

Даний винахід стосується сполук, композицій і способів, призначених для лікування інфекції, викликаной вірусом гепатиту С (HCV). Зокрема, даний винахід стосується нових пептидів, їхніх аналогів і проміжних продуктів, фармацевтичних композицій, що містять такі пептиди, і способів застосування цих пептидів для лікування HCV-інфекції.

Вірус гепатиту С (HCV) є основним збудником гепатиту, що не стосується гепатитів А і В і який виникає після переливання крові й уражує людей у всьому світі. Було встановлено, що понад 150 мільйонів людей у світі заражено цим вірусом. Високий відсоток носіїв стає хронічно інфікованими, а в багатьох пацієнтів це призводить до хронічного захворювання печінки, так званого хронічного гепатиту С. У свою чергу, ця група хворих має високий ризик захворювання на таку серйозну хворобу печінки, як цироз печінки, печінково-клітинний рак і остання стадія хвороби печінки, що призводить до смерті.

Механізм, за допомогою якого відбувається збереження вірусу HCV в організмі і забезпечується високий коефіцієнт захворюваності на хронічну хворобу печінки, поки вивчений не досить глибоко. Не відомо, яким чином HCV взаємодіє з імунною системою хазяїна й переборює її дію. Крім того, ще не виявлено ролі клітинних і гуморальних імунних відповідей у захисті від HCV-інфекції і при захворюванні на гепатит. Є дані про те, що імуноглобуліни можуть застосовуватися для профілактики пов'язаного з переливанням крові вірусного гепатиту, однак Центр контролю захворюваності в даний час не рекомендує лікування з використанням імуноглобулінів для цієї мети. Відсутність ефективної захисної імунної відповіді утруднює розроблення вакцини чи адекватних профілактичних заходів після експозиції, тому найближчим часом надії в основному покладаються на антивірусні засоби.

Щоб виявити фармацевтичні агенти, що володіють ефективністю щодо лікування HCV-інфекції в пацієнтів, які страждають на хронічний гепатит С, було проведено різні клінічні дослідження. У цих дослідженнях застосовували інтерферон-альфа індивідуально чи в поєднанні з іншими антивірусними агентами. Результати цих досліджень свідчать про те, що в основній більшості учасників експерименту не виявлено реакції на такі схеми лікування, а з тих учасників, що виявилися чутливими до лікування, у більшій частини після закінчення лікування спостерігався рецидив.

Таким чином, у даний час терапія з використанням інтерферону (IFN) залишається єдиним доступним методом лікування пацієнтів, що страждають на хронічний гепатит С, з підтвердженою в клінічних умовах ефективністю. Однак ефект при такому лікуванні є нетривалим, і, крім того, лікування інтерфероном викликає серйозні побічні дії (тобто ретинопатію, тиреоїдит, гострий панкреатит, депресію), що знижує якість життя пацієнтів, які піддаються лікуванню.

В даний час інтерферон у поєднанні з рибавирином запропоновано для лікування пацієнтів, не чутливих тільки до IFN. Однак побічні дії, викликані IFN, не зменшуються при такій спільній терапії.

Таким чином, існує потреба в розробленні ефективних антивірусних агентів для лікування HCV-інфекції, які не мали б вад дотеперішніх методів лікування з використанням фармацевтичних засобів.

HCV являє собою вкладений в оболонку позитивний ланцюг РНК-го вірусу родини Flaviviridae. Геном HCV, представлений одноланцюговою РНК, яка складається з 9500 нуклеотидів і має одну відкриту рамку зчитування (BPC), що кодує один великий поліпротеїн, який складається приблизно з 3000 амінокислот. У заражених клітинах цей поліпротеїн розщеплюється в багатьох сайтах клітинними і вірусними протеазами з утворенням структурних і неструктурних (NS) протеїнів. У випадку HCV під дією двох вірусних протеаз утворюються зрілі неструктурні протеїни (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A і NS5B). Перша з них, яку поки ще недостатньо охарактеризовано, розщеплює зв'язок NS2-NS3, а друга являє собою серинпротеазу, що міститься в N-кінцевій ділянці NS3 (далі позначена як NS3-протеаза), і виступає посередником усіх наступних розщеплень, що відбуваються по ходу транскрипції щодо NS3, як у цис-орієнтації в сайті розщеплення NS3-NS4A, так і в трансорієнтації в інших сайтах NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. Протеїн NS4A, імовірно, має множинні функції, дійови як кофактор для NS3-протеази і можливо сприяючи локалізації на мембрані NS3 також інших компонентів вірусної реплікази. Утворення комплексу протеїну NS3 з NS4A, імовірно, необхідне для процесування, посилення протеолітичної ефективності в усіх сайтах. Протеїн NS3 також володіє нуклеозидтрифосфатазною активністю і РНК-геліказною активністю. NS5B являє собою РНК-залежну РНК-полімеразу, що бере участь у реплікації HCV.

Загальна стратегія розроблення антивірусних агентів полягає в інактивації кодованих вірусом ферментів, важливих для реплікації вірусу. Стосовно цього в WO 97/06804 описано (-)-енантіомер нуклеозидного аналога цитозин-1,3-оксатіолану (також відомий як ЗТС), активний щодо HCV. Хоча в проведених раніше клінічних дослідженнях для цієї сполуки й було виявлено активність щодо ВІЛ і HBV, проте поки немає клінічного підтвердження його активності щодо HCV і не виявлено його механізму дії щодо цього вірусу.

Значні зусилля, докладені для виявлення сполук, що інгібують NS3-протеазу чи РНК-геліказу HCV, дали такі результати.

У патенті US 5633388 описано заміщені гетероциклом карбоксаміди та їхні аналоги, що володіють активністю щодо HCV. Об'єктом дії цих сполук є геліказна активність протеїну NS3 вірусу, однак поки немає даних про їхні клінічні дослідження.

У Chui та ін. (Tet. Lett., (1996), 7229-7232) описано фенантренхінон, що володіє активністю щодо NS3-протеази HCV in vitro. Ніякі додаткові дані про цю сполуку не опубліковані.

У науковій доповіді, представленій на Дев'ятій міжнародній конференції з антивірусних досліджень [Ninth International Conference on Antiviral Research, Urabandai, Fukushima, Japan (1996) (Antiviral Research, (1996), 30, 1, A23 (теза 19)], повідомлялося про триазолідинові похідні, що володіють інгібувальною активністю щодо HCV-протеази.

У деяких дослідженнях описано сполуки, що володіють інгібувальною дією щодо інших серинпротеаз, таких, як людська еластаза лейкоцитів. Одну групу таких сполук описано в WO 95/33764 (на ім'я Hoechst Marion Roussel, 1995). Описані в цій заявці пептиди являють собою морфолінілкарбонілбензоїлпептидні аналоги, що структурно відрізняються від пептидів з даного винаходу.

У WO 98/17679 (на ім'я Vertex Pharmaceuticals Inc.) описано інгібітори серинпротеази, зокрема NS3-пртеази вірусгепатиту С. Ці інгібітори являють собою пептидні аналоги, основою яких є природний субстрат NS5A/5B. Характерною рисою всіх зазначених пептидів є те, що вони містять С-кінцеву активовану карбонільну функцію. Для цих аналогів також відомо, що вони активні щодо іншої серинпротеази і, таким чином, не є специфічними для NS3-протеази HCV.

У повідомленнях, опублікованих фірмою Hoffman LaRoche, також описані гексапептиди, що є інгібіторами

протеїнази, як антивірусні агенти для лікування HCV-інфекції. Ці пептиди містять альдегід чи боронову кислоту на С-кінці.

У Steinkühler та ін. і Ingallinella та ін. опубліковано дані про продукт інгібування NS4A-4B (Biochemistry (1998), 37, 8899-8905 і 8906-8914). Однак описані в цих публікаціях пептиди чи пептидні аналоги не включають пептидів з даного винаходу і не можуть привести до їх створення.

У WO 98/46597 на ім'я Emory University описано інгібітори серинпротеази, зокрема протеази вірусу гепатиту С. Усі описані сполуки відрізняються будовою від пептидів з даного винаходу.

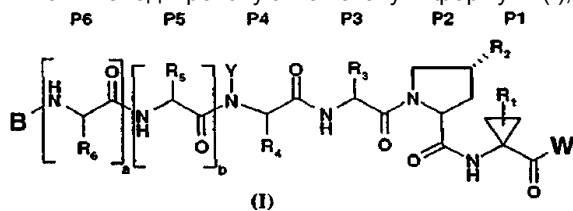
У WO 98/46630 на ім'я фірми Peptide Therapeutics Ltd. описано інгібітори NS 3-протеази вірусу гепатиту С. Однак жоден з описаних пептидів не подібний до пептидів за винаходом.

У JP 10298151 на ім'я фірми Japan Energy Corp. описані N-(2,3-дигідроксибензоїл) - заміщені похідні серину як інгібітори серинпротеази, зокрема як інгібітори протеази вірусу гепатиту С. Ці сполуки не мають ніякої структурної схожості з аналогами пептидів за даним винаходом.

Одна з переваг даного винаходу полягає в тому, що в ньому запропоновано пептиди, які володіють інгібувальною активністю щодо NS3-протеази вірусу гепатиту С.

Ще одна перевага даного винаходу полягає в тому, що ці пептиди специфічно інгібують NS3-протеазу і не виявляють помітної інгібувальної активності в концентрації до 300мкМ щодо інших серинпротеаз, таких, як еластаза лейкоцитів людини (HLE), еластаза панкреатичної залози свині (PPE) чи бичачий хімотрепсин панкреатичної залози, чи цистеїнпротеаз, таких, як кателсин В печінки людини (Cat B).

У винаході пропонуються сполуки формули (I), включаючи їхні рацемати, діастереоізомери й оптичні ізомери



де

a дорівнює 0 чи 1,

b дорівнює 0 чи 1,

Y позначає H чи C₁-C₆алкіл,

B позначає H, ацильне похідне формули R₇-C(O)- чи сульфоніл формули

R₇-SO₂, де

R₇ позначає

(I) C₁-C₁₀алкіл, необов'язково заміщений карбоксилем, C₁-C₆алканоліокси- чи C₁-C₆алкоксигрупою,

(II) C₃-C₇циклоалкіл, необов'язково заміщений карбоксилем, (C₁-C₆алкокси) карбонілом чи фенілметоксикарбонілом,

(III) C₆- чи C₁₀арил або C₇-C₁₆аралкіл, необов'язково заміщений C₁-C₆алкілом, гідрокси- чи аміногрупою, необов'язково заміщеною C₁-C₆алкілом, або

(IV) Het, необов'язково заміщений C₁-C₆алкілом, гідрокси- чи аміногрупою, необов'язково заміщеною C₁-C₆алкілом, або амідогрупою, необов'язково заміщеною C₁-C₆алкілом,

R₆ за його наявності позначає C₁-C₆алкіл, заміщений карбоксилем,

R₅ за його наявності позначає C₁-C₆алкіл, необов'язково заміщений карбоксилем.

R₄ позначає C₁-C₁₀алкіл, C₃-C₇циклоалкіл чи C₄-C₁₀(алкілциклоалкіл),

R₃ позначає C₁-C₁₀алкіл, C₃-C₇циклоалкіл чи C₄-C₁₀(алкілциклоалкіл),

R₂ позначає CH₂-R₂₀, NH-R₂₀, O-R₂₀, чи S-R₂₀, де

R₂₀ позначає насичений чи ненасичений C₃-C₇циклоалкіл або C₄-C₁₀(алкілциклоалкіл), необов'язково моно- ди- чи тризаміщений R₂₁, або

R₂₀ позначає C₆- або C₁₀арил C₇-C₁₆аралкіл, необов'язково моно-, ди- чи тризаміщений радикалом R₂₁, або

R₂₀ позначає Het або (нижч.)алкіл-Het необов'язково моно- ди- чи тризаміщений радикалом R₂₁, де

R₂₁ у кожному випадку незалежно позначає C₁-C₆алкіл, C₁-C₆алкоксигрупу, аміногрупу, необов'язково моно- чи дизаміщену C₁-C₆алкілом, сульфоніл, NO₂, OH, SH, галоген, галоалкіл, амідогрупу, необов'язково монозаміщену C₁-C₆алкілом, C₆- чи C₁₀арилом, C₇-C₁₆аралкілом, Het або (нижч.)алкіл-Het карбоксил, карбокси(нижч.)алкіл, C₆- чи C₁₀арил, C₇-C₁₆аралкіл або Het, де арил, аралкіл чи Het необов'язково заміщені радикалом R₂₂, при цьому

R₂₂ позначає C₁-C₆алкіл, C₁-C₆алкоксигрупу, аміногрупу, необов'язково моно- чи дизаміщену C₁-C₆алкілом, сульфоніл, NO₂, OH, SH, галоген, галоалкіл, карбоксил, або амід(нижч.)алкіламід,

R₁ позначає C₁-C₆алкіл чи C₂-C₆алкеніл, необов'язково заміщений галогеном, і

W позначає гідрокси- чи N-заміщену аміногрупу, та їхні фармацевтично прийнятні солі або складні ефіри.

У винаході пропонується також фармацевтична композиція, що включає ефективну щодо вірусу гепатиту С кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі чи її складного ефіру в суміші з фармацевтично прийнятним носієм чи допоміжною речовиною.

Ще одним об'єктом винаходу є спосіб лікування інфекції, викликаной вірусом гепатиту С у ссавця, що передбачає введення ссавцю ефективної щодо вірусу гепатиту С кількості сполуки формули I чи її терапевтично прийнятної солі або складного ефіру чи описаної вище композиції.

Ще одним об'єктом винаходу є спосіб інгібування реплікації вірусу гепатиту С шляхом оброблення вірусу інгібувальною щодо NS3-протеази вірусу гепатиту С кількістю сполуки формули I чи її терапевтично прийнятної солі або складного ефіру чи описаної вище композиції.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб лікування інфекції, викликаной вірусом гепатиту С у ссавця, що передбачає введення ссавцю ефективної щодо вірусу гепатиту С кількості комбінації, яка включає сполуку формули I чи її терапевтично прийнятну сіль або складний ефір та інтерферон. Фармацевтична композиція, що включає зазначену

комбінацію в суміші з фармацевтично прийнятним носієм чи допоміжною речовиною, також є об'єктом даного винаходу.

Якщо не зазначено іншого, то в контексті даного опису використані поняття мають такі значення.

У тих випадках, коли для позначення конфігурації замісника, наприклад R₄ у сполуці формули I, використовують символи (R) чи (S), то позначення стосується всієї сполуки, а не тільки замісника.

Природні амінокислоти, за винятком гліцину, містять хіральний атом вуглецю. Якщо не зазначено іншого, то бажаніші сполуки, що містять природні амінокислоти з L-конфігурацією. Однак маєтись на увазі, що в конкретних випадках деякі амінокислоти формули I можуть мати або D-, або L-конфігурацію чи можуть бути сумішами D- і L-ізомерів, включаючи рацемічні суміші.

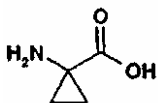
Позначення "P1, P2 і P3 і т.д." у контексті даного опису стосується положення амінокислотних залишків, починаючи з C-кінця пептидних аналогів у бік N-кінця [(тобто P1 позначає положення 1 щодо C-кінця, P2 позначає положення 2 щодо C-кінця і т.д.) (див. Berger A. і Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257. 249-264 (1970))].

Скорочення α-амінокислот, використані в даному описі, наведено в таблиці A.

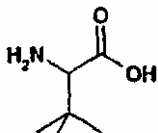
Таблиця A

Амінокислота	Символ
аланін	Ala
аспарагінова кислота	Asp
цистеїн	Cys
циклогексилгліцин (також відомий під назвою 2-аміно-2-циклогексаноїтова кислота)	Chg
глутамінова кислота	Glu
ізолейцин	Ile
лейцин	Leu
фенілаланін	Phe
пролін	Pro
валін	Val
трет-бутилгліцин	Tbg

У контексті даного опису поняття "1-аміноциклопропілкарбонова кислота" (Асса) стосується сполуки формули:



У контексті даного опису поняття "трет-бутилгліцин" (Тbg) стосується сполуки формули:



Поняття "залишок" з посиланням на амінокислоту чи амінокислотне похідне позначає радикал, отриманий з відповідної α-амінокислоти шляхом видалення гідроксильної чи карбоксильної групи й одного водню α-аміногрупи. Так, наприклад, поняття Gin, Ala, Gly, Ile, Arg, Asp, Phe, Ser, Leu, Cys, Asn, Sar і Tyr позначають "залишки" L-глутаміну, L-аланіну, гліцину, L-ізолейцину, L-аргініну, L-аспарагінової кислоти, L-фенілаланіну, L-серину, L-лейцину, L-цистеїну, L-аспарагіну, саркозину і L-тирозину відповідно.

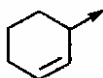
Поняття "бічний ланцюг" з посиланням на амінокислоту чи амінокислотний залишок позначає групу, приєднану до атома α-вуглецю α-амінокислоти. Наприклад, R-група бічного ланцюга гліцину позначає водень, аланіну-метіл, валіну-ізопропіл. Конкретні R-групи чи бічні ланцюги α-амінокислот описано в A.L. Lehninger's text on Biochemistry (див. розділ 4).

Поняття "галo" у контексті даного опису позначаєгалогеновий замісник, вибраний ізгрупи, що включає бром, хлор, фтор чи йод.

Поняття "C₁-C₆алкіл" чи "(нижч.)алкіл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим замісником позначають ациклічні алкільні замісники з прямим чи розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю, і включає, наприклад, метил, етил, пропіл, бутил, тер-бутил, гексил, 1-метилетил, 1-метилпропіл, 2-метилпропіл, 1,1-диметилетил (наприклад, тер-бутил).

Поняття "C₃-C₇циклоалкіл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим замісником позначає циклоалкільний замісник, що містить від 3 до 7 атомів вуглецю, і включає, наприклад, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил і циклогептил.

Поняття "ненасичений циклоалкіл" включає, наприклад, циклогексеніл:



Поняття C₄-C₁₀(алкілциклоалкіл) у контексті даного опису позначає циклоалкільний радикал, що містить від 3 до 7 атомів вуглецю, зв'язаних з алкільним радикалом, причому приєднані радикали містять до 10 атомів вуглецю, наприклад, циклопропілметил, циклопентилетил, циклогексилметил, циклогексилетил чи циклогептилетил.

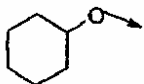
Поняття "C₂-C₁₀алкеніл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає

алкільний радикал, як він визначений вище, що містить від 2 до 10 атомів вуглецю і, крім того, містить щонайменше один подвійний зв'язок. Наприклад, алкеніл включає аліл і вініл.

Поняття "C₁-C₆алканоліл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає 1-оксоалкільні радикали, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю, і включає форміл, ацетил, 1-оксопропіл (пропіоніл), 2-метил-1-оксопропіл, 1-оксогексил тощо.

Поняття "C₁-C₆алкокси" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає радикал - O(C₁-C₆алкіл), де алкіл має зазначені вище значення, що містить до 6 атомів вуглецю. Алкокси включає метокси, етокси, пропокси, 1-метилетокси, бутокси і 1,1-диметилетокси. Останній радикал звичайно називають трет-бутокси.

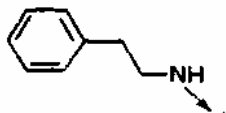
Поняття "C₃-C₇циклоалкокси" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає C₃-C₇циклоалкільну групу, зв'язану з атомом кисню, таку, наприклад, як:



Поняття "C₆- чи C₁₀-арил" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає або ароматичну моноциклічну групу, що містить 6 атомів вуглецю, або ароматичну біциклічну групу, що містить 10 атомів вуглецю. Прикладами арилу є феніл, 1-нафтил чи 2-нафтил.

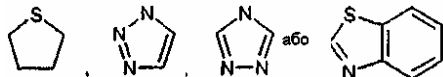
Поняття "C₇-C₁₆аралкіл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає C₆- чи C₁₀-арил, як він визначений вище, зв'язаний з алкільною групою, де алкіл має зазначені вище значення, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю. C₇-C₁₆аралкіл включає, наприклад, бензил, бутилфеніл і 1-нафтил метил.

Поняття "аміноаралкіл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає аміногрупу, заміщену C₇-C₁₆ аралкільною групою, таку, наприклад, як аміноаралкіл:

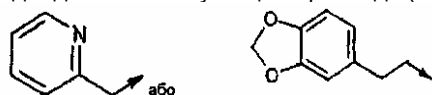


Поняття "карбокси(нижч.)алкіл" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає карбонільну групу (COOH), зв'язану через (нижч.)алкільну групу, як вона визначена вище, і включає, наприклад, масляну кислоту.

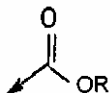
Поняття "гетероцикл" чи "Het" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим радикалом позначає одновалентний радикал, отриманий видаленням водню з 5-, 6- чи 7-членного насиченого чи ненасиченого (у тому числі ароматичного) гетероциклу, що містить від 1 до 4 гетероатомів, вибраних із ряду, що включає азот, кисень і сірку. Крім того, "Het" у контексті даного опису позначає гетероцикл, як він визначений вище, сконденсований з одним чи декількома іншими циклічними групами, що можуть являти собою гетероцикл чи будь-яку іншу циклічну групу. Приклади прийнятих гетероциклів включають піролідін, тетрагідрофуран, тiazолідін, пірол, тіофен, діазепін, 1H-імідазол, ізоксазол, тiazол, тетразол, піперидин, 1,4-діоксан, 4-морфолін, піридин, піримідин, тiazол [4,5-b] піридин, хінолін чи індол або такі гетероцикли:



Поняття "(нижч.)-Het" у контексті даного опису позначає гетероциклічний радикал, як він визначений вище, зв'язаний через алкільну групу з прямим чи розгалуженим ланцюгом, де алкіл має подані вище значення, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю. Приклади (нижч.)алкіл-Het включають:



Поняття "фармацевтично прийнятний складний ефір" у контексті даного опису індивідуально чи в поєднанні з іншим замісником позначає складні ефіри сполуки формули I, у якій кожна з карбоксильних функцій у молекулі, але бажано C-кінцева функція, заміщена алкоксикарбонільною функцією:



де фрагмент R складного ефіру вибирають з алкілу (наприклад, метилу, етилу, н-пропілу, трет-бутилу, н-бутилу), алкоксіалкілу (наприклад, метоксиметилу), алкоксіацилу (наприклад, ацетоксиметилу), аралкілу (наприклад, бензилу), арилоксіалкілу (наприклад, феноксиметилу), арилу (наприклад, фенілу), необов'язково заміщеного галогеном, C₁-C₄алкілом чи C₁-C₄алкоксигрупою. Інші придатні як проліки складні ефіри описано в "Design of prodrugs", Bundgaard H., вид-во Elsevier (1985) (публікація включена в даний опис як посилання). Такі фармацевтично прийнятні складні ефіри звичайно гідролізуються in vivo при введенні ссавцю й перетворюються на кислотну форму сполуки формули I.

Що стосується описаних вище складних ефірів, то, якщо не зазначено іншого, бажано, щоб будь-який присутній алкільний фрагмент містив 1-16 атомів вуглецю, найкраще 1-6 атомів вуглецю. Бажано, щоб будь-який присутній у таких складних ефірах арильний фрагмент містив фенільну групу.

Зокрема, складні ефіри можуть являти собою C₁-C₁₆алкільовий ефір, незаміщений бензиловий ефір чи бензиловий ефір, заміщений щонайменше одним галогеном, C₁-C₁₆алкілом, C₁-C₁₆алкокси-, нітрогрупою чи трифторметилом.

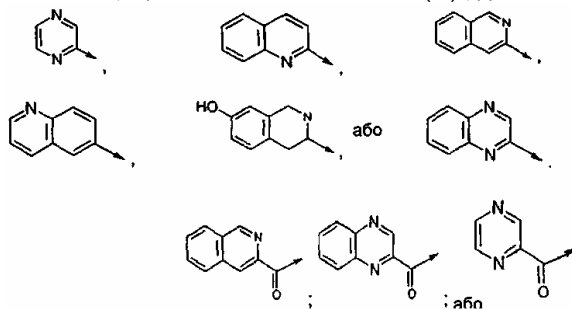
Поняття "фармацевтично прийнятна сіль" у контексті даного опису стосується солей, отриманих із фармацевтично прийнятих основ. Приклади прийнятих основ включають холін, етаноламін і етилендіамін. До даного винаходу включено також солі Na⁺, K⁺ і Ca⁺⁺ [див. також "Pharmaceutical salts", Birge, S.M. та ін., J. Pharm. Sc., (1977), 66, 1-19,

публікація включена в даний опис як посилання].

Бажані варіанти здійснення

До обсягу винаходу включено сполуки формули I, у яких бажано, щоб В позначало R_7-SO_2 і R_7 позначало C_6 - чи C_{10} арил, C_7-C_{16} аралкіл або Het, усі необов'язково заміщені C_1-C_6 алкілом.

В іншому варіанті бажано, щоб В позначав Н чи ацильне похідне формули $R_7-C(O)-$, де R_7 позначає C_1-C_6 алкіл, C_1-C_6 алкокси, C_3-C_7 циклоалкіл, необов'язково заміщений гідроксигрупою, амідогрупою, необов'язково заміщену C_1-C_6 алкілом чи Het, C_6 - або C_{10} арил, C_7-C_{16} аралкіл чи Het, усі необов'язково заміщені C_1-C_6 алкілом чи гідроксигрупою. Бажаніше, щоб В позначав Н чи $R_7-C(O)-$, де R_7 позначає C_1-C_6 алкіл чи гетероцикли, такі, як:



Найбажаніше, щоб В позначав Н, ацетил,

Ще бажаніше, щоб В позначало ацетил.

До обсягу винаходу включено сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_6 , якщо він присутній, позначав бічний ланцюг Asp чи Glu. Найбажаніше, щоб R_6 , якщо він присутній, позначав бічний ланцюг Asp.

В альтернативному варіанті бажано, щоб а дорівнювало 0 і в цьому випадку R_6 відсутній.

До обсягу винаходу включено далі сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_5 , якщо він присутній, позначав бічний ланцюг амінокислоти, вибраної з групи, що включає D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Val, L-Val, D-трет-бутилгліцин (Tbg) і L-Tbg. Бажаніше, щоб R_5 , якщо він присутній, позначав бічний ланцюг D-Asp, D-Val чи D-Glu. Найбажаніше, щоб R_5 , якщо він присутній, позначав бічний ланцюг D-Glu.

В альтернативному варіанті а дорівнює 0, b дорівнює 0 і в цьому випадку R_6 , і R_5 відсутні.

До обсягу винаходу включено також сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_4 позначав бічний ланцюг амінокислоти, вибраної з групи, що включає Val, циклогексилгліцин (Chg), Tbg, Ile чи Leu. Бажаніше, щоб R_4 позначав бічний ланцюг Chg чи Ile. Найбажаніше, щоб R_4 позначав бічний ланцюг Chg.

До обсягу винаходу включено далі сполуки формули I, у яких бажано, щоб Y позначав Н чи Me. Найбажаніше, щоб Y позначав Н.

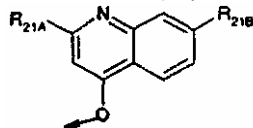
До обсягу винаходу включено також сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_3 позначав бічний ланцюг амінокислоти, вибраної з групи, що включає Ile, Chg, Val чи Tbg. Бажаніше, щоб R_3 позначав бічний ланцюг Val, Chg чи Tbg. Найбажаніше, щоб R_3 позначав бічний ланцюг Val чи Tbg.

До обсягу винаходу включено й сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_2 позначав S- R_{20} , O- R_{20} , де бажано, щоб R_{20} позначав C_6 -чи C_{10} арил, C_7-C_{16} аралкіл, Het чи $-CH_2$ -Het, усі необов'язково моно-ди- чи тризаміщені радикалом R_{21} .

Бажано, щоб R_{21} позначав C_1-C_6 алкіл, C_1-C_6 алкокси-, аміно-, моно- чи ди(нижч.)алкіламіногрупу, амідогрупу, необов'язково монозаміщену C_1-C_6 алкілом, C_6 - чи C_{10} арилом, C_7-C_{16} аралкілом, Het чи (нижч.)алкіл-Het, чи означає NO_2 , OH, галоген, трифторметил, карбоксил, C_6 - чи C_{10} арил, C_7-C_{16} аралкіл чи Het, де арил, аралкіл чи Het необов'язково заміщені радикалом R_{22} . Бажаніше, щоб R_{21} позначав C_1-C_6 алкіл, C_1-C_6 алкокси-, аміно-, ди(нижч.)алкіламіногрупу, ди(нижч.)алкіламід, C_6 - чи C_{10} арил чи Het, де арил чи Het необов'язково заміщені радикалом R_{22} .

Бажано, щоб R_{22} позначав C_1-C_6 алкіл, C_1-C_6 алкоксигрупу, аміногрупу, моно- чи ди(нижч.)алкіламіногрупу, (нижч.)алкіламід, NO_2 , OH, галоген, трифторметил чи карбоксил. Бажаніше, щоб R_{22} позначав C_1-C_6 алкокси-, аміно-, ди(нижч.)алкіламіногрупу, (нижч.)алкіламід, галоген чи трифторметил. Ще бажаніше, щоб R_{22} позначав 1-нафтилметокси-, 2-нафтилметокси-, бензилметокси-, 1-нафтилокси-, 2-нафтилокси- чи хіноліноксигрупу, незаміщену, моно- чи дизаміщену радикалом R_{21} , як зазначено вище. Бажаніше, щоб R_{22} позначав 1-нафтилметокси- чи хіноліноксигрупу, незаміщену, моно- чи дизаміщену радикалом R_{21} , як зазначено вище.

Бажаніше, щоб R_2 позначав:



Бажаніше, щоб R_{21A} позначав амідогрупу, необов'язково монозаміщену C_1-C_6 алкілом, C_6 - чи C_{10} арилом, C_7-C_{16} аралкіл чи Het, C_6 - чи C_{10} арил чи Het, необов'язково заміщені радикалом R_{22} . Найбажаніше, щоб R_{21A} позначав C_6 - чи C_{10} арил чи Het, усі необов'язково заміщені R_{22} . Найбажаніше, щоб R_{22} позначав аміно-, ди(нижч.)алкіламіногрупу чи (нижч.)алкіламід. Ще бажаніше, щоб R_{22} позначав аміно-, диметиламіно- чи ацетамідогрупу.

Бажаніше, щоб R_{21A} позначав C_6 - чи C_{10} арил чи Het, усі незаміщені.

Бажано, щоб R_{21B} позначав C_1-C_6 алкіл, C_1-C_6 алкокси-, аміно-, ди(нижч.)алкіламіногрупу, ди(нижч.)алкіламід, NO_2 , OH, галоген, трифторметил чи карбоксил. Бажаніше, щоб R_{21B} позначав C_1-C_6 алкокси чи ди(нижч.)алкіламіногрупу. Найбажаніше, щоб R_{21B} позначав метокси.

До обсягу винаходу включено далі сполуки формули I, у яких бажано, щоб R_1 позначав метил, етил, пропіл, вініл, усі необов'язково заміщені галогеном. Бажаніше, щоб R_1 позначав етил, вініл чи бромвініл. Найбажаніше, щоб R_1 позначав вініл.

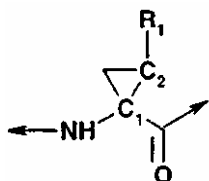
До обсягу винаходу включено також сполуки формули I, у яких бажано, щоб W позначав гідроксигрупу чи фармацевтично прийнятну сіль або складний ефір або (нижч.)алкіламіно-, ди(нижч.)алкіламіно- чи аралкіламіногрупу.

Бажаніше, щоб W позначав гідроксигрупу чи N(R_{13a}) R-_{13b} де R_{13a} і R_{13b} незалежно один від одного позначають H, арил чи C₁-C₆алкіл, необов'язково заміщений гідроксигрупою чи фенілом, чи фармацевтично прийнятну сіль. Найбажаніше, щоб W позначав -OH, -NH-бензил чи -NH-CH(Me)Ph. Ще бажаніше, щоб W позначав -OH, -NH-(S)CH(Me)-феніл.

Коли W позначає складний ефір, то цей складний ефір вибирають із групи, що включає C₁-C₆алкокси, фенокси чи арил (C₁-C₆алкокси).

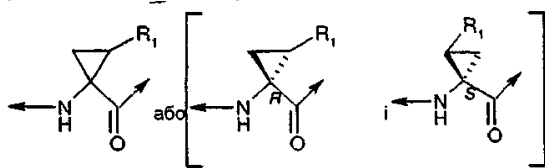
Бажаніше, щоб складний ефір позначав метокси, етокси, фенокси, бензилокси чи PhCH(Me)-O-.

Як описано вище, сегмент P1 сполук формули I являє собою циклопропільну кільцеву систему:

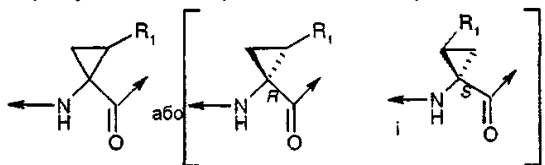


де C₁ і C₂ кожний позначає асиметричний атом вуглецю в положеннях 1 і 2 циклопропільного кільця. Незалежно від інших можливих асиметричних центрів на інших сегментах сполук формули I присутність цих двох асиметричних центрів означає, що сполуки формули I можуть існувати у вигляді рацемічних сумішей діастереоізомерів. Як проілюстровано в наведених нижче прикладах, є можливість отримати рацемічні суміші, які потім можна розподілити на індивідуальні оптичні ізомери, або ці оптичні ізомери можна одержати за допомогою хірального синтезу.

Зі сказаного випливає, що сполука формули I може існувати у вигляді рацемічної суміші діастереоізомерів, коли R₁ у положенні 2 перебуває в син-орієнтації щодо карбонільної групи в положенні 1, як це подано радикалом:

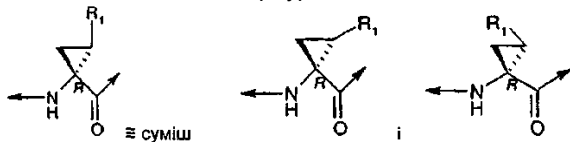


чи сполука формули I може існувати у вигляді рацемічної суміші діастереоізомерів, причому коли R₁ у положенні 2 перебуває в анти-орієнтації щодо карбонільної групи в положенні 1, то цей випадок можна подати радикалом:

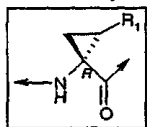


У свою чергу рацемічні суміші можна розподілити на індивідуальні оптичні ізомери.

Найбільш важливе значення згідно з винаходом має просторова орієнтація сегмента P1. Несподіваний ефект пов'язаний з конфігурацією асиметричного вуглецю в положенні 1. Краще, коли один з асиметричних атомів вуглецю в положенні 1 має R-конфігурацію.



Більш конкретно, коли атом вуглецю в положенні 1 має R-конфігурацію, то інгібувальна активність щодо NS3-протеази HCV додатково підсилюється положенням замісника R₁ (наприклад, алкілу чи алкілену) на атомі вуглецю в положенні 2 циклопропільного кільця. Найкращою сполукою є оптичний ізомер, що включає замісник R₁ і карбоніл у син-орієнтації та має таку абсолютну конфігурацію:



У випадку, коли R₁ позначає, наприклад, етил, асиметричні атоми вуглецю в положеннях 1 і 2 мають R,R-конфігурацію.

Проілюструвати вплив абсолютної конфігурації замісника на рівень ефективності сполуки можна на прикладі сполуки 112 (таблиця 1), що має абсолютну конфігурацію 1R,2R, значення IC₅₀ якого становить 1,6мкМ, при цьому значення IC₅₀ відповідного 1S,2S-ізомеру (сполука 113) становить 27,5мкМ. Таким чином, 1R,2R-ізомер у 25 разів ефективніший за відповідний 1S,2S-ізомер.

До обсягу винаходу включено далі сполуки формули I, у яких B позначає H, (нижч.)алкіл-C (O)- чи Het-C(O)-,

R₆ за його наявності позначає бічний ланцюг Asp чи Glu,

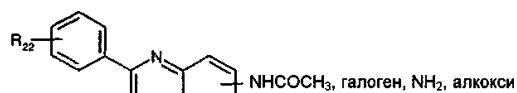
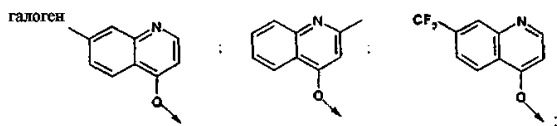
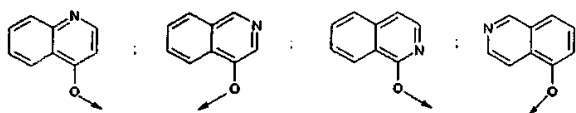
R₅ за його наявності позначає бічний ланцюг D- чи L-Asp, -Glu, -Val чи -Tbg,

Y позначає H чи метил,

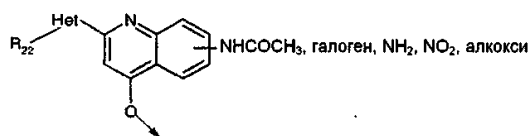
R₄ позначає бічний ланцюг Val, Chg, Tbg, He чи Leu,

R₃ позначає бічний ланцюг Ile, Chg, Val чи Tbg,

R₂ позначає 1-нафтилметокси, 2-нафтилметокси, O-Bn,



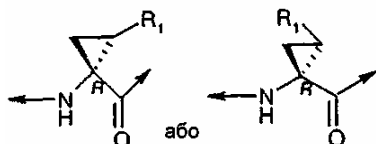
або



де

R₂₂ позначає аміно-, ди(нижч.)алкіламіногрупу, (нижч.)алкіламід, NO₂, OH, галоген, CF₃ чи карбоксигрупу;

P1 позначає циклопропілну кільцеву систему формули

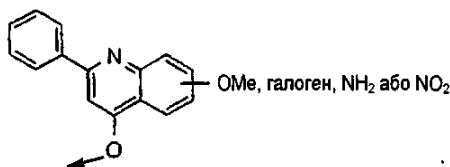


де

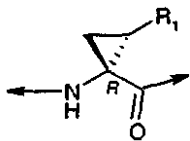
R₁ позначає етил, вініл чи бромвініл, і

W позначає гідроксигрупу чи N(R_{13a})R_{13b} де R_{13a} і R_{13b} незалежно один від одного позначають H, арил чи C₁-C₆алкіл, необов'язково заміщений гідроксигрупою чи фенілом, або їхня фармацевтично прийнятна сіль чи складний ефір.

Ще одна бажана група сполук представлена сполуками формули I, у яких B позначає H, ацетил чи Het-C(O)-, R₆, якщо він присутній, позначає бічний ланцюг Asp, R₅, якщо він присутній, позначає бічний ланцюг D-Asp, D-Glu чи D-Val, Y позначає H, R₄ позначає бічний ланцюг Chg чи Ile, R₃ позначає бічний ланцюг Val, Chg чи Tbg, R₂ позначає 1-нафтилметокси-, бензилокси-, 4-хіноліноксигрупу чи

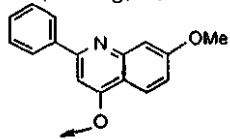


P1 позначає циклопропілну кільцеву систему формули

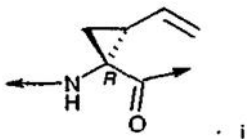


де R₁ позначає Et чи CH=CH₂ чи CH=CHBr, і W позначає гідроксигрупу чи -NH-(S)CH(Me)Ph, чи їхніми фармацевтично прийнятними солями чи складними ефірами.

Ще бажаніша група сполук представлена сполуками формули I, у яких B позначає ацетил, R₆, якщо він присутній, позначає бічний ланцюг Asp, R₅, якщо він присутній, позначає бічний ланцюг D-Glu, Y позначає H, R₄ позначає бічний ланцюг Chg, R₃ позначає бічний ланцюг Val чи Tbg, R₂ позначає



PI позначає



i W позначає гідроксигрупу, чи їх фармацевтично прийнятними солями чи складними ефірами.

Крім цього, в обсяг винаходу включена кожна сполука формули I, представлена в таблицях 1-5.

Відповідно до іншого варіанта здійснення фармацевтичні композиції за винаходом можуть додатково включати інший анти-HCV-агент. Приклади таких анти-HCV-агентів включають α - чи β -інтерферон, рибавірин і амантадин.

Згідно ще одного варіанта здійснення фармацевтичні композиції за винаходом можуть додатково включати інші інгібітори протеази HCV.

У відповідності ще з одним варіантом фармацевтичні композиції за винаходом можуть додатково включати інгібітор інших мішеней життєвого циклу HCV, у тому числі (але не обмежуючи тільки ними) геліказу, полімерази, металопротеази чи внутрішній сайт входу в рибосому (IRES).

Фармацевтичні композиції за винаходом можна вводити орально, парентерально чи за допомогою пристрою для імплантації. Кращим є оральне введення чи введення за допомогою ін'єкції. Фармацевтичні композиції за винаходом можуть містити будь-які загальноприйняті нетоксичні фармацевтично прийнятні носії, ад'юванти чи наповнювачі. У деяких випадках рН композиції можна регулювати за допомогою фармацевтично прийнятних кислот, основ чи буферів з метою підвищення стабільності сполуки, введеної в композицію чи у форму для її введення. У контексті даного опису поняття "парентеральний" включає підшкірний, внутрішньоскірний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньосуглобовий, інтрасиновіальний, інтрастернальний, інтратекальний шлях введення за допомогою ін'єкції чи інфузії, а також введення в ділянку ушкодження.

Фармацевтичні композиції можуть мати форму стерильного препарату для ін'єкції, наприклад, стерильної ін'єкційної водної чи жиророзчинної суспензії. Ця суспензія можна отримати за допомогою добре відомих методів з використанням диспергувальних чи змочувальних агентів (таких, як Твін 80) і суспендувальних агентів.

Фармацевтичні композиції за винаходом можна вводити орально у вигляді будь-якої прийнятної дозованої форми для орального введення, включаючи (але не обмежуючи тільки ними) імікапсули, таблетки й водні суспензії та розчини. У випадку таблеток для орального введення звичайно застосовувані носії включають лактозу і кукурудзяний крохмаль. Як правило, також додають замаслювачі, такі, як стеарат магнію. Для орального введення у формі капсул прийнятні розріджувачі включають лактозу і безводний кукурудзяний крохмаль. Коли оральним шляхом вводять водні суспензії, діючу речовину поєднують з емульгувальними та суспендувальними агентами. У разі потреби можна додавати певні підсолоджувальні речовини, і/або коригенти і/або барвники.

Інші придатні наповнювачі чи носії для зазначених вище препаративних форм і композицій описано в звичайних фармацевтичних довідниках, наприклад, у "Remington's Pharmaceutical Sciences", The Science and Practice of Pharmacy, 19-вид., вид-во Mack Publishing Company, Easton, Penn., (1995).

Сполуку за винаходом, що є інгібітором протеази, можна застосовувати для мототерапії з метою попередження й лікування опосередкованої HCV хвороби в дозах від приблизно 0,01 до приблизно 100мг/кг ваги тіла на день, краще від приблизно 0,5 до приблизно 75мг/кг ваги тіла на день. Як правило, фармацевтичні композиції за винаходом можуть вводитися від приблизно 1 до приблизно 5 разів на день чи в іншому варіанті шляхом безперервної інфузії. Таке введення може застосовуватися як для екстреного, так і для тривалого лікування. Кількість діючої речовини, яку можна об'єднати з носіями для одержання стандартної дозованої форми, може варіюватися залежно від конкретного пацієнта, що підлягає лікуванню, і конкретного шляху введення. Звичайна композиція може містити від приблизно 5% до приблизно 95% діючої речовини (мас. %). Бажано, щоб такі композиції містили від приблизно 20% до приблизно 80% діючої речовини.

Очевидно, що застосовувані дози можуть відрізнятися від зазначених вище як у більший, так і в менший бік. Специфічні схеми дозування і лікування для будь-якого конкретного пацієнта можуть залежати від різних факторів, включаючи активність конкретно застосовуваної сполуки, вік, вагу тіла, загальний стан здоров'я, стать, раціон, час введення, 1Нвидкість виведення, взаємодії лікарських засобів, серйозності й особливості розвитку хвороби, схильності пацієнта до інфекції, і визначаються лікарем. Як правило, лікування починають з невеликих доз, істотно нижчих, ніж оптимальна доза пептиду. Потім дозу поступово підвищують до досягнення оптимальної дії в конкретних умовах. Зазвичай найбажаніше вводити сполуку в такому діапазоні концентрацій, що забезпечують антивірусну активність, але не мають будь-якої шкідливої чи небезпечної побічної дії.

Коли композиції за винаходом включають комбінацію сполуки формули I і одного чи декількох додаткових терапевтичних чи профілактичних агентів, то доза сполуки і додаткового агента повинна становити від приблизно 10% до 100%, бажаніше від приблизно 10 до 80%, від дози, звичайно застосовуваної в режимі монотерапії.

Коли ці сполуки чи їхні фармацевтично прийнятні солі поєднують у препаративній формі з фармацевтично прийнятним носієм, то отримана композиція може вводитися *in vivo* ссавцеві, такому, як людина, для інгібування NS3-протеази HCV чи для чи лікування попередження інфекції, викликаной вірусом HCV. Ефекту при такому лікуванні також можна досягти при використанні сполуки за винаходом в поєднанні з агентами, що включають імуномодулятори, такі як α -, β - чи інтерферон- γ -інтерферони, інші антивірусні агенти, такі, як рибавірин, амантадин, інші інгібітори NS3-протеази HCV, інгібітори інших мішеней у життєвому циклі HCV, що включають (але не обмежуючи тільки ними) геліказу, полімерази, металопротеази чи внутрішній сайт входу в рибосому (IRES), або їхню комбінацію, при цьому список інгібіторів не обмежений переліченими вище. Додаткові агенти можна об'єднати зі сполуками за винаходом з одержанням однократної дозованої форми. В альтернативному варіанті ці агенти можуть вводитися окремо ссавцеві у вигляді частини багаторазової дозованої форми.

Ще одним об'єктом винаходу є способи інгібування активності NS3-протеази HCV у ссавця шляхом введення сполуки формули I, у якому замісники мають зазначені вище значення.

Відповідно до кращого варіанта здійснення, ці способи можуть застосовуватися для зниження активності NS3-протеази HCV у ссавця. Якщо фармацевтична композиція включає тільки сполуку за винаходом як діючу речовину, такі способи можуть додатково передбачати введення ссавцю агента, вибраного з імуномодулятора, антивірусного

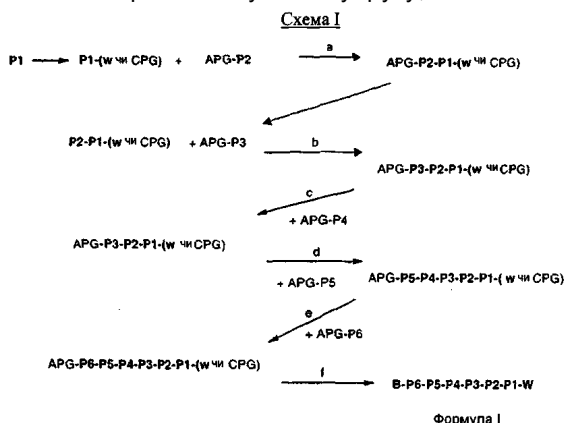
агента, інгібітору протеази HCV чи інгібітору інших мішеней у життєвому циклі HCV, таких, як геліказа, полімераза, металопротеаза чи IRES. Такий додатковий агент може вводитися ссавцеві до чи одночасно після введення композицій за винаходом.

Згідно з ще одним бажаним варіантом здійснення, ці способи можуть застосовуватися для інгібування реплікації вірусу в ссавця. Такі способи можуть застосовуватися для лікування чи попередження викликової HCV хвороби. Якщо фармацевтична композиція включає тільки сполуку за винаходом як дійову речовину, такі способи можуть додатково передбачати введення ссавцю агента, вибраного з імуномодулятора, антивірусного агента, інгібітору протеази HCV чи інгібітору інших мішеней у життєвому циклі HCV. Такий додатковий агент може вводитися ссавцю до чи одночасно після введення композиції за винаходом.

Пропоновані у винаході композиції також можуть застосовуватися як лабораторні реагенти. Сполуки за винаходом також можуть застосовуватися для лікування чи попередження вірусного забруднення матеріалів і тим самим знижувати ризик зараження вірусом персоналу лабораторій чи медичних установ, що мають контакт із такими матеріалами (наприклад, кров'ю, тканинами, хірургічними інструментами і предметами одягу, лабораторними інструментами та предметами одягу, приладами і матеріалами для збору крові).

Пропоновані у винаході композиції також можуть застосовуватися як реагенти для досліджень. Сполуки за винаходом можуть також використовуватися як позитивний контроль для обґрунтованого вибору заміників у дослідях на клітинах чи у дослідях з реплікації вірусів *in vitro* чи *in vivo*.

Сполуки за даним винаходом синтезували відповідно до загального процесу, поданого на схемі I (де CPG позначає карбоксильну захисну групу, а APG позначає амінозахисну групу):



Цей спосіб полягає загалом у такому: P1, P2, P3, P4 і необов'язково P5 і P6 можуть бути зв'язані за допомогою добре відомих методів пептидного поєднання групи P1, P2, P3, P4, а також P5 і P6 можуть бути з'єднані один з одним у будь-якому порядку таким чином, щоб отримана кінцева сполука відповідала пептидам формули I. Так, наприклад, P6 може бути зв'язаний з P5 з одержанням фрагмента P5-P6, що у свою чергу зв'язаний з P4-P3-P2-P1, чи P6 зв'язаний із фрагментом P5-P4-P3-P2, що далі зв'язаний відповідним чином з захищеним С-кінцевим P1.

Звичайно пептиди подовжують шляхом видалення α-аміногрупи на N-кінцевому залишку і сполуки з незахищеною карбоксильною групою наступної придатної відповідним чином N-захищеної амінокислоти через пептидний зв'язок, використовуючи описані методи. Цю процедуру видалення захисної групи і сполуки повторюють до одержання необхідної послідовності. Це поєднання можна здійснювати з використанням у функції складових амінокислот ступеневим синтезом, як це показано на схемі I, або шляхом конденсації фрагментів (двох чи більшої кількості амінокислот), або за допомогою комбінації обох методів, або за допомогою твердофазного пептидного синтезу з використанням методу, вперше описаного в Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963) (зміст публікації включений у даний опис як посилання).

Поєднання двох амінокислот, амінокислоти і пептиду чи двох пептидних фрагментів можна здійснювати за допомогою стандартних методів поєднання, таких, як азидний метод, метод на основі змішаного ангідриду вугільної-карбонової кислоти (ізобутилхлорформіат), карбодимідний (дициклогексилкарбодимід, діізопропілкарбодимід чи водорозчинний карбодимід) метод, метод на основі активного складного ефіру (пара-нітрофеніловий ефір, N-гідроксисукцинімідовий ефір), K-метод з використанням реагенту Вудварда, карбонілдіімідазольний метод, метод, заснований на використанні фосфорних реагентів, і окислювально-відновні методи. Деякі з цих методів (насамперед карбодимідний метод) може бути інтенсифікований додаванням 1-гідроксибензотриазолу. Ці реакції поєднання можна проводити або в розчині (рідинна фаза), або у твердій фазі.

Стадія поєднання включає, зокрема, дегідратційне поєднання вільного карбоксилу одного реагенту з вільною аміногрупою іншого реактанта в присутності агента поєднання з одержанням амідного зв'язку. Такі агенти поєднання описані в загальнодоступних довідниках з хімії пептидів, [наприклад, у M. Bodanszky, "Peptide Chemistry", 2-е перероблене видання, вид-во Springer-Verlag, Berlin, Germany (1993)]. Прикладами прийнятих агентів поєднання є N,N'-дициклогексилкарбодимід, 1-гідроксибензотриазол у присутності N,N'-дициклогексилкарбодиміду чи N-етил-N'-[(3-диметиламіно)пропіл]карбодиміду. Придатним для застосування на практиці агентом поєднання, наявним у продажу, є гексафторфосфат бензотриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонію або індивідуально, або в присутності 1-гідроксибензотриазолу. Іншим придатним для застосування на практиці агентом поєднання, наявним у продажу, є тетрафторборат 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронію. Ще одним придатним для застосування на практиці агентом поєднання, наявним у продажу, є гексафтофосфат O-(7-азабензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронію.

Реакцію поєднання проводять в інертному розчиннику, наприклад, дихлорметані, ацетонітрилі чи диметилформаміді. Щоб підтримати значення pH реакційної суміші на рівні приблизно 8, додають надлишок третинного аміну, наприклад, діізопропілетиламіну, N-метилморфоліну чи N-метилпіролідону. Температура реакції, як

правило, становить від 0 до 50°C, а час проведення реакції, як правило, коливається від 15хв. до 24год.

При застосуванні твердофазного синтезу С-кінцеву карбонову кислоту приєднують до нерозчинного носія (звичайно полістиролу). Ці нерозчинні носії містять групу, що може взаємодіяти з карбоксильною групою з утворенням зв'язку, яка зберігає стабільність протягом потрібного тривалого проміжку часу, а потім легко розщеплюється. Як приклади таких носіїв можна назвати хлор- чи бромметилову смолу, гідроксиметилову смолу й амінометилову смолу. Багато таких смол з уже включеною необхідною С-кінцевою амінокислотою наявні в продажу. В іншому варіанті амінокислоту можна включити у твердий носій за допомогою відомих методів [Wang S.-S., J. Am. Chem. Soc. (1973), 95, 1328; Atherton E.; Shepard R.C. "Solid-phase peptide synthesis; a practical approach", изд-во IRL Press: Oxford, (1989), 131-148]. Крім вищевказаних, можна застосовувати й інші методи пептидного синтезу, описані в [Stewart і Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2-е вид., вид-во Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984); "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", за ред. Gross, Meienhofer, Udenfriend, том 1, 2, 3, 5 і 9, вид-во Academic Press, New-York (1980-1987); Bodansky та ін. "The Practice of Peptide Synthesis", вид-во Springer-Verlag, New-York (1984)] (зміст цих публікацій включено в даний опис як посилання).

Функціональні групи застосовуваних амінокислот, як правило, слід захищати під час реакцій поєднання, щоб уникнути утворення небажаних зв'язків. Захисні групи, що можуть застосовуватися для цієї мети, описані в Greene, ["Protective Groups in Organic Chemistry", вид-во John Wiley & Sons, New York (1981), і в "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", том 3, вид-во Academic Press, New York (1981)] (зміст цих публікацій включено в даний опис як посилання).

α -Карбоксильну групу С-кінцевого залишку, як правило, захищають у вигляді складного ефіру (CPG), що має розщепитися з утворенням карбонової кислоти. Захисні групи, що можуть застосовуватися з цією метою, включають 1) складні алкілові ефіри, такі, як метиловий, триметилсиліловий і трет-бутиловий, 2) складні аралкілові ефіри, такі, як бензиловий і заміщений бензиловий, чи 3) складні ефіри, що можуть розщеплюватися в результаті оброблення слабкою основою або в слабких умовах відновлення, такі, як трихлоретиловий і фенацетилівий ефіри.

α -Аміногрупа кожної амінокислоти, що має приєднуватися, подовжуючи пептидний ланцюг, повинна бути захищеною (APG). Для цього можуть застосовуватися будь-які захисні групи. Приклади таких груп включають 1) ацильні групи, такі, як форміл, трифторацетил, фталіл і пара-толуолсульфоніл, 2) ароматичні карбаматні групи, такі, як бензилоксикарбоніл (Cbz чи Z) і заміщені бензилоксикарбоніли, а також 9-флуоренілметилоксикарбоніл (Fmoc), 3) аліфатичні карбаматні групи, такі, як трет-бутоксикарбоніл (Boc), етоксикарбоніл, діізопропілметоксикарбоніл і алілоксикарбоніл, 4) циклічні алкілкарбаматні групи, такі, як циклопентилоксикарбоніл і адамантилоксикарбоніл, 5) алкільні групи, такі, як трифенілметил і бензил, 6) триалкілсиліл, такий, як триметилсиліл, і 7) тіоломісні групи, такі, як фенілтіокарбоніл і дитіасукциноіл. Кращими α -амінозахисними групами є або Boc, або Fmoc. Багато амінокислотних похідних, захищені таким чином, як це потрібно для синтезу пептидів, є в продажу.

α -Амінозахисну групу знову додаваного залишку амінокислоти відщеплюють перед поєднанням з наступною амінокислотою. Якщо застосовують групу Boc, то вибирають метод на основі трифтороцтової кислоти, чистої чи у дихлорметані, або HCl у діоксані чи в етилацетаті. Амонійну сіль, що утворилася, потім нейтралізують або до поєднання, або *in situ* за допомогою основних розчинів, таких, як водні буфери чи третинні аміни в дихлорметані, ацетонітрилі чи диметилформаміді. Якщо застосовують групу Fmoc, то вибирають такі реагенти, як піперидин чи заміщений піперидин у диметилформаміді, але також може використовуватися будь-який вторинний амін. Захисні групи видаляють при температурі від 0°C до кімнатної (КТ), що звичайно становить 20-22°C.

Будь-які амінокислоти, що мають функціонально активні групи в бічному ланцюзі, слід захищати в процесі одержання пептиду за допомогою кожної з описаних вище груп. Очевидно, що вибір і застосування захисних груп для цих функціонально активних груп у бічному ланцюзі залежить від амінокислоти і наявності інших захисних груп у пептиді. Вибір таких захисних груп важливий у тому плані, що групи не слід видаляти під час видалення захисних груп і поєднання α -аміногрупи.

Так, наприклад, коли у функції α -амінозахисної групи використовують Boc, то прийнятними є такі захисні групи бічного ланцюга: пара-толуолсульфонільні (тозилні) фрагменти, які можна застосовувати для захисту аміногрупи бічного ланцюга таких амінокислот, як Lys і Arg, ацетамідометильний, бензильний (Bn) чи трет-бутилсульфонільний фрагменти, які можна застосовувати для сульфідовмісного бічного ланцюга цистеїну, прості бензильні (Bn) ефіри, які можна застосовувати для бічних ланцюгів серину, які містять гідроксигрупу, треоніну чи гідроксипроліну, і складні бензильні ефіри, які можна застосовувати для захисту бічних ланцюгів, що містять карбоксильні групи, аспарагінової кислоти і глутамінової кислоти.

Коли для захисту α -аміногруп вибирають Fmoc, як правило, прийнятними є захисні групи на основі терла-бутилу. Наприклад, Boc може застосовуватися для лізину й аргініну, простий трет-бутиловий ефір - для серину, треоніну й гідроксипроліну, а складний трет-бутиловий ефір - для аспарагінової кислоти і глутамінової кислоти. Трифенілметильний фрагмент (тритил) може застосовуватися для захисту сульфідовмісного бічного ланцюга цистеїну.

Якщо W позначає амід (w), P1 піддають поєднанню з відповідним аміном до поєднання з P2. Таке амінування добре відоме в даній галузі.

Подовживши пептид, усі захисні групи видаляють. Якщо використовують синтез у рідинній фазі, то захисні групи видаляють будь-яким методом, що залежить від вибору захисних груп. Ці методи добре відомі.

Якщо використовують синтез у твердій фазі, то пептид відщеплюють від смоли одночасно з видаленням захисних груп. Якщо для синтезу застосовують метод на основі захисту за допомогою Boc, то оброблення безводної HF, що містить такі добавки, як диметилсульфід, анізол, тіоанізол чи пара-крезол, при 0°C являє собою кращий метод відщеплення пептиду від смоли. Відщеплювати пептид також можна за допомогою інших кислотних реагентів, таких, як суміші трифторметансульфонової кислоти/трифтороцтової кислоти. Якщо для синтезу застосовують метод на основі захисту за допомогою Fmoc, то N-кінцеву групу Fmoc відщеплюють за допомогою зазначених вище реагентів. Інші захисні групи і пептиди відщеплюють від смоли за допомогою розчину трифтороцтової кислоти і різних добавок, таких, як анізол і т.д.

Синтез блокувальної групи В і фрагментів P6, P5, P4 і P3

Різні блокувальні групи В, уводять у P4, P5 чи P6 або будь-який інший пептидний сегмент, захищений за

допомогою відповідного ацилхлориду чи сульфонілхлориду, що або є в продажу, або синтез якого добре відомий у даній галузі. Різні фрагменти R⁶-R³ є в продажу або їх можна синтезувати за допомогою добре відомого методу.

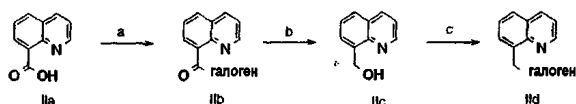
1. Синтез фрагментів R²

1.1. Синтез попередників

А) Синтез галоарилметанових похідних.

Галометил-8-хінолін IId одержували за методом, описаним у K.N. Campbell та ін., J. Amer. Chem. Soc. 68, 1844 (1946).

Схема II

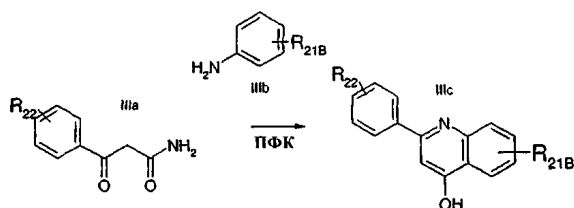


Цей метод складається в наступному: 8-хінолінкарбонову кислоту IIa перетворювали у відповідний спирт IIc відновленням відповідного ацилгалогеніду IIb за допомогою такого відновлювача, як алюмогідрид літію. Обробкою спирту IIb відповідною галогенводневою кислотою одержували необхідне галогенмаюче похідне IId. Конкретний варіант здійснення цього способу представлений у прикладі 1A.

Б) Синтез арилових спиртових похідних

2-феніл-4-гідроксихінолінові похідні IIc одержували за методом, описаним у Giardina та ін. [J. Med. Chem. 40, 1794-1807 (1997)].

Схема III

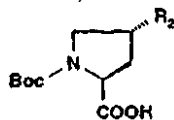


R₂₂ і R_{21B} позначають алкіл, OH, SH, галоген, NH₂, NO₂.

Бензоїлацетамід (IIIa) конденсували з відповідним аніліном (IIIb) і отриманий імін піддавали циклізації з поліфосфорною кислотою (ПФК), одержуючи відповідний 2-феніл-4-гідроксихінолін (IIc). Конкретний варіант здійснення цього способу подано у прикладах 1B і 1B.

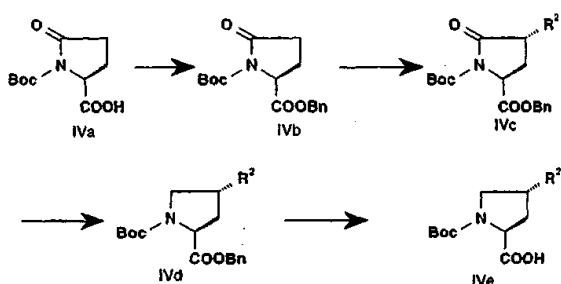
1.2. Синтез R²

А) Синтез 4-заміщеного проліну (де R₂ приєднаний до кільця через атом вуглецю) (стереохімічну будову наведено нижче)



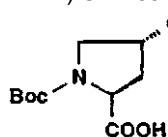
Синтез здійснювали відповідно до схеми IV за методом, описаним у J. Ezquerre та ін. [Tetrahedron 38, 8665-8678 (1993)] і C Pedregal та ін. (Tetrahedron Lett. 35, 2053-2056 (1994)).

Схема IV



Цей метод полягає в основному в такому: Вос-піроглютамінову кислоту захищали у вигляді бензилового ефіру. Обробивши сильною основою, такою, як діізопропіламід літію, з наступним додаванням алкілувального агента (Br-R²⁰ чи I-R²⁰), одержували потрібні сполуки IVe після відновлення аміду і видалення складного ефіру.

Б) Синтез O-аралкілової 4-(R)-гідроксипроліну

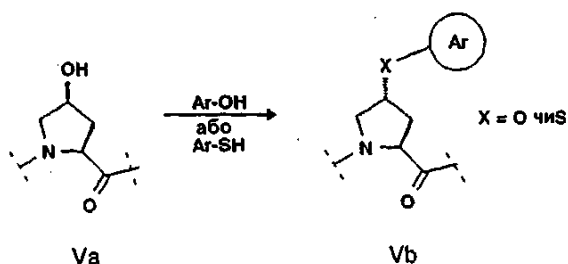


Коли R²⁰ позначає арил, Het, аралкіл чи (нижч.) алкіл - Het, процес можна здійснювати за методом, описаним в Е.М. Smith та ін. [J. Med. Chem. 31, 875-885 (1988)]. Цей метод полягає в основному в такому: наявний у продажу Вос-4(R)-гідроксипролін обробляли основою, такою, як гідрид натрію чи K-tBuO (трет-бутоксид калію), і алкоксид, що утворився, піддавали взаємодії з гало-R²⁰ (Br-R²⁰, I-R²⁰ і т.д.), одержуючи потрібні сполуки. Конкретні варіанти здійснення цього способу подано в прикладах 2, 3 і 4Б.

В) В альтернативному варіанті, коли R²⁰ позначає арил чи Het, сполуки також можна отримати за реакцією

Митсунобу [Mitsunobu, Synthesis, січень, 1-28 (1981); Rano та ін., Tet. Lett. 36(22). 3779-3792 (1995); Krchnak та ін., Tet. Lett. 36(5). 62193-62196 (1995); Richter та ін., Tet. Lett. 35(27). 4705-4706 (1994)]. Цей метод полягає в основному в такому: наявний у продажу метиловий ефір Boc-4-(S)-гідроксипроліну піддавали взаємодії з відповідним ариловим спиртом чи тіолом у присутності трифенілфосфіну і діетилазодикарбоксилату (DEAD) і складний ефір, що утворився, гідролізували з одержанням кислоти. Конкретний варіант здійснення цього способу подано у прикладі 4А.

Схема V



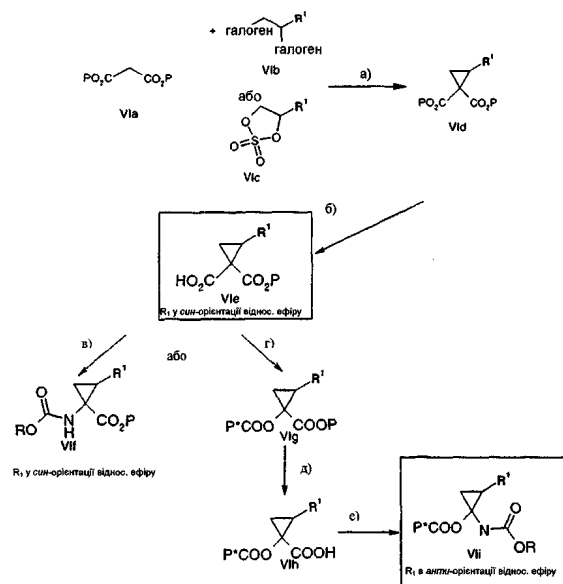
В альтернативному варіанті реакцію Митсунобу можна проводити у твердій фазі (схема V). Для цього в 96-ячковий блок синтезатора моделі 396 (поставляє фірма ChemTech) вносили аліквоти, зв'язані зі смолою сполуки (Va) та різні арилові спирти або тіоли, додаючи відповідні реагенти. Після інкубації кожен зв'язаний зі смолою продукт (Vb) промивали, сушили й відщеплювали від смоли.

Для додаткового введення функціональних груп в арильний замісник може також застосовуватися реакція Сузуки [Miyaura та ін., Synth. Comm. 1, 513 (1981); Sato та ін., Chem. Lett., 1405 (1989); Watanabe та ін., Synlett, 207 (1992); Takayuki та ін., J. Org. Chem. 58, 2201 (1993); Frenette та ін., Tet. Lett. 35(49). 9177-9180 (1994); Guiles та ін., J. Org. Chem. 61 5169-5171 (1996)].

2. Синтез фрагментів P1 (2-заміщена 1-аміноциклопропілкарбонова кислота)

Синтез здійснювали відповідно до схеми VI.

Схема VI



а) Цей метод полягає в основному в такому: двічі захищений малонат Via і 1,2-дігалогалкан Vib чи циклічний сульфат Vic (синтезований за методом, описаним у K. Burgess і Chun-Yen KE [Synthesis (1996), 1463-1467], піддавали взаємодії в основних умовах, одержуючи діефір VId.

б) Здійснювали вибірково стосовно певної ділянки гідроліз найменш просторово утрудненого ефіру, одержуючи кислоту VIf.

в) Цю кислоту VIf піддавали перегрупуванню Курціуса, одержуючи рацемічну суміш похідних 1-аміноциклопропілкарбонової кислоти VIf,

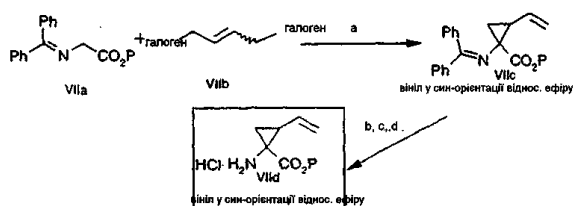
у якій R¹ перебуває в син-орієнтації щодо карбоксильної групи. Конкретний варіант здійснення цього способу подано у прикладі 5.

г, д) В альтернативному варіанті вибіркоче утворення ефіру з кислоти VIf за допомогою галогеніду (P*Cl) чи спирту (P*OH) дозволило одержати діефір VIf, у якому P*-ефір може піддаватися вибірково гідролізу у вигляді P-ефіру. Гідроліз P-ефіру дозволив одержати кислоту VIf.

е) Перегрупування Курціуса кислоти VIf дозволили одержати рацемічну суміш похідних 1-аміноциклопропілкарбонової кислоти VIf, у яких група R¹ перебуває в анти-орієнтації щодо карбоксильної групи. Конкретний варіант здійснення цього способу подано у прикладі 10.

Нижче описаний альтернативний варіант синтезу похідних VIf (де R¹ позначає вініл і перебуває в син-орієнтації щодо карбоксильної групи).

Схема VII



Обробляючи наявний у продажу іміну VIIa за допомогою 1,4-дігалобутену VIIb у присутності основ, одержували після гідролізу утвореного іміну, іміну VIIc сполуку VIId, що має алільний замісник, який перебуває в син-орієнтації щодо карбоксильної групи. Конкретний варіант здійснення цього способу подано у прикладі 11.

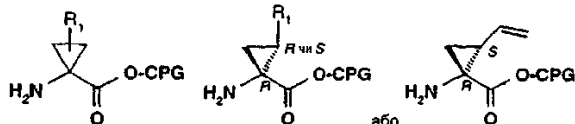
Усі зазначені вище енантімерні суміші можна розподілити щодо вуглецю в положенні 1 (Vle і VIId) шляхом:

- 1) ферментативного поділу (приклад 9 і 13),
- 2) кристалізації з хіральною кислотою (приклад 14) чи
- 3) хімічної дериватизації (приклад 6).

Після поділу абсолютну стереохімію можна визначати за методикою, описаною в прикладі 7.

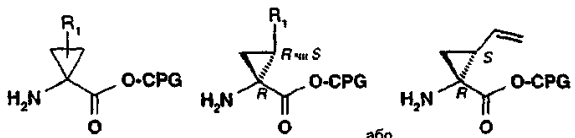
Поділ енантімерів і визначення стереохімічної будови можна здійснювати аналогічно до того, як це описано для енантімерних сумішей щодо вуглецю в положенні 1, у яких замісник C2 перебуває в анти-орієнтації щодо карбоксильної групи (VII).

Винахід також стосується способу одержання пептидного аналога формули (I), у якому P1 позначає залишок заміщеної аміноциклопропіл-карбонової кислоти, що передбачає поєднання пептиду, вибраного з ряду, куда входять APG-P6-P5-P4-P3-P2, APG-P5-P4-P3-P2, APG-P4-P3-P2, APG-P3-P2 і APG-P2, із проміжним продуктом P1 формули



де R₁ позначає C₁-C₆алкіл чи C₂-C₆алкеніл, необов'язково заміщений галогеном, CPG позначає карбоксизахисну групу, APG позначає амінозахисну групу, а P6-P2 мають зазначені вище значення.

Крім того, винахід стосується застосування проміжного продукту формули:



де R₁ позначає C₁-C₆алкіл чи C₂-C₆алкеніл, необов'язково заміщений галогеном, призначеним для одержання сполуку формули I, як вона визначена вище.

Приклади

Нижче винахід проілюстровано на прикладах, що не обмежують його обсягу.

Температури зазначено в градусах Цельсія. Відсотки для розчинів являють собою відношення маси до об'єму (мас/об.), а співвідношення в розчинах являють собою об'ємні співвідношення, якщо не зазначено іншого. Спектри ядерного магнітного резонансу (ЯМР) реєстрували за допомогою спектрометра фірми Bruker при частоті 400МГц, хімічні зсуви (δ) виражено в част./млн. Експрес-хроматографію проводили на силікагелі (SiO₂) згідно з експрес-хроматографічним методом Стілла [W.C. Still та ін., J. Org. Chem., 43, 2923 (1978)].

У прикладах використано такі скорочення:

Bn бензил

Boc трет-бутилоксикарбоніл {Me₃CO-C(=O)-}

BSA бичачий сироватковий альбумін

ХАПС 3-[(3-холамідопропіл)діметиламоній]-1-пропансульфонат

ДБУ 1,8-діазабіцикло[5.4.0]ундец-7-ен

CH₂Cl₂=ДХМ метиленхлорид

ДЕАД діетилазодикарбоксилат

ДІАД діізопропілазодикарбоксилат

ДІЕА діізопропілетиламін

ДІПЕА діізопропілетиламін

ДМАП диметиламінопіридин

ДЦК 1,3-дициклогексилкарбодіімід

ДМЕ 1,2-диметилоксиетан

ДМФ диметилформамід

ДМСО диметилсульфоксид

ДТТ дитіотреїтол або трео-1,4-димеркапто-2,3-бутандіол

ДФФА дифенілфосфорилазид

ЕДТК етилендіамінтетраоцтова кислота

Et етил

EtOH етанол

EtOAc етилацетат

Et₂O діетиловий ефір

ГАТУ гексафторфосфат О-7-азабензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилурионію

PXBP рідинна хроматографія високого розділення

МС мас-спектрометрія (MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (час прольоту при лазерній десорбційній іонізації за участю матриці; FAB: бомбардування прискореними атомами) АГЛ алюмогідрид літію

Me метил

MeOH метанол

МЕС (2-[1N-морфоліно]етансульфонова кислота)

NaHMDS біс (триметилсиліл) амід натрію

N-MM N-метилморфолін

N-МП N-метилпіролідін

Pr пропіл

Succ 3-карбоксіпропанол

pNA 4-нітрофеніламіно чи пара-нітроанілід

ТБАФ тетра-н-бутиламонійфторид

ТБТУ тетрафторборат 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію

ТКЕФгідрохлорид трис (2-карбоксіетил)фосфіну

ТФК трифтороцтова кислота

ТГФ тетрагідрофуран

ТІС триізопропілсилан

ТШХ тонкошарова хроматографія

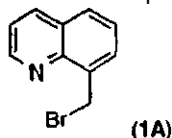
ТМСЕ триметилсилілетил

Трис/HCl гідрохлорид трис(гідроксиметил)амінометану

Елементи структури Р2

Приклад 1А

Синтез бромметил-8-хіноліну (1А)



До наявної в продажу 8-хінолінкарбонової кислоти (2,5г, 14,4ммоль) додавали чистий тіонілхлорид (10мл, 144ммоль). Цю суміш витримували при 80°C протягом 1год. після чого надлишок тіонілхлориду видаляли, переганяючи при зниженому тиску. До твердого продукту коричневатого кольору, що утворився, додавали абсолютний EtOH (15мл) і суміш витримували при 80°C протягом 1год., після чого концентрували у вакуумі. Залишок розподіляли між EtOAc і насиченим водним розчином NaHCO₃, органічну фазу сушили (MgO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи олію коричневатого кольору (2,8г). Цей продукт (приблизно 14,4ммоль) додавали краплями протягом 35хв. до суспензії АГЛ (0,76г, 20,2ммоль) у Et₂O, що була охолоджена до -60°C. Реакційну суміш повільно нагрівали протягом 1,5год. до -35°C до завершення реакції. Реакцію припиняли, повільно додаючи протягом 30хв. MgSO₄·10H₂O, а потім вологий ТГФ. Суміш розподіляли між Et₂O і 10%-им водним розчином NaHCO₃. Органічну фазу сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи твердий продукт жовтуватого кольору (2,31г, 80% для 2 стадій), що являє собою спирт. Цей спирт (2,3г, 11,44ммоль) розчиняли в AcOH/HBr (20мл, 30%-ий розчин, що поставляється фірмою Aldrich) і витримували при 70°C протягом 2,5год. Суміш концентрували у вакуумі до висихання, розподіляли між EtOAc (100мл) і насиченим водним розчином NaHCO₃, після чого сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи потрібну сполуку (1А) у вигляді твердої речовини коричневатого кольору (2,54г, 100%).

Приклад 1Б

Синтез 2-феніл-4-гідроксихіноліну (1В)

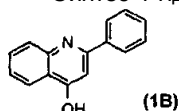
Наявний у продажу етилбензоїлацетат (6,00г, 31,2ммоль) витримували при 85°C (у закупореній пробірці) протягом 2год. у 75мл 30%-го NH₄OH. Твердий продукт, що утворився після охолодження, фільтрували й кип'ятили зі зворотним холодильником у воді протягом 2год. Розчин екстрагували три рази CH₂Cl₂. Органічні шари поєднували, сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували. Залишок жовтого кольору хроматографували на силікагелі, елюючи сумішшю EtOAc/гексан (3:7), з одержанням відповідного амід у вигляді твердої речовини білого кольору, 1,60г, вихід 31%.

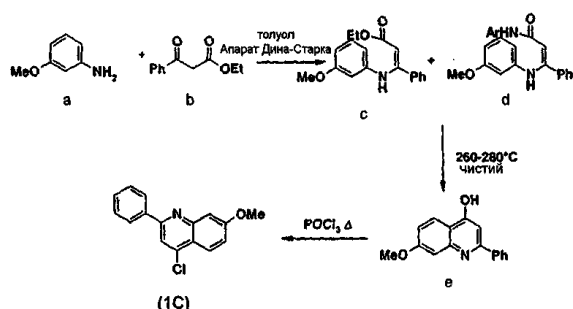
Цей амід (250мг, 1,53ммоль) кип'ятили зі зворотним холодильником в апараті Дина-Старка з аніліном (143мг, 1,53ммоль) і анілін·HCl (10мг, 0,08ммоль) толуолі (10мл) протягом 16год. Розчин концентрували, одержуючи олію коричневого кольору, змішаний з поліфосфорною кислотою (2г), і витримували при 135°C протягом 20хв. Реакційну суміш зливали у воду і значення рН доводили до 8 за допомогою 5М NaOH. Водну суспензію двічі екстрагували етилацетатом. Органічні шари поєднували, промивали соляним розчином, сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували. Залишок піддавали експрес-хроматографії на силікагелі, елюючи 3%-им MeOH в етилацетаті, з одержанням 2-феніл-4-гідроксихіноліну(1В), 67мг, вихід 20%.

¹H-ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,11 (d, J=7Гц, 1H), 7,86-7,83 (m, 2H), 7,77 (d, J=8Гц, 1H), 7,68 (dd, J=8,7Гц, 1H), 7,61-7,58 (m, 3H), 7,35 (dd, J=8,7Гц, 1H), 6,34 (s, 1H).

Приклад 1В

Синтез 4-гідрокси-2-феніл-7-метоксихіноліну (1С)





4-гідрокси-2-феніл-7-метоксихінолін (е)

Розчин, що містить етилбензоїлацетат (b) (100,0г, 0,52моля), мета-анідин (a) (128,1г, 1,04моля) і 4н. HCl/діоксан (5,2мл) у толуолі (1,0л), кип'ялили зі зворотним холодильником протягом 6,25г в апараті Дина-Старка. Охолоджений толуольний розчин послідовно промивали 10%-им водним розчином HCl (2×300мл), 1н. NaOH (2×300мл), H₂O (300мл) і соляним розчином (150мл). Толуольну фазу сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували при зниженому тиску, одержуючи суміш (1,2:1,0) складного ефіру c та аміду d (144,6г, вихід неочищених продуктів 45%/38%) у вигляді олії темно-коричневого кольору. Неочищену олію нагрівали до 280° С протягом 80хв., відганяючи при цьому утворений EtOH. Отриманий охолоджений твердий продукт розтирали з CH₂Cl₂ (200мл). Суспензію фільтрували і твердий продукт, що утворився, промивали CH₂Cl₂, одержуючи сполуку е (22,6г, 17% щодо a) у вигляді твердої речовини бежевого кольору.

¹H-ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,00 (d, J=9,0Гц, 1H), 7,81-7,82 (m, 2H), 7,57-7,59 (m, 3H), 7,20 (d, J=2,2Гц, 1H), 6,94 (dd, J=9,0, 2,2Гц, 1H), 6,26 (s, 1H), 3,87 (s, 3H).

4-хлор-2-феніл-7-метоксихінолін (1C)

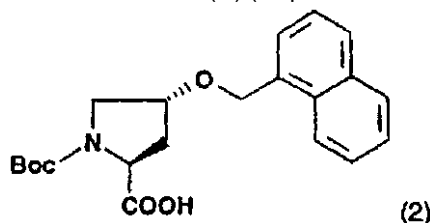
Суспензію сполуки е (8,31г, 33,1ммоль) у POCl₃ (90мл) нагрівали зі зворотним холодильником протягом 2год. (після нагрівання одержували прозорий розчин). Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між 1н. NaOH (екзотермічна реакція, для підтримання високого значення pH додавали 10н. NaOH) і EtOAc (500мл). Органічний шар промивали H₂O (100мл) і соляним розчином (100мл), а потім сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували при зниженому тиску, одержуючи сполуку 1C (8,60г, вихід 96%) у вигляді твердої речовини світло-жовтого кольору.

¹H-ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,28-8,30 (m, 2H), 8,20 (s, 1H), 8,10 (d, J=9,1Гц, 1H), 7,54-7,58 (m, 3H), 7,52 (d, J=2,5Гц, 1H), 7,38 (dd, J=9,1, 2,5Гц, 1H), 3,98 (s, 3H).

Цю реакцію повторювали тричі і завжди одержували вихід 96-98%, що істотно перевищує 68%-ий вихід, про який повідомлялося в J. Med. Chem. (1997), 40, 1794.

Приклад 2

Синтез Вос-4-(R)-(нафталін-1-ілметокси)проліну (2)

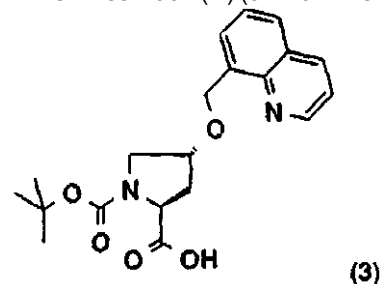


Наявний у продажу Вос-4-(R-гідроксипролін (5,00г, 21,6ммоль) розчиняли в ТГФ (100мл) і охолоджували до 0°С. Порціями протягом 10хв. додавали гідрид натрію (60%-а дисперсія в олії, 1,85г, 45,4ммоль) і суспензію перемішували при кімнатній температурі протягом 1год. Потім додавали 1-(бромметил)нафталін (8,00г, 36,2ммоль) [отриманий за методом, описаним в E.A. Dixon та ін., Can. J. Chem. 59, 2629-2641 (1981)] і суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 18год. Суміш зливали у воду (300мл) і промивали гексаном. Водний шар підкислювали 10%-им водним розчином HCl і двічі екстрагували етилацетатом. Водні шари об'єднували і промивали соляним розчином, сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (суміш гексан/етилацетат/оцтова кислота у співвідношенні 49:49:2), одержуючи зазначену в заголовку сполуку у вигляді безбарвної олії (4,51г, вихід 56%).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆), результати свідчать про наявність двох ротамерів: δ 8,05 (m, 1H), 7,94 (m, 1H), 7,29 (d, J=14Гц, 1H), 7,55-7,45 (m, 4H), 4,96 (m, 2H), 4,26 (шир. s, 1H), 4,12 (dd, J=8Гц, 1H), 3,54-3,42 (m, 2H), 2,45-2,34 (m, 1H), 2,07-1,98 (m, 1H), 1,36 (s, (3/9), 9H), 1,34 (s, (6/9), 9H).

Приклад 3

Синтез Вос-4(R) (8-хінолінметокси)проліну (5)



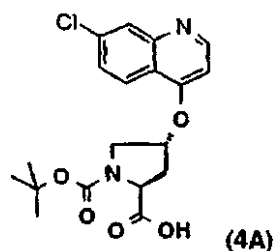
До суспензії NaH (1,4г, 60%-а в олії, 34ммоль) у ТГФ (100мл) додавали Вос-4-(R)-гідроксипроліну (1,96г, 8,5ммоль)

у безводному ТГФ (20мл). Цю суміш перемішували протягом 30хв., після чого додавали бромметил-8-хінолін із прикладу 1 (2,54г, 11,44ммоль) у ТГФ (30мл). Реакційну суміш витримували при 70°C (5год.), після чого надлишок NaN оберезно розчиняли вологим ТГФ. Реакційну суміш концентрували у вакуумі і продукт, що утворився, розчиняли в EtOAc і H₂O. Основну водну фазу відокремлювали і підкислювали за допомогою 10%-го водного розчину HCl до pH ~5, після чого екстрагували EtOAc (150мл). Органічну фазу сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи олію коричневого кольору. Після очищення за допомогою експрес-хроматографії (елюент: 10%-ий MeOH/CHCl₃) одержували потрібну сполуку (5) у вигляді твердої речовини світло-жовтого кольору (2,73г, вихід 86%), РХВР (97,5%).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆), результати свідчать про наявність ротамерів у співвідношенні 6:4: δ 12-11,4 (шир. s, 1H), 8,92 (2xd, J=4,14 і 4,14Гц, 1H), 8,38 (2xd, J=8,27 і 8,27Гц, 1H), 7,91 (d, J=7,94Гц, 1H), 7,77 (d, J=7,0Гц, 1H), 7,63-7,54 (m, 2H), 5,14 (2xs, 2H), 4,32-4,29 (m, 1H), 4,14-4,07 (m, 1H), 3,52-3,44 (m, 2H), 2,43-2,27 (m, 1H), 2,13-2,04 (m, 1H), 1,36 і 1,34 (2xs, 9H).

Приклад 4А

Одержання Вос-4-(R)-(7-хлорхінолін-4-оксо)проліну (4А)



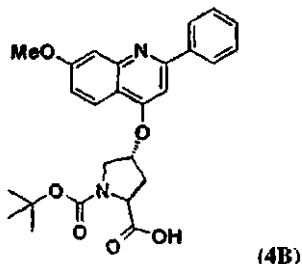
Наявний у продажу метиловий ефір Вос-4-(8)-гідроксипроліну (500мг, 2,04ммоль) і 7-хлор-4-гідроксихінолін (440мг, 2,45ммоль) розчиняли в безводному ТГФ (10мл) при 0°C. Додавали трифенілфосфін (641мг, 2,95ммоль), а потім повільно додавали ДІАД (426мг, 2,45ммоль). Суміш перемішували при КТ протягом 20год. Потім реакційну суміш концентрували, розчиняли в етилацетаті й тричі екстрагували 1н. HCl. Водну фазу підлужували за допомогою Na₂CO₃ і двічі екстрагували етилацетатом. Органічні шари поєднували, сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували, одержуючи олію жовтого кольору. Олію очищали експрес-хроматографією, одержуючи складний метиловий ефір у вигляді твердої речовини білого кольору, 498мг, вихід 58%.

Цей складний метиловий ефір (400мг, 0,986ммоль) піддавали гідролізу за допомогою 1М водного розчину гідроксиду натрію (1,7мл, 1,7ммоль) у метанолі (4мл) при 0°C протягом 3год. Розчин концентрували для видалення метанолу і нейтралізували 1М водним розчином HCl. Суспензію концентрували до висихання й розчиняли в метанолі (20мл), солі відфільтровували й фільтрат концентрували, одержуючи потрібну сполуку (4А) у вигляді твердої речовини білого кольору, 387мг, кількісний вихід.

¹H-ЯМР (DMSO-d₆) (суміш ротамерів у співвідношенні приблизно 1:1): δ 8,74 (d, J=5Гц, 1H), 8,13-8,09 (m, 1H), 7,99 і 7,98 (s, 1H), 7,58 (d, J=9Гц, 1H), 7,02 (d, J=5Гц, 1H), 5,26-5,20 (m, 1H), 4,10-4,01 (m, 1H), 3,81-3,72 (m, 1H), 3,59 (dd, J=12, 10Гц, 1H), 2,41-2,31 (m, 2H), 1,34 і 1,31 (s, 9H).

Приклад 4Б

Синтез Вос-4-(R)-(2-феніл-7-метоксихінолін-4-оксо)проліну (4В)



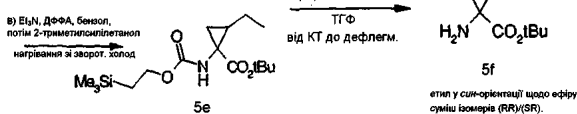
1-[(1,1-диметилетокси)карбоніл-4-(R)-[(7-метокси-2-феніл-4-хінолініл)окси]-L-пролін (4В)

До розчину Вос-4-(R)-гідроксипроліну (6,73г, 29,1ммоль) у ДМСО (83мл), температуру якого підтримували на рівні 25°C, невеликими порціями протягом 15хв. додавали трет-бутоксид калію (8,16г, 72,7ммоль). Суміш перемішували при 25°C протягом 1,5год. До реакційної суміші 4-ма порціями протягом 15хв. додавали хлор-2-феніл-7-метоксихінолін 1С (8,61г, 32,0ммоль). Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 19год. Суспензію, що утворилася, зливали на H₂O (650мл) і суміш промивали Et₂O (3×150мл) для видалення надлишку хлорхіноліну (у подальшому було встановлено, що EtOAc ефективніше). Водний шар підкисляли 1н. водним розчином HCl (з розрахунку потрібно 1,5екв., тобто 38мл, брали 43,6мл) до значення pH 4-5. Твердий осад білого кольору виділяли фільтрацією. Вологий твердий продукт сушили при зниженому тиску над P₂O₅, одержуючи пролінове похідне 4В (12,6г, вихід 91%, уміст ДМСО 2,3об.%) у вигляді твердої речовини бежевого кольору:

¹H-ЯМР (DMSO-d₆) (суміш ротамерів 2:1): δ 8,27 (d, J=7,0Гц, 2H), 8,00, 7,98 (2d, J=9,2; ~9,2Гц, 1H), 7,48-7,56 (m, 3H), 7,45, 7,43 (2s, 1H), 7,39 (d, J=2,5Гц, 1H), 7,17 (dd, J=9,2, 2,5Гц, 1H), 5,53-5,59 (m, 1H), 4,34-4,41 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,76 (широкий s, 2H), 2,63-2,73 (m, 1H), 2,32-2,43 (m, 1H), 1,36, 1,33 (2s, 9H).

Елементи структури РІ Приклад 5

Синтез суміші ізомерів (1R, 2R)/(1S, 2R)-1-аміно-2-етилциклопропіл-карбонової кислоти

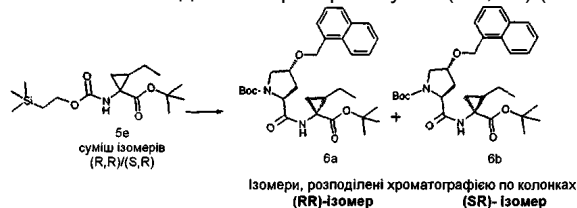
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,78-1,70 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,46 (s, 9H), 1,44-1,39 (m, 1H), 1,26-1,64 (m, 3H), 1,02 (t, 3H, J=7,6Гц).¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 2,09-2,01 (m, 1H), 1,98 (dd, J=3,8, 9,2Гц, 1H), 1,81-1,70 (m, 1H), 1,66 (dd, J=3,0, J=8,2Гц, 1H), 1,63-1,56 (m, 1H), 1,51 (s, 9H), 1,0 (t, J=7,3Гц, 3H).

MC (FAB) 330 (MH^+).

г) До карбамату 5е (258мг, 0,783ммоль) додавали 1,0М розчин ТБАФ у ТГФ (940мкл, 0,94ммоль, 1,2екв.). Через

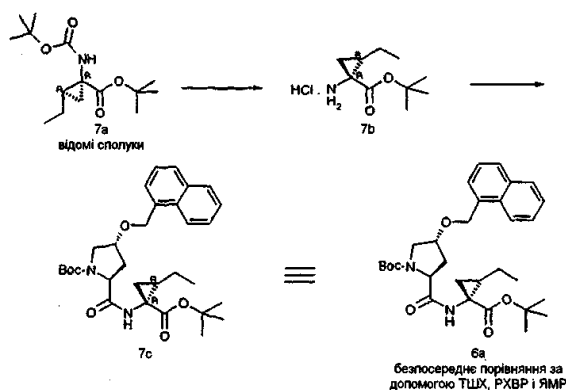
¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 1,96 (шир. s, 2H), 1,60-1,40 (m, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,31-1,20 (m, 1H), 1,14 (dd, J=4,1, 7,3Гц, 1H), 1,02 (dd, J=4,1, 9,2Гц, 1H), 0,94 (t, J=7,3Гц, 3H).

Хімічний поділ ізомерів трет-бутил-(1R,2R)/(1S,2R)-1-аміно-2-етилциклопропілкарбоксилату (із прикладу 5)



Приклад 7

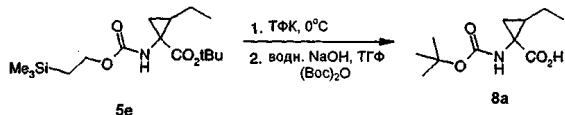
Визначення абсолютної стереохімічної будови сполук 6a і 6b на основі кореляції з відомим трет-бутил(1R-аміно-2R-етилциклопропіл)карбоксилатом



Сполука 7a, що має наведену вище абсолютну стереохімічну будову, що було визначено за допомогою рентгеноструктурного аналізу [J. Am. Chem. Soc., 117, 12721, 1995], було надано проф. А. Charette з Монреальського університету. Сполуку 7a (13,2мг, 0,046ммоль) розчиняли в 1М HCl/EtOAc (240мкл) і перемішували протягом приблизно 48год. Суміш упарювали до висихання, одержуючи сполуку 7b в вигляді пасти світло-жовтого кольору, і здійснювали поєднання зі сполукою 2 (18мг, 0,049ммоль), як це описано в прикладі 10, використовуючи N-MM (20,3мкл, 0,185ммоль) і ГАТУ (21,1мг, 0,056ммоль) у CH₂Cl₂. Неочищений продукт очищали за допомогою експрес-хроматографії (елюент:гексан/Et₂O у співвідношенні 50:50), одержуючи дипептид 7c у вигляді олії (7,7мг; вихід 31%). Шляхом порівняння даних, отриманих за допомогою ТШХ, РХВР і ЯМР, було встановлено, що дипептид 7c ідентичний з менш полярною сполукою 6a, отриманою в прикладі 10, а це свідчить про те, що абсолютна стереохімічна будова сполуки 6a описується як (1R,2R).

Приклад 8

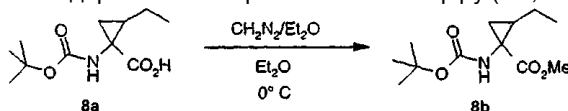
Одержання ізомерів (1R,2R)/(1S,2R)-1-Вос-аміно-2-етилциклопропіл-карбонової кислоти (8a)



Карбамат 5e з прикладу 9 (2,6г, 7,88ммоль) змішували протягом 40хв. із ТФК при 0°C. Потім суміш концентрували і розбавляли ТГФ (10мл). Додавали водний розчин NaOH (700мг, 17,5ммоль у 8,8мл H₂O), а потім розчин (Boc)₂O (2,06г, 9,44ммоль, 1,2екв.) у ТГФ (13мл). Реакційну суміш перемішували протягом ночі при КТ (значення pH підтримували на рівні 8 шляхом додавання в разі потреби 10%-го водного розчину NaOH), а потім розбавляли H₂O, промивали Et₂O (3×) і підкислювали при 0°C з допомогою 10%-го водного розчину лимонної кислоти. Водний шар екстрагували EtOAc (3×) і послідовно промивали H₂O (2×) і соляним розчином. Після звичайного перероблення (MgSO₄), фільтрація і концентрація) виділяли необхідну Вос-захиснену амінокислоту (8a) (788мг, 3,44ммоль, вихід 44%).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,18 (ibh- s, 1H), 1,64-1,58 (m, 2H), 1,55-1,42 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,32-1,25 (m, 1H), 0,99 (t, 3H, J=7,3Гц).

Одержання ізомерів метилового ефіру (1R,2R)/(1S,2R)-1-Вос-аміно-2-етилциклопропілкарбонової кислоти (8b)

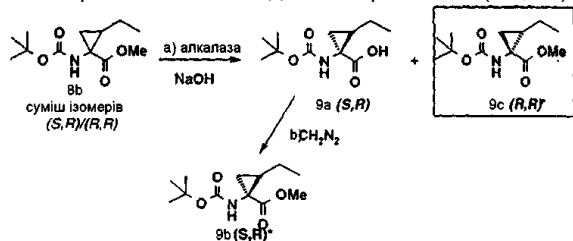


Вос-захиснене похідне 8a (0,30г, 1,31ммоль) розчиняли в Et₂O (10мл) і обробляли свіжоприготовленим діазометаном у Et₂O при 0°C до появи стійкого жовтого кольору, що свідчить про невеликий надлишок діазометану. Після перемішування протягом 20хв. при КТ реакційну суміш концентрували до висихання, одержуючи сполуку 8b в вигляді прозорої безбарвної олії (0,32г, вихід 100%).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,1 (шир. s, 1H), 3,71 (s, 3H), 1,62-1,57 (m, 2H), 1,55 (s, 9H), 1,53-1,43 (m, 1H), 1,28-1,21 (m, 2H), 0,95 (t, J=7,3Гц, 3H).

Приклад 9

Ферментативний поділ ізомерів метил (1R,2R)/(1S,2R)-Вос-1-аміно-2-етилциклопропілкарбоксилату:



*Аналіз за допомогою РХВР на колонці Chiralcel®OD-H

** можуть також використовуватися інші складні ефіри (напр., Et)

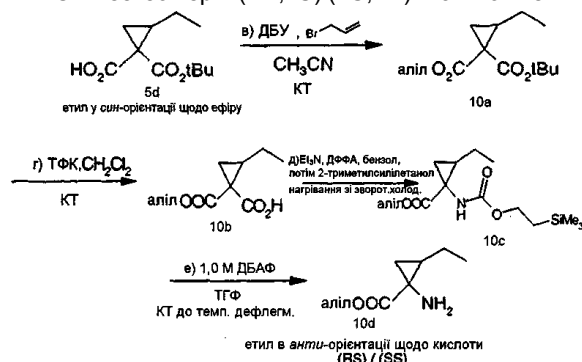
а) Суміш енантіомерів метилового ефіру (1S,2R)/(1R,2R)-1-Вос-аміно-2-етилкарбонової кислоти з прикладу 10 (0,31г, 1,27ммоль) розчиняли в ацетоні (3мл) і потім при інтенсивному перемішуванні розбавляли водою (7мл). Значення pH розчину доводили до 7,5 за допомогою 0,05М водного розчину NaOH, після чого додавали алкалазу Alcalase® [2,4л екстракту, отриманого від фірми Novo Nordisk Industrials] (300мг). У процесі інкубації значення pH стабілізували за допомогою NaOH і вимірювали значення pH для регулювання процесу додавання розчину NaOH. Через 40год суміш розбавляли EtOAc і H₂O (у суміші з 5мл насиченого NaHCO₃) і фази розподіляли. Водну фазу підкислювали за допомогою 10%-ного водного розчину HCl і екстрагували EtOAc, сушили (MgSO₄), фільтрували і

концентрували, одержуючи кислоту 9а (48,5мг). Абсолютну стереохімічну будову визначали за допомогою кореляції, як це описано в прикладах 10 і 11.

б) Обробляючи аліквотну кількість кислоти 9а діазометаном, у Et₂O одержували метиловий ефір, при цьому РХВР-аналіз з використанням хіральної колонки [Chiralcel® OD-H, 2,5% ізопропанол/гексан, ізократичні умови] показав, що співвідношення (S,R)-ізомерів становить 51:1.

Приклад 10

Синтез ізомерів (1R,2S)/(1S,2R)-1-аміно-2-етилциклопропілкарбонової кислоти



Як вихідний продукт використовували кислоту 5d, описану в прикладі 5.

в) До кислоти 5d (1,023г, 4,77ммоль) у CH₃CN (25мл) послідовно додавали ДБУ (860мкл, 5,75ммоль, 1,2екв.) і алілбромід (620мкл, 7,16ммоль, 1,5екв.). Реакційну суміш перемішували протягом 4год. при КТ і потім концентрували. Залишок розбавляли Et₂O і послідовно промивали 10%-им водним розчином лимонної кислоти (2×), H₂O, насиченим водним розчином NaHCO₃, H₂O (2×) і соляним розчином. Після звичайної переробки (MgSO₄), фільтрація і концентрування) виділяли потрібний складний ефір 10а (1,106г, 3,35ммоль, вихід 91%) у вигляді безбарвної олії.

МС (FAB) 255 (M⁺).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,96-5,86 (m, 1H), 5,37-5,22 (m, 2H), 4,70-4,65 (m, 1H), 4,57-4,52 (m, 1H), 1,87-1,79 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,45-1,40 (m, 1H), 1,33-1,24 (m, 3H), 1,03 (t, J=7,3Гц, 3H).

г) До складного ефіру 10а (1,106г, 4,349ммоль) у безводному CH₂Cl₂ (5мл) при КТ додавали ТФК (5мл). Реакційну суміш перемішували протягом 1,5год. і потім концентрували, одержуючи сполуку 10b (854мг, 4,308ммоль, вихід 99%).

МС (FAB) 199 (M⁺).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,99-5,79 (m, 1H), 5,40-5,30 (m, 2H), 4,71-4,62 (m, 2H), 2,22-2,00 (m, 2H), 1,95-1,88 (m, 1H), 1,84-1,57 (m, 2H), 0,98 (t, J=7,3Гц, 3H).

д) До кислоти 10b (853мг, 4,30ммоль) у безводному бензолі (14,8мл) послідовно додавали Et₃N (684 мкл, 4,91ммоль, 1,14екв.) і ДФФА (992мкл, 4,60ммоль, 1,07екв.). Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4,5год., а потім додавали 2-триметилсилілетанол (1,23мл, 8,58ммоль, 2,0екв.). Кип'ятіння зі зворотним холодильником продовжували протягом ночі й потім реакційну суміш розбавляли Et₂O і послідовно промивали 10%-им водним розчином лимонної кислоти, водою, насиченим водним розчином NaHCO₃, водою (2×) і соляним розчином. Після звичайного перероблення (MgSO₄, фільтрація, концентрування) залишок піддавали експрес-хроматографії (5см, від 10 до 15% AcOEt у гексані), одержуючи карбамат 10с (1,212г, 3,866ммоль, вихід 90%) у вигляді олії світло-жовтого кольору.

МС (FAB) 314 (M⁺).

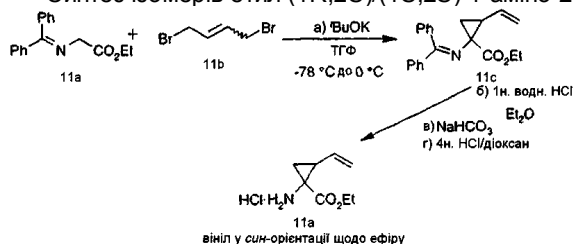
¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,93-5,84 (m, 1H), 5,32-5,20 (m, 2H), 5,05 (шир. s, 1H), 4,60-4,56 (m, 2H), 4,20-4,11 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 3H), 1,39-1,22 (m, 1H), 1,03 (t, J=7,6Гц, 3H), 0,96-0,86 (m, 1H), 0,04 (s, 9H).

е) До карбамату 10с (267мг, 0,810ммоль) додавали 1,0М розчин ТБАФ у ТГФ (1,62мл, 1,62ммоль, 2,0екв.). Реакційну суміш перемішували протягом ночі при КТ, кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30хв. і потім розбавляли AcOEt. Розчин послідовно промивали водою (2×) і соляним розчином. Після звичайного перероблення (MgSO₄, фільтрація і концентрування) виділяли потрібний амін 10d (122мг, 0,721ммоль, вихід 89%) у вигляді рідини світло-жовтого кольору.

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,94-5,86 (m, 1H), 5,31-5,22 (m, 2H), 4,58 (d, J=5,7Гц, 2H), 1,75 (шир. s, 2H), 1,61-1,53 (m, 2H), 1,51-1,42 (m, 2H), 1,00 (t, J=7,3Гц, 3H), 0,70-0,62 (m, 1H).

Приклад 11

Синтез ізомерів етил-(1R,2S)/(1S,2S)-1-аміно-2-вінілциклопропілкарбоксилату



а) До розчину трет-бутоксиду калію (4,62г, 41,17ммоль, 1,1екв.) у ТГФ (180мл) при -78°C додавали наявний у продажу імін 11а (10,0г, 37,41ммоль) у ТГФ (45мл). Реакційну суміш нагрівали до 0°C і перемішували при цій температурі протягом 40хв. Потім суміш знову охолоджували до -78°C, додавали 1,4-дибромбутен 11b (8,0г, 37,40ммоль) і потім перемішували при 0°C протягом 1год. і знову проохолоджували до -78°C, після чого додавали трет-бутоксид калію (4,62г, 41,17ммоль, 1,1екв.). Після цього реакційну суміш перемішували ще протягом більше однієї години при 0°C і концентрували, одержуючи сполуку 11с.

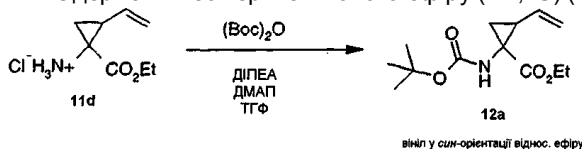
б, в, г) Сполуку 11с розчиняли в Et₂O (265мл) і обробляли 1н. водним розчином HCl (106мл). Після витримання

протягом 3,5 год. при КТ шари розподіляли і водний шар промивали Et₂O (2×) і підлужували насиченим водним розчином NaHCO₃. Потрібний амін екстрагували Et₂O (3×) і об'єднані органічні екстракти промивали соляним розчином. Після звичайного перероблення (MgSO₄, фільтрація і концентрування) залишок обробляли 4н. розчином HCl у діоксані (187мл, 748ммоль). Після концентрування виділяли гідрохлорид 11d у вигляді твердої речовини коричневого кольору (2,467г, 12,87ммоль, вихід 34%).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 9,17 (шир. s, 3H), 5,75-5,66 (m, 1H), 5,39 (d, J=17,2Гц, 1H), 5,21 (d, J=10,2Гц, 1H), 4,35-4,21 (m, 2H), 2,77-2,70 (m, 1H), 2,05 (dd, J=6,4, 10,2Гц, 1H), 1,75 (dd, J=6,4, 8,3Гц, 1H), 1,33 (t, J=7,0Гц, 3H).

Приклад 12

Одержання ізомерів етилового ефіру (1R,2S)/(1S,2S)-1-Вос-аміно-2-вінілциклопропілкарбонової кислоти

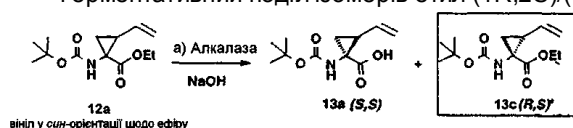


Гідрохлорид 11d (1,0г, 5,2ммоль) і (BOC)₂O (1,2г, 5,7ммоль) розчиняли в ТГФ (30мл) і обробляли ДМАП (0,13г, 1,04ммоль, 0,2екв.) і діізопропілетиламіном (2,8мл, 15,6ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 24 год., після чого розбавляли EtOAc (40мл) і промивали послідовно насиченим розчином NaHCO₃ (водний), 5%-им водним розчином HCl і насиченим соляним розчином. Органічну фазу сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи після очищення за допомогою експрес-хроматографії (15%-ний EtOAc/гексан) сполука 12a (0,29г, вихід 23%).

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 5,80-5,72 (m, 1H), 5,29-5,25 (dd, J=17,2, 17,2Гц, 1H), 5,24-5,1 (шир. s, 1H), 5,10 (dd, J=9,2, 9,2Гц, 1H), 4,22-4,13 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 1H), 1,85-1,73 (шир. s, 1H), 1,55-1,5 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,26 (t, J=7,3Гц, 3H).

Приклад 13

Ферментативний поділ ізомерів етил-(1R,2S)/(1S,2S)-аміно-2-вінілциклопропілкарбоксилату



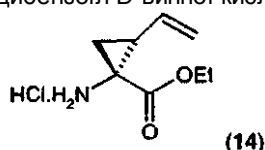
*Аналіз за допомогою РХВР на колонці Chiralcel® OD-H

а) Похідне 12a у вигляді рацемічної суміші (0,29г, 1,14ммоль) розчиняли в ацетоні (5мл) і розбавляли H₂O (10мл). Значення рН доводили до 7,2 за допомогою 0,2н. водного розчину NaOH, після чого додавали алкалазу Alcalase® (300mg). Щоб підтримати значення рН під час інкубації на постійному рівні за допомогою статичного титратора рН протягом 9 днів додавали розчин NaOH доти, доки не була додана теоретично розрахована кількість основи. Після екстракції кислотою/основою, як це описано в прикладі 13, виділяли негідролізований складний ефір (0,15г, вихід 100%) і гідролізований продукт (0,139г, вихід 95%). Шляхом аналізу негідролізованого складного ефіру за допомогою РХВР із використанням хіральної колонки було встановлено, що співвідношення потрібної сполуки 17с становить 43:1. Сполука 206 (де R₁ позначає вініл, таблиця 2) гідрували (10,8мг, 0,015ммоль) у 1мл EtOH за наявності приблизно 1мл 20%-го Pd(OH)₂ при тиску 1атм. H₂ протягом 45хв.), одержуючи сполуку 214 (де R₁ позначає етил, таблиця 2). На основі хімічної кореляції відповідно до методу, описаного в прикладах 6 і 7, було встановлено, що стереохімічна будова сполуки 206 (R₁ позначає вініл) відповідає (R,S), і воно має таку ж абсолютну конфігурацію, що і сполука 13с (хоча воно описується як 1R,2S, оскільки R₁ позначає вініл).

Умови проведення аналізу за допомогою РХВР: Chiralcel® OD-H (4,6мм×25см), ізократичні умови з використанням як рухомої фази 2,5%-го ізопропанолу/гексану.

Приклад 14

Поділ ізомерів (1R,2S)/(1S,2S)-1-аміно-2-вінілциклопропілкарбоксилату шляхом кристалізації за допомогою дибензоїл-D-винної кислоти



До розчину неочищеної рацемічної суміші (1S,2S)- і (1R, 2S)-ізомерів етил-і-аміно-2-вінілциклопропілкарбоксилату [отриманого з етилового ефіру M-(дифенілметил)гліцину (25,0г, 93,5ммоль) відповідно до прикладу 15] у EtOAc (800мл) додавали дибензоїл-D-винну кислоту (33,5г, 93,5ммоль). Суміш нагрівали до температури дефлегмації, витримували при КТ протягом 15хв., а потім прохолоджували до 0°C Через 30хв. одержували тверду речовину білого кольору. Цю тверду речовину відфільтровували, промивали EtOAc (100мл) і сушили на повітрі. Тверду речовину суспендували в ацетоні (70мл), обробляли ультразвуком і фільтрували (3×). Потім тверду речовину двічі перекристалізовували в гарячому ацетоні (партія А). Маткові розчини концентрували і залишок тричі перекристалізовували в гарячому ацетоні (партія Б). Дві партії солі дибензоїл-D-винної кислоти у вигляді аморфного твердого продукту білого кольору поєднували (5,53г) і суспендували в суміші Et₂O (250мл) і насичений розчин NaHCO₃ (150мл). Органічний шар промивали соляним розчином, сушили (MgSO₄) і фільтрували. Фільтрат розбавляли 1н. HCl/Et₂O (100мл) і концентрували при зниженому тиску. Маслянистий залишок упарювали зі CCl₄, одержуючи гідрохлорид етил-1-(R)-аміно-2-(S)-вінілциклопропанкарбоксилату (940мг, вихід 11%) у вигляді гігроскопічної твердої речовини білого кольору, абсолютну стереохімічну будову якої було встановлено на основі кореляції зі сполукою 13с із прикладу 13.

[α]_D²⁵+39,5°C (з 1,14 MeOH).

[α]₃₆₅²⁵+88,5°C (з 1,14 MeOH).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆): δ 9,07 (шир. s, 2H), 5,64 (ddd, J=17,2, 10,4, 8,7Гц, 1H), 5,36 (dd, J=17,2, 1,6Гц, 1H), 5,19 (dd,

J=10,4, 1,6Гц, 1H), 4,24-4,16 (m, 2H), 2,51-2,45 (m, виділенню піків перешкоджав ДМСО, 1H), 1,84 (dd, J=10,0, 6,0Гц, 1H), 1,64 (dd, J=8,3, 6,0Гц, 1H), 1,23 (t, J=7,1Гц, 3H).

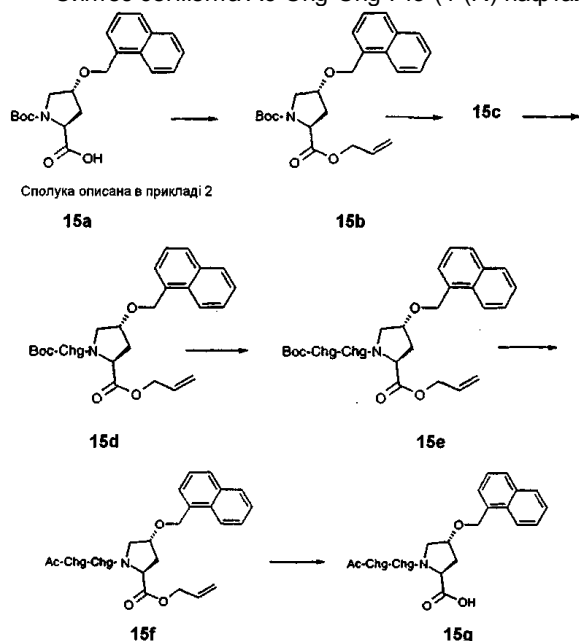
МС (ESI) m/z 156 (MH)⁺.

Чистота енантіомера Вос-захищеного похідного за даними РХВР-аналізу становила 91% (колонка типу CHIRALPAK AS®, гексан/ізо-PrOH) (приклад 13).

Елементи структури P4-P2

Приклад 15

Синтез сегмента Ас-Сhg-Сhg-Про-(4-(R)-нафталін-1-ілметокси)-ОН 15g



Сполука 15a (ідентична зі сполукою 2 із прикладу 2) (4,45г, 11,98ммоль) розчиняли в безводному CH₃CN (60мл), послідовно додавали ДБУ (2,2мл, 14,38ммоль) і алілбромід (1,1мл, 13,18ммоль) і реакційну суміш примішували при КТ протягом 24год. Суміш концентрували, олію, що утворилася, розбавляли EtOAc і водою, послідовно промивали водою (2×) і соляним розчином (1×). Етилацетатами шар сушили (MgSO₄), фільтрували й упарювали до висихання. Олію жовтого кольору, що утворилася, очищали експрес-хроматографією (елюент: гексан/EtOAc у співвідношенні від 90:10 до 85:15), одержуючи продукт 15b у вигляді олії жовтого кольору (2,417г; вихід 85%).

¹H-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів у співвідношенні приблизно 1:2: δ (d, J=8Гц, 1H), 7,87 (d, J=8Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,55-7,41 (m, 4H), 5,95-5,85 (m, 1H), 5,34-5,21 (m, 2H), 5,03-4,88 (m, 2H), 4,70-4,56 (m, 2H), 4,48 і 4,39 (t, J=8, 15Гц, 1H), 4,28-4,23 (m, 1H), 3,81-3,55 (m, 2H), 2,46-2,36 (m, 1H), 2,13-2,05 (m, 1H), 1,44 і 1,41 (s, 9H).

Сполуку 15b (2,08г, 5,05ммоль) обробляли протягом 30хв. при КТ сумішню 4н. HCl/діоксан. Після розпарювання до висихання одержували відповідний гідрохлорид аміну в вигляді олії. Гідрохлорид аміну 15с розчиняли в безводному ДХМ (25мл) і послідовно додавали N-MM (2,2мл, 20,22ммоль), Вос-Сhg-ОН·H₂O (1,53г, 5,56ммоль) і ТБТУ (1,95г, 6,07ммоль). Реакційну суміш перемішували при КТ протягом ночі, а потім розбавляли EtOAc і послідовно промивали 10%-им водним розчином лимонної кислоти (2×), насиченим водним розчином NaHCO₃ (2×), водою (2×) і соляним розчином (1×). Етилацетатний шар сушили (MgSO₄), фільтрували й упарювали до висихання, одержуючи продукт 15d у вигляді піни жовтувато-білого кольору (приблизно 2,78г, вихід 100%).

МС (FAB) 551,4 MH⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 8,03 (d, J=8Гц, 1H), 7,86 (шир. d, J=8,5Гц, 1H), 7,84 (d, J=8Гц, 1H), 7,56-7,40 (m, 4H), 5,92-5,85 (m, 1H), 5,31 (dd, J=1,17Гц, 1H), 5,22 (dd, J=1,10Гц, 1H), 5,17 (d, J=9Гц, 1H), 5,05 (d, J=12Гц, 1H), 4,91 (d, J=12Гц, 1H), 4,67-4,60 (m, 3H), 4,31-4,27 (m, 2H), 4,16 (шир. d, J=11Гц, 1H), 3,71 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,47-2,41 (m, 1H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,85-1,63 (m, 5H), 1,44-1,40 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,28-1,00 (m, 5H).

Неочищений дипептид 15d (приблизно 5,05ммоль) обробляли сумішню 4н. HCl/діоксан (25мл), як це описано для синтезу сполуки 15с.

Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Вос-Сhg-ОН·H₂O (1,53г, 5,55ммоль) за допомогою N-MM (2,22мл, 20,22ммоль) і ТБТУ (1,95г, 6,07ммоль) у DCM (25мл), як це описано для синтезу сполуки 15d, одержуючи неочищений трипептид 15е у вигляді маслянистої піни жовтого кольору. Неочищений продукт очищали за допомогою експрес-хроматографії (елюент: гексан/EtOAc у співвідношенні від 80:20 до 75:25), одержуючи трипептид 15е у вигляді піни білого кольору (2,75г; вихід 79% по двох стадіях).

МС (FAB) 690,5 MH⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃), в основному один ротамер: δ 8,06 (d, J=8Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=8,5Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,57-7,40 (m, 4H), 6,41 (d, J=8,5Гц, 1H), 5,92-5,84 (m, 1H), 5,31 (dd, J=1, 17Гц, 1H), 5,23 (dd, J=1, 10,5Гц, 1H), 5,04 (d, J=12Гц, 1H), 4,98 (шир. d, J=7Гц, 1H), 4,93 (d, J=12Гц, 1H), 4,63-4,58 (m, 4H), 4,29-4,25 (m, 1H), 4,10-4,07 (m, 1H), 3,90-3,84 (m, 1H), 3,72 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,48-2,40 (m, 1H), 2,07-1,99 (m, 1H), 1,83-1,55 (m, 12H), 1,43 (s, 9H), 1,23-0,89 (m, 10H).

Трипептид 15е (2,75г 3,99ммоль) обробляли сумішню 4н. HCl/діоксан (20мл), як це описано для синтезу сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид розчиняли в безводному ДХМ (20мл). Послідовно додавали N-MM (1,75мл, 15,94ммоль) і оцтовий ангідрид (752мкл, 7,97ммоль). Реакційну суміш перемішували при КТ протягом ночі й потім розбавляли EtOAc. Органічний шар послідовно промивали 10%-им водним розчином лимонної кислоти (2×), насиченим водним

розчином NaHCO_3 (2х), водою (2х) і соляним розчином (1х), сушили (MgSO_4), фільтрували й упарювали до висихання, одержуючи неочищений трипептид 15f у вигляді піни білого кольору (2,48г, вихід 98%). МС(FAB) 632,4 МН+1.

^1H -ЯМР (CDCl_3), в основному один ротамер: δ 8,06 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,83 (d, J=8Гц, 1H), 7,58-7,40 (m, 4H), 6,36 (d, J=9Гц, 1H), 6,01 (d, J=9Гц, 1H), 5,94-5,83 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 5,25-5,21 (m, 1H), 5,05 (d, J=12Гц, 1H), 4,94 (d, J=12Гц, 1H), 4,64-4,57 (m, 4H), 4,30-4,23 (m, 2H), 4,12-4,08 (m, 1H), 3,73 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,49-2,42 (m, 1H), 2,08-2,01 (m, 1H), 1,99 (s, 3H), 1,85-1,53 (m, 11H), 1,25-0,88 (m, 11H).

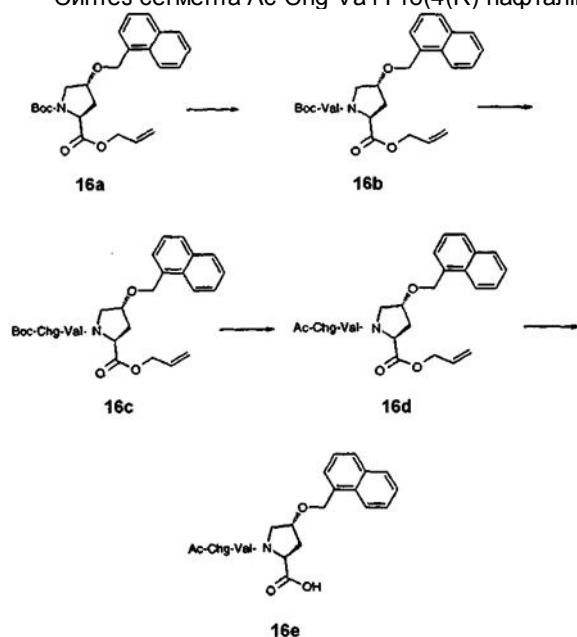
Неочищений трипептид 15f (2,48г, 3,93ммоль) розчиняли в безводній суміші $\text{CH}_3\text{CN}/\text{ДХМ}$ (20мл). Послідовно додавали трифенілфосфин (53,5мг, 0,200ммоль) і тетракіс(трифенілфосфин)палладій(0) як каталізатор (117,9мг, 0,102ммоль), а потім піролідін (353,9мкл, 4,24ммоль). Реакційну суміш перемішували при КТ протягом 18год. Після цього розчинник випарювали. Залишок розчиняли в EtOAc і 10%-му водному розчині лимонної кислоти і потім промивали ще двічі 10%-им водним розчином лимонної кислоти, водою (2х) і соляним розчином (1х). Органічний шар сушили (MgSO_4), фільтрували й упарювали. Неочищений продукт розтирали в $\text{Et}_2\text{O}/\text{ДХМ}$ (85:15), одержуючи після фільтрації трипептид 15g у вигляді твердої речовини білого кольору (2,09г, вихід 90%).

МС (FAB) 592,4 МН⁺; 614,3 (M+Na)⁺.

^1H -ЯМР (CDCl_3), в основному один ротамер: δ 8,08 (d, J=8Гц, 1H), 7,93 (шир. d, J=9Гц, 1H), 7,88 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,57-7,41 (m, 4H), 6,47 (d, J=8,5Гц, 1H), 5,05 (d, J=12,5Гц, 1H), 4,94 (d, J=12,5Гц, 1H), 4,73 (t, J=9,5, 19Гц, 1H), 4,44-4,35 (m, 2H), 4,26 (шир. s, 1H), 4,19 (d, J=11,5Гц, 1H), 3,75 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,47 (шир. dd, J=7,5, 13,5Гц, 1H), 2,20-2,11 (m, 1H), 2,04 (s, 3H), 1,88-1,41 (m, 11H), 1,30-0,80 (11H).

Приклад 16

Синтез сегмента Ас-Chg-Va I-Pro(4(R)-нафталін-1-ілметокси)-ОН (16e)



Сполуку 16a (22,89г, 7,02ммоль) обробляли сумішшю 4н. HCl /діоксан (30мл), як це описано для синтезу сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Boc-Val-OH (1,53г, 7,73ммоль) з N-MM (3,1мл, 28,09ммоль) і ТБТУ (2,71г, 8,43ммоль) у ДХМ (35мл) протягом 3,5год., як це описано для синтезу сполуки 15d, одержуючи неочищений дипептид 16b у вигляді маслянистої піни кольору слонової кістки (приблизно 3,60г, вихід 100%).

МС (FAB) 509,3 МН⁺, 511,3 МН⁺, 533,2 (M+Na)⁺.

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ 8,04 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=7Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,56-7,40 (m, 4H), 5,93-5,85 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 5,24-5,19 (m, 2H), 5,04 (d, J=12Гц, 1H), 4,92 (d, J=12Гц, 1H), 4,67-4,60 (m, 3H), 4,31-4,26 (m, 2H), 4,11-4,09 (m, 1H), 3,72 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,48-2,41 (m, 1H), 2,07-1,99 (m, 1H), 1,44-1,36 (m, 1H), 1,37 (s, 9H), 1,01 (d, J=7Гц, 3H), 0,93 (d, J=7Гц, 3H).

Неочищений дипептид 16b (приблизно 7,02ммоль) обробляли сумішшю 4н. HCl /діоксан (30мл), як це описано для синтезу сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з $\text{Boc-Chg-OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2,13г, 7,73ммоль) з N-MM (3,1мл, 28,09ммоль) і ТБТУ (2,71г, 8,43ммоль) у CH_2Cl_2 (35мл), як це описано для синтезу сполуки 15d, одержуючи неочищений трипептид 16с у вигляді піни кольору слонової кістки (приблизно 4,6г, вихід 100%).

МС (FAB) 648,5 МН⁺, 672,4 (M+Na)⁺.

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ 8,06 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,82 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,57-7,40 (m, 4H), 6,46 (шир. d, J=8,5Гц, 1H), 5,94-5,84 (m, 1H), 5,31 (dd, J=1,17Гц, 1H), 5,23 (dd, J=1,10,5Гц, 1H), 5,03 (d, J=12Гц, 1H), 5,00-4,97 (m, 1H), 4,93 (d, J=12Гц, 1H), 4,63-4,59 (m, 4H), 4,29-4,27 (m, 1H), 4,10-4,07 (m, 1H), 3,92-3,86 (m, 1H), 3,72 (dd, J=5, 11Гц, 1H), 2,48-2,41 (m, 1H), 2,10-1,99 (m, 1H), 1,76-1,57 (m, 6H), 1,43 (s, 9H), 1,20-0,92 (m, 6H), 1,00 (d, J=7Гц, 3H), 0,93 (d, J=7Гц, 3H).

Неочищений трипептид 16с (приблизно 7,02ммоль) обробляли сумішшю 4н. HCl /діоксан (30мл), як це описано для синтезу сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид потім обробляли оцтовим ангідридом (1,33мл, 14,05ммоль) і N-MM (3,1мл, 28,09ммоль) у CH_2Cl_2 (35мл), як це описано для синтезу сполуки 15d. Неочищений продукт піддавали очищенню за допомогою експрес-хроматографії (елюент: гексан/ EtOAc у співвідношенні 30:70), одержуючи ацетильований захищений трипептид 16d у вигляді піни білого кольору (3,39г, вихід 81% по 3 стадіях).

МС (FAB) 590,3 МН⁺, 592,4 МН⁺, 614,4 (M+Na)⁺.

^1H -ЯМР (CDCl_3), в основному один ротамер: δ 8,06 (d, J=8Гц, 1H), 7,88 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,83 (d, J=8Гц, 1H), 7,58-

7,41 (m, 4H), 6,37 (d, J=9Гц, 1H), 5,97 (d, J=8,5Гц, 1H), 5,94-5,84 (m, 1H), 5,31 (dd, J=1, 17Гц, 1H), 5,24 (dd, J=1, 10,5Гц, 1H), 5,05 (d, J=12Гц, 1H), 4,94 (d, J=12Гц, 1H), 4,66-4,57 (m, 4H), 4,31-4,22 (m, 2H), 4,11-4,05 (m, 1H), 3,73 (dd, J=4,5, 11Гц, 1H), 2,50-2,43 (m, 1H), 2,09-2,01 (m, 2H), 2,00 (s, 3H), 1,68-1,55 (m, 5H), 1,15-0,89 (m, 6H), 0,99 (d, J=7Гц, 3H), 0,91 (d, J=7Гц, 3H).

В ацильованому трипептиді 16d (3,39г, 5,73ммоль) видаляли захисну групу за допомогою тетракіс(трифенілфосфін) паладію (0) як каталізатор (172,1мг, 0,149ммоль) із трифенілфосфіном (78,1мг, 0,298ммоль) і піролідином (516мкл, 6,19ммоль) у суміші 1:1 безводного CH₃CN/ДХМ (30мл), як це описано для синтезу сполуки 15g. Неочищений продукт у вигляді піни світло-жовтого кольору розтирали в суміші Et₂O/ДХМ (85:15), одержуючи після фільтрації трипептид 16e у вигляді білуватої твердої речовини (3,0г; вихід 95%).

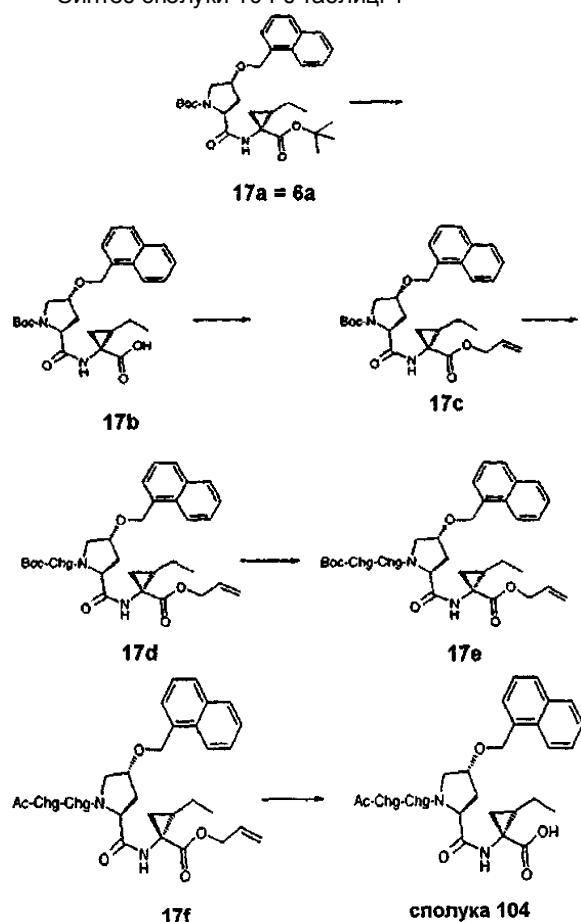
МС (FAB) 550,3 МН⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃): δ 8,08 (d, J=8Гц, 1H), 8,04 (шир. d, J=9Гц, 1H), 7,88 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,58-7,37 (m, 5H), 5,05 (d, J=12Гц, 1H), 4,94 (d, J=12Гц, 1H), 4,61 (t, J=9,5, 19,5Гц, 1H), 4,46-4,37 (m, 2H), 4,27 (шир. s, 1H), 4,17 (d, J=11Гц, 1H), 3,74 (dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,49 (шир. dd, J=7,5, 13Гц, 1H), 2,17-2,09 (m, 1H), 2,04 (s, 3H), 2,03-1,94 (m, 1H), 1,79 (шир. d, J=12,5Гц, 1H), 1,62-1,43 (m, 5H), 1,08-0,85 (m, 5H), 1,00 (d, J=7Гц, 3H), 0,90 (d, J=7Гц, 3H).

Сполуки з таблиць 1-4

Приклад 17

Синтез сполуки 104 з таблиці 1



Сполуку 17a (4,27г, 7,93ммоль, сполуку 6a в прикладі 6) обробляли сумішшю 4н. HCl/діоксан (40мл) протягом 5год., як це описано для сполуки 15c. Неочищений гідрохлорид розчиняли в ТГФ (10мл) і додавали розчин NaOH (348,7мг, 8,72ммоль) у H₂O (5мл), після чого краплями додавали (Boc)₂O (1,73г, 7,93ммоль), розчинений у ТГФ (13мл). Значення pH підтримували на рівні 8, додаючи в разі потреби 10%-ий водний розчин. Реакційну суміш інтенсивно перемішували, а потім розбавляли Et₂O і H₂O і екстрагували більш ніж один раз Et₂O. Водний шар підкислювали до pH3 за допомогою 10%-го водного розчину лимонної кислоти. Суміш екстрагували EtOAc (3×). Об'єднані EtOAc-екстракти промивали H₂O (2×), соляним розчином (1×), сушили (MgSO₄), фільтрували й упарювали до висихання, одержуючи неочищену сполуку 17b у вигляді піни кольору слонов'ячої кістки (приблизно 7,93ммоль).

МС (FAB) 481,3 МН⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів приблизно 1:1:5 8,04 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,82 (d, J=7,5Гц, 1H), 7,56-7,40 (m, 5H), 4,96 (шир. s, 2H), 4,33 (t, J=7,5, 14,5Гц, 1H), 4,21-4,09 (m, 0,5H), 3,99-3,84 (m, 0,5H), 3,78-3,75 (m, 0,5H), 3,68-3,62 (m, 0,5H), 3,61-3,42 (m, 1H), 2,55-2,41 (m, 1H), 2,22-2,11 (m, 1H), 1,61-1,52 (m, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,40-1,31 (m, 1H), 1,25-1,19 (m, 1H), 0,99 (t, J=7,5, 14,5Гц, 3H).

Сполуку 17b (приблизно 7,93ммоль) обробляли ДБУ (1,18мл, 93ммоль) і алілбромідом (4,12мл, 47,61ммоль) у безводному CH₃CN (40мл) протягом 48год., як це описано для сполуки 15b, одержуючи алілований дипептид 17c у вигляді піни кольору слонов'ячої кістки (3,54г; 86% вихід по 2 стадіях).

МС (FAB): 521,3 МН⁺, 545,2 (M+Na)⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів приблизно 1:1:5 8,05 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,86 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,82 (d, J=8Гц, 1H), 7,55-7,40 (m, 5H), 5,88-5,79 (m, 1H), 5,27 (шир. d, J=17,5Гц, 1H), 5,18 (шир. d, J=10Гц, 1H), 5,03-4,89 (m, 2H), 4,63-4,50 (m, 2H), 4,44-4,19 (m, 2H), 4,00-3,40 (m, 2H), 2,70-2,02 (m, 2H), 1,66-1,35 (m, 5H), 1,44 (s, 9H), 0,95 (t, J=7,5,

14,5Гц, 3Н).

Неочищений дипептид 17с (1,18г, 2,26ммоль) обробляли сумішшю 4н. НСІ/діоксан (35мл), як це описано для сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Вос-Сhg-ОН·Н₂О (684мг, 2,48ммоль) з N-MM (993мкл, 9,03ммоль) і ТБТУ (870мг, 2,71ммоль) у ДХМ (11мл), як це описано для сполуки 15d, одержуючи неочищений трипептид 17d у вигляді піни кольору слонової кістки (1,41г; 95%).

МС (FAB): 660,4 МН⁺, 662,3 МН⁺.

¹Н-ЯМР (CDCl₃), в основному один ротамер: δ 8,03 (шир. d, J=8Гц, 1Н), 7,85 (шир. d, J=8Гц, 1Н), 7,81 (d, J=8Гц, 1Н), 7,56-7,39 (m, 5Н), 5,88-5,77 (m, 1Н), 5,26 (dd, J=1,5, 17Гц, 1Н), 5,15 (dd, J=1,5, 10,5Гц, 1Н), 5,12 (s, 1Н), 5,02-4,92 (m, 2Н), 4,72-4,59 (m, 1Н), 4,57-4,46 (m, 1Н), 4,42-4,35 (m, 1Н), 4,33-4,20 (m, 1Н), 4,02-3,90 (m, 1Н), 3,78-3,70 (m, 1Н), 3,67-3,51 (m, 1Н), 2,71-2,61 (m, 1Н), 2,12-2,02 (m, 1Н), 1,79-1,48 (m, 10Н), 1,45-1,39 (m, 1Н), 1,38 (s, 9Н), 1,25-1,01 (m, 5Н), 0,94 (t, J=7,5, 14Гц, 3Н).

Неочищений трипептид 17d (265мг, 0,400ммоль) обробляли сумішшю 4н. НСІ/діоксан (3мл), як це описано для сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Вос-Сhg-ОН·Н₂О (143,3мг, 0,521ммоль) з N-MM (176мкл, 1,60ммоль) і ТБТУ (154,3мг, 0,481ммоль) у ДХМ (3мл), як це описано для сполуки 15d, одержуючи неочищений тетрапептид 17е у вигляді піни кольору слонової кістки (приблизно 0,400ммоль; 100%).

МС (FAB): 799,5 МН⁺, 801,5 МН⁺, 823 (М+Na)⁺.

¹Н-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів приблизно 1:1: δ 8,05 (шир. d, J=8,5Гц, 1Н), 7,87 (шир. d, J=7,5Гц, 1Н), 7,81 (d, J=8,5Гц, 1Н), 7,55-7,40 (m, 4Н), 7,37 (s, 1Н), 6,58-6,41 (m, 1Н), 5,89-5,78 (m, 1Н), 5,26 (шир. dd, J=1,5, 17Гц, 1Н), 5,16 (шир. dd, J=1,5, 10,5Гц, 1Н), 5,01 (d, J=12Гц, 1Н), 4,96 (d, J=12Гц, 1Н), 4,68-4,58 (m, 2Н), 4,57-4,47 (m, 1Н), 4,43-4,26 (m, 1Н), 3,99-3,81 (m, 2Н), 3,78-3,60 (m, 2Н), 2,67-2,60 (m, 1Н), 2,11-2,02 (m, 1Н), 1,78-1,42 (m, 14Н), 1,44-1,43 (s, 9Н), 1,25-0,91 (m, 13Н), 0,95 (t, J=7,5, 15Гц, 3Н).

Неочищений тетрапептид 17е (приблизно 0,400ммоль) обробляли сумішшю 4н. НСІ/діоксан (3мл), як це описано для сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид потім обробляли оцтовим ангідридом (83мкл, 0,884ммоль) і N-MM (194мкл, 1,77ммоль) у ДХМ (3мл), як це описано для сполуки 15f, одержуючи неочищений ацетилюваний тетрапептид 17f у вигляді піни кольору слонової кістки (приблизно 0,400ммоль).

МС (FAB): 741,5 МН⁺, 743,4 МН⁺, 765,4 (М+Na)⁺.

¹Н-ЯМР (CDCl₃): δ 8,05 (шир. d, J=8,5Гц, 1Н), 7,87 (шир. d, J=7,5Гц, 1Н), 7,82 (d, J=8,5Гц, 1Н), 7,55-7,41 (m, 4Н), 7,39 (s, 1Н), 6,63-6,48 (m, 1Н), 6,01 (d, J=8,5Гц, 1Н), 5,90-5,79 (m, 1Н), 5,27 (шир. dd, J=1,5, 17Гц, 1Н), 5,16 (шир. dd, J=1,5, 10,5Гц, 1Н), 5,01 (d, J=12Гц, 1Н), 4,96 (d, J=12Гц, 1Н), 4,69-4,48 (m, 3Н), 4,44-4,37 (m, 1Н), 4,36-4,22 (m, 1Н), 3,96 (dd, J=4, 11Гц, 1Н), 3,78-3,60 (m, 2Н), 2,67-2,59 (m, 1Н), 2,10-2,00 (m, 1Н), 2,01 (s, 3Н), 1,78-1,48 (m, 13Н), 1,45-1,35 (m, 1Н), 1,26-0,89 (m, 13Н), 0,95 (t, J=7,5, 15Гц, 3Н).

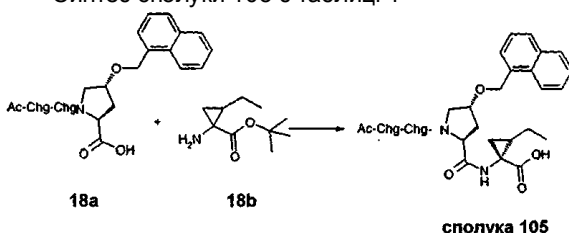
В ацетилюваному тетрапептиді 17f (приблизно 0,400ммоль) видаляли захисну групу в присутності тетракіс(трифенілфосфін) паладію (0) як каталізатора (11,3мг, 0,010ммоль) із трифенілфосфіном (5,12мг, 0,020ммоль) і піролідином (34мкл, 0,406ммоль) у суміші 1:1 безводний СН₃CN/ДХМ (2мл), як це описано для сполуки 15g. Неочищений продукт очищували експрес-хроматографією (елюент: 1-ий EtOAc, потім 2-ий 1,92% HOAc, 3,85% MeOH у ДХМ), одержуючи після ліофілізації сполуку, що являє собою тетрапептид 104 з таблиці 1 у вигляді білуватої аморфної твердої речовини (193,1мг; вихід 73% по 5 стадіях).

МС (FAB): 701,4 МН⁺, 703,4МН⁺, 725,4 (М+Na)⁺.

¹Н-ЯМР (DMSO), суміш приблизно 1:5 ротамерів: δ 8,57 і 8,32 (s, 1Н), 8,04 (d, J=7,5Гц, 1Н), 7,94 (шир. d, J=7,5Гц, 1Н), 7,88 (d, J=8Гц, 1Н), 7,83-7,78 (m, 2Н), 7,58-7,30 (m, 4Н), 4,99 (d, J=12Гц, 1Н), 4,90 (d, J=12Гц, 1Н), 4,44-4,29 (m, 2Н), 4,29-4,05 (m, 3Н), 3,87-3,73 (m, 1Н), 2,23-2,13 (m, 1Н), 2,05-1,95 (m, 1Н), 1,91 і 1,84 (s, 3Н), 1,75-1,40 (m, 15Н), 1,29-0,84 (m, 12Н), 0,91 (t, J=7,5, 14,5Гц, 3Н).

Приклад 18

Синтез сполуки 105 з таблиці 1



Сполуку 5f із прикладу 5 піддавали реакції поєднання з попередньо отриманим трипептидом 18а, описаним вище в прикладі 15. Зокрема, сполуку 18b (приблизно 0,521ммоль) поєднували зі сполукою 18а (323,6мг, 0,547ммоль) у ДХМ (3мл) і N-MM (172мкл, 1,562ммоль), а потім додавали ГАТУ (237,6мг, 0,625ммоль). Реакційну суміш перемішували при КТ протягом 18год., після чого, працюючи аналогічно до того, як це описано для сполуки 15d, одержували неочищений тетрапептид у вигляді рацемічної суміші відносно Р1. Обидва ізомери частково очищали за допомогою експрес-хроматографії (елюент: толуол/EtOAc у співвідношенні 40:60). Після об'єднання елююваних першими фракцій одержували суміш 9:1, у якій основним компонентом був аналогічний складний трет-бутиловий ефір сполуки 17f (58мг). Елюювані в середині фракції містили різні співвідношення відповідних складних трет-бутилових ефірів сполуки 17f і складного трет-бутилового ефіру сполуки 105 (163мг). Елюювані останніми фракції містили як основний компонент відповідний складний трет-бутиловий ефір сполуки 105 (75,8мг).

Останній ефір (74мг, 0,0975ммоль) розчиняли в суміші 4н. НСІ/діоксан (2мл), перемішували при КТ протягом 5,5год. і потім упарювали до висихання, одержуючи олію. Після очищення за допомогою експрес-хроматографії (елюент: 1-ий EtOAc, потім 2-ий 1,92% HOAc, 3,85% MeOH у ДХМ) одержували після ліофілізації сполуку 105 у вигляді аморфної твердої речовини білого кольору (38,7мг, вихід 56%). РХВР-аналіз показав наявність суміші 3:1 сполуки 105 і сполуки 104. Дані, отримані за допомогою МС і ЯМР для сполуки 105:

МС (FAB): 701,5 МН⁺, 703,5 МН⁺, 725,6 (М+Na)⁺;

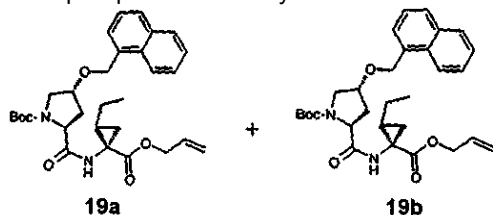
¹Н-ЯМР (DMSO), суміш ротамерів приблизно 1:2,5: δ 8,76 і 8,34 (s, 1Н), 8,05 (шир. d, J=7,5Гц, 1Н), 7,94 (шир. d,

J=8Гц, 1H), 7,88 (d, J=8,5Гц, 1H), 7,85-7,78 (m, 2H), 7,59-7,43 (m, 4H), 4,99 (d, J=12Гц, 1H), 4,89 (d, J=12Гц, 1H), 4,41-4,05 (m, 5H), 3,82-3,66 (m, 1H), 2,25-2,11 (m, 1H), 2,11-1,98 (m, 1H), 1,90 і 1,84 (s, 3H), 1,78-1,40 (m, 15H), 1,39-0,82 (m, 12H), 0,90 (t, J=7, 14Гц, 3H).

Приклад 19

Синтез сполук 103 з таблиці 1

Працюючи аналогічно до процедури, описаної для синтезу сполуки 104 із прикладу 17, суміш 1(R)-,2(R)- і 1(R),2(S)-ізомерів проміжної сполуки 10d, отриманої в прикладі 10, піддавали реакції поєднання зі сполукою 2, одержуючи суміш ізомерів проміжних сполук 19a і 19b.



Аналогічно до прикладу 18, ізомерні сполуки 19a і 19b розподіляли і перетворювали на відповідну сполуку формули 1 для виділення відповідної сполуки 103 з таблиці 1.

Дані спектрального аналізу:

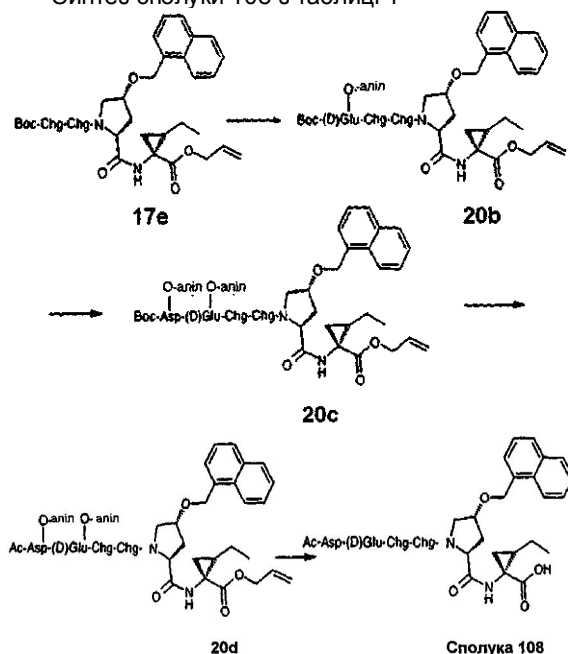
Сполука 103: співвідношення ротамерів, виявлене за допомогою ЯМР, становить приблизно (1:8,7):

МС (FAB) m/z: 703 (M⁺);

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆): δ 8,21-8,09 (шир.s, 1H), 8,05 (шир.d, J=7,63Гц, 1H), 7,94 (шир.d, J=7,0Гц, 1H), 7,91-7,83 (m, 2H), 7,83-7,76 (m, 1H), 7,59-7,5 (m, 3H), 7,5-7,43 (m, 1H), 4,99 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,89 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,43-4,30 (m, 3H), 4,23-4,16 (m, 1H), 4,13 (шир.d, J=10,8Гц, 1H), 3,71 (dd, J=11,1, 4Гц, 1H), 2,2-2,02 (m, 2H), 1,87 і 1,84 (2×s, 3H), 1,81-1,71 (m, 2H), 1,70-1,40 (m, 12H), 1,26-1,06 (m, 4H), 1,04-0,83 (m, 11H), 0,59 (m, 1H).

Приклад 20

Синтез сполуки 108 з таблиці 1



Неочищений тетрапептид 17e з прикладу 17 (приблизно 0,963ммоль) обробляли розчином 4н. HCl/діоксан (5мл), як це описано для сполуки 15c. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Boc(D)Glu(O-аліл)-ОН (331,9мг, 1,155ммоль) з N-MM (423мкл, 3,850ммоль) і ТБТУ (370,8мг, 1,155ммоль) у ДХМ (5мл) протягом 3год. при КТ, як це описано для сполуки 15d. У результаті одержали неочищений пентапептид 20b у вигляді піни кольору слонов'ї кістки (приблизно 933,9мг, 0,963ммоль).

МС (FAB): 968,6 M⁺, 970,6 M⁺, 992,5 (M+Na).

¹H-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів приблизно 1:4: δ 8,05 (d, J=8,5Гц, 1H), 7,87 (шир. d, J=7,5Гц, 1H), 7,81 (d, J=8,5Гц, 1H), 7,58-7,34 (m, 5H), 6,77-6,25 (m, 2H), 5,98-5,77 (m, 2H), 5,38-5,21 (m, 4H), 5,16 (dd, J=1,5, 10,5Гц, 1H), 5,06-4,89 (m, 2H), 4,68-4,13 (m, 7H), 3,96-3,52 (m, 4H), 2,69-2,38 (m, 3H), 2,23-1,87 (m, 2H), 1,78-1,37 (m, 17H), 1,46 і 1,44 (s, 9H), 1,22-0,87 (m, 11H), 0,95 (t, J=7, 14,5Гц, 3H).

Неочищений пентапептид 20b (приблизно 0,963ммоль) обробляли розчином 4н. HCl/діоксан (5мл), як це описано для сполуки 15c. Неочищений гідрохлорид піддавали реакції поєднання з Boc-Asp(O-аліл)-ОН (315,6мг, 1,155ммоль) з N-MM (423мкл, 3,85ммоль) і ТБТУ (370,8мг, 1,155ммоль) у ДХМ (5мл), як це описано для сполуки 15d. Таким шляхом одержали неочищений гексапептид 20c у вигляді піни кольору слонов'ї кістки (приблизно 1,083г, 0,963ммоль).

МС (FAB): 1147,6 (M+Na)⁺.

¹H-ЯМР (CDCl₃), суміш ротамерів приблизно 1:1:5 8,06 (шир. d, J=8Гц, 1H), 7,86 (d, J=8Гц, 1H), 7,81 (d, J=8Гц, 1H), 7,59-7,39 (m, 5H), 7,39-6,34 (m, 4H), 5,98-5,76 (m, 3H), 5,38-5,10 (m, 6H), 5,10-4,89 (m, 2H), 4,66-4,05 (m, 10H), 3,87-3,58 (m, 4H), 3,30-2,65 (m, 2H), 2,65-1,89 (m, 3H), 1,79-1,33 (m, 19H), 1,47 і 1,45 (s, 9H), 1,33-0,86 (m, 14H).

Неочищений гексапептид 20c (приблизно 0,963ммоль) обробляли розчином 4н. HCl/діоксан (5мл), як це описано

для сполуки 15с. Неочищений гідрохлорид ацетильовали оцтовим ангідридом (182мкл, 1,193ммоля) і N-MM (423,5мкл, 3,850ммоля) у ДХМ (5мл), як це описано для сполуки 15f, одержуючи неочищений ацетильований тетрапептид. Залишок у вигляді піни очищали експрес-хроматографією (елюент: 1-ий гексан/EtOAc у співвідношенні від 20:80 до 10:90 і 2-ий чистий EtOAc), одержуючи ацетильований гексапептид 20d у вигляді піни кольору слонов'ячої кістки (528мг, вихід 51% по 4 стадіях).

МС (FAB): 1067,6 (MH⁺), 1089,6 (M+Na).

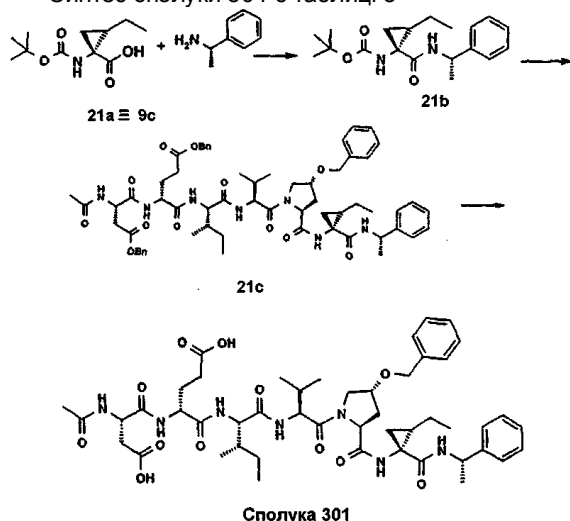
Ацетильований гексапептид 20d (528мг, 0,495ммоля) розчиняли в ДХМ (3мл) і обробляли попередньо приготовленою сумішшю, що одержували перемішуванням протягом 15хв. розчину тетракис(трифеніл-фосфонія)паладію(0) (90мг, 0,078ммоля) як каталізатор і піродиліну (134мкл, 1,603ммоля) у ДХМ (3мл). Реакційну суміш перемішували при КТ протягом 48 год, після чого розчинник випарювали. Неочищений продукт частково очищали, розтираючи в Et₂O/ДХМ (85:15), і потім очищали двома порціями за допомогою препаративної РХВР. Половину частково очищеного продукту розчиняли в крижаній оцтовій кислоті (5мл), фільтрували крізь фільтр типу Millipore®: Millex®-HV з розміром пор 0,45мкм і вводили за допомогою інжектора у зрівноважену C18-колонку з оберненою фазою типу Whatman Partisil® 10-ODS-3 (2,2×50см). Запрограмовані умови для очищення: лінійний градієнт при швидкості 15мл/хв., 230мкм, уведення при 5% А; після того елюювання усього HOAc починали роботу з такої програми: при 5% А протягом 10хв., 5-58% А протягом 70хв.; А: 0,06%-а ТОК/CH₃CN; Б: 0,06%-а ТФК/H₂O. Фракції аналізували за допомогою аналітичної РХВР, при цьому відповідні фракції, отримані в результаті обох очищень з використанням РХВР, збирали і ліофілізували, одержуючи потрібну сполуку, що являє собою гексапептид 108, у вигляді аморфної твердої речовини білого кольору (218,3мг, вихід 47%).

МС (FAB): 945,5 MH⁺, 947,4 MH⁺, 969,5 (M+Na)⁺, 985,4 (M+K)⁺.

¹H-ЯМР (DMSO), суміш ротамарів приблизно 1:9: δ 8,55 і 8,31 (s, 1H), 8,16 (d, J=7,5Гц, 1H), 8,11 (d, J=8Гц, 1H), 8,05 (d, J=8,5Гц, 1H), 7,97-7,85 (m, 2H), 7,88 (d, J=8,5Гц, 1H), 7,75 (d, J=9Гц, 1H), 7,59-7,39 (m, 4H), 4,99 (d, J=12Гц, 1H), 4,89 (d, J=12Гц, 1H), 4,53 (dd, J=7, 14Гц, 1H), 4,08-4,45 (m, 6H), 3,77 (шир. dd, J=4, 11Гц, 1H), 2,64 (dd, J=6,5, 16,5Гц, 1H), 2,48-2,41 (m, 1H), 2,25-2,12 (m, 3H), 2,07 і 1,82 (s, 3H), 2,04-1,86 (m, 2H), 1,80-1,35 (m, 14H), 1,32-0,80 (m, 14H), 0,91 (t, J=7,5, 14,5Гц, 3H).

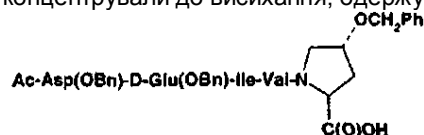
Приклад 21

Синтез сполуки 301 з таблиці 3



Розчин моногідрату гідроксиду літію (23мг, 0,56ммоля) у H₂O (4мл) додавали до розчину складного ефіру сполуки 21a (45мг, 0,185ммоля, описаного вище як (R,R)-ізомер 9с) у MeOH (3,5мл) і ТГФ (3,5мл). Розчин, що утворився, інтенсивно перемішували протягом 16год. і потім розподіляли між EtOAc (60мл) і 10%-ним водним розчином HCl (20мл). Органічну фазу відокремлювали, сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували, одержуючи відповідну кислоту з кількісним виходом.

Цей продукт (приблизно 0,185ммоля) поєднували з (S)-(-)-α-метилбензиламіном (27мг, 0,22ммоля), ГАТУ (77мг, 0,20ммоля) і ДІПЕА (0,11мл, 0,65ммоля) у ДМФ (5мл). Через 20год. реакційну суміш концентрували. Залишок розчиняли в EtOAc і розчин послідовно промивали насиченим водною розчином NaHCO₃, 10%-им водним розчином HCl і соляним розчином, після чого сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували у вакуумі. Після очищення експрес-хроматографією (елюент: 35% EtOAc/гексан) одержали 11мг (28%) отриманого в результаті поєднання продукту 21b. Цей продукт (11мг, 0,033ммоля) обробляли сумішшю 4н. HCl/діоксан протягом 35хв. Після цього реакційну суміш концентрували до висихання, одержуючи гідрохлорид відповідного аміну. Останній продукт піддавали сполученню з



(33мг, 0,036ммоля), отриманого відповідно до прикладів 15 і 20), ГАТУ (14мг, 0,036ммоля) і ДІПЕА (0,116мл, 0,02ммоля) у ДМФ (4мл). Після перемішування реакційної суміші протягом 16 год її концентрували. Залишок розчиняли в EtOAc. Розчин промивали послідовно насиченим водним розчином NaHCO₃, 10%-им водним розчином HCl і соляним розчином, сушили (MgSO₄), фільтрували і концентрували у вакуумі, одержуючи тверду речовину білого кольору. Цей продукт (приблизно 0,033) розчиняли в EtOH (6мл) і обробляли ацетатом амонію (7мг, 0,09ммоля) і 10%-им Pd/C (10мг) в атмосфері газоподібного водню. Через 3 год реакційну суміш фільтрували через діатомову землю. Фільтрат концентрували до висихання. Потім залишок розчиняли в DMSO й очищали за допомогою РХВР, одержуючи

після ліофілізації тверду речовину білого кольору (17,6мг, вихід по 2 стадіях 57%).

Дані спектрального аналізу: МС (FAB) ES⁻ 932,6 (M-H)⁻, 954,5 (M-Na)⁻; ВР-МС розраховано для C₄₈H₆₇N₇O₁₂ (MH⁺) 934,49261, виявлено 934,49010.

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆): δ 8,90 (s, 1H), 8,24 (d, J=7,95Гц, 1H), 8,14 (d, J=7,63Гц, 1H), 7,99 (d, J=8,26Гц, 1H), 7,79 (d, J=8,9Гц, 1H), 7,75 (d, J=8,26Гц, 1H), 7,42-7,17 (m, 10H), 5,00 (квінтет, J=7,63Гц, 1H), 4,7 (m, 1H), 4,52 (d, J=11,76Гц, 1H), 4,43 (d, J=11,4Гц, 1H), 4,33-4,2 (m, 6H), 3,70 (dd, J=11,4 і 11,1Гц, 2H), 2,63 (dd, J=5,7 і 5,7Гц, 1H), 2,45 (dd, J=7,95 і 7,95Гц, 1H), 2,21-2,11 (m, 3H), 2,07-1,97 (m, 1H), 1,93-1,83 (m, 2H), 1,81 (s, 3H), 1,78-1,63 (m, 2H), 1,54-1,41 (m, 2H), 1,39 (d, J=7,0Гц, 3H), 1,29 (dd, J=7,94 і 7,63Гц, 1H), 1,15 (квінтет, J=7,0Гц, 1H), 1,05 (m, 1H), 0,90 (d, J=6,36Гц, 6H), 0,88-0,83 (m, 1H), 0,71 (m, 9H).

Приклад 22

Сполуку 107 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 17.

Співвідношення ротамерів, визначено за допомогою ЯМР (1:7,6).

МС (FAB) m/z: 675 (MH⁺).

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆): δ 8,35-8,19 (шир.s, 1H), 8,04 (d, J=7,63Гц, 1H), 7,93 (шир. d, J=7,31Гц, 1H), 7,88 (d, J=8,27Гц, 1H), 7,86-7,79 (m, 2H), 7,59-7,49 (m, 3H), 7,46 (dd, J=7,95, 7,95Гц, 1H), 4,98 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,89 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 4,32 (шир.s, 1H), 4,29-4,24 (m, 1H), 4,22-4,15 (m, 1H), 4,09 (d, J=11,8Гц, 1H), 3,74 (dd, J=11,1, 4Гц, 1H), 2,20-2,12 (m, 1H), 2,05-1,94 (m, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,72-1,42 (m, 7H), 1,20-1,13 (m, 1H), 1,08-0,87 (m, 13H), 0,85 (d, J=6,68Гц, 6H).

Приклад 23

Сполуку 114 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 17.

Співвідношення ротамерів, визначено за допомогою ЯМР (1:7,5).

МС (FAB) m/z: 747 (M+Na⁺).

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆): δ 8,40-8,24 (шир.s, 1H), 8,07-8,01 (m, 1H), 1,96-1,9, (m, 1H), 7,87 (d, J=8,26Гц, 1H), 7,85-7,78 (m, 2H), 7,58-7,49 (m, 3H), 7,46 (dd, J=7,95, 7,95Гц, 1H), 7,30-7,21 (m, 4H), 7,20-7,14 (m, 1H), 4,98 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,89 (d, J=11,8Гц, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 4,34-4,29 (m, 1H), 4,29-4,25 (m, 1H), 4,22-4,15 (m, 1H), 4,09 (d, J=11,8Гц, 1H), 3,74 (dd, J=11,1, 4Гц, 1H), 2,95-2,79 (m, 2H), 2,21-2,11 (m, 1H), 2,05-1,94 (m, 2H), 1,89-1,83 (2×s, 3H), 1,63-1,41 (m, 7H), 1,38-1,30 (m, 1H), 1,27-1,22 (m, 1H), 1,12-0,94 (m, 5H), 0,89 (d, J=6,4Гц, 3H), 0,84 (d, J=6,4Гц, 3H).

Приклад 24

Сполуку 118 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 17.

Співвідношення ротамерів, визначено за допомогою ЯМР приблизно (1:6,3).

МС (FAB) m/z: 677,4 (MH⁺).

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 8,58 і 8,38 (2×шир.s, 1H), 8,04 (d, J=7,63Гц, 1H), 7,93 (d, J=7,63Гц, 1H), 7,91-7,81 (m, 3H), 7,59-7,49 (m, 3H), 7,49-7,43 (m, 1H), 4,98 (d, J=12,1Гц, 1H), 4,89 (d, J=12,1Гц, 1H), 4,41-4,29 (m, 2H), 4,29-4,14 (m, 2H), 4,1 (d, J=10,8Гц, 1H), 3,74 (шир.d, J=7,63Гц, 1H), 2,21-2,12 (m, 1H), 2,04-1,92 (m, 2H), 1,90 і 1,84 (2×s, 3H), 1,63-1,41 (m, 9H), 1,39-1,26 (m, 3H), 1,21-1,15 (m, 1H), 1,06-0,92 (m, 5H), 0,92-0,80 (m, 9H).

Приклад 25

Сполуку 116 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 17.

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 8,36 (s, 1H), 8,14 (d, J=8Гц, 1H), 8,04 (d, J=8Гц, 1H), 7,99 (d, J=9Гц, 1H), 7,79 (d, J=9Гц, 1H), 7,33-7,26 (m, 5H), 4,54-4,42 (m, 3H), 4,30-4,21 (m, 5H), 4,06 (d, J=11Гц, 1H), 3,69 (dd, J=Гц, 1H), 2,62 (dd, J=16, 10Гц, 1H), 2,47-2,42 (m, 1H), 2,18-2,14 (m, 3H), 2,02-1,87 (m, 2H), 1,82 (s, 3H), 1,74-1,66 (m, 2H), 1,54-1,47 (m, 2H), 1,38-1,27 (m, 2H), 1,21-1,18 (m, 1H), 0,97-0,85 (m, 1H), 0,80-0,70 (m, 7H).

Приклад 26

Сполуку 121 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 17.

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 9,12 (d, J=6Гц, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,30 (d, J=8Гц, 1H), 8,12 (d, J=9Гц, 1H), 8,05 (dd, J=8, 7Гц, 1H), 7,97 (d, J=8Гц, 1H), 7,80 (dd, J=8, 7Гц, 1H), 7,66 (d, J=9Гц, 1H), 7,54 (d, J=6Гц, 1H), 5,70-5,61 (m, 2H), 5,26 (d, J=17Гц, 1H), 5,07 (d, J=12Гц, 1H), 4,52 (d, J=12Гц, 1H), 4,39 (dd, J=9, 8Гц, 1H), 4,23-4,12 (m, 2H), 4,03-3,99 (m, 1H), 2,66-2,54 (m, 1H), 2,35-2,28 (m, 1H), 2,08 (dd, J=9, 17Гц, 1H), 2,01-1,93 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,65-1,46 (m, 5H), 1,41-1,38 (m, 1H), 1,24-1,20 (dd, J=9, 5Гц, 1H), 0,105-0,78 (m, 12H).

Приклад 27

Сполуку 205 з таблиці 2 синтезували за методом, описаним в прикладі 17.

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 9,14 (d, J=6Гц, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,32 (d, J=8Гц, 1H), 8,14-8,06 (m, 2H), 7,98 (d, J=8Гц, 1H), 7,82 (dd, J=8, 7Гц, 1H), 7,66 (d, J=9Гц, 1H), 7,55 (d, J=8Гц, 1H), 5,75-5,66 (m, 2H), 5,22 (d, J=17Гц, 1H), 5,07 (d, J=10Гц, 1H), 4,50 (d, J=12Гц, 1H), 4,39 (dd, J=9, 9Гц, 1H), 4,23-4,08 (m, 3H), 2,56-2,50 (m, 1H), 2,36-2,28 (m, 1H), 2,04-1,97 (m, 1H), 1,82 (s, 3H), 1,62-1,41 (m, 7H), 1,24 (dd, J=5, 4Гц, 1H), 0,94-0,75 (m, 12H).

Приклад 28

Сполуку 117 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 20.

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 8,36 (s, 1H), 8,17 (d, J=8Гц, 1H), 8,09 (d, J=8Гц, 1H), 8,04 (d, J=8Гц, 1H), 7,96-7,92 (m, 2H), 7,87 (d, J=8Гц, 1H), 7,77 (d, J=9Гц, 1H), 7,56-7,45 (m, 4H), 4,99 (d, J=12Гц, 1H), 4,89 (d, J=12Гц, 1H), 4,52 (dd, J=14, 7Гц, 1H), 4,37-4,12 (m, 6H), 3,78-3,73 (m, 1H), 2,63 (dd, J=17, 6Гц, 1H), 2,47-2,42 (m, 1H), 2,22-2,16 (m, 3H), 2,04-1,86 (m, 2H), 1,82 (s, 3H), 1,77-1,71 (m, 1H), 1,69-1,42 (m, 8H), 1,30 (квінт., J=8Гц, 1H), 1,20 (dd, J=12, 8Гц, 1H), 1,10-0,85 (m, 15H), 0,76-0,72 (m, 1H).

Приклад 29

Сполуку 120 з таблиці 1 синтезували за методом, описаним у прикладі 20.

¹H-ЯМР САМСО-d₆: δ 8,34 (s, 1H), 8,12 (d, J=8Гц, 1H), 8,05 (d, J=8Гц, 1H), 7,95-7,87 (m, 3H), 7,81 (d, J=9Гц, 1H), 7,64-7,52 (m, 4H), 7,46 (dd, J=8, 7Гц, 1H), 4,99 (d, J=12Гц, 1H), 4,89 (d, J=12Гц, 1H), 4,63 (dd, J=14, 7Гц, 1H), 4,37-4,14 (m, 4H), 3,74 (dd, J=11, 4Гц, 1H), 3,41-3,35 (m, 2H), 2,61 (dd, J=16, 7Гц, 1H), 2,44 (dd, J=16, 8Гц, 1H), 2,20-2,15 (m, 1H), 2,04-1,96 (m, 3H), 1,82 (s, 3H), 1,70-1,64 (m, 1H), 1,56-1,43 (m, 7H), 1,30 (квінт., J=8Гц, 1H), 1,20 (dd, J=8, 5Гц, 1H), 0,99-0,72 (m, 21H).

Приклад 30

Клонування, експресія й очищення рекомбінантної NS3-протеази HCV типу 1b

Сироватку пацієнта, зараженого HCV, одержували в рамках міжнародного співробітництва (д-р мед. Bernard Willems, H6pital St-Luc, Montreal, Canada, і д-р Donald Murphy, Laboratoire de Sante Publique du Quebec, Ste-Anne de Bellevue, Canada). Конструювали повнорозмірну кДНК-матрицю геному HCV із фрагментів ДНК, отриманих за допомогою ПЦР зі зворотною транскрипцією (ОТ- ПЦР) сироваткової РНК і з використанням праймерів, вибраних на основі гомології між штамми з іншими генотипами 1b.

Після визначення повної геномної послідовності оцінювали генотип 1b ізоляту HCV відповідно до класифікації Simmonds та ін. [J. Clin. Microbiol. 31, стор.1493-1503 (1993)]. Було встановлено, що амінокислотна послідовність неструктурної ділянки, тобто NS2-NS4B, була більш ніж на 93% ідентична з генотипом 1b HCV (ізоляти ВК, JK і 483) і на 88% ідентична з генотипом 1a HCV (ізолят HCV-1). Фрагмент ДНК, що кодує поліпротеїновий попередник (NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B), одержували за допомогою ПЦР і вмонтовували в еукаріотичні експресійні вектори. Після нетривалої трансфекції процесування поліпротеїну, опосередковане NS3-протеазою HCV, виявляли за наявністю зрілого протеїну NS3 з використанням аналізу методом Вестерн-блоттинга. Зрілий протеїн NS3 не утворювався при експресії попередника поліпротеїну, що містить мутацію S1165A, яка інактивує NS3-протеазу, що підтверджує функціональну активність NS3-протеази HCV.

Фрагмент ДНК, що містить рекомбінантну NS3-протеазу HCV (амінокислоти 1027-1206), клонували в бактеріальному експресивному векторі pET11d. Експресію NS3-протеази в штамі E.coli BL21(DE3)pLysS індукували інкубацією з 1М ІПТГ протягом 3год. при 22°C. За допомогою звичайної ферментації (18л) одержували приблизно 100г вологої клітинної пасти. Клітини ресуспендували в буфері для лізису (3,0мл/г), що включає 25мМ фосфат натрію, рН7,5, 10% гліцерину (об./об.), 1мМ ЕДТК, 0,01% NP-40, і зберігали при -80°C. Клітини піддавали розмерзанню і гомогенізували після додавання 5мМ ДТТ. Потім до гомогенату додавали хлорид магнію і ДНКазу в кінцевих концентраціях 20мМ і 20мкг/мл відповідно. Після інкубації протягом 25хв. при 4°C гомогенат обробляли ультразвуком і центрифугували при 15000хг протягом 30хв. при 4°C. Потім значення рН супернатанту доводили до 6,5 за допомогою 1М розчину фосфату натрію.

До двоступінчастої процедури очищення, описаної в WO 95/22985 (включена в даний опис як посилання), додавали стадію гел'фільтрації. Цей спосіб полягає в основному в такому: супернатант бактеріального екстракту вносили в попередньо зрівноважену колонку SP HiTrap (фірма Pharmacia) зі швидкістю потоку 2мл/хв. у буфері А (50мМ фосфат натрію, рН6,5, 10% гліцерину, 1мМ ЕДТК, 5мМ ДТТ, 0,01% NP-40). Потім колонку промивали буфером А, що містить 0,15М NaCl, і протеазу елюювали за допомогою 10 об'ємів елюенту щодо об'єму колонки з лінійним градієнтом від 0,15 до 0,3М NaCl. Фракції, що містять NS3-протеазу, поєднували і розбавляли до кінцевої концентрації NaCl 0,1М. Фермент додатково очищали на HiTrap-гепариновій колонці (фірма Pharmacia), зрівноваженому в буфері Б (25мМ фосфат натрію, рН7,5, 10% гліцерину, 5мМ ДТТ, 0,01% NP-40). Зразок завантажували зі швидкістю потоку 3мл/хв. Потім колонку промивали буфером Б, що містить 0,15М NaCl, зі швидкістю потоку 1,5мл/хв. Здійснювали дві стадії промивання в присутності буфера Б, що містить 0,3М чи 1М NaCl. Протеазу виділяли в змиві 0,3М NaCl, розбавляли 3 рази буфером Б, повторно вносили в HiTrap-гепаринову колонку й елюювали буфером Б, що містить 0,4М NaCl. Насамкінець фракції, що містять NS3-протеазу, вносили в колонку Superdex 75 HiLoad 16/60 (фірма Pharmacia), зрівноважену буфером Б, що містить 0,3М NaCl. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності ДСН (ДСН-ПААГ) з наступним денсіометричним аналізом удалося встановити, що чистота NS3-протеази HCV, отриманої з об'єднаних фракцій, становить більш ніж 95%.

Фермент зберігали при -80°C і перед застосуванням піддавали розмерзанню на льоду і розбавляли.

Приклад 31

Радіометричний аналіз NS3-протеази HCV/пептидного кофактора NS4A

Фермент клонували, експресували і одержували відповідно до протоколу, описаного в прикладі 30. Фермент зберігали при -80°C, піддавали розмерзанню на льоду й перед застосуванням розбавляли в буфері для аналізу, що містить пептидний кофактор NS4A.

Субстрат, що використовується для радіометричного аналізу NS3-протеази/пептидного кофактора NS4A, DDIVPC-SMSYTW, розщеплюється між залишками цистеїну й серину за допомогою ферменту. Послідовність DIVPC-SMSYTW відповідає природному сайту розщеплення NS5A/NS5B, у якому залишок цистеїну в P2 замінений на пролін. Пептидний субстрат DDIVPC-SMSYTW і мітку біотин-DDIVPC-SMS[¹²⁵I-Y]TW інкубували з рекомбінантою NS3-протеазою й пептидним кофактором NS4A KKGSVIVGRILSGRK (молярне співвідношення фермент/кофактор 1:100) у присутності інгібіторів чи без них. Відділення субстрату від продуктів проводили, додаючи покриті авідином агарозні гранули до суміші для аналізу з наступною фільтрацією. Кількість продукту SMS[¹²⁵I-Y]TW, виявлене у фільтраті, дозволяє розрахувати відсоток перетворення субстрату і відсоток інгібування.

А. Реагенти

Трис і Трис-HCl (високого ступеня чистоти (UltraPure)) були отримані від фірми Gibco-BRL. Гліцерин (UltraPure), МЕС і BCA були отримані від фірми Sigma. ТКЕФ був отриманий від фірми Pierce, ДМCO був отриманий від фірми Aldrich і NaOH був отриманий від фірми Anachemia.

Буфер для аналізу: 50мМ Трис-HCl, рН7,5, 30% (мас/об.) гліцерину, 1мг/мл BCA, 1мМ ТКЕФ (ТКЕФ додавали безпосередньо перед застосуванням з 1М маткового розчину у воді).

Субстрат: DDIVPCSMSYTW, кінцева концентрація 25мкМ (з 2мМ маткового розчину в ДМCO, що зберігався -20°C, щоб уникнути окислювання).

Мітка: відновлений моноіодований субстрат біотину DDIVPC SMS[¹²⁵I Y]TW (кінцева концентрація ~1нМ).

NS3-протеаза типу 1b HCV, кінцева концентрація 25нМ (з маткового розчину в суміші, що містить 50мМ фосфат натрію, рН7,5, 10% гліцерину, 300мМ NaCl, 5мМ ДТТ, 0,01% NP-40).

Пептидний кофактор NS4A: KKGSVIVGRILSGRK, кінцева концентрація 2,5мкМ (з 2мМ маткові розчини в ДМCO, що зберігались при -20°C).

Б. Протокол

Аналіз проводили в 96-ячковому полістирольному планшеті фірми Costar. Кожна ямка містила:

- 20мкл субстрату/мітки в буфері для аналізу;
- 10мкл інгібітору в 20% ДМCO/буфері для аналізу;
- 10мкл NS3-протеази 1b/пептидного кофактора NS4 (молярне співвідношення 1:100).

На цьому ж планшеті для аналізу також готували чистий контроль (без інгібітору і без ферменту) і контроль (без інгібітору).

Ферментативну реакцію ініціювали, додаючи розчин ферменту/пептиду NS4A, і аналізовану суміш інкубували протягом 40хв. при 23°C при обережному перемішуванні. Додавали десять (10)мкл 0,5н. NaOH і 10мкл 1М МЕС, pH5,8, для припинення ферментативної реакції.

У фільтраційний планшет типу Millipore MADP N65 додавали двадцять (20)мкл покритих авідіном агарозних гранул (отриманих від фірми Pierce). Суміш для аналізу, в якій припинена ферментативна реакція, переносили у фільтраційний планшет і інкубували протягом 60хв. при 23°C при обережному перемішуванні.

Планшети фільтрували за допомогою пристрою для вакуум-фільтрації типу Millipore MultiScreen Vacuum Manifold Filtration і 40мкл фільтрату переносили в непрозорий 96-ямковий планшет, що містить по 60мкл сцинтиляційної рідини на ямку.

Радіоактивність фільтратів підраховували за допомогою лічильника Packard TopCount, використовуючи протокол на основі ^{125}I -рідини протягом 1хв.

Інгібування (у %) розраховували таким рівнянням:

$$100 - \left[\frac{\text{імпульс}_{\text{інгібітору}} - \text{імпульс}_{\text{чистого контролю}}}{\text{імпульс}_{\text{чистого контролю}} - \text{імпульс}_{\text{імігульсіва чистого контролю}}} \right] \times 100$$

Дані про залежність інгібування від концентрації апроксимували нелінійною кривою з використанням моделі Хілла і величину ефективної концентрації, при якій відбувається 50%-е інгібування (IC_{50}), розраховували за допомогою програмного забезпечення SAS (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

Приклад 32

Аналіз повнорозмірного гетеродимерного протеїну NS3-NS4A

Некодуючу ділянку NS2-NS5B-3' клонували за допомогою ОТ-ПЦР у векторі pCR®3 (фірма Invitrogen), використовуючи РНК, екстраговану з сироватки, зараженої генотипом 1b HCV (наданої д-ром Bernard Willems, Hopital St-Luc, Montreal, Quebec, Canada). Потім NS3-NS4A-ділянку ДНК субклонували за допомогою ПЦР в експресійному бакусоловірусному векторі pFastBac™ HTa (фірма Gibco/BRL). Послідовність вектора включала кодовану ділянку, що складається з 28 залишків N-кінцевої послідовності, що містить мітку із шести залишків гістидину. Для одержання рекомбінантного бакуловірусу використовували бакуловірусну систему експресії Bac-to-Bac™ (фірма Gibco/BRL). Повнорозмірний зрілий гетеродимерний протеїн NS3 і NS4A (His-NS3-NS4AFL) експресували, заражаючи 10^6 клітин лінії Sf21/мл рекомбінантним бакуловірусом з коефіцієнтом зараження 0,1-0,2 при 27°C. Заражену культуру збирали через 48-64год. центрифугуванням при 4°C. Клітинний дебрис гомогенізували в суміші, що містить 50мМ NaPO₄, pH7,5, 40% гліцерину (мас/об.), 2мМ β-меркаптоетанол, у присутності суміші інгібіторів протеаз. Потім His-NS3-NS4AFL екстрагували з клітинного лізату за допомогою 1,5% NP-40, 0,5% Тритона X-100, 0,5М NaCl і оброблення ДНКазою. Після ультрацентрифугування розчинний екстракт розбавляли в 4 рази і зв'язували з Ni-хелатувальною колонкою типу Hi-Trar. His-NS3-NS4AFL елюювали у формі, що має чистоту >90% (що підтверджено за допомогою ДСН-ПААГ), використовуючи градієнт імідазолу від 50 до 400мМ. His-NS3-NS4AFL зберігали при -80°C в суміші, що містить 50мМ фосфат натрію, pH7,5, 10% (мас/об.) гліцерину, 0,5М NaCl, 0,25М імідазол, 0,1% NP-40. Перед застосуванням його піддавали розмерзанню на льоду й розбавляли.

Протеазну активність His-NS3-NS4AFL оцінювали в 50мМ Трис-HCl, pH 8,0, 0,25М цитраті натрію, 0,01% (мас/об.) н-додецил-β-D-мальтозиді, 1мМ ТКЕФ 5мкМ субстрату антраніл-DDIVPAbu[C(O)-O]-AMY(3-NO₂)TW-OH, у якого була припинена внутрішня реакція, інкубували в присутності різних концентрацій інгібітору з 1,5нМ His-NS3-NS4AFL протягом 45хв. при 23°C. Кінцева концентрація ДМСО не перевищувала 5,25%. Реакцію припиняли, додаючи 1М МЕС, pH5,8. Флуоресценцію N-кінцевого продукту визначали за допомогою флуориметра типу Perkin-Elmer LS-50B, обладнаного 96-клітинним планшет-ридером (довжина хвилі збудження 325нм; довжина хвилі випущення 423нм).

Дані про залежність інгібування від концентрації апроксимували нелінійною кривою з використанням моделі Хілла і величину ефективної концентрації (IC_{50}) розраховували за допомогою програмного забезпечення SAS (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

Приклад 33

Аналіз MS3-протеази на клітинному рівні

Цей аналіз проводили з використанням клітинок лінії Huh-7, що являють собою лінію клітин людини, отриману з гепатоми, що спільно трансфектували двома такими конструкціями ДНК:

- перша експресує поліпротеїн, що містить неструктурні протеїни HCV, злиті з tTA у такій послідовності: NS3-NS4A-NS4B-NS5A-tTA (позначена як NS3);

- друга експресує репортерний протеїн, що секретує лужну фосфатазу під контролем tTA (позначена як SEAP).

Поліпротеїн слід розщепити NS3-протеазою для виділення зрілих протеїнів. При виділенні зрілих протеїнів вірусні протеїни, імовірно, формують комплекс на мембрані ендоплазматичного ретикулу, у той час як tTA може мігрувати в ядро і трансактивувати ген SEAP. Таким чином, відновлення протеолітичної активності NS3 повинно привести до відновлення рівнів зрілого tTA і сприяти зниженню активності SEAP.

Для оцінення інших впливів сполук здійснювали паралельну трансфекцію, при якій проводили спільну трансфекцію конструкцією, що експресує тільки tTA (позначена як tTA) і конструкцією SEAP, при цьому SEAP-активність не залежала від протеолітичної активності NS3.

Протокол аналізу: клітини лінії Huh-7, вирощені в CHO-SFMII+10% ФТС (фетальна теляча сироватка), спільно трансфектували або NS3 і SEAP, або tTA і SEAP, використовуючи протокол FuGenel (фірма Boehringer Mannheim). Після інкубації протягом 5год. при 37° клітини промивали, обробляли трипсином і висівали (80000 клітин/ямку) у 96-ямкові планшети, що містять різні концентрації тестованих сполук. Після 24-годинного періоду інкубації вносили аліквоту середовища й активність SEAP у цієї аліквоти визначали за допомогою набору Phospha-Light (фірма Tropix).

Оцінювали відсоток інгібування активності SEAP залежно від концентрації сполуки за допомогою програмного забезпечення SAS, одержуючи значення EC_{50} .

Потім визначали токсичність сполуки (TC_{50}) за допомогою аналізу на основі МТТ відповідно до такої процедури:

- у ямку додавали 20мкл розчину МТТ (5мг/мл середовища) і інкубували при 37° протягом 4 год.;
 - середовище видаляли і додавали 50мкл суміші 0,01н. HCl+10% Тритону Х-100;
 - після струшування при КТ протягом щонайменше 1 год. у кожній ямці визначали ОП при довжині хвилі 595нм.
- Значення $ТС_{50}$ розраховували так само, як і $ЕС_{50}$.

Приклад 34

Визначення специфічної активності

Специфічну активність сполук визначали щодо різних серинпротеаз: еластази лейкоцитів людини (HLE), еластази панкреатичної залози свині (PPE) і бичачого α -хімотрипсину панкреатичної залози (α -Chym.), катепсину В печінки людини (Cat. B.). У всіх випадках використовували протокол, заснований на застосуванні 96-ямкових планшетів і субстрату для колориметричного аналізу паранітроаніліду (pNA), специфічного для кожного ферменту. Кожен аналіз полягав у попередній інкубації протягом 1 год. ферменту-інгібітору при 30°C з наступним додаванням субстрату й гідролізом до $\approx 30\%$ перетворення, що оцінювали за допомогою планшет-ридера для мікротитраційних планшетів типу UV Thermomax®. Концентрації субстрату підтримували на рівні нижче від можливого значення K_m з метою зменшення конкуренції субстрату. Концентрації сполук варіювали від 300 до 0,06мкМ залежно від їхньої активності.

Кінцеві умови кожного аналізу були такі:

- 50мМ Трис-HCl pH8, 0,5мМ Na_2SO_4 , 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК, 3% ДМСО, 0,01% Твін а 20с:
- [100мкМ Succ-AAPF-pNA і 250пМ α -хімотрипсин], [133мкМ Succ-AAA-pNA і 8нМ еластаза свині], [133мкМ Succ-AAV-pNA і 8нМ еластаза лейкоцитів] або
- 100мМ $NaHPO_4$ pH6, 0,1мМ ЕДТК, 3% ДМСО, 1мМ ТКЕФ, 0,01% Твіну 20, 30мкМ Z-FR-pNA і 5нМ катепсин В (вихідний фермент активували перед застосуванням у буфері, що містить 20мМ ТКЕФ)].

Нижче як характерний приклад узагальнені умови для еластази панкреатичної залози свині.

У плоскодонний полістирольний 96-ямковий планшет додавали, використовуючи ручний заборник для рідин типу Biomek (фірма Beckman):

- 40мкл буфера для аналізу (50мМ Трис-HCl, pH8, 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК),
- 20мкл розчину ферменту (50мМ Трис-HCl, pH8, 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК, 0,02% Твіну 20, 40нМ еластаза панкреатичної залози свині) і
- 20мкл розчину інгібітору (50мМ Трис-HCl, pH8, 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК, 0,02% Твіну 20, від 1,5мМ до 0,3мкМ інгібітор, 15об.% ДМСО).

Після попередньої інкубації протягом 60хв. при 30°C в кожну ямку додавали по 20мкл розчину субстрату (50мМ Трис-HCl, pH8, 0,5мМ Na_2SO_4 , 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК, 665мкМ Succ-AAA-pNA) і реакційну суміш додатково інкубували протягом 60хв. при 30°C, після чого визначали час абсорбції за допомогою планшет-ридера типу UV Thermomax®. Ряди ямок залишали для контрольованого варіанта (без інгібітору) і для чистого контролю (без інгібітору і без ферменту).

Проводили послідовні дворазові розведення розчину інгібітору на окремому планшеті за допомогою ручного забірника рідини, використовуючи 50мМ Трис-HCl, pH8, 50мМ NaCl, 0,1мМ ЕДТК, 0,02% Твіну 20, 15% ДМСО.

Усі досліді з визначення специфічної активності проводили аналогічним способом.

Інгібування (у %) визначали таким рівнянням:

$$[1 - (\frac{УФ_{\text{інгібітору}}}{УФ_{\text{чистого контролю}}})] / (\frac{УФ_{\text{контролю}}}{УФ_{\text{чистого контролю}}}) \times 100]$$

Дані про залежність інгібування від концентрації апроксимували нелінійною кривою з використанням моделі Хілла і величину ефективної концентрації, при якій відбувається 50%-е інгібування (IC_{50}), розраховували за допомогою програмного забезпечення SAS (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

Таблиці сполук

Сполуки за винаходом оцінювали або за допомогою одного, або обох аналізів, описаних у прикладі 31 і прикладі 32, при цьому було встановлено, що вони мають активність і мають значення IC_{50} нижче ніж 50мкМ (діапазон активності А), нижче ніж 5мкМ (діапазон активності Б) або нижче ніж 0,5мкМ (діапазон активності В).

Активність у досліді на клітинах і специфічна активність

Репрезентативні сполуки за винаходом також тестували на модельній лінії клітин, як це описано в прикладі 33, або за допомогою одного чи декількох аналізів, описаних у прикладі 34. Наприклад, для сполуки 233 з таблиці 2 було встановлено, що її значення IC_{50} становить 1нМ у досліді, описаному в прикладі 32. Значення $ЕС_{50}$, визначене відповідно до методу, описаного в прикладі 33, становить 5,4мкМ, у той час як інші впливи (tTA) не були виявлені при концентраціях, що досягають 120мкМ. Сполука 233 також тестована за допомогою МТТ-методу й було встановлено, що її значення $ТС_{50}$ перевищує 120мкМ, що свідчить про те, що сполука нетоксична в ефективній концентрації. В досліді з визначення специфічної активності, що проводили відповідно до прикладу 34, було встановлено, що ця ж сполука має таку активність: HLE>75мкМ, PPE>75мкМ, α -Chym >75мкМ; Cat. B>75мкМ.

Ці результати свідчать про те, що ця група сполук має високу специфічність щодо NS3-протеази.

У наведених далі таблицях використано такі скорочення: МС дані мас-спектрометрії

Ac ацетил

Bn бензил

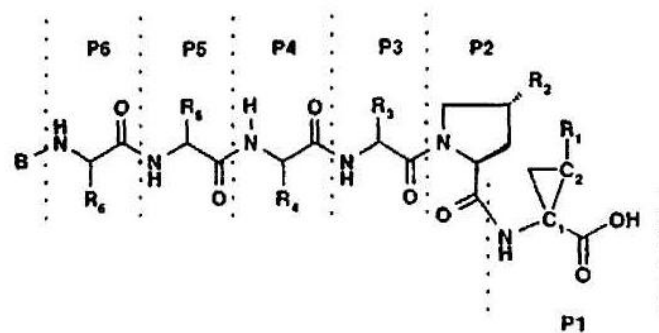
Chg циклогексилгліцин (2-аміно-2-циклогексаноїтова кислота)

Dnl дансил

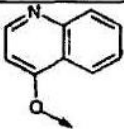
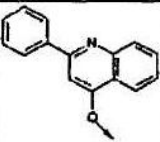
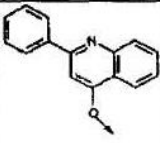
O-Bn бензилокси

Pip піпеколінова кислота

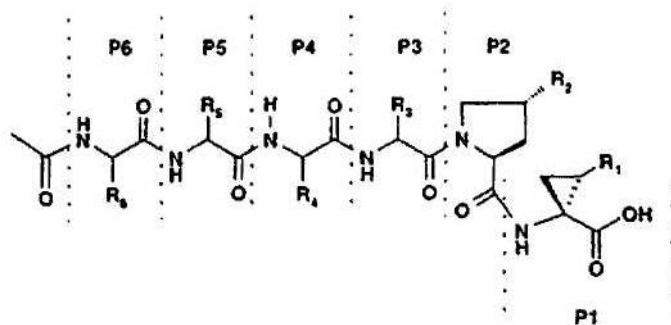
Tbg трет-бутилгліцин

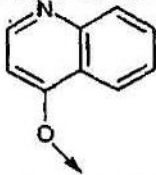
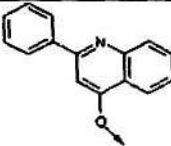
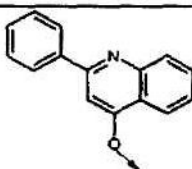
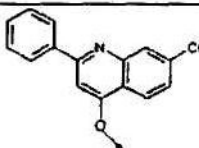
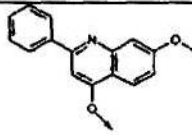
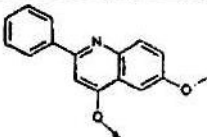


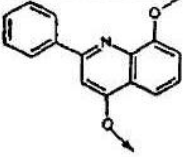
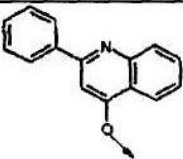
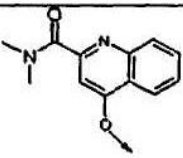
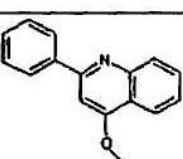
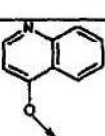
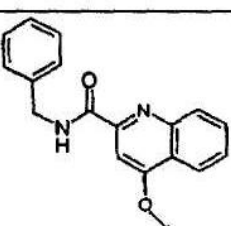
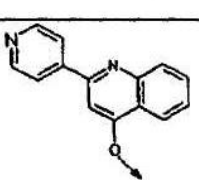
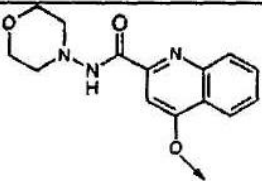
Сполука №	B	P6	P5	P4	P3	R ₂	R ₁	PI C ₁ -C ₂	MC (MH ⁺)	Діапазон активності
101	Ac	—	—	Chg	Val	OBn	Et	1R,2R	613,4	A
102	Ac	—	—	Chg	Val	OBn	Et	1R,2?	613,4	A
103	Ac	—	—	Chg	Chg	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2?	703	Б
104	Ac	—	—	Chg	Chg	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2R	703,4	Б
105	Ac	—	—	Chg	Chg	l-NpCH ₂ O	Et	1S, 2S	703,5	Б
106	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Me	1R,2?	649,5	A
107	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	CHMe ₂	1R,2?	M + Na 699	Б
108	Ac	Asp	D-Glu	Chg	Chg	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2R	947,4	B
109	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	CH ₂ OCH ₂ Ph	1R,2?	M + Na 777,4	A
110	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	CH ₂ OCH ₂ Ph	1R,2?	M + Na 777,4	A
111	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	(CH ₃) ₂ Ph	1R,2?	M + Na 761	A
112	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2R	M + Na 685	Б
113	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Et	1S,2S	M + Na 685	A
114	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Bn	1R,2?	M + Na 747	A
115	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Bn	1R,2?	M + Na 747	A
116	Ac	Asp	D-Glu	Ile	Val	OBn	Et	1R,2R		Б
117	Ac	Asp	D-Glu	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2R	M + Na 929,4	Б
118	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Pr	1R,2?	677,4	Б
119	Ac	—	—	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Pr	1R,2?	677,4	A
120	Ac	Asp	D-Val	Chg	Val	l-NpCH ₂ O	Et	1R,2R	M + Na 899,5	Б

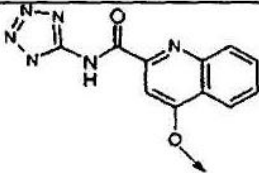
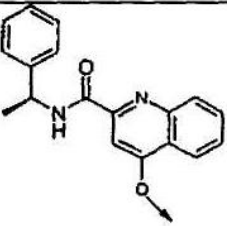
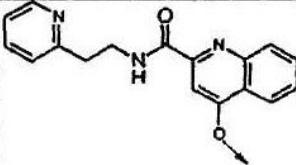
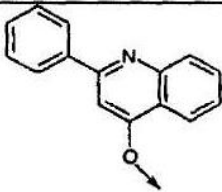
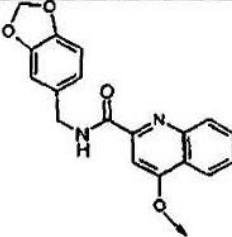
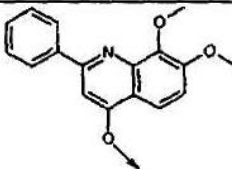
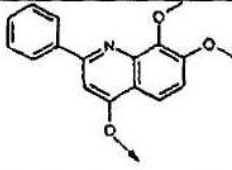
121	Ac	---	---	Chg	Val		вініл	1S,2R	648,3	Б
122	Ac	---	---	Chg	Val		етил	1R,2S	726,6	В
123	Ac	---	---	Chg	Val		пропіл	1R,2R	740,3	В

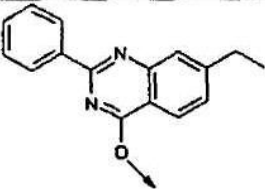
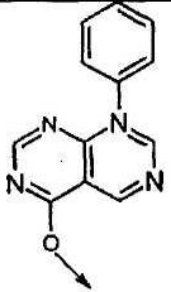
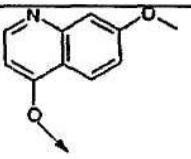
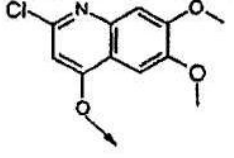
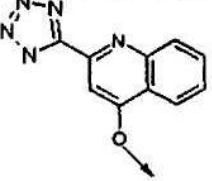
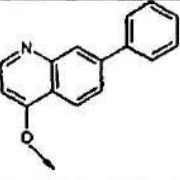
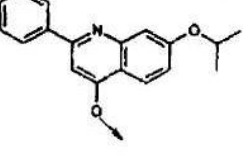
Таблиця 2

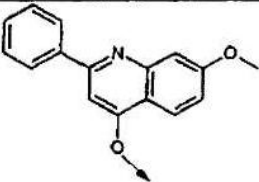
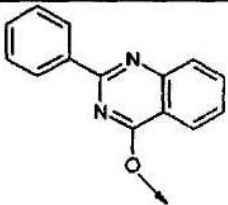
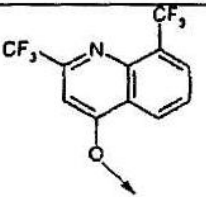
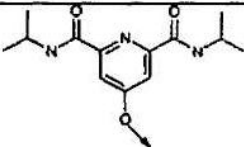
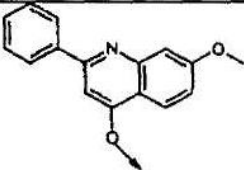


Сполука №	P6	P5	P4	P3	R ₂	R ₁	MC (MH ⁺)	Діапазон активності
201	—	—	Chg	Val	OBn	CH = CH ₂	611,3	Б
202	—	—	Chg	Chg	1-NpCH ₂ O	CH = CH ₂	701,3	В
203	—	—	Chg	Val	1-NpCH ₂ O	CH = CH ₂	661,1	В
204	—	—	Chg	Val	OBn	CH = CHBr*	687,4	Б
205	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	648,4	В
206	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	724,4	В
207	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	738,4	В
208	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	758,5	В
209	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	754,5	В
210	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	754,3	В

211	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	754,3	В
212	Asp	D-Glu	Chg	Val		CH = CH ₂	968,4	В
213	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	719,3	Б
214	—	—	Chg	Val		етил	726,4	В
215	—	—	Val	Chg		CH = CH ₂	648,3	В
216	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	781,6	В
217	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	690,6	Б
218	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	776,4	В

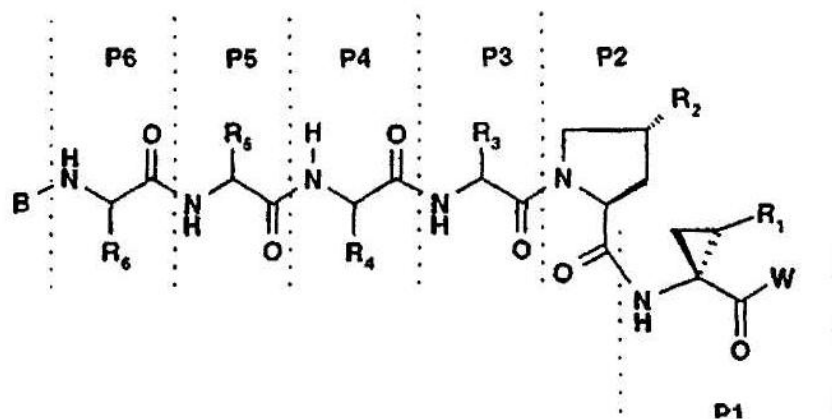
219	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	759,3	B
220	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	795,3	B
221	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	796,3	B
222	Asp	D-Glu	Chg	Tbg		CH = CH ₂	982,4	B
223	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	825,3	B
224	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	798,3	B
225	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	784,2	B

226	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	752,2	B
227	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	715,4	B
228	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	692,2	B
229	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	743,2	B
230	—	—	Chg	Val		CH = CH ₂	716,3	B
231	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	738,3	B
232	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	796,4	B

233	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	768,3	B
234	—	—	Chg	Tbg		CH = CH ₂	739,4	B
235	—	—	Chg	Val		вініл	782,2	B
236	Asp	D-Glu	Ile	Val	O-Bn	вініл	829,3	B
237	—	—	Chg	Val		вініл	768,4	B
238	Asp	D-Glu	Chg	Tbg		вініл	1012,6	B

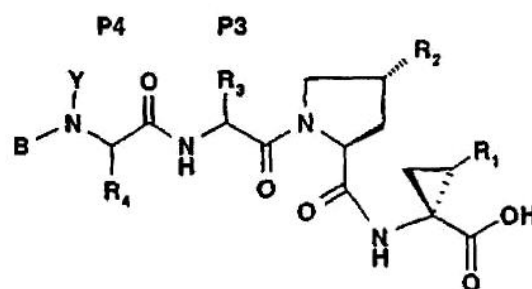
*співвідношення ізомерів Br 5,5:2

Таблиця 3



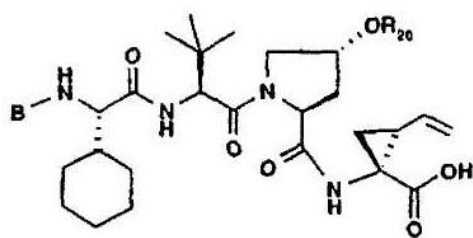
Сполука №	B	P6	P5	P4	P3	R ₂	R ₁	W	МС (М-Н)	Діапазон активності
301	Ac	Asp	D-Glu	Ile	Val	OBn	Et	NH-(S)-CHMePh	932,6	В
302	Dnl	Asp	D-Glu	Chg	Tbg		вініл	ОН	1203,5	В

Таблиця 4

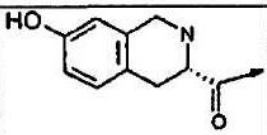
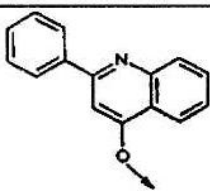
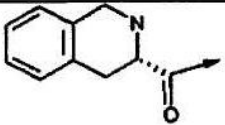
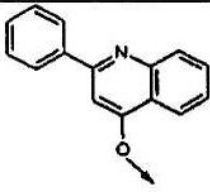
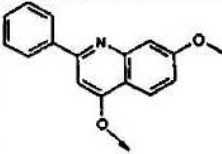
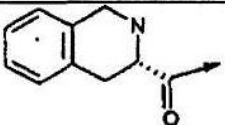
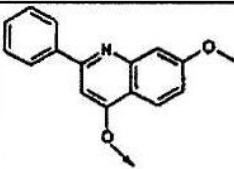
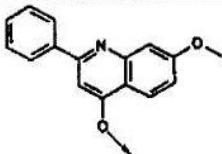


Сполука №	B	Y	P4	P3	R ₂	R ₁	МС (МН')	Діапазон активності
401	Ac	Me	Chg	Tbg		вініл	782,3	В

Таблиця 5



Спол. №	B	R ₂₀	MC	Діапазон активності
501			802,4	B
502			852,4	B
503			851,3	B
504			851,3	B
505			851,3	B
506	H		696,3	B

507			871,4	B
508			855,4	B
509	H		726,7	B
510			901,7	B
511	Dnl		959,4	B