

(19) **KG** (11) **175** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁶ **C07D 217/26, 401/12;
A61K 31/47**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

(21) 940211.1

(22) 28.12.1994

(31) 8927913.7

(32) 11.12.1989

(33) GB

(46) 01.01.1997, Бюл. №3, 1997

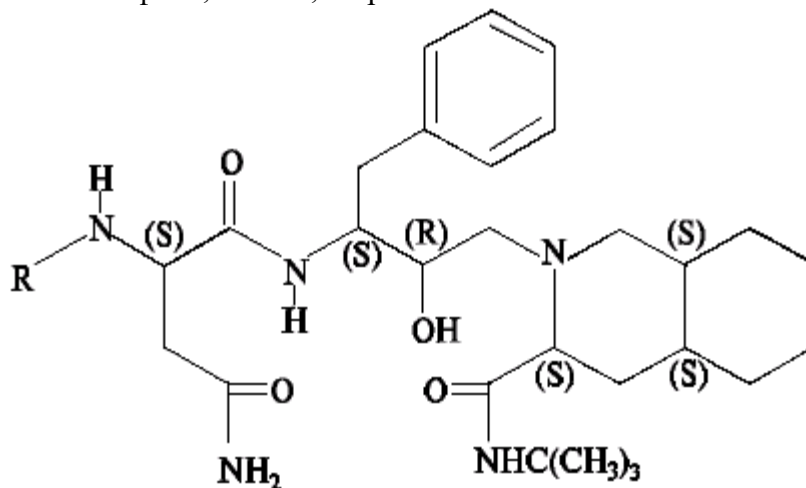
(71)(73) Ф. Хоффманн-Ля Рош АТ, СН

(72) Джосеф Армстронг Мартин, Селли Редшо, GB

(56) Европейский патент №0346847, C07D 217/26, 1989

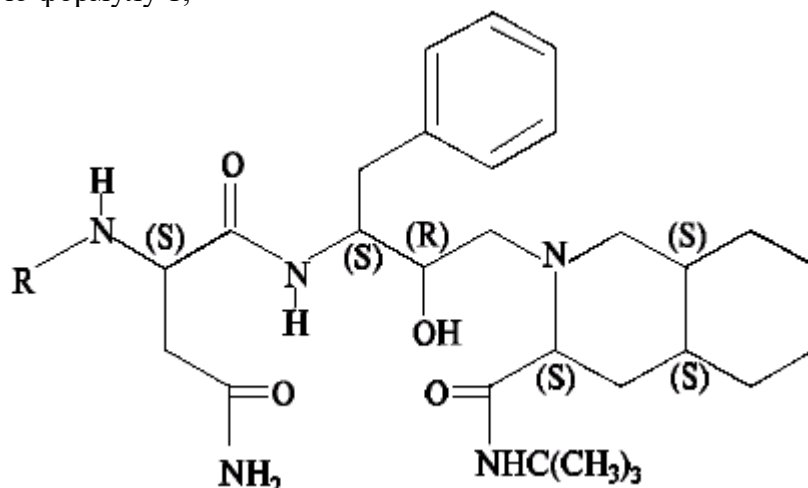
(54) **Производные аминокислот и их кислотно-аддитивные соли**

(57) Использование в качестве ингибитора протеазы вирусного начала. Сущность изобретения: производные аминокислот ф-лы 1, где R-бензилоксикарбонил или 2-хинолилкарбонил. Реагент 1: 2-[3(S)-амино-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичный бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид. Реагент 2: N-(бензилоксикарбонил)-альфа-аспарагин. Условия реакции: в присутствии гидроксibenзотриазола, N-этилморфолина и дициклогексилкарбодиимида в сухом тетрагидрофуране. 3 з.п. ф-лы, 1 табл., 4 пр.



Изобретение касается производных аминокислот.

Производные аминокислот, описанные в данном изобретении, - это соединения, имеющие общую формулу 1,



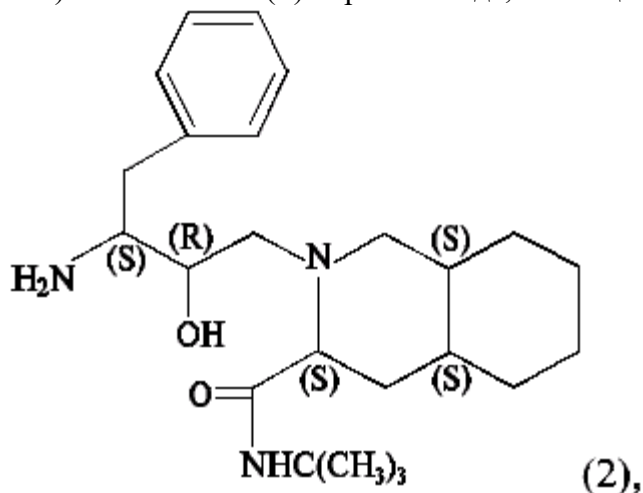
где R - бензилоксикарбонил или 2-хинолилкарбонил, и их приемлемые для фармацевтического использования кислые соли. Соединения, имеющие формулу 1, и их кислые соли являются новыми и обладают ценными фармакологическими свойствами. В частности, они ингибируют протеазы вирусного начала и их можно использовать для профилактики или лечения вирусных инфекций, в частности заболеваний, вызываемых вирусом НГУ и другими ретровирусами.

Задача изобретения - синтез соединений, имеющих формулу 1, и их вышеупомянутых солей, которые применяют в качестве веществ, имеющих терапевтическое действие. Указанные соединения и соли применяют для борьбы или профилактики заболеваний, особенно при лечении или профилактике вирусных инфекций; в частности, применяют указанные соединения и соли при приготовлении лекарств для лечения или профилактики вирусных инфекций.

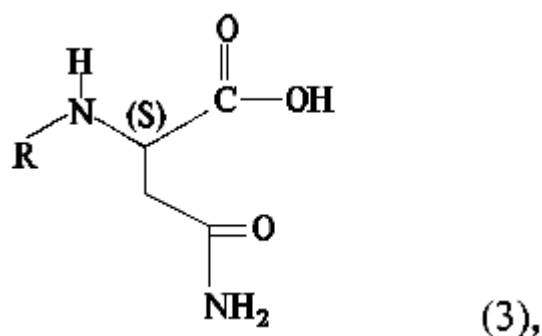
Приемлемые для фармацевтического использования кислые соли - это соли, образованные в результате реакций с неорганическими кислотами, например, галогеноводородными кислотами, такими как хлористоводородная или бромистоводородная, серная, азотная и фосфорная кислоты и др. или с органическими кислотами, например, уксусная, лимонная, малеиновая, фумаровая и винная кислоты, метансульфокислота, p-толуолсульфокислота и др.

Согласно настоящему изобретению соединения, имеющие формулу 1 и их соли, пригодные для фармацевтического использования, можно получить следующим образом:

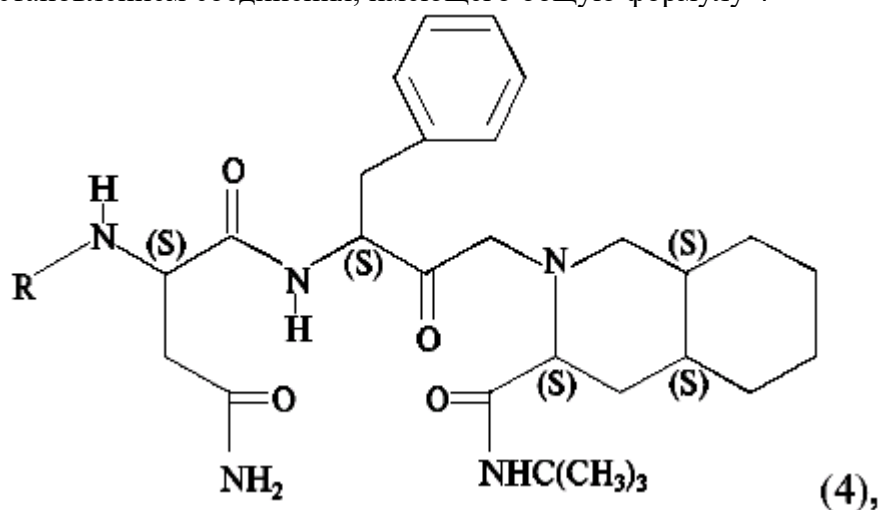
а) взаимодействием 2-[(3(S) амино-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичный бутилдекагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид, имеющего формулу 2



с соединением общей формулы 3

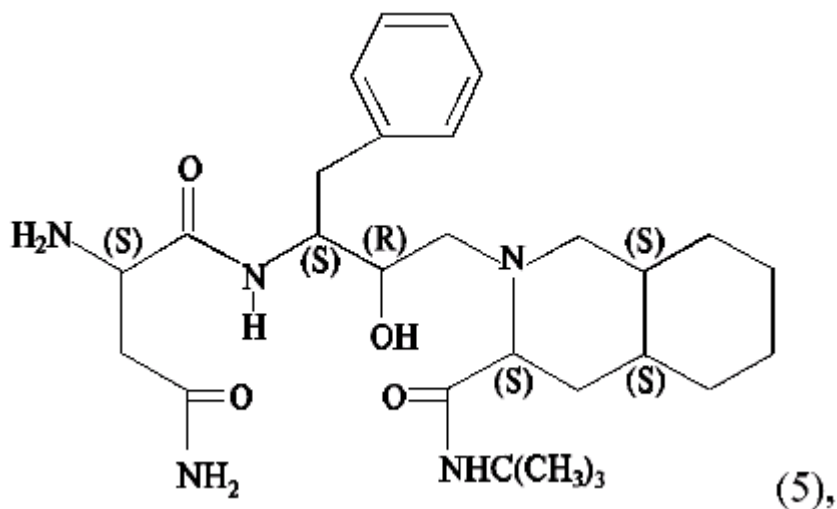


где R имеет значение, определенное ранее или их реагирующие производные;
в) восстановлением соединения, имеющего общую формулу 4



где R имеет ранее определенное значение, и отделением необходимого 2(R)-гидрокси изомера от полученной смеси;

с) взаимодействием 2-[3(S)-(L-аспарагинил) амино] 2 (R)-гидрокси-4-фенилбутил-N-третичный бутилдекагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида, имеющего формулу 5,



с агентом образования бензилоксикарбонильной группы или 2-хинолилкарбонильной группы;

d) если необходимо, превращением полученного соединения, имеющего формулу

1, в соль, полученную при реагировании с кислотой, и допущенную к фармацевтическому применению.

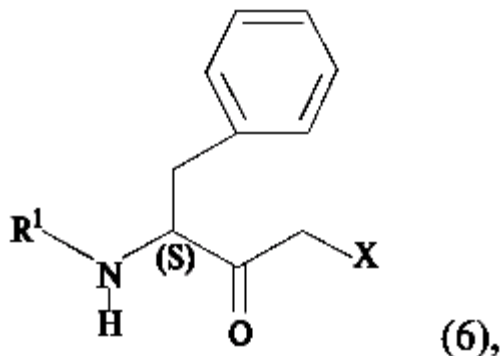
Взаимодействие соединения, имеющего формулу 2, с кислотой, имеющей формулу 3, согласно способу осуществления процесса (а), можно выполнить, применяя методы, известные из химии белков. Таким образом, реакция осуществляется в присутствии реагента конденсации, таких как гидроксибензотриазол и дициклогексилкарбодиимид. Реакция выполняется в инертном органическом растворителе, таком как эфир (например, диэтилэфир, тетрагидрофуран и др.) или диметилформамид при низких температурах от -10 до +5°C, а особенно при 0°C. Подходящие реактивные производные кислот, имеющие формулу 3, - это галоидные соединения (например, хлорангидрид), ангидриды кислот, смешанные ангидриды, активированные эфиры и др. При использовании реактивных производных реакция выполняется в инертных органических растворителях, таких как галоидзамещенные алифатические углеводороды (например, дихлорметане) или в эфире (например, диэтилэфире, тетрагидрофуране и др.) или в присутствии органического основания (например, N-этилморфолина, диизопропилэтиламина и др.) при низких температурах от -10 до +5°C, особенно при 0°C.

Реакция восстановления соединений формулы 4 (согласно способу осуществления процесса (в)) осуществляется методами восстановления карбонильной группы до гидроксигруппы. Таким образом, восстановление осуществляется с использованием комплексных гидридов металлов, таких как борогидрид щелочных металлов, особенно борогидрид натрия в присутствии органических растворителей, таких как метанол, этанол, пропанол, изопропанол и др. Обычно реакция восстановления выполняется при комнатной температуре. Отделение необходимого 2(R)-гидрокси изомера от полученной смеси можно осуществить известными способами, например, хроматографией и т.д.

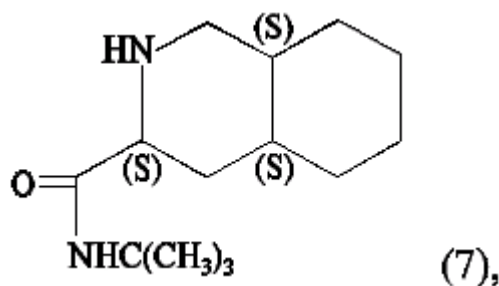
Согласно пункту (с) подходящим реагентом для получения бензилоксикарбонильной группы является бензиловый эфир хлормуравьиной кислоты. Подходящими реагентами для получения 2 - хинолилкарбонильной группы являются соответствующие кислоты или их реактивные производные, такие как галоидангидриды (например, хлорангидрид), ангидриды кислот, смешанные ангидриды, активированные сложные эфиры и др. Взаимодействие соединений формулы (5) с вышеупомянутыми реагентами осуществляется способом, описанным в пункте (а).

Превращение соединений формулы 1 в кислые соли, допущенные к фармацевтическому использованию, согласно пункту (d), можно осуществить обработкой этих соединений неорганической кислотой, например, галоидводородной кислотой - хлористоводородной или бромисто-водородной кислотами, серной, азотной и фосфорной кислотами или органической кислотой, такой как: уксусная, лимонная, малеиновая и фумаровая кислоты, метансульфокислота, паратолуолсульфокислота и др.

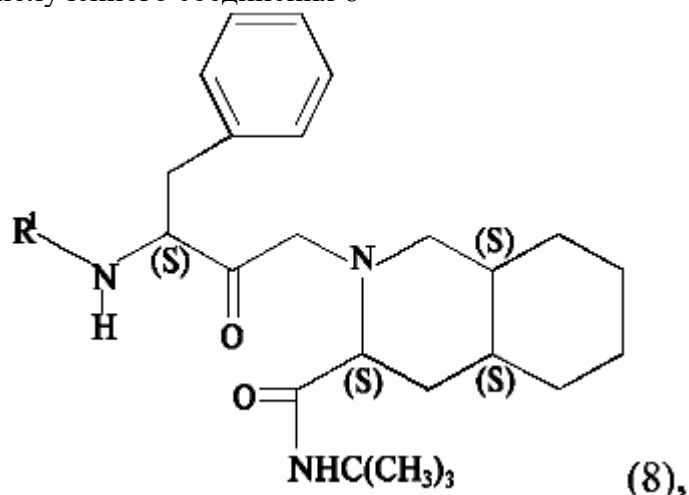
Соединение формулы 2 можно приготовить, например, 1) взаимодействием соединения, имеющего общую формулу 6,



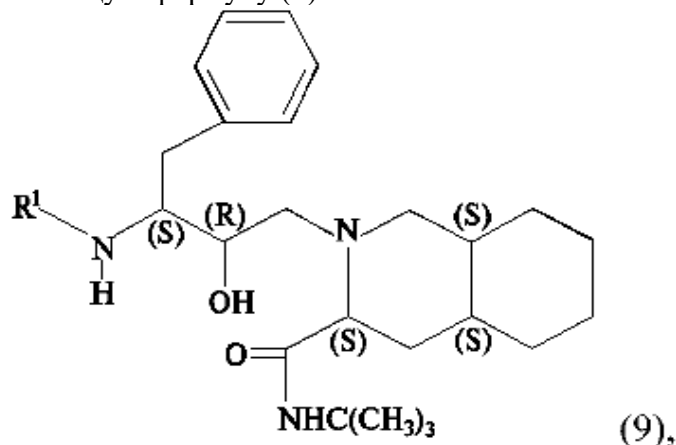
где R^1 - аминокзащитная группа (например, третичный буюксикарбонил или бензилоксикарбонил), а X - атом хлора или брома, с N-третичным буюл-декагидро-(4aS, 8aS) изохиолин-(S)-карбюксамидом, имеющим формулу (7)



и восстановлением полученного соединения 8



где R^1 имеет значение, определенное ранее, отделением необходимого 2(R)-гидроксиизомера от полученной смеси и отщеплением группы R^1 от полученного соединения, имеющего общую формулу (9)



в которой R^1 имеет ранее определенное значение, до получения соединений формулы 2.

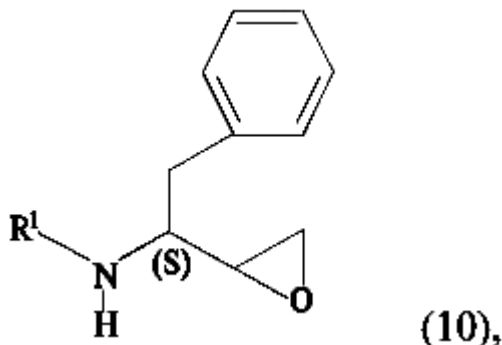
Взаимодействие соединения формулы 6, где одна группа R^1 бензилоксикарбонил, с соединением формулы 7 можно осуществить известным способом, например, в инертном органическом растворителе, таком как галоидзамещенный алифатический углеводород (например, в дихлорметане) и в присутствии основания (триалкиламин-триэтиламин и др.) обычно при комнатной температуре.

Восстановление соединений формулы 8 до соединения формулы 9 с последующим отделением необходимого 2(R)-гидроксиизомера можно осуществить методом, описанным ранее, согласно пункту (в), т.е. восстановлением соединения формулы 4 и отделением 2(R)-гидроксиизомера из полученной смеси.

Отщепление группы R^1 от соединения формулы 9, можно также осуществить известным способом, используя сильную неорганическую кислоту, как галоидводородная кислота или сильную органическую кислоту (трифторуксусная кислота) при температуре

от 0°C до комнатной температуры. С другой стороны, аминоклокирующая группа R¹, которую можно отщепить восстановлением сложного эфира в спирт действием водорода, отщепляется при использовании водорода в присутствии благородного металла в качестве катализатора (например, палладия, палладиевое покрытие на угле) в органическом растворителе или в смеси растворителей, которые в условиях реакции инертны (это, например, этанол, изопропанол, или этиловый эфир уксусной кислоты) при комнатной температуре.

Следующим методом получения соединений формулы 2 является взаимодействие соединений формулы 10



где R¹ определен ранее с соединением, имеющим формулу 7 в инертном органическом растворителе (например, в метаноле), диметилформамиде или в аналогичных растворителях при повышенной температуре от 60°C до 120°C с последующим отщеплением группы R¹ в продукте реакции (соединение формулы 9), как было описано ранее.

Соединения формулы 4, которые используются в качестве исходного материала для получения по (в) можно приготовить, при отщеплении аминоклокирующей группы R¹ от соединения, имеющего формулу 8, и взаимодействием продукта реакции с кислотой, имеющей формулу 3, или с ее реактивными производными. Взаимодействие можно осуществлять способом аналогичным описанному ранее согласно пункту (а).

Соединение, имеющее формулу 5, и которое используется в качестве исходного материала в полученной по пункту (с) является новым.

Соединение формулы 5 можно получить отщеплением бензилоксикарбонильной группы R от соединения формулы 1, в котором R - бензилоксикарбонильная или третичная бутоксикарбонильная группа, соединение, в котором R - третичный бутоксикарбонил, можно получить при взаимодействии соединения формулы 2 с N-(третичным бутоксикарбонил)-L-аспарагином, согласно пункту (а). Процесс отщепления выполняется аналогичным способом, описанным ранее в связи с отщеплением группы R¹ от соединений формулы 8.

Исходный материал формулы 3 и его реактивные производные, а также соединения формул 6, 7 и 10, поскольку они неизвестны и не аналогичны известным соединениям, можно получить аналогичным способом, как и для известных соединений, или способом, описанным в примерах. Более того реагенты, использованные в пункте (с), большей частью известные соединения.

Как было упомянуто выше, соединения формулы 1 и их кислые соли, допущенные для фармакологического применения, ингибируют протеазы вирусного начала и применяются для лечения и профилактики вирусных инфекций, в частности, инфекций, вызванных вирусом HIV и другими ретровирусами.

Ингибирование протеазы вируса HIV вне организма соединениями, которые представлены в настоящем изобретении, можно продемонстрировать посредством следующего теста:

Протеаза вируса HIV была экспрессирована в бактерии E.coli, частично очищена от растворимых экстрактов бактерии фракционированием сульфатом аммония (0 % - 30 %). Активность протеазы анализировалась с применением в качестве субстрата защищенного

гексапептида сукцинил-Ser-Leu-Asn-Tyr-Pro-Ile изобутиламида (S^1) или защищенного гептапептида сукцинил-Val-Ser-Gln-Asn-Phe-Pro-Ile изобутиламида (S^2), отщепление субстрата оценивалось количественно посредством определения H-Pro-Ile изобутиламида спектрофотометрическим анализом N-терминального пролина.

1.25 мМ субстрата растворяли в 125 мМ буфера цитрата (pH = 5.5), содержащего 0.125 мг/мл Tween 20. К 80 мкл вышеупомянутого буферного субстрата добавляли 10 мл раствора исследуемого соединения различных концентраций (растворенного в метаноле или в диметилсульфоксиде и разбавленного водой, содержащей 0.1 % Tween 20) и 10 мл протеазы. Переваривание осуществлялось при температуре 37°C в течение установленного времени, затем процесс останавливали добавлением 1 мл цветного реагента (30 мкг/мл изатина и 1.5 мкг/мл 2-(4-хлоробензоил) бензойной кислоты в 10 % ацетоне в этаноле (в объемном соотношении). Раствор нагревали на водяной бане, затем пигментированный осадок подвергался вторичному растворению в 1 мл 1 % пирогаллола с 33 % содержанием воды в ацетоне (соотношения вес: объем: объем). Оптическая плотность раствора измерялась методом спектрофотометрии при 599 нм. Образование H-Pro-Ile изобутиламида в присутствии исследуемого соединения сравнивали с контрольными, концентрация исследуемого соединения, дающая 50 % ингибирования (I_{50}) была определена графопостроением различных концентраций применяемых исследуемых соединений.

Антивирусная *in vitro* активность соединений, имеющих, формулу 1, может быть продемонстрирована на примере анализа описанного ниже:

Активность против вируса HIV

В этой пробе были использованы HTLV-III (штамм RF), выращенные в клетках C8166 ($CD4^+$ человеческого Т-лимфобластоидного происхождения), с применением среды RPMI 1640 с бикарбонатным буфером, антибиотиками и 10 % сывороткой коровьего эмбриона.

Суспензию клеток заражали вирусом в количестве, десятикратном TCD_{50} , адсорбцию осуществляли при температуре 37°C в течение 90 мин. Клетки отмывались средой три раза. Тест выполнялся в 6 мл пробирках с культурой ткани, каждая пробирка содержала 2×10^5 инфицированных клеток в 1.5 мл среды. Анализируемые соединения растворялись в водно-эфирной среде или в диметилсульфоксиде в зависимости от растворимости и добавляли 15 мл раствора субстанции. Культуры инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч во влажной атмосфере с содержанием 5 % углекислого газа. Затем культуры центрифугировали, а аликвотная проба надосадочной жидкости переводилась в растворимое состояние посредством Nonidet P40 и подвергалась действию пробы антигена, в которой была первичная антисыворотка, имеющая конкретную реактивность против белка вируса 24 и систему нахождения пероксидазы хрена обыкновенного. Окрашенное образование определялось методом спектрофотометрии и наносилось на диаграмму в зависимости от концентрации исследуемой субстанции. Концентрация, при которой наблюдалась 50 % защита, определялась индексом (I_{50}).

Цитотоксическая проба, основанная на поглощении красителя и метаболизме или на внедрении меченного радиоактивного изотопа аминокислоты, представляет собой серию опытов, наряду с вышеуказанной пробой для определения активированной селективности.

Результаты, полученные при проведении вышеуказанных исследований, где используются соединения, имеющие формулу 1, в качестве анализируемых соединений, объединены в таблице.

Соединения, имеющие формулу 1, а также их соли, допущенные для фармацевтического применения, можно использовать в качестве лекарственных препаратов. Фармацевтические препараты должны быть приготовлены для внутреннего применения, например, орального (в форме таблеток, облаток, драже, мягких и твердых желатиновых капсул, растворов, эмульсий или суспензий), назального (в форме носовых

аэрозолей) или ректального (в форме суппозитория). Однако также должна иметься инструкция для парентерального применения, например, внутримышечного или внутривенного (в форме растворов для инъекций).

В промышленном производстве таблеток, облаток, драже и твердых желатиновых капсул соединения формулы 1 и их соли можно перерабатывать с инертными неорганическими или органическими наполнителями. В качестве таких наполнителей можно использовать лактозу, кукурузный крахмал или их производные, тальк, стеариновую кислоту и ее соли.

Подходящей средой для мягких желатиновых капсул являются растительные масла, воски, жиры, полутвердые или жидкие полиолы.

Подходящей средой для растворов и сиропов могут быть вода, полиолы, сахароза, инертный сахар, глюкоза.

Подходящими средами для растворов для инъекций являются вода, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла.

Подходящими средами для суппозитория могут быть натуральные или отвердевшие масла, воски, жиры, полужидкие или жидкие полиолы.

Более того, в состав фармацевтических препаратов могут входить консервирующие вещества, растворители, вещества, повышающие вязкость, антикоагулянты, смачивающие реагенты, эмульгаторы, подслащивающие вещества, красители, ароматизирующие вещества, соли для изменения осмотического давления, буферы, покрывающие вещества (оболочки) или антиоксиданты. Кроме того, могут входить другие вещества, имеющие терапевтическое значение.

Согласно настоящему изобретению, соединения, имеющие формулу 1, а также их соли, допущенные для фармацевтического применения, можно использовать для лечения и профилактики вирусных заболеваний, в частности, ретровирусных инфекций. Дозировка может варьироваться в широких пределах и, естественно, подбирается индивидуально в каждом конкретном случае, обычно в случае орального применения достаточно следующей суточной дозы от 3 мг до 3 г, предпочтительнее 10 мг до 1 г. (например 300 мг на человека), 1-3 раза в сутки, каждая доза, как правило, одинаковая. Однако следует отметить, что верхний предел может быть превышен.

Данные ниже примеры наглядно иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1.

Раствор 561 мг 2-[3(S)-амино-2(R)-гидрокси-4 фенилбутил]-N-третичный бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид и 372 мг N-(бензилоксикарбонил)-L-аспарагина в 20 мл сухого тетрагидрофурана охлаждали в смеси льда и соли. Добавляли 189 мг гидроксibenзотриазола, 161 мг N-этилморфолина и 317 мг дициклогексилкарбодиимида, смесь перемешивали в течение 16 ч. Затем смесь разбавляли в этиловом эфире уксусной кислоты и фильтровали. Фильтрат промывали водным раствором бикарбоната натрия и раствором хлорида натрия. Растворитель удалялся испарением, а осадок подвергался хроматографии на силикагеле с применением смеси дихлорметана и метанола (9:1) для извлечения из адсорбента до 434 мг 2-[3(S)-N-(бензилоксикарбонил)-L-аспарагил амина]-2 (R)-гидрокси-4-фенилбутил-N-третичный бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид в виде белого твердого вещества из смеси метанол (диэтиловый эфир, Масс-спектр: 650 $[M+H]^+$ ЯМР: δ (d_4 CH_3OH , 400 MHz): 7.33 (5H, m, $PhCH_2O$), 7.25 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.09 (1H, m), 5.05 (2H, s, $PhCH_2O$), 4.42 (1H, dd, Asn α $J=7.8$, 6.1), 4.22 (1H, m, $-CH_2CHCH(OH)-$ $J=10.7$ около 4, около 4), 3.85 (1H, m, $-CHCH(OH)CH_2-$ $J=8.0$, 6.2, около 4), 3.02 (1H, dd, $PhCH(H)CH$, $J=-13.9$ около 4), 3.02 (1H, dd, 1_{eq} , $J=-12.0$, немного 2.69 (1H, dd, $PhCH(H)CH$ - $J=13.9$, 10.7), 2.63 (1H, dd, $-CH(OH)CH(H)N$ - $J=12.6$, 8.0), 2.62 (1H, dd, H_{3ax} $J=$ около 11, немного) 2.57 (1H, dd, Asn β_1 $J=-15.2$, 6.1), 2.38 (1H, dd, Asn β_2 , $J=-15.2$, 7.8), 2.19 (1H, dd, $-CH(OH)CH(H)N$ - $J=-12.6$, 6.2), 2.17 (1H, dd, 1_{ax} , $J=-12.0$, 3.2), 2.07 (1H, m, H_{4ax} , $J=-12.7$, около 11, около 11.5), 1.78 (1H, m, H_{4ax} , $J_{4a-4ax}=$ около 11.5, $J_{4a-4eq}=$ немного $J_{4a-8a}=$

немного), 1.63 (1H, m, H_{8a}, J_{8a-1ax} = 3.2, J_{8a-1eq} = немного, J_{8a-4a} = немного), 1.35 (1H, m, H_{4eq}, J = -12.7, немного, немного), 1.30 (9H, s, t-бутил), 2.0-1.2 (8H, m).

Используемый в качестве исходного материала 2-[3(S)-амино-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичный бутилдекагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид получали следующим образом:

1. Суспензию из 12.676 г (71.6 ммоль) 1,2,3,4-тетрагидро-3(S)-изохинолинкарбоновой кислоты (Chem. Pharm. Bull. 1983, 31, 312) в 200 мл 90 % уксусной кислоты гидрогенизировали при температуре 80°C и давлении 140 атм над 5 % родием на графите в течение 24 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры, а катализатор затем отфильтровывали. Фильтрат испаряли до получения камеди, которую растворяли в 10 мл этилацетата, и медленно добавляли к 100 мл энергично перемешиваемого диизопропилового эфира. Получался смолистый осадок. Надосадочные жидкости удалялись переливанием, а осадок экстрагировали горячим этилацетатом. Этот горячий раствор вливали в интенсивно перемешиваемую смесь 150 мл диэтилэфира и диизопропил эфира (1:1) до получения светло-серого твердого вещества, которое отфильтровывали, промывали в диэтилэфире и высушивали. Таким образом, получая 5.209 г смеси гидроизохинолин-3(S)-карбоновых кислот, в состав которых входили в боль шей степени (около 65 %) 4aS, 8aS изомеры вместе с 4aR, 8aR изомерами (около 25 %), и около 10 % транс-изомеров; MS: m/e 184 [M+H]⁺.

2. 9.036 г (49.4 ммоль) смеси декагидроизохинолин -3(S)-карбоновых кислот растворяли в 50 мл (50 ммоль) 1M раствора гидроксида натрия, полученный раствор охлаждали до 0°C, 7.40 мл (51.87 ммоль) бензилхлороформата и 58.7 мл (58.7 ммоль) 1M раствора гидроксида натрия добавляли по каплям в течение 1 ч, температура поддерживалась на уровне 0 - 5°C охлаждением. Затем смесь перемешивали еще 2 часа, за это время температура смеси доводилась до комнатной. 100 мл диэтилового эфира добавляли к отфильтрованной смеси, при помощи которого нерастворимый R,R - изомер удаляли. Водный слой фильтрата сепарировали и доводили до pH = 1.5- 2 добавлением концентрированной соляной кислоты, посредством которой осаждалось масло. Смесь дважды экстрагировали 100 мл этилацетата. Связанные органические экстракты промывались водой, высушивалось безводным сульфатом натрия, и испарялись до получения масла. Это масло растворяли в 35 мл этилацетата с добавлением 2.85 мл (25 ммоль) циклогексанамина. Белый осадок собирали центрифугированием до получения (после нескольких дробных декристаллизаций из метанол/этилацетата) 2.38 г циклогексиламиновой соли 2-(бензилоксикарбонил)-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоновой кислоты; MS : m/e 318 [M+H]⁺.

3. 2.334 г циклогексиламиновой соли 2-(бензилоксикарбонил)-декагидро (4aS, 8aS)-изохинолин- 3 (S) – карбоновой кислоты разделили между 50 мл этилацетата и 50 мл 10 % раствора лимонной кислоты. Органическую фазу отделили, промыли водой, отфильтровали и испарили до получения 1.87 г 2-(бензилоксикарбонил)-декагидро-(4aS, 8aS) - изохинолин-3(S)-карбоновой кислоты в виде бесцветной камеди: MS: m/e 318 [M+H]⁺.

4. Раствор 0.634 г (2.0 ммоль) 2-(бензилоксикарбонил) декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоновой кислоты в 6 мл диметоксиэтана обработали 0.23 г (2.0 моль) N-имидом оксиянтарной кислоты и 0.412 г (2.0 ммоль) дициклогексилкарбодиимидом. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Смесь фильтровали, а фильтрат испаряли до получения 0.879 г эфира N-имида оксиянтарной кислоты в виде светло-желтого масла. Раствор 0.828 г (2.0 моль) эфира N-имида оксиянтарной кислоты перемешивали в 5 мл дихлорэтана, охлаждали до 0°C и обрабатывали 0.219 г (3.0 ммоль) третичного бутиламина. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем в течение 4.5 ч при комнатной температуре. Затем смесь промывали 2M соляной кислотой, раствором карбоната натрия и раствором хлорида натрия, высушивали безводным сульфатом магния и испаряли. Осадок растворяли в 20 мл диэтилового эфира и отфильтровывали. Фильтрат

испаряли до получения 0.712 г 2-(бензилокси-карбонил)-N-третичный бутил-декагидро 4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в виде белого твердого вещества; MS; m/e 373 [M + H]⁺.

5. Раствор 0.689 г (1.85 ммоль) 2-(бензилоксикарбонил)-N-третичный бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в 20 мл этанола гидрогенизировали в присутствии 0.01 г 10 % палладия на графите при комнатной температуре и при атмосферном давлении в течение 18 ч. Катализатор удаляли фильтрацией, а растворитель удаляли испарением до получения количественного выхода N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в виде чистого масла: MS; m/e 239 [M+H]⁺, которое использовалось на следующем этапе без дальнейшего очищения.

6. Раствор 440 мг N-третичного бутил-декагидро(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида и 549 мг 3(S)-(бензилоксиформамидо)-1,2 (S)-эпокси-4-фенилбутана в 6 мл этанола перемешивали при температуре 60°C в течение 7 ч, добавляли дополнительные 54 мг 3(S)-(бензилоксиформамидо)-1,2(S)-эпокси-4-фенил-бутана, раствор перемешивали при температуре 20°C в течение 16 ч. Растворитель удаляли испарением, а осадок подвергали хроматографии на силикагеле с использованием диэтилового эфира: н-гексана: метанола (47.5:47.5:5) для элюирования с получением 771 мг 2-[3(S)-(бензилоксиформамидо)-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил-N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в виде белого твердого осадка: MS : m/e 536 [M+H]⁺.

7. Раствор 747 мг 2-[3(S)-(бензилоксиформамидо)-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичного-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в 40 мл этанола гидрогенизировали на 10 % палладия на графите при температуре 20°C и атмосферном давлении в течение 5 ч. Катализатор удаляли фильтрацией, а фильтрат испаряли до получения 561 мг 2-[3(S)-амино-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичного декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовалось на следующих этапах без дальнейшей очистки.

Пример 2.

Раствор 154 мг 2-[3(S)-[(L-аспарагинил)-амино]-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS) изохинолина-3(S)-карбоксамида и 52 мг хинной кислоты в 6 мл сухого тетрагидрофурана охлаждали в смеси льда и соли. Добавляли 41 мг гидроксibenзотриазола, 35 мг N-этилморфолина и 68 мг дициклогексилкарбодиимида, смесь перемешивали в течение 64 ч. Смесь разбавляли этилацетатом и отфильтровывали. Фильтрат промывали водным раствором бикарбоната натрия и раствором хлорида натрия, затем испаряли. Осадок подвергался хроматографии на силикагеле с применением дихлорметана и метанола (9:1) для элюирования с целью получения 50 мг N-третичного бутил-декагидро-2-[2(R)-гидрокси-4-фенил-3(S)-[[N-(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагинил]амино]-бутил]- (4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамида в виде белого осадка: MS; m/e 671 [M+H]⁺, ЯМР: δ (d₄CH₃OH 400 MHz): 8.52 (1H, m), 8.18 (1H, m), 8.14 (1H, m), 8.02 (1H, m), 7.84 (1H, m), 7.69 (1H, m), 7.18 (2H, m), 6.90 (2H, m), 6.72 (1H, m), 4.93 (1H, dd, Asn αCH, J=6.6, 6.8), 4.27 (1H, m, -CH₂ CHCH(OH) - J= 3.8, 3.8, 11.0), 3.89 (1H, m, -CHCH(OH)CH₂ - J = 7.2, 6.4, 3.8), 3.06 (1H, dd, H_{1eq}, J=-12.0, 3.0), 3.02 (1H, dd, PhCH(H)CH -J=-14.0, 3.8), 2.77 (1H, dd, Asn β₁ J=-15.6, 6.6), 2.68 (1H, dd, Asn β₂ J=-15.6, 6.8), 2.68 (1H, dd, PhCH(H)CH - J=-14.0, 11.0), около 2.68 (1H, dd, -CH(OH)CHN - J = -12.0, 7.2), 2.63 (1H, dd, H_{3ax} J=11.0, 2.2), 2.22(1H, dd, -CH(OH)CH(H)N - J = -12.0, 6.4), 2.18 (1H, dd, H_{1ax} J=-12.0, 2.2), 2.06 (1H, m, H_{4ax} J=-11.0, 11.0, 11.0), 1.78 (1H, m, 4a J_{4a-4ax} = 11.0, J_{4a-4eq} = около 4, J_{4a-8a} = около 4), 1.65 (1H, m, 8a J_{8a-1ax} = 2.2, J_{8a-1eq} = 3.0 J_{8a-4a} = около 4), 1.37 (1H, m, H_{4eq} J = -11.0, 2.2 около 4), 1.30 (9H, s, t - бутил), 2.0-1.2 (8H, m).

Используемый в качестве исходного 2-[3(S)-[(L-аспарагинил)-амино]-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичный бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид получали следующим методом.

Раствор 195 мг 2- [3(S)-[[N-(бензилоксикарбонил)-L-аспарагинил] амино] -2(R)-

гидрокси-4-фенилбутил] N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид в 20 мл этанола гидрировали при комнатной температуре и атмосферном давлении в течение 18 ч над 10 % палладия на угле. Катализатор отфильтровывался, а фильтрат упаривали при пониженном давлении до получения 154 мг 2-[3(S)-[(L-аспарагинил) амино]-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS), изохинолин-3 (S)-карбоксамид, который использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки.

Пример 3.

Раствор 287 мг N-(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагина и 401 мг 2-[3(S)-амино-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-третичного бутил-декагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид (полученного способом, описанным в примере 1 (1) - (7) в 3 мл тетрагидрофурана охлаждали до -10°C и добавляли 163 мг 3-гидрокси-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-она и 220 мг дициклогексилкарбодиимида. Смесь перемешивали при температуре -10°C в течение 2 ч и при температуре 20°C в течение 16 ч, затем разбавляли этилацетатом и отфильтровывали. Фильтрат промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, насыщенным раствором хлорида натрия, а затем испаряли. Осадок подвергали хроматографии на силикагеле с использованием 4 % (по объему) метанола в дихлорметане для элюирования с получением 537 мг N-третичного бутил-декагидро -2[2(R)-гидрокси-4-фенил-3(S)-[[N-(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагинил]амино]бутил]-(4aS, 8aS)-изохинолил-3(S)-карбоксамид, который был идентичен продукту, полученному в примере 2.

N-(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагин, используемый в качестве исходного материала, получали следующим образом:

Смесь 540 мг сложного эфира амида янтарной кислоты и хинной кислоты и 300 мг L-аспарагин моногидрата в 2 мл диметилформамида перемешивали при температуре 20°C в течение 96 ч. Растворитель удаляли испарением до получения белого твердого осадка, который интенсивно перемешивали в 10 мл дихлорметана, отфильтровывали и промывали в дихлорметане. Таким образом, получали 431 мг N-(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагина в виде белого твердого вещества: MS; m/e 288 [M+H]⁺.

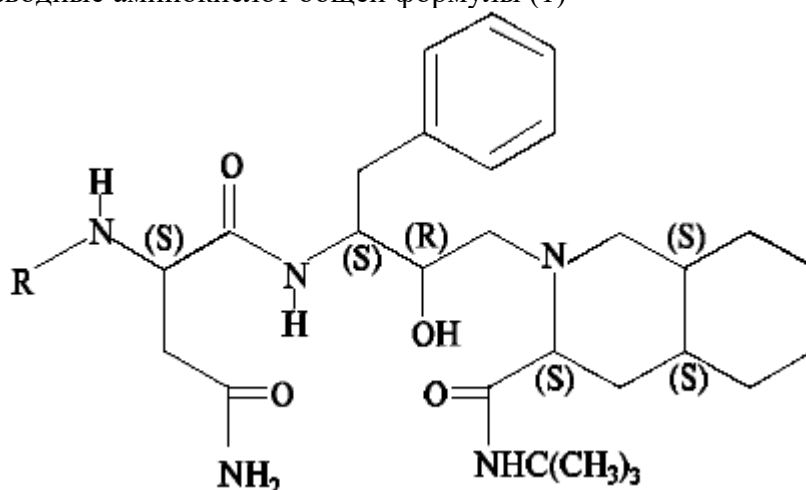
Следующий пример иллюстрирует приготовление фармацевтического препарата, состоящего из соединения формулы 1 или его соли, допущенной для фармацевтического применения в виде активного ингредиента.

Пример 4.

Водный раствор активного ингредиента стерильно фильтрованный смешивали при нагревании со стерильным желатиновым раствором, в который входил фенол в качестве консерванта, с применением 1.00 мл полученного раствора, включающего 3.0 мг активного ингредиента, 150.0 мг желатина, 4.7 мг фенола и 1.0 мл дистиллированной воды. Смесь разливали в пробирки емкостью 1.0 мл в условиях антисептики.

Таблица 1

Соединение 1 R	I ₅₀		
	ингибирование HIV протеазы (мкМ)		активность против вируса HIV (n M)
	S ¹	S ²	
Бензилоксикарбонил	≤ 0.024	≤ 0.0027	20
2-хинолилкарбонил	≤ 0.033	≤ 0.00037	2

Формула изобретения**1. Производные аминокислот общей формулы (1)**

где R - бензилоксикарбонил или 2-хинолилкарбонил, и их кислотнo-аддитивные соли.

2. N-трет.бутил-декагидро-2-[2(R)-гидрокси-4-фенил-3(S)-[[N(2-хинолилкарбонил)-L-аспарагинил]амино]бутил]-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)- карбоксамид.

3. 2-[3-(S)-Амино-2-(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-трет. бутилдекагидро-(4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид.

4. 2-[3-(R)-[(L-Аспарагинил) амино]-2(R)-гидрокси-4-фенилбутил]-N-трет.бутил-декагидро (4aS, 8aS)-изохинолин-3(S)-карбоксамид.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03