H, CH₂); 3,71 (s, 3H, COOCH₃); 4,53-4,64 (m, 1H, CH-COO); 4,98 (bd, 1H, NH); 7,02-7,28 (m, 3H, тієніл); 7,10-7,54 (m, 4H, фенілен).

Приклад 4

Одержання дигідрохлориду метилового ефіру 4-(3-піридил)-L-фенілаланіну

Тіонілхлорид (0,85мл; 4,78ммоль) додавали по краплях до розчину метилового ефіру N-трет-бутоксикарбоніл-4-(3-піридил)-L-фенілаланіну (1,4г; 3,93ммоль) в метанолі (30мл), одержаного згідно з прикладом 3, підтримуючи температуру на рівні 0°C. По закінченні додання температуру реакційної суміші доводили до кімнатної і витримували при перемішуванні протягом 8год. Розчинник випарювали при пониженому тиску, одержуючи дигідрохлорид метилового ефіру 4-(3-піридил)-L-фенілаланіну (820мг; вихід 71%), який безпосередньо використали в наступних реакціях.

МС (С. І.): (M+H)⁺=257 (вільна основа).

¹H-ЯМР (200МГц, D₂O): δ (част./млн): 3,11-3,32 (m, 2H, CH₂); 3,67 (s, 3H, CH₃); 4,31-4,37 (m, 1H, CH); 7,30-7,63 (t, 4H, фенілен); 7,97 (dd, 1H, CH-N-CH-CH-CH); 8,59 (d, 1H, CH-N-CH-CH-CH); 8,65-8,71 (m, 1H, CH-N-CH-CH); 8,89 (d, 1H, CH-N-CH-CH-CH).

Працюючи аналогічно, одержували наступні сполуки:

дигідрохлорид метилового ефіру 4-(2-піридил)-L-фенілаланіну:

МС (С. І.): (M+H)⁺=257 (вільна основа);

¹H-ЯМР (200МГц, D₂O): δ (част./млн): 3,12-3,33 (m, 2H, CH₂); 3,64 (s, 3H, CH₃); 4,30-4,37 (m, 1H, CH); 7,36-7,73 (m, 4H, фенілен); 7,78-8,58 (m, 4H, піридил);

дигідрохлорид етилового ефіру 4-(5-піримідиніл)-L-фенілаланіну:

¹H-ЯМР (200МГц, DMSO-d₆): δ (част./млн): 1,11 (t, 3H, CH₂-CH₃); 3,10-3,35 (m, 2H, CH₂-CH); 4,04-4,20 (m, 2H, CH₂-CH₃); 4,22-4,35 (m, 1H, CH); 7,40-7,84 (m, 4H, фенілен); 9,15 (s, 2H, N-CH-C-CH-N); 9,19 (s, 1H, N-CH-N);

дигідрохлорид метилового ефіру 4-(2-піразиніл)-L-фенілаланіну:

МС (С. І.): (M+H)⁺=258 (вільна основа);

¹H-ЯМР (200МГц, DCl 1 н.): δ (част./млн): 3,45-3,67 (m, 2H, CH₂); 3,98 (s, 3H, CH₃); 4,65-4,72 (m, 1H, CH); 7,68-8,26 (m, 4H, фенілен); 9,02 (d, 1H, CH-N-CH-CH); 9,44 (dd, 1H, CH-N-CH-CH); 9,54 (d, 1H, CH-N-CH-CH);

гідрохлорид метилового ефіру 4-(2-тієніл)-L-фенілаланіну:

МС (С. І.): (M+H)⁺=262 (вільна основа);

¹H-ЯМР (200МГц, D₂O): δ (част./млн): 2,98-3,19 (m, 2H, CH₂); 3,65 (s, 3H, CH₃); 4,21-4,28 (m, 1H, CH); 6,96-7,28 (m, 3H, тієніл); 7,08-7,52 (m, 4H, фенілен);

дигідрохлорид метилового ефіру 4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну:

¹H-ЯМР (200МГц, D₂O): δ (част./млн): 3,10-3,32 (m, 2H, CH₂-CH); 3,68 (s, 3H, CH₃); 4,30-4,38 (m, 1H, CH); 7,30-7,80 (m, 4H, фенілен); 7,70-7,91 (m, 2H, тіазоліл).

Приклад 5

Одержання 2-ізобутил-3-фенілкарбонілітіопропіонової кислоти

Суміш 2-ізобутилакрилової кислоти (6,34г; 49ммоль) та тіобензойної кислоти (5,96мл; 51ммоль) витримували, перемішуючи, при 100°C протягом 2год. Після цього реакційну суміш обробляли петролейним ефіром при 40-60°C (100мл) і охолоджували при -70°C в бані сухий лід/ацетон. Після фільтрації та промивання петролейним ефіром при -70°C збирали залишок, з якого після сушіння при пониженому тиску одержували 2-ізобутил-3-фенілкарбонілітіопропіонову кислоту (11,12г; вихід 85%) у вигляді твердої речовини білого кольору.

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 0,90-1,00 (m, 6H); 1,40-1,90 (m, 3H); 2,70-2,90 (m, 1H); 3,10-3,40 (m, 2H); 7,35-7,62 (m, 3H); 7,90-8,00 (d, 2H).

Аналогічним чином одержували наступні сполуки:

2-(3-метоксифеніл)метил-3-фенілкарбонілітіопропіонову кислоту:

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,32 (s, 3H); 2,80-3,15 (m, 5H); 3,77 (s, 3H); 6,70-6,80 (m, 3H); 7,14-7,25 (m, 1H);

3-ацетилтіо-2-(2-фторфеніл)метилпропіонову кислоту:

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,31 (s, 3H); 2,90-3,20 (m, 5H); 6,95-7,30 (m, 4H);

бензиламінову сіль 3-фенілкарбонілітіо-2-(2-тієніл)метилпропіонової кислоти:

¹H-ЯМР (200МГц, DMSO-d₆): δ (част./млн): 2,45-3,25 (m, 5H, S-CH₂-CH-CH₂); 3,90 (s, 2H, CH₂-феніл); 6,85-7,91 (m, 13H, арил).

Приклад 6

Одержання метилового ефіру N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (сполука 1)

Розчин гідроксибензотриазолу (0,54г; 4ммоль) в тетрагідрофурани (30мл) і потім розчин дициклогексилкарбодіїміду (0,825г; 4ммоль) в метиленхлориді (15мл) додавали з перемішуванням при 0°C до суміші, що містить (2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-(фенілметилпропіонову кислоту (1,2г; 4ммоль), дигідрохлорид метилового ефіру 4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (1,34г; 4ммоль), одержаний згідно з прикладом 4, триетиламін (1,11мл; 8ммоль) в тетрагідрофурани (20мл) та в метиленхлориді (30мл). Реакційну суміш витримували при перемішуванні протягом 20год., після цього відфільтровували дициклогексилсечовину і розчинник випарювали при пониженому тиску. Залишок збирали етилацетатом і розчин промивали 20%-ним водним розчином хлориду натрію, 5%-ним розчином бікарбонату натрію і ще раз 20%-ним розчином хлориду натрію. Після розподілу фаз та упарювання органічної фази утворену білу тверду речовину очищали експрес-хроматографією (силікагель, елюент етилацетат:гексан у співвідношенні 40:60, тиск азоту 0,1атм.), одержуючи таким шляхом метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (1,5г).

t_{пл} 98-100°C.

МС (С. І.): (M+H)⁺=545.

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,63-3,35 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-тіазоліл); 3,68 (s, 3H, COOCH₃); 4,75-4,85 (m, 1H, CH-COO); 5,78 (d, 1H, NH); 7,10-8,00 (m, 16H, арил).

Аналогічним чином, використовуючи як вихідні речовини відомі сполуки або сполуки, одержані згідно з прикладами 4 та 5, одержували наступні сполуки:

метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-фурил)-L-фенілаланіну (сполука 2):

t_{пл} 132-134°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=528;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,60-3,35 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-фурил); 3,58 (s, 3H, COOCH₃); 4,71-4,81 (m, 1H, CH-COO); 5,73 (d, 1H, NH); 6,40-8,00 (m, 17H, арил);

етиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(5-піримідиніл)-L-фенілаланіну (сполука 3):

t_{пл} 117-119°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=554;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,18 (t, 3H, CH₃-CH₂); 2,65-3,35 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-піримідиніл); 3,95-4,20 (m, 2H, COOCH₃); 4,70-4,80 (m, 1H, CH-COO); 5,78 (d, 1H, NH); 7,05-8,00 (m, 14H, феніл, фенілен); 8,68 (s, 2H, CH-N-CH-N-CH); 9,11 (s, 1H, N-CH-N);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-піразиніл)-L-феніلالаніну (сполука 4):
t_{пл} 145-147°C;
МС (С. І.): (M+H)⁺=540;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,65-3,35 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-піразиніл); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 4,75-4,85 (m, 1H, CH-COO); 5,78 (d, 1H, NH); 7,10-8,00 (m, 14H, феніл, фенілен); 8,48-8,75 (m, 3H, CH-N-CH-CH-N);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-піридил)-L-феніلالаніну (сполука 5):
t_{пл} 132-134°C;
МС (С. І.): (M+H)⁺=539;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,66-2,79 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂); 2,88-3,35 (m, 6H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-піридил); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 4,75-4,85 (m, 1H, CH-COO); 5,77 (d, 1H, NH); 7,07-7,99 (m, 16H, CH-CH-CH-N, феніл, фенілен); 8,51-8,64 (m, 2H, CH-N-CH);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-піридил)-L-феніلالаніну (сполука 6):
t_{пл} 123-125°C;
МС (С. І.): (M+H)⁺=539;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,63-2,77 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂); 2,85-3,35 (m, 6H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-піридил); 3,56 (s, 3H, COOCH₃); 4,75-4,85 (m, 1H, CH-COO); 5,75 (d, 1H, NH); 7,09-7,99 (m, 16H, CH-CH-CH-N, феніл, фенілен); 8,61-8,65 (m, 1H, N-CH-CH);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тієніл)-L-феніلالаніну (сполука 7):
МС (С. І.): (M+H)⁺=544;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,64-3,36 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CONH-CH-CH₂); 3,58 (s, 3H, COOCH₃); 4,74-4,83 (m, 1H, CH-COO); 5,74 (d, 1H, NH); 6,97-7,99 (m, 17H, арил);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-тієніл)-L-феніلالаніну (сполука 8):
МС (С. І.): (M+H)⁺=544;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,63-3,35 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 3,58 (s, 3H, COOCH₃); 4,73-4,85 (m, 1H, CH-COO); 5,70-5,76 (bd, 1H, NH); 7,00-7,62 (m, 15H, феніл, фенілен, CH-CH-S); 7,93-8,00 (m, 2H, CH-S-CH);
метиловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбонілітіо-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-фурил)-L-феніلالаніну (сполука 9):
t_{пл} 115-117°C;
МС (С. І.): (M+H)⁺=528;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,62-3,36 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 3,58 (s, 3H, COOCH₃); 4,71-4,82 (m, 1H, CH-COO); 5,72 (bd, 1H, NH); 6,50-8,00 (m, 17H, арил);
метиловий ефір N-[3-фенілкарбонілітіо-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенідаланіну: стереоізомер А (сполука 10):
МС (С. І.): (M+H)⁺=546;
ТСХ (етилацетат:петролейний ефір = 95:5), R_f=0,33;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,60-3,38 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 3,60 (s, 3H, COOCH₃); 4,79-4,90 (m, 1H, CH-COO); 6,21 (bd, 1H, NH); 7,29-7,81 (m, 2H, тіазоліл); 6,75-8,48 (m, 13H, феніл, фенілен, піридил);
метиловий ефір N-[3-фенілкарбонілітіо-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоділ)-L-фенідаланіну: стереоізомер В (сполука 11):
МС (С. І.): (M+H)⁺=546;
ТСХ (етилацетат:петролейний ефір = 95:5), R_f=0,24;
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,61-3,25 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 3,60 (s, 3H, COOCH₃); 4,80-4,91 (m, 1H, CH-COO); 6,09 (bd, 1H, NH); 7,27-7,80 (m, 2H, тіазоліл); 7,10-8,40 (m, 13H, феніл, фенілен, піридил);
метиловий ефір N-[2-ізобутил-3-фенілкарбонілітіопропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенідаланіну (сполука 12):
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 0,80-0,95 (m, 6H); 1,30-1,80 (m, 3H); 2,40-2,60 (m, 1H); 3,00-3,30 (m, 4H); 3,70 (d, 3H); 4,90-5,05 (m, 1H); 6,00-6,15 (bt, 1H); 7,10-8,00 (m, 11H);
метиловий ефір N-[3-ацетилтіо-2-(3-метоксифеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенідаланіну (сполука 13):
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,30 (d, 3H); 2,45-3,20 (m, 7H); 3,63 (d, 3H); 3,75 (d, 3H); 4,70-4,93 (m, 1H); 5,70-5,90 (dd, 1H); 6,60-6,85 (m, 4H); 7,17-7,32 (m, 3H); 7,68-7,90 (m, 3H);
метиловий ефір N-[3-ацетилтіо-2-(3-фторфеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенідаланіну (сполука 14):
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,29 (s, 3H); 2,55-3,20 (m, 7H); 3,65 (2s, 3H); 4,70-4,90 (m, 1H); 5,80-6,00 (2d, 1H); 6,70-7,32 (m, 3H);
метиловий ефір N-[3-фенілкарбонілітіо-2-(2-тієніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенідаланіну (сполука 15):
¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 2,68-3,37 (m, 7H); 3,60-3,61 (2s, 3H, COOCH₃); 4,31-4,45 (m, 1H, CH-COOCH₃); 6,01-6,10 (2d, 1H, NH); 6,80-8,00 (m, 14H).

Приклад 7

Одержання N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (сполука 16)

Метилловий ефір N-[(2S)-3-фенілкарбоніліто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланіну (1,4г; 2,57ммоль), одержаний, як описано у прикладі 6, суспендували в етанолі (30мл), дегазували, барботуючи азотом, для вилучення кисню. До суспензії при 5°C додавали по краплях водний дегазований 1н. розчин гідроксиду натрію (7,7мл) і в кінці додавали додаткову порцію дегазованого етанолу (20мл). Реакційну суміш витримували при перемішуванні протягом 4год. при кімнатній температурі, після цього охолоджували до 0°C та підкисляли 5%-ною соляною кислотою (10мл). Реакційну суміш упарювали досуха і залишок збирали ацетонітрилом та водою і після цього фільтрували, одержуючи таким шляхом N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (1г).

$t_{пл}$ 180-182°C.

МС (С. І.): (M+H)⁺=427.

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,80-1,88 (m, 1H, SH); 2,22-2,84 (m, 5H, CH₂-CH-CH₂); 2,86-3,18 (m, 2H, CH₂-CH-COO); 4,46-4,57 (m, 1H, CH-COO); 7,10-7,25 (m, 5H, феніл); 7,32-7,84 (m, 4H, фенілен); 7,74 (d, 1H, N-CH=CH-S); 7,89 (d, 1H, N-CH=CH-S); 8,35 (d, 1H, NH); 12,76 (s, 1H, COOH).

Аналогічним чином одержували наступні сполуки:

N-[(2R)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 17):

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 2,15-2,23 (m, 1H, SH); 2,31-2,74 (m, 5H, CH₂-CH-CH₂); 2,78-3,07 (m, 2H, CH₂-CH-COO); 4,42-4,53 (m, 1H, CH-COO); 7,02-7,80 (m, 9H, феніл та фенілен); 7,75 (d, 1H, N-CH=CH-S); 7,90 (d, 1H, N-CH=H-S); 8,36 (d, 1H, NH);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-фурил)-L-фенілаланін (сполука 18):

$t_{пл}$ 153-155°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=410;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,40 (t, 1H, SH); 2,45-3,25 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-CH-COO); 4,80-4,90 (m, 1H, CH-COO); 5,86 (d, 1H, NH); 6,42-7,42 (m, 3H, фурил); 7,07-7,57 (m, 9H, феніл, фенілен);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(5-піримідиніл)-L-фенілаланін (сполука 19):

$t_{пл}$ 193-195°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=422;

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,81 (bm, 1H, SH); 2,21-3,20 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-C₆H₄-піримідиніл); 4,46-4,57 (m, 1H, CH-COO); 7,06-7,29 (m, 5H, феніл); 7,36-7,72 (m, 4H, фенілен); 8,33 (d, 1H, NHCO); 9,08 (s, 2H, N-CH-C-CH-N); 9,15 (s, 1H, N-CH-N);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-піразиніл)-L-фенілаланін (сполука 20):

$t_{пл}$ 176-178°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=422;

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,84 (bt, 1H, SH); 2,21-3,21 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-CH-COO); 4,48-4,59 (m, 1H, CH-COO); 7,10-7,26 (m, 5H, феніл); 7,37-8,05 (m, 4H, фенілен); 8,37 (d, 1H, NHCO); 8,58 (d, 1H, CH-N-CH-CH-N); 8,68-8,70 (m, 1H, CH-N-CH-CH-N); 9,21 (d, 1H, C-CH-N); 12,78 (b, 1H, COOH);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-піридил)-L-фенілаланін (сполука 21):

$t_{пл}$ 146-148°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=421;

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,69-1,89 (b, 1H, SH); 2,22-3,18 (m, 7H, CH₂-CH-CH₂, CH₂-фенілен); 4,45-4,56 (m, 1H, CH-COO); 7,09-7,26 (m, 5H, феніл); 7,42-7,48 (m, 1H, CH-N-CH-CH-CH); 7,62-7,33 (m, 4H, фенілен); 7,98-8,04 (m, 1H, CH-N-CH-CH-CH); 8,30 (d, 1H, CONH); 8,53 (dd, 1H, CH-N-CH-CH-CH); 8,83 (d, 1H, CH-N-CH-CH-CH);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-піридил)-L-фенілаланін (сполука 22):

$t_{пл}$ 157-159°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=421;

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,87 (b, 1H, SH); 2,23-3,19 (m, 7H, S-CH₂-CH-CH₂, CONH-CH-CH₂); 4,44-4,45 (m, 1H, CH-COO); 7,09-7,93 (m, 8H, N-CH-CH-CH-CH, феніл); 7,30-7,99 (m, 4H, фенілен); 8,29 (d, 1H, CONH); 8,61-8,65 (m, 1H, C-N-CH);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(2-тієніл)-L-фенілаланін (сполука 23):

$t_{пл}$ 152-154°C;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,34-1,43 (m, 1H, SH); 2,44-3,26 (m, 7H, S-CH₂-CH-CH₂, CONH-CH-CH₂); 4,80-4,89 (m, 1H, NH-CH-COO); 5,81 (d, 1H, NH); 7,02-7,52 (m, 12H, арил);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-тієніл)-L-фенілаланін (сполука 24):

$t_{пл}$ 169-171°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=426;

ТСХ (етилацетат:гексан:оцтова кислота = 50:50:5), Rf=0,44;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,84 (bs, 1H, SH); 2,23-3,13 (m, 7H, S-CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 4,42-4,53 (m, 1H, NH-CH-COO); 7,12-7,80 (m, 12H, арил); 8,30 (d, 1H, JHH=8,2Гц, NH);

N-[(2S)-3-меркапто-2-фенілметилпропіоніл]-4-(3-фурил)-L-фенілаланін (сполука 25):

$t_{пл}$ 140-142°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=410;

ТСХ (етилацетат:гексан:оцтова кислота = 50:50:5), Rf=0,42;

¹H-ЯМР (200МГц, CDCl₃): δ (част./млн): 1,79-1,90 (m, 1H, SH); 2,22-3,11 (m, 7H, S-CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 4,41-4,53 (m, 1H, NH-CH-COO); 7,11-7,50 (m, 9H, феніл, фенілен); 6,91-8,12 (m, 3H, фурил); 8,30 (d, 1H, JHH=8,2Гц, NH);

N-[3-меркапто-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін: стереоізомер А (сполука 26):

$t_{пл}$ 193-196°C;

МС (С. І.): (M+H)⁺=428;

ТСХ (метилхлорид:метанол:оцтова кислота = 85:15:1,5), Rf=0,53;

¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 2,37-3,05 (m, 7H, S - CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂); 4,36-4,47 (m, 1H, NH-CH-COO); 7,76-7,90 (т, 2H, тіазоліл); 7,10-8,33 (m, 9H, NH, піридил, фенілен);

N-[3-меркапто-2-(3-піридилметил)пропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін: стереоізомер В (сполука 27):
 МС (С. І.): (M+H)⁺=428;
 ТСХ (метиленхлорид:метанол:оцтова кислота = 85:15:1,5), Rf=0,47;
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 2,28-3,20 (m, 7H, S - CH₂-CH-CH₂, NH-CH-CH₂; 4,20-4,35 (m, 1H, NH-CH-COO); 7,70-7,90 (m, 2H, тіазоліл); 7,17-8,40 (m, 9H, NH, піридил, фенілен);
 N-(2-ізобутил-3-меркаптопропіоніл)-4-(2-тіазоліл)-L- фенілаланін (сполука 28):
 МС (С. І.): (M+H)⁺=393;
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 0,50-1,44 (m, 9H); 1,68-2,25 (m, 4H); 2,79-3,22 (m, 2H); 4,50-4,63 (m, 1H); 7,34-7,85 (m, 4H); 7,73-7,90 (m, 2H); 8,27-8,39 (2d, 1H);
 N-[3-меркапто-2-(3-метоксифеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 29):
 МС (С. І.): (M+H)⁺=457;
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО- d₆+D₂O): δ (част./млн): 2,20-3,21 (m, 7H); 3,70 (d, 3H); 4,48 (m, 1H); 6,55-6,86 (m, 3H); 7,00-7,40 (m, 3H); 7,65-7,95 (m, 4H); 8,27-8,45 (bt, CONH);
 N-[3-меркапто-2-(2-фторфеніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 30):
 МС (С. І.): (M+H)⁺=445;
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 2,20-3,18 (m, 8H); 4,35-4,55 (m, 1H); 6,85-7,35 (m, 6H); 7,65-7,90 (m, 4H); 8,35 (d, 1H);
 N-[3-меркапто-2-(2-тієніл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 31):
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,82-3,19 (m, 8H, CH₂-CH₂-CH₂; NH-CH-CH₂); 4,44-4,59 (m, 1H, CH-COO); 6,62-7,91 (m, 9H, арил); 8,42 (d, 1H, NH);
 N-[3-меркапто-2-(2-фурил)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 32):
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 1,79-3,18 (m, 8H, S-CH₂-CH₂-CH₂; NH-CH-CH₂); 4,43-4,58 (m, 4H, CH-NH); 5,79-7,47 (m, 3H, фурил); 7,30-7,85 (m, 4H, фенілен); 7,73-7,91 (m, 2H, тіазоліл); 8,40-8,46 (2d, 1H, NH);
 N-[3-меркапто-2-(3-метил-5-ізоксазоліл)метилпропіоніл]-4-(2-тіазоліл)-L-фенілаланін (сполука 33):
¹H-ЯМР (200МГц, ДМСО-d₆): δ (част./млн): 2,00-2,12 (2s, 3H, CH₃-ізоксазоліл); 2,28-3,19 (m, 8H, S-CH₂-CH₂-CH₂; CH₂-фенілен); 4,43-4,59 (t, 1H, CH-NH); 5,75-6,03 (2s, 1H, ізоксазоліл); 7,29-7,86 (m, 4H, фенілен); 7,74-7,90 (m, 2H, тіазоліл); 8,46-8,53 (2d, 1H, NH).

Приклад 8

Оцінка фармакологічної активності in vitro

а) Інгібуюча активність щодо NEP

Інгібуючу активність щодо NEP оцінювали на мембранах кіркового шару нирки щурів, одержаних відповідно до способу, описаного у Т. Maeda та ін. в Biochim. Biophys. Acta, 1983, 731 (1), 115-120.

У самців щурів лінії Sprague-Dawley вагою приблизно 300г видаляли нирки та витримували при 4°C Кірковий шар нирки обережно відсікали, тонко подрібнювали і суспендували в гомогенізуючому буфері (10мМ фосфат натрію, рН 7,4, що містить 1мМ MgCl₂, 30мМ NaCl, 0,02% NaN₃) у співвідношенні 1:15мас/об. Після цього тканину гомогенізували протягом 30сек. на холоді з використанням гомогенізатора типу Ultra-Turrax. Приблизно 10мл гомогенату нашаровували на 10мл сахарози (41% мас/об.) і центрифугували при 31200об./хв. протягом 30хв. при 4°C з фіксованим кутом ротора. Мембрани збирали з поверхні буферу/сахарози, двічі промивали 50мМ трис-HCl-буфером (рН 7,4) та ресуспендували в цьому ж буфері для зберігання до використання у вигляді невеликих аліквотних кількостей при -80°C. Інгібуючу активність щодо NEP оцінювали відповідно до методу, описаного у С. Llorens та ін. в Eur. J. Pharmacol., 69, (1981), 113-116, згідно з даним описом. Аліквотні кількості одержаної за описаною вище методикою суспензії мембран (концентрація 5мкг/мл протеїнів) попередньо інкубували в присутності інгібітора амінопептидази (бестатин-1мМ) протягом 10хв. при 30°C. Додавали [³H] [Leu⁵-енкефалін (15нМ) та трис-HCl-буфер, рН 7,4 (50мМ) таким чином, щоб одержати кінцевий обсяг 100мкл. Інкубацію (20хв. при 30°C) припиняли, додаючи 0,1М HCl (100мкл). Утворення метаболіту [³H] Tyr-Gly-Gly кількісно оцінювали за допомогою хроматографії на полістиролових колонках (Rogarak Q). Відсоток інгібування утворення метаболіту в препаратах мембран, оброблених сполуками формули I та сполуками-еталонами, у порівнянні з необробленими препаратами мембран виражали у вигляді значення IC₅₀ (нМ).

б) Інгібуюча активність щодо ACE

Інгібуючу активність щодо ACE оцінювали відповідно до методу, відомого з літератури [B. Holmquist та ін., Analytical Biochemistry, 95, 540-548 (1979)].

50мкМ ACE (250міліод./мл, виділений з легені кролика, КФ 3.4.15.1, фірма SIGMA) попередньо інкубували в термостатованих кюветах при 37°C з 50мкл сполуки формули I або сполуки-еталону чи відповідного носія. Реакцію починали додаванням 0,8мМ фурилакрилоїлфенілаланілгліцилгліцину (FAPGG-SIGMA). Одночасно за допомогою спектрофотометра типу Beckman DU-50, оснащеного програмою для розрахунку дельта А/хв. та коефіцієнтів регресії кривих, що описують кінетику ферменту, реєстрували безперервно протягом 5хв. поглинання при 340нм. Відсоток інгібування ферменту в препаратах, оброблених сполуками формули I або сполуками-еталонами, у порівнянні з необробленими препаратами виражали у вигляді значення IC₅₀ (нМ). Значення IC₅₀ (нМ), відповідні інгібуючій активності щодо ACE та інгібуючій активності щодо NEP сполук 16, 18-25, 27-33 і сполук-еталонів тіорфану та каптоприлу, наведені нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

NEP-інгібуюча та ACE-інгібуюча активність, виражена у вигляді значення IC₅₀ (нМ) сполук 16, 18-25, 27-33 і сполук-еталонів тіорфану та каптоприлу

Сполука	ACE-інгібуюча активність IC ₅₀ (нМ)	NEP - інгібуюча активність IC ₅₀ (нМ)
16	3,2	1,8
18	1,8	1,8

19	1,9	1,8
20	1,5	2,5
21	1,7	2,6
22	1,8	2,0
23	1,6	0,6
24	2,5	1,3
25	2,4	1
27	9,1	17,3
28	5,8	1,8
29	4,6	9,0
30	10,7	11,2
31	8,6	1,2
32	8,6	4,0
33	7,9	4,5
тіорфан	99	18
каптоприл	4,6	не активне

Дані, наведені в таблиці 1, показують, що запропоновані згідно з винаходом сполуки формули I мають виражену змішану ACE/NEP-інгібуючу активність. Виявлена активність співставна з активністю каптоприлу щодо ACE-інгібуючої активності і вище активності тіорфану щодо NEP-інгібуючої активності.

Приклад 9

Оцінка фармакологічної активності *ex vivo*

а) Інгібуюча активність щодо NEP

Інгібуючу активність щодо NEP *ex vivo* оцінювали відповідно до методу, відомого з літератури (M. Orlowsky та ін., Biochemistry, 1981, 20, 4942-4950).

Інгібуючу активність сполук формули I оцінювали на нирках щурів зі спонтанною гіпертензією (SHR) через 5хв. після внутрішньовенної ін'єкції тестованих сполук (0,6 та 21мкмоль/кг) і через 30хв., 60хв. та 4год. після орального уведення (30мкмоль/кг) тестованих сполук. Після видалення нирок у щурів з SHR ниркову тканину гомогенізували та інкубували протягом 15хв. при 37°C в присутності глутарил-Ala-Ala-Phe-2-нафтиламід (GAAP) як субстрату та амінопептидази M при pH 7,6. Реакцію припиняли, додаючи 10%-ний водний розчин трихлороцтової кислоти. 2-Нафтиламін, що вивільнюється, виявляли доданням барвника швидкий темно-червоний (2мл). Швидкості ферментативної реакції визначали виміром збільшення оптичної щільності при 524нм (ОП₅₂₄) порівняно зі стандартом, одержаним для комплексу 2-нафтиламіну та швидкого темно-червоного. Інгібуючу активність тестованих сполук щодо NEP виражали у вигляді відсотка інгібування NEP в нирках SHR.

б) Інгібуюча активність щодо ACE

Інгібуючу активність щодо ACE *ex vivo* оцінювали відповідно до радіометричного методу, відомого з літератури [J. W. Ryan та ін., Biochem. J., (1977), 167, 501-504].

Інгібуючу активність сполук формули I оцінювали на легенях щурів зі спонтанною гіпертензією (SHR) через 5хв. після внутрішньовенної ін'єкції тестованих сполук (0,6 та 21мкмоль/кг) і через 30хв., 60хв. та 4год. після орального уведення (30мкмоль/кг) тестованих сполук. Після видалення легень у щурів з SHR тканину легень гомогенізували та інкубували протягом 2год. при 37°C в присутності [³H]Нур-Gly-Gly як субстрату. Реакцію припиняли доданням соляної кислоти. Радіоактивно мічену гіпурову кислоту, що звільнилася, екстрагували етилацетатом і рівень радіоактивності визначали за допомогою рідинної сцинтиляційної спектрометрії відповідно до загальноприйнятих методів. Інгібуючу активність тестованих сполук щодо ACE виражали у вигляді відсотка інгібування ACE в легенях SHR.

Як приклад нижче в таблиці 2 наведені виражені у відсотках базові ферментативні активності, одержані в досліді *ex vivo* після внутрішньовенного або орального уведення сполуки 16 і сполук-еталонів R-1, R-2, R-3 та R-4.

Таблиця 2

Відсоток NEP-інгібування та ACE-інгібування *ex vivo* сполукою 16 і сполуками R-1, R-2, R-3 та R-4

Сполука	Спосіб уведення	ACE-інгібування (легені)		NEP-інгібування (нирки)	
		5 хвилин	60 хвилин	5 хвилин	60 хвилин
16	в.в. (0,6мкмоль/кг)	15%		34%	
16	в.в. (21мкмоль/кг)	72%		49%	
16	оральний (30мкмоль/кг)		36%		39%
		30 хвилин	4 години	30 хвилин	4 години
16	оральний (30мкмоль/кг)	60%	45%	55%	40%
R-1	оральний (30мкмоль/кг)	25%	20%	5%	не активне
R-2	оральний (30мкмоль/кг)	30%	25%	30%	не активне
R-3	оральний (30мкмоль/кг)	25%	20%	10%	5%
R-4	оральний (30мкмоль/кг)	25%	10%	не активне	не активне

Дані, наведені в таблиці 2, підтверджують, що запропоновані згідно з винаходом сполуки формули I мають виражену ACE/NEP-інгібуючу активність як після внутрішньовенного, так і після орального уведення. При цьому в досліді *ex vivo* ACE/NEP-інгібуюча активність сполук формули I виявилася істотно більш високою порівняно з такою сполук-еталонів.