



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900607426
Data Deposito	30/06/1997
Data Pubblicazione	30/12/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Titolo

DERIVATI PEPTIDOMIMETICI INIBITORI SUICIDI DELLA PROLIFERAZIONE DEL HIV

Derivati peptidomimetici inibitori suicidi della proliferazione del HIV.

Descrizione

La presente invenzione si riferisce a derivati peptidomimetici ed al loro uso in campo terapeutico.

La domanda di brevetto EP-0 094 815 (a nome SmithKline Beecham) descrive oligopeptidi contenenti un residuo di glicina α -sostituito, ad esempio feniltioglicina, utili come *pro-drug* per agenti antitumorali ed antimicrobici grazie alla loro capacità di attraversare la membrana cellulare e di liberare in essa l'agente attivo per mezzo di una degradazione enzimatica. Al fine di venire trasportati all'interno della cellula questi oligopeptidi non devono recare gruppi protettivi sulle posizioni terminali, oppure tali gruppi devono essere scindibili in vivo, e la glicina α -sostituita in essi contenuta deve essere della serie L. Tra i vari agenti attivi ivi descritti il tiofenolo viene detto essere particolarmente utile nello studio dell'attività proteasica/peptidasica in sistemi biologici.

La domanda di brevetto WO 91/10679 (a nome Warner-Lambert) descrive derivati peptidici inibitori della renina contenenti il gruppo $\text{-NH-CH(S-fenile)-CO-}$ utili, tra l'altro, nel trattamento di disturbi causati da retrovirus quali HTLV-I, -II e -III.

L'HIV-aspartil-proteasi è detto agire unicamente su substrati naturali composti da almeno 9 amminoacidi. Ad esempio, Niddam V. et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters, 6, No.6, 609-14 (1996) illustrano tiofenossi-peptidi inibitori della replicazione di HIV derivati di un substrato specifico per le proteasi del HIV e contenenti l'unità strutturale -Leu-(S)-Phe- (struttura peptidica α -glicina-sostituita). La presenza dell'atomo di zolfo sembra rendere la struttura resistente all'azione delle proteasi. I dati di attività antivirale sembrano indicare la necessità di avere i residui terminali del peptide liberi, come già suggerito dalla domanda di brevetto

MI 97 A 1545
30/06/1997

EP-0 094 815 sopra discussa, e inoltre si sottolinea la necessità di avere un peptide di almeno 9-10 amminoacidi, dal momento che entrambi i dipeptidi tiofenolici saggiati si sono mostrati inattivi.

La necessità di avere un peptide di almeno 9 amminoacidi, facoltativamente contenenti un gruppo tiofenolico, viene evidenziata anche dalla domanda di brevetto WO 97/01576 (a nome Laboratoire Laphal) che descrive peptidi in grado di inibire la replicazione del HIV tramite l'inibizione di un dimero aspartil-proteasico.

E' stato ora sorprendentemente trovato che derivati peptidomimetici recanti una porzione tiofenolica come catena laterale e formati da due sole unità amminoacidiche sono inibitori suicidi della proliferazione del HIV per liberazione di detta porzione tiofenolica selettivamente all'interno della cellula infetta ad opera di HIV-proteasi.

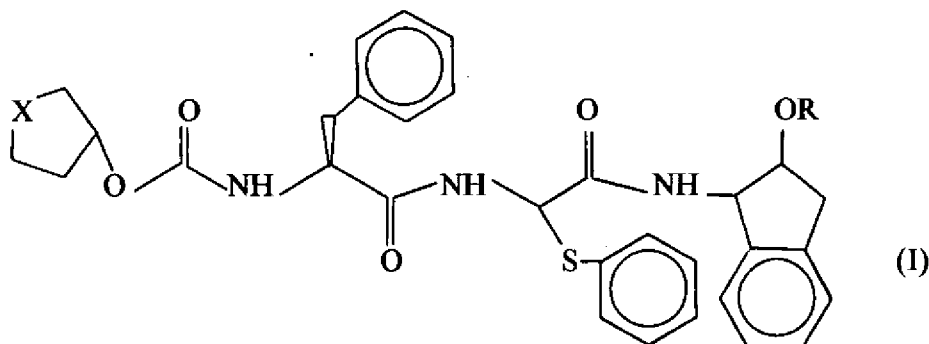
Contrariamente a quanto insegnato dall'arte nota, i composti dell'invenzione hanno ridotte dimensioni (due residui amminoacidici contro gli almeno 9 indicati da WO 97/01576 e Niddam V. et al. supra) e sono sostituiti sulle porzioni N- e C-terminali (diversamente da quanto indicato in EP-0 094 815 supra).

Cionondimeno essi mostrano specificità per le HIV-proteasi e dunque per le cellule infette da questo virus. In questo sito, e solo in questo, essi vengono deacilati dall'enzima sopra detto e in questo stato sono sufficientemente instabili da liberare l'agente citocida, cioè il tiofenolo.

Il concetto di inibitore suicida è noto da tempo in farmacologia. Si tratta di molecole che, al contrario degli inibitori classici, interagiscono con la struttura per la quale mostrano affinità al fine di venirne distrutte e così liberare una loro porzione che porta alla morte l'intera cellula ospite. E' chiaro che al fine di esplicitare la loro attività sostanze del genere necessitano un bersaglio ben definito e caratteristico

della patologia da affrontare. A nostra conoscenza, non si era trovato sinora un inibitore suicida per il virus HIV e questo costituisce un'importante caratteristica della presente invenzione.

La presente invenzione pertanto si riferisce a dipeptidi di formula (I)



dove X è un atomo di ossigeno oppure un gruppo SO_2 ; e

R è un atomo di idrogeno oppure un gruppo protettivo della funzione idrossilica.

I composti di formula I possiedono centri asimmetrici e possono quindi essere in forma di stereoisomeri.

Oggetto della presente invenzione sono composti di formula I in forma di miscele stereoisomeriche così come di singoli stereoisomeri.

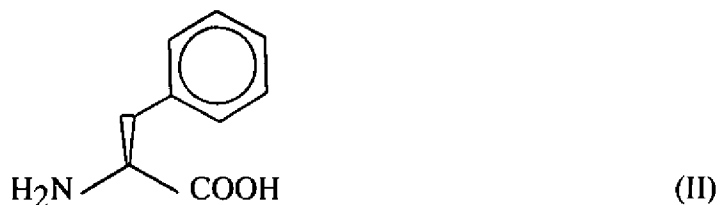
I composti di formula I sono inibitori suicidi della proliferazione del HIV. Essi sono in grado di liberare tiofenolo, agente citocida, all'interno della cellula infettata, a seguito di una deacilazione cui vengono selettivamente sottoposti dalla HIV-aspartil-proteasi, cosa che garantisce una selettività d'azione nei confronti di cellule infette da HIV e di conseguenza una trascurabile tossicità.

Per gruppo protettivo della funzione idrossilica si intende, ad esempio un gruppo trimetilsilile, trietilsilile o acetile, preferibilmente trimetilsilile.

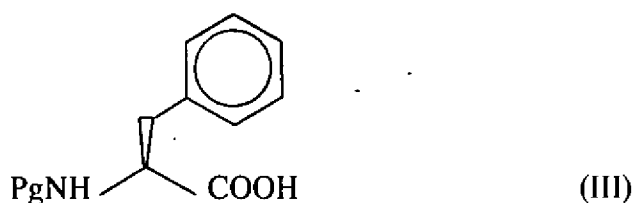
La configurazione preferita per i composti di formula I è 1S,2R per la porzione 2-idrossi-indan-1-ile e 3S per la porzione tetraidro-3-furanile.

I composti di formula I possono venire ottenuti a partire da L-fenil-alanina

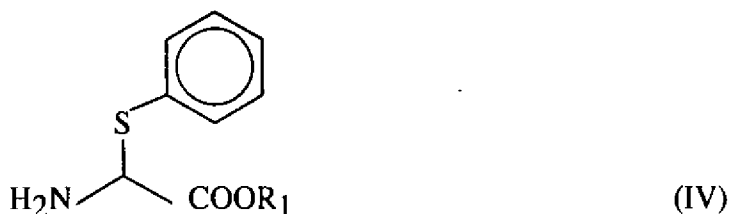
- 5 -



che viene fatta reagire con un opportuno agente acilante quale, ad esempio, di-t-butildicarbonato, benzilcloroformiato, t-butildimetilsilossi-cloroformiato, facoltativamente in presenza di una base organica a dare un composto di formula III

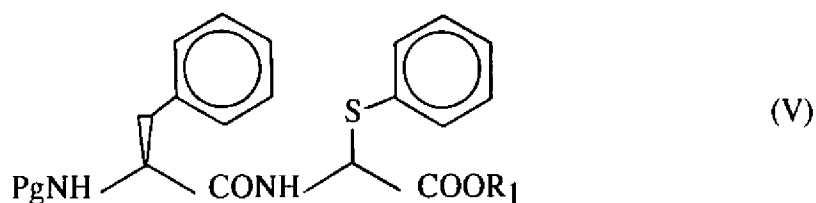


dove Pg è un gruppo protettivo per la funzione amminica, che a sua volta viene condensato con un composto di formula IV

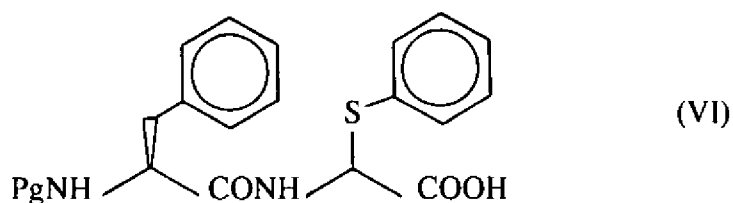


dove R₁ è un gruppo alchilico inferiore oppure un gruppo -CH₂CCl₃, in presenza di un agente condensante quale, ad esempio, 1-idrossibenzotriazolo, N-idrossisuccinimide, e dicioesilcarbodiimmide. Il composto di formula IV è ottenuto secondo metodi noti in letteratura.

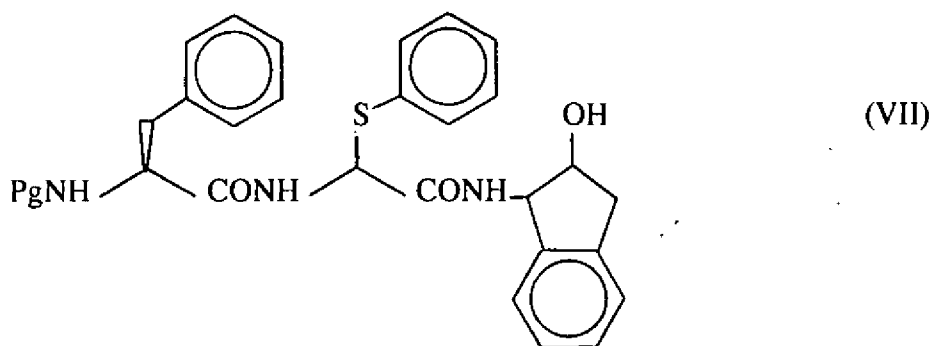
La condensazione tra i composti di formula III e IV dà il composto di formula V



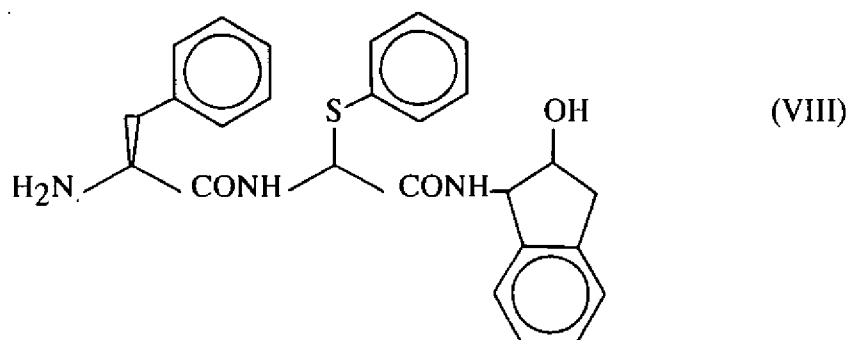
dove Pg è come sopra definito e R₁ è un gruppo alchilico inferiore o un gruppo CH₂CCl₃, che sottoposto ad idrolisi in presenza di una base forte quale idrossido di sodio, potassio o tetrabutilammonio fornisce un composto di formula VI



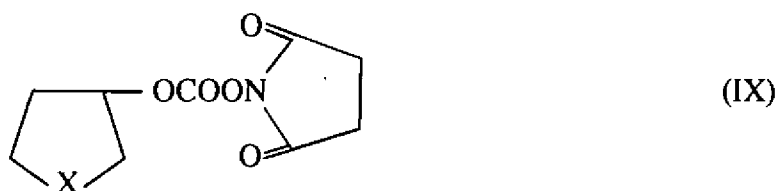
dove Pg è come sopra definito, che a sua volta viene condensato con *cis*-1-ammino-2-indanolo, in presenza di 1-idrossibenzotriazolo, dicicloesilcarbodiimmide, o *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N*-etilcarbodiimmide cloruro/*N*-metilmorfolina, a dare un composto di formula VII



dove Pg è come sopra definito, che per idrolisi in presenza di un acido forte, ad esempio acido cloridrico, bromidrico o trifluoroacetico, fornisce un composto di formula VIII



Il composto di formula VIII condensato con un composto di formula IX



dove X è come definito nella formula I, in presenza di basi, porta ad un composto di formula I dove R è H.

Un composto di formula I dove R è un gruppo protettivo della funzione idrossilica può essere ottenuto a partire da un composto di formula I dove R è H secondo tecniche ben note all'esperto del ramo (si veda, ad esempio, T.W. Greene e P.G.M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, New York).

I composti di formula I in forma otticamente attiva vengono ottenuti per separazione ottica o attraverso sintesi stereospecifiche o stereoselettive.

I composti di formula I sono inibitori suicidi del HIV come risulta dalla prova di affinità per l'enzima HIV-aspartil-proteasi e da quella di liberazione del tiofenolo (esempi 13 e 14). Come composto di riferimento è stato usato un composto strutturalmente analogo compreso dalla formula generale della domanda di brevetto EP-0 094 815 sopra discussa. Esso, pur avendo mostrato una buona affinità per l'enzima, non ha portato a liberazione di tiofenolo dimostrando in tal modo di non possedere le caratteristiche degli inibitori suicidi di formula I dell'invenzione.

Appare chiaro come queste caratteristiche di selettività e specificità enzimatica rendano i composti di formula I particolarmente adatti per il trattamento delle infezioni virali dovute all'azione di un retrovirus quale il HIV.

Ne consegue che per gli impieghi pratici in terapia, i composti di formula I possono essere somministrati sia per via parenterale sia per via orale.

Le dosi terapeutiche saranno generalmente comprese tra 1 e 40 mg al giorno per via parenterale e tra 20 e 200 mg per via orale per singola somministrazione.

Costituiscono inoltre oggetto della presente invenzione le composizioni farmaceutiche contenenti un quantitativo terapeuticamente efficace dei composti di formula I o di loro sali farmaceuticamente accettabili in miscela con un adatto veicolante.

Le composizioni farmaceutiche oggetto dell'invenzione possono essere liquide, adatte alla somministrazione enterale o parenterale, e, preferibilmente, solide quali compresse, capsule, granulati, adatte per la somministrazione orale.

La preparazione delle composizioni farmaceutiche oggetto della invenzione può essere effettuata secondo tecniche tradizionali.

Allo scopo di meglio illustrare la presente invenzione vengono ora forniti i seguenti esempi.

Le purificazioni cromatografiche sono state effettuate su colonne di gel di silice (230-400 mesh).

Gli spettri di massa, qualora non diversamente specificato, sono stati effettuati nelle seguenti condizioni: ionizzazione chimica, isobutano, ioni positivi.

L'assegnazione dei nomi ai composti degli esempi è stata effettuata seguendo la nomenclatura IUPAC tramite il sistema ACD/Name (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

Esempio 1

Preparazione dell'acido 2-(2S)-t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionico

Ad una soluzione di L-fenil-glicina (33,04 g; 0,2 moli) in NaOH 1N (200 ml; 0,2 moli) sotto agitazione si sono aggiunti 300 ml di diossano, quindi la soluzione è stata raffreddata a 0-5°C e vi si è gocciolata, nell'arco di un'ora, una soluzione di diterbutildicarbonato (48,02 g; 0,22 moli) in diossano (50 ml). La miscela di reazione è stata quindi portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per una notte. Il diossano è stato eliminato sotto vuoto e la miscela acidificata con 30 g di KOH (0,22 moli) sciolti in 100 ml di acqua. L'olio formatosi è stato estratto con acetato di etile per tre volte. Le fasi organiche riunite sono state lavate con cloruro di sodio al 20% fino a pH neutro, poi la soluzione è stata anidrificata e concentrata

- 9 -

a dare un olio (58 g) che è stato estratto con etere di petrolio e tirato a secco.

Sono stati ottenuti 53 g di acido 2-(2S)-t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionico che è stato usato come tale nella fase successiva.

Esempio 2

Preparazione di carbonato di 2,5-diosso-pirrolidin-1-ile e (3S)-tetraidrofuran-3-ile

Ad una soluzione di (S)(+)-3-idrossitetraidrofurano (1 g; 11,35 mmoli) in cloruro di metilene (10 ml) sotto agitazione e in atmosfera di azoto, è stata aggiunta N,N'-disuccinimmidilcarbonato (3,2 g; 12,84 mmoli) a dare una sospensione nella quale, a 18°C, è stata gocciolata una soluzione di trietilammina (1,74 ml; 12,48 mmoli) in cloruro di metilene (10 ml). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte in atmosfera di azoto, quindi diluita con cloruro di metilene e lavata con una soluzione di cloruro di sodio per tre volte. La fase organica è stata anidrificata e concentrata a dare un olio che salifica per innescio, ed è stato separato con etere di petrolio, filtrato e portato a secco.

Si sono ottenuti 2,3 g di carbonato di 2,5-diosso-pirrolidin-1-ile e (3S)-tetraidrofuran-3-ile che sono stati usati come tale nella fase successiva.

Esempio 3

Preparazione di (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)-fenil-sulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile

Ad una soluzione di acido 2-(2S)-t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionico (6,98 g; 0,0263 moli), preparato come descritto nell'esempio 1, in cloruro di metilene (70 ml) si è aggiunta una soluzione di 1-idrossibenzotriazolo (2,96 g; 0,0219 moli) in tetraidrofurano anidro (90 ml) ottenuta per leggero riscaldamento, e di seguito una soluzione di amminofenilsulfanilacetato di 2,2,2-tricloroetile (7,7 g; 0,0219 moli) preparato secondo la procedura descritta da J.A.C.S., 1992, 35,

pag. 1032-1042, in cloruro di metilene (80 ml). La miscela è stata posta sotto agitazione ad una temperatura di 0-5°C e vi si è gocciolata una soluzione di trietilammina (3,05 ml; 0,0219 moli) in cloruro di metilene (30 ml) nel corso di 30 minuti, seguita da una soluzione di dicicloesilcarbodiimmide (4,53 g; 0,0219 moli) in cloruro di metilene (30 ml). La miscela risultante è stata lasciata sotto agitazione per altri 30 minuti, poi riportata a temperatura ambiente proseguendo l'agitazione per una notte. Dopo aver filtrato via il residuo insolubile, la miscela è stata concentrata sotto vuoto a dare un residuo che è stato ripreso con acetato di etile e cloruro di sodio al 20%. Dopo filtrazione, si è separata e lavata la fase organica con acido citrico al 5%, cloruro di sodio al 5%, bicarbonato di sodio al 5% e infine con cloruro di sodio al 20% fino a pH neutro. La soluzione è stata anidrificata e concentrata a dare un olio rossastro (13,5 g) che è stato ripreso con cloruro di metilene. Il precipitato formatosi è stato filtrato via e la soluzione nuovamente portata a secco a dare un residuo che, sciolto in cloruro di metilene, è stato purificato per cromatografia flash (eluente acetato di etile/etere di petrolio da 40:60 a 20:80).

Si sono ottenuti 8,8 g di (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile (resa: 71,5%).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,44-7,14 (m, 10H, Ar); 6,85-6,73 (m, 1H, S-CH-*NH); 5,80-5,74 (m, 1H, CHS); 4,85-4,74 (m broad, 1H, NH-COO); 4,76-4,61 (m, 2H, COOCH₂); 4,44-4,30 (m, 1H, *CH-NH-COO); 3,17-2,92 (m, 2H, *CH₂-Ar); 1,38 e 1,36 (2s, 9H, t-bu).

Massa: 563 [M+H]

Esempio 4

Preparazione dell'acido [(2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammi-

no)]fenilsulfanil-acetico

In una soluzione di (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile (8,8 g; 15,66 mmoli) preparato come descritto nell'esempio 3, in diossano (300 ml) e acqua (30 ml), sotto agitazione a 15-20°C, sotto azoto, si è gocciolato NaOH 0,1N (164 ml), e la miscela risultante è stata lasciata a sé per una notte. Il diossano è stato evaporato a temperatura ambiente e la miscela portata a pH=8 con una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio al 5%, quindi estratta con etere etilico. La fase acquosa separata è stata filtrata su celite, acidificata con KHSO₄ 5%, estratta con acetato di etile, e la fase organica è stata anidrificata e concentrata a dare un residuo che è stato usato come tale nella fase successiva.

Si sono ottenuti 6,46 g di acido (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)fenilsulfanil-acetico (resa: 95%).

Esempio 5

Preparazione di [(1S)-(1-{[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil)]carbammato di t-butile

Ad una soluzione di (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)fenilsulfanil-acetico (5 g; 11,6 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 4, in cloruro di metilene (50 ml) si è aggiunta una soluzione di (1S,2R)(-)-cis-1-ammino-2-indanolo (1,83 g; 11,6 mmoli) in cloruro di metilene (50 ml). La miscela risultante è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente e quindi addizionata con una soluzione di 1-idrossi-benzotriazolo (1,57 g; 11,6 mmoli) in tetraidrofuran anidro (60 ml) e, in successione, con N-metil-morfolina (1,4 ml; 12,8 mmoli) e N-(3-dimetilamminopropil)-N-etilcarbodiimmide cloruro (2,45 g; 12,8 mmoli), quindi la miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per due

giorni, quindi è stata concentrata sotto vuoto e il residuo ripreso con acetato di etile, lavato con acido citrico al 5%, cloruro di sodio al 5%, bicarbonato di sodio al 5% e infine con una soluzione satura di cloruro di sodio. La fase organica è stata anidrificata e concentrata ed il residuo sgranato con etere etilico ed etere di petrolio, infine portato a secco sotto vuoto a temperatura ambiente.

Si sono ottenuti 6,21 g di [(1S)-(1-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)fenilsulfanil-metil]-carbamoil)-2-feniletil)]carbammato di t-butile (resa: 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,44-7,05 (m, 16H, Ar, *NH-CH-CH-OH e *NH-CH-S); 5,98-5,69 (broad, 1H, CH-S); 5,25-5,19 (m, 1H, NH*-CH-CH-OH); 4,91-1,12 (broad, 1H, NH-COO); 4,45-4,27 (m, 2H, *CH-OH e t-bu-NH-*CH-CH₂); 3,12-2,63 (m, 4H, 2*CH₂-Ar); 1,29 e 1,35 (2s, 9H, t-bu).

Massa: 562 [M+H]

Esempio 6

Preparazione di (2S)-2-ammino-N-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)-fenilsulfanil-metil]-3-fenil-propionammide

Ad una sospensione di [(1S)-(1-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)fenilsulfanil-metil]-carbamoil)-2-feniletil)]carbammato di t-butile (6,68 g; 11,89 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 5, in acetato di etile (70 ml) si è aggiunto HCl in acetato di etile (30 ml). La miscela è stata addizionata con 5 ml di metanolo, lasciata sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente, quindi concentrata sotto vuoto. Il residuo risultante è stato ripreso con acqua (200 ml) e portato a pH acido con qualche goccia di HCl 1N. Le impurezze precipitate sono state filtrate via, quindi la soluzione è stata basificata (pH=7,5-8) con una soluzione di bicarbonato di sodio al 5%. Il solido precipitato è stato estratto con cloruro di metilene, e la fase organica è stata anidrificata e portata a secco. Il residuo è stato sgranato con etere etili-

co/etere di petrolio, filtrato, lavato con etere di petrolio e seccato sotto vuoto a temperatura ambiente.

Si sono ottenuti 4,05 g di (2S)-2-ammino-N-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)-fenilsulfanil-metil]-3-fenil-propionammide (resa: 85,6%).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,45-8,20 (broad, 1H, CO-NH); 7,50-7,08 (m, 15H, Ar e CO-NH); 6,10-5,82 (m, 1H, CHS); 5,35-5,19 (m, 1H, CO-NH-*CH-CH); 3,57-3,50 (m, 1H, *CH-NH₂); 3,20-2,45 (m, 4H, 2*CH₂-Ar).

Massa (iniezione a flusso liquido): 576 (M + H)⁺.

Esempio 7

Preparazione di [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile (Composto 1)

Ad una sospensione di (2S)-2-ammino-N-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)-fenilsulfanil-metil]-3-fenil-propionammide (3 g; 6,5 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 6, in 30 ml di cloruro di metilene, sotto agitazione, sono stati aggiunti, in successione, tetraidrofurano anidro (30 ml), una soluzione trietilammina (0,9 ml; 6,5 mmoli) in cloruro di metilene (5 ml) e una soluzione di carbonato 2,5-diosso-pirrolidin-1-ile e (3S)-tetraidrofuran-3-ile (1,9 g; 6,5 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 2, in cloruro di metilene (15 ml). La miscela è stata posta sotto agitazione per una notte, concentrata sotto vuoto, ed il residuo ripreso con acetato di etile ed una soluzione acquosa di cloruro di sodio al 20%. Il solido risultante è stato filtrato e lavato con acetato di etile ed acqua. La fase organica è stata separata, lavata 3 volte con una soluzione acquosa di cloruro di sodio al 20%, alternata da acido citrico al 5% prima e bicarbonato di sodio al 5% poi. Quindi si è proceduto ad anidrificare e concentrare dal che si è ottenuto un residuo che è stato sgranato con una miscela di etere etilico ed etere di petrolio, quindi seccato sotto vuoto a

temperatura ambiente.

Si sono ottenuti 2,9 g di [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]fenil-sulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,89-8,28 (m, 2H, CH-CO-*NH-CH-CO-*NH); 7,54-7,1 (m, 15H, Ar e *NH-CH-CH₂-Ph); 6,20 e 6,01 (2d, 1H, CHS); 5,22-4,84 (m, 3H, *CH-NH, OH e CH-O-CO); 4,45-4,23 (m, 2H, *CH-OH e *CH-CH₂-Ph); 3,75-2,38 (m, 8H, 2*CH₂-O, *CH₂-Ph e *CH₂-CH-OH); 2,14-1,68 (m, 2H, O-CH₂-*CH₂-CH-O-CO).

Massa (iniezione a flusso liquido): 576 (M + H)⁺.

Esempio 8

Separazione degli isomeri di [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]-fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile

1. [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil]fenil-sulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile (1,7 g) sciolto in una miscela di cloruro di metilene e metanolo è stato caricato su una colonna di gel di silice eluendo con cloruro di metilene/metanolo 95:5 (cromatografia flash). Gli eluati contenenti l'isomero che eluisce per primo sono stati tirati a secco ed il residuo formatosi è stato sgranato con una miscela di etere etilico/etere di petrolio, filtrato, lavato con la stessa miscela e seccato sotto vuoto.

Si sono ottenuti 0,53 g di [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]-fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile isomero A (Composto 1A)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,66 (d, 1H, J_{HH}=8,6 Hz, *NH-CHS); 8,31 (d, 1H, J_{HH}=8,4 Hz, *NH-CH-CH); 7,55-7,05 (m, 15H, Ar e *NH-COO); 6,01 (d, 1H, CHS); 5,21-4,83 (m, 3H, NH-*CH-CH-OH e CH₂-*CH-CH₂); 4,46-

4,40 (m, 1H, *CH-OH); 4,33-4,21 (m, 1H, *CH-CH₂-Ar); 3,78-2,62 (m, 8H, 2*CH₂-Ar e *CH₂-O-*CH₂); 2,15-1,74 (m, 2H, CH-*CH₂-CH₂-S).

Massa (iniezione a flusso liquido) : 576 (M + H)⁺.

HPLC: 98,7%

2. Procedendo analogamente al punto 1., e raccogliendo l'isomero a più lenta eluizione si sono ottenuti 0,61 g di di [1-(1S)-{[[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]-fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetra-idro-3-furanile isomero B (Composto 1B)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,87 (d, 1H, J_{HH}=9,2 Hz, *NH-CHS); 8,57 (d, 1H, J_{HH}=8,6 Hz, *NH-CH-CH); 7,54-7,08 (m, 15H, Ar e *NH-COO); 6,20(d, 1H, CHS); 5,21-5,14 (m, 2H, NH-*CH-CH-OH); 4,95-4,90 (m, 2H, CH₂-*CH-CH₂); 4,46-4,40 (m, 1H, *CH-OH); 4,36-4,25 (m, 1H, *CH-CH₂-Ar); 3,76-2,37 (m, 8H, 2*CH₂-Ar e *CH₂-O-*CH₂); 2,11-1,68 (m, 2H, CH-*CH₂-CH₂-S).

Massa (iniezione a flusso liquido) : 576 (M + H)⁺.

HPLC: 97,1%

Esempio 9

Preparazione e separazione degli isomeri di [1-(1S)-{[[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]-fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di 1,1-diosso-tetraidro-1λ⁶-tiofen-3-ile (Composto 2)

Ad una sospensione di (2S)-2-ammino-N-[(2-idrossi-indan-1-ilcarbamoil)-fenil-sulfanil-metil]-3-fenil-propionammide (400 mg; 0,866 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 6, in 4 ml di cloruro di metilene e 1,5 ml di tetraidrofurano anidro si è aggiunta piridina (74 µl; 0,91 mmoli) in cloruro di metilene (1 ml) e quindi vi si è gocciolata una soluzione di carbonato di 2,5-diosso-pirrolidin-1-ile e (3S)-1,1-diosso-tetraidro-1λ⁶-tiofen-3-ile (0,252 g; 0,91 mmoli), preparato come

descritto in Bioorg. & Med. Chem. Letters, 1995, 5, 2891-2896, in cloruro di metilene (3 ml). La soluzione risultante è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per due giorni, quindi concentrata ed il residuo ripreso con acetato di etile acquoso. Il solido formatosi è stato filtrato via e la fase organica è stata lavata, in sequenza, con acido citrico al 5% (2 volte), una soluzione di cloruro di sodio al 20% (2 volte), una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio al 5% (1 volta) e acqua (2 volte), quindi è stata concentrata sotto vuoto e il residuo riunito al solido precedentemente filtrato. La purificazione e la contemporanea separazione degli isomeri sono state effettuate per cromatografia flash (eluente: acetato di etile/etere di petrolio 80:20).

1. Le frazioni alte tirate a secco hanno fornito un solido che è stato sgranato in etere etilico, il solido è stato filtrato, lavato con etere etilico e seccato a dare 200 mg di isomero A (Composto 2A) (resa: 37%)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6 + \text{DCI}$) δ (ppm): 8,74 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8,8$ Hz, $^*\text{NH-CH-S}$); 8,30 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8,6$ Hz, $^*\text{NH-CH-CH}$); 7,68 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8,8$ Hz, O-CO-N); 7,55-7,05 (m, 14H, Ar); 6,02 (d, 1H, CHS); 5,23-5,09 (m, 2H, $\text{CH-}^*\text{CH-N}$, CH-O-CO); 4,46-4,40 (m, 1H, $^*\text{CH-OH}$); 4,31-4,24 (m, 1H, $^*\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$); 3,40-2,64 (m, 8H, $2^*\text{CH}_2\text{-SO}_2$, $^*\text{CH-Ph}$ e $^*\text{CH}_2\text{-CH-OH}$); 2,45-2,10 (m, 2H, $\text{S-CH}_2\text{-}^*\text{CH}_2\text{-CH-O-CO}$).

Massa (iniezione a flusso liquido) : 624 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

HPLC: 96,2%

TLC (acetato di etile/etere di petrolio 80:20): $R_f=0,44$

TLC (cloruro di metilene/metanolo 95:5): $R_f=0,48$

2. Procedendo come per il punto 1 sulle frazioni basse si sono ottenuti 165 mg di isomero B (Composto 2B) (resa: 30,5%).

- 17 -

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6 + \text{DCI}$) δ (ppm): 8,94 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=9,1$ Hz, $^*\text{NH-CH-S}$); 8,56 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8,6$ Hz, $^*\text{NH-CH-CH}$); 7,60 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8,8$ Hz, O-CO-N); 7,54-7,08 (m, 14H, Ar); 6,21 (d, 1H, CHS); 5,21-5,08 (m, 2H, $\text{CH-}^*\text{CH-N}$, CH-O-CO); 4,45-4,40 (m, 1H, $^*\text{CH-OH}$); 4,34-4,27 (m, 1H, $^*\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$); 3,36-2,67 (m, 8H, $2^*\text{CH}_2\text{-SO}_2$, $^*\text{CH-Ph}$ e $^*\text{CH}_2\text{-CH-OH}$); 2,42-2,03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}^*\text{CH}_2\text{-CH-O-CO}$).

Massa (iniezione a flusso liquido) : 624 (M + H) $^+$.

HPLC: 97,8%

TLC (acetato di etile/etere di petrolio 80:20): $R_f=0,3$

TLC (cloruro di metilene/metanolo 95:5): $R_f=0,37$

Esempio 10

Preparazione di (2-fenil-(1S)-1-[[fenilsulfanil-((1S,2R)-2-trimetilsilanilossi-indan-1-il-carbamoil)-metil]-carbamoil]}etil)-carbammato di (3S)-tetraidrofuran-3-ile

(Composto 3)

Ad una sospensione di [1-(1S)-{[(1S,2R)-2-idrossi-indan-1-il carbamoil]fenilsulfanil-metil]-carbamoil}-2-feniletil]carbammato di (3S)-tetraidro-3-furanile (0,575 g; 1 mmole), preparato come descritto nell'esempio 7, in 10 ml di cloruro di metilene sotto agitazione sono stati aggiunti 5 ml di tetraidrofurano anidro e, in atmosfera di azoto, vi si è gocciolata una soluzione di trimetil-silil-isocianato al 98% (0,141 g; 1,2 mmoli) in 5 ml di cloruro di metilene. Dopo una notte sotto agitazione a temperatura ambiente, vi si sono aggiunti 0,6 ml di trietilammina e 0,3 ml di trimetil-silil-isocianato. La sospensione è stata scaldata in un bagno d'acqua e lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per due giorni, in atmosfera di azoto. Dopo diluizione con cloruro di metilene, la fase organica è stata lavata, in sequenza, con una soluzione di cloruro di sodio al 20%, acido citrico al 5%, una soluzione di

cloruro di sodio al 20%, una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio al 5% e una soluzione di cloruro di sodio al 20% fino a pH neutro, quindi è stata concentrata sotto vuoto e il residuo è stato purificato per cromatografia flash (eluente cloruro di metilene/metanolo 95:5).

Si sono ottenuti 0,3 g di (2-fenil-(1S)-1-{[fenilsulfanil-((1S,2R)-2-trimetilsilanilos-si-indan-1-il carbamoil)-metil]-carbamoil}etil)-carbammato di (3S)-tetraidrofuran-3-ile (Composto 3) (Resa: 46,4%).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,78-8,35 (m, 2H, CH-CO-*NH-CH-CO-*NH); 7,52-7,08 (m, 15H, Ar e *NH-CH-CH₂-Ph); 6,13 e 6,04 (m, 1H, CHS); 5,24-4,79 (m, 2H, *CH-NH, e CH-O-CO); 4,62-4,20 (m, 2H, *CH-OSi e *CH-CH₂-Ph); 3,78-2,35 (m, 8H, 2*CH₂-O, *CH₂-Ph e *CH₂-CH-OSi); 2,14-1,67 (m, 2H, O-CH₂-*CH₂-CH-O-CO).

Massa (iniezione a flusso liquido) : 648 (M + H)⁺.

Esempio 11

Preparazione di [(2S)-2-ammino-3-fenil-propionilammino]-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile

Ad una soluzione di (2S)-2-(t-butossicarbonilammino-3-fenil-propionilammino)-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile (8,8 g; 15,66 mmoli), preparato come descritto nell'esempio 3, in 50 ml di etere etilico anidro, sotto agitazione magnetica, si aggiungono 50 ml di etere etilico contenente HCl e la miscela di reazione viene lasciata a sè per due giorni. Quindi si porta a secco, si riprende con esano, si sgrana e si filtra lavando con esano.

Si sono così ottenuto 7,2 g di [(2S)-2-ammino-3-fenil-propionilammino]-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile che è stato usato come tale nella fase successiva.

Esempio 12

Preparazione di acido [(2S)-2-ammino-3-fenil-propionilammino]-fenilsulfanil-acetico
(Composto di riferimento)

Ad una soluzione di [(2S)-2-ammino-3-fenil-propionilammino]-fenilsulfanil-acetato di 2,2,2-tricloroetile (0,5 g; 1 mmole), preparato come descritto nell'esempio 11, in 20 ml di etanolo, si gocciolano 20 ml di idrossido di sodio 0,1N (2 mmoli), mantenendo la temperatura tra 0 e 5°C. La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a circa 10°C per una notte. Si aggiunge acqua e la fase acquosa viene acidificata con acido cloridrico, quindi si concentra, ed il residuo viene ripreso per 2 volte con acetonitrile e concentrato sotto vuoto.

Si ottengono così 0,43 g di acido [(2S)-2-ammino-3-fenil-propionilammino]-fenilsulfanil-acetico.

¹H-NMR (200 MHz, DCl 1N) δ (ppm): 7,67-7,34 (m, 10H, Ar); 5,95 e 5,73 (2s, 1H, CHS); 4,48-4,41 (m, H, CH-CON); 3,31-3,05 (m, 2H, CH₂).

Esempio 13

Saggio di valutazione dell'affinità per l'enzima HIV-1 aspartil-proteasi

La miscela di incubazione era composta da 0,5 µg/campione di HIV-1 aspartil proteasi (Bachem AG, Svizzera; in tampone sodio acetato 0,1M, pH 5,5 + 10% (v/v) glicerolo + 5% (v/v) etilenglicole), 10µg/campione di HIV proteasi substrato III (H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-p-nitro-Phe-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂ della Bachem), dal composto in esame a varie concentrazioni e da un tampone di reazione (Sodio acetato 50mM pH 4,9 + cloruro di sodio 200mM + ditiotreitolo 5mM + glicerolo al 10% v/v) quanto basta ad un volume finale di 125 µl.

La reazione è stata condotta per 20 minuti a 37°C e bloccata per aggiunta di 10 µl di acido trifluoroacetico al 10%.

L'idrolisi del substrato è stata valutata per HPLC in fase inversa usando una colon-

na C18 per proteine e peptidi (Vydac, cat. 218TP54). I prodotti sono stati eluiti con un gradiente lineare 10-60% di acetonitrile + 0,1% di acido trifluoroacetico in acqua, ad un flusso di 1 ml/min per un tempo di 15 minuti. La lunghezza d'onda utilizzata era di 220 nm.

L'idrolisi del substrato III avviene tra i residui Leu e p-nitro-Phe, generando due picchi che eluiscono prima del substrato.

L'affinità dei composti dell'invenzione viene espressa come concentrazione in grado di inibire del 50% l'idrolisi del substrato (IC_{50}). I risultati sono esposti nella successiva tabella.

Tabella 1

Composto	IC_{50} μ M
1A	32
1B	>60
1	49
riferimento	>50

Esempio 14

Saggio di valutazione del rilascio di tiofenolo

La miscela di reazione era composta da HIV-1 aspartil proteasi (0,5 μ g/campione), da un composto dell'invenzione (alla concentrazione standard di 50 μ M) e da tampone di reazione quanto basta a volume finale di 125 μ l.

La reazione è stata condotta in provette ermeticamente chiuse per 120 minuti a 37°C e bloccata per aggiunta di 85 μ l di acetonitrile.

La liberazione di tiofenolo è stata valutata in HPLC usando una colonna Nucleosil C18 (Macherey Nahel) ed eluendo con acido fosforico allo 0,2% p/v acetonitrile

40:60 ad un flusso di 1,2 ml/min. La lunghezza d'onda alla quale il tiofenolo è stato valutato è di 238 nm.

I risultati sono esposti nella successiva tabella 2.

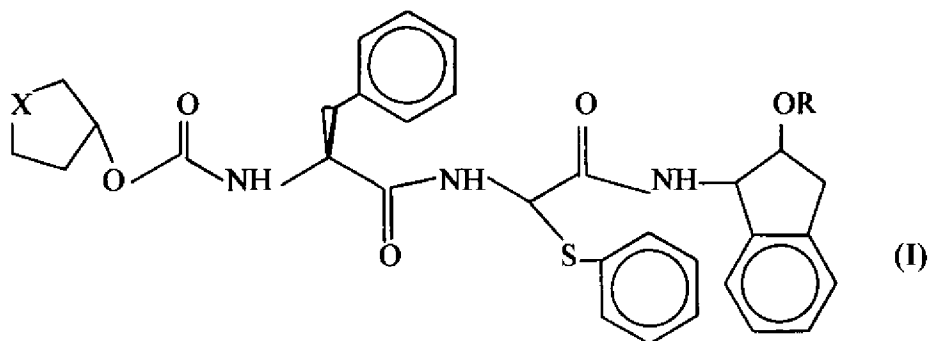
Tabella 2

Composto	Tiofenolo rilasciato (ng/ml)
1A	218
1	446
2A	180
3	470
riferimento	<50

Gli esperimenti di cui sopra mostrano come i composti dell'invenzione siano in grado di interagire con la HIV aspartil-proteasi e di liberare tiofenolo a seguito di tale interazione.

Rivendicazioni

1. Un composto di formula I



dove X è un atomo di ossigeno oppure un gruppo SO_2 ; e

R_1 è un atomo di idrogeno oppure un gruppo sostituito della funzione idrossilica.

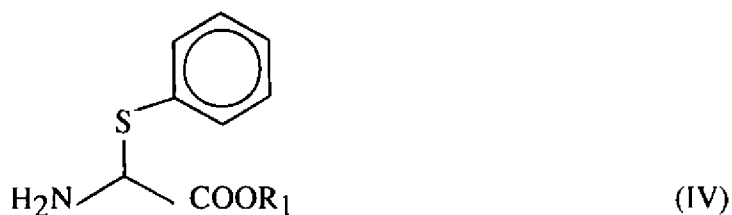
2. Un composto secondo la rivendicazione 1 dove R_1 è un atomo di idrogeno oppure un gruppo trimetilsilile.

3. Una composizione farmaceutica contenente un quantitativo terapeuticamente efficace di un composto secondo la rivendicazione 1 in miscela con un adatto veicolante.

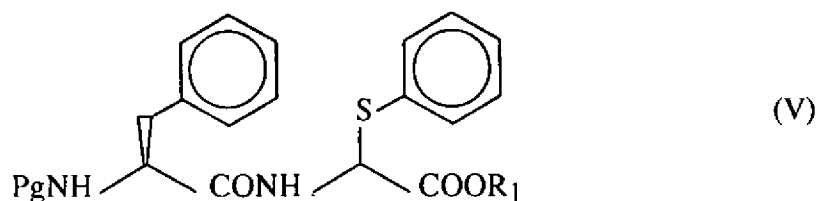
4. Processo per la preparazione di un composto secondo la rivendicazione 1 in cui la L-fenil-alanina viene fatta reagire con un opportuno agente acilante, facoltativamente in presenza di una base organica a dare un composto di formula III



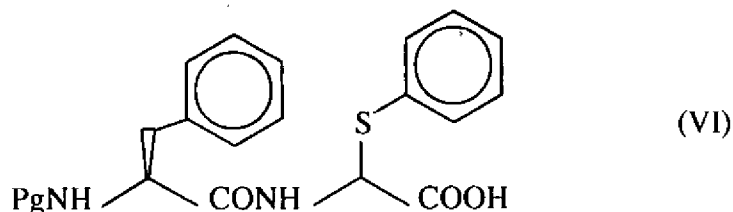
dove Pg è un gruppo protettivo per la funzione amminica, che a sua volta viene condensato con un composto di formula IV



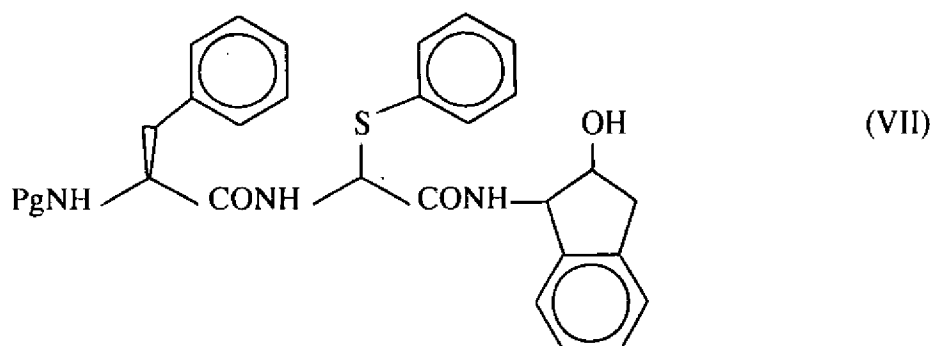
dove R_1 è un gruppo alchilico inferiore oppure un gruppo $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$, in presenza di un agente, e dicicloesilcarbodiimide a dare il composto di formula V



dove Pg è come sopra definito e R_1 è un gruppo alchilico inferiore o un gruppo CH_2CCl_3 , che sottoposto ad idrolisi in presenza di una base forte fornisce un composto di formula VI

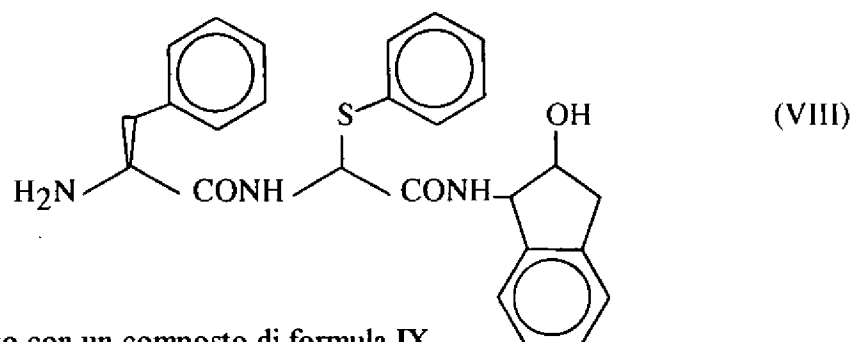


dove Pg è come sopra definito, che a sua volta viene condensato con cis-1-ammino-2-indanolo, in presenza di 1-idrossibenzotriazolo, dicicloesilcarbodiimide o N-(3-dimetilamminopropil)-N-etilcarbodiimide cloruro/N-metilmorfolina, a dare un composto di formula VII

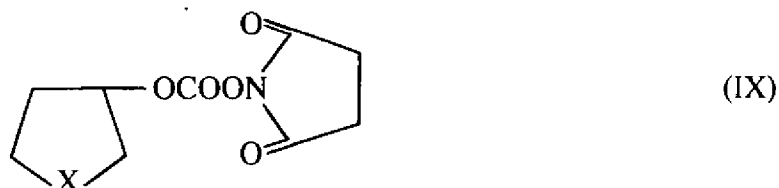


dove Pg è come sopra definito, che per idrolisi in presenza di un acido forte, fornisce un composto di formula VIII

- 24 -



che condensato con un composto di formula IX



dove X è come definito nella formula I, in presenza di basi, porta ad un composto di formula I dove R è H, e, nel caso, venendo ad essere tale composto protetto opportunamente sulla funzione R.

5. Inibitore suicida in grado di rilasciare un tiofenolo come agente citocida utile nel trattamento delle infezioni dovute ad HIV.

Alessandra Longoni

N. iscriz. Albo 492 BM

